



Title	Dad1はインテグリンのN型糖鎖修飾を制御することで細胞接着障害性心筋細胞死を抑制する
Author(s)	森, 翔太
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101939
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和 6 年度 博士学位論文

**Dad1 はインテグリンの N 型糖鎖修飾を制御する
ことで細胞接着障害性心筋細胞死を抑制する**

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻
臨床薬効解析学分野

森 翔太

目次

略号一覧	3
緒論	4
方法	6
結果	12
考察	32
結論	35
参考文献	36
謝辞	40

略号一覧

本文中には以下の略号を使用した。

cDNA complementary DNA 相補的 DNA

Dad1 defender against cell death 1

DAMPs damage-associated molecular patterns ダメージ関連分子パターン

DMEM Dulbecco's modified eagle medium ダルベッコ改変イーグル培地

FAK focal adhesion kinase 接着斑キナーゼ

FBS fetal bovine serum ウシ胎児血清

GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

グリセラルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

GRP78 78 kDa glucose-regulated protein

mRNA messenger RNA 伝令 RNA

NRCM neonatal rat cardiomyocytes 新生仔ラット心筋細胞

PBS phosphate-buffered saline リン酸緩衝生理食塩水

qRT-PCR quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

SDS sodium dodecyl sulfate ドデシル硫酸ナトリウム

siRNA small interfering RNA 低分子干渉 RNA

Stt3A staurosporine and temperature sensitive 3A

Stt3B staurosporine and temperature sensitive 3B

TBS Tris buffered saline トリス緩衝食塩水

OST oligosaccharyltransferase オリゴ糖転移酵素

緒論

心不全 (heart failure) は「なんらかの心臓機能障害、すなわち、心臓に器質的および/あるいは機能的異常が生じて心ポンプ機能の代償機転が破綻した結果、呼吸困難・倦怠感や浮腫が出現し、それに伴い運動耐容能が低下する臨床症候群」と定義される病態であり[1]、世界中で推定 2600 万人に影響を与えるとされる国際的公衆衛生問題である[2, 3]。日本においても心疾患は悪性新生物に次ぎ死因の第 2 位を占めており、特に心不全は心疾患の内訳の中で最も死亡数が多いとされている[4]。現在の臨床現場では、心不全治療法としてアンジオテンシン変換酵素阻害薬や β 遮断薬などを用いた薬物療法が広く実施されている[1]。また近年では、SGLT2 (sodium/glucose cotransporter 2) 阻害薬をはじめとする新規心不全治療薬の導入が積極的に推奨されるようになり[5]、心不全患者の予後改善が期待されている。一方で、心不全患者数は今後も増加し続けることが予測されることから[3, 6]、心不全に対する更なる課題解決が急務とされている。

心筋細胞は生後間もなく増殖能を失うため[7]、心筋梗塞などにより心筋細胞死が惹起されると心筋細胞はほとんど再生せず心不全へと発展する。よって、心筋細胞死の抑制は新規心不全治療戦略になりうると考えられる。その一方で、心筋細胞死の抑制を標的とする心不全治療薬は未だ存在しないことから、新たな心筋細胞死抑制因子の探索が求められる。

細胞死はアポトーシス (apoptosis) に代表されるプログラム細胞死 (programmed cell death) と、非プログラム細胞死であるネクローシス (necrosis) に大別され[8]、アポトーシスとネクローシスはともに心不全発症に大きく寄与していることが知られている[9]。近年では、ネクロプトーシス (necroptosis)、パイロプトーシス (pyroptosis)、フェロトーシス (ferroptosis) といった非アポトーシス性のプログラム細胞死も新たに発見されており[8]、心筋細胞の恒常性や心不全病態への関連性が報告がされている[10–12]。一方で、これらの心筋細胞死を媒介するシグナル伝達機構や分子メカニズムは非常に複雑で不明な点も多いことから、心筋細胞死の機序解明は心不全の病態解明に重要であるといえる。

本研究では心筋細胞死を抑制する遺伝子を探索するため、健常なマウスの心臓を用いた cDNA マイクロアレイのデータベースから、心臓で高発現し、他の細胞でアポトーシスを抑制することが報告がされている遺伝子を抽出した。抽出した複数の遺伝子について、培養心筋細胞に siRNA を導入し心筋細胞死を評価した結果、Dad1 が心筋細胞死を抑制することを見出した。

Dad1 は小胞体においてタンパク質の N 型糖鎖修飾を行う酵素であるオリゴ糖転移酵素 (oligosaccharyltransferase: OST) 複合体を構成する重要なサブユニットであることが知られ

ており、OST 複合体の安定化に重要な役割を担っているとされる[13][14]。糖鎖修飾は真核生物において最も一般的なタンパク質の翻訳後修飾の 1 つであり、ヒトにおいては N 型、11 種類の O 型、C 型、GPI アンカー型の合計 14 種類の糖鎖修飾が存在する。これらの糖鎖修飾はそれぞれ異なる種類の糖転移酵素によって特異的に触媒され、中でも N 型糖鎖修飾を担う酵素として OST 複合体が知られている[15]。また、OST 複合体には触媒サブユニットとして Stt3A を含むものと Stt3B を含むものの 2 種類が存在し、特に Stt3A を含む OST 複合体は翻訳と同時に N 型糖鎖修飾を行う機能を有し、一方で Stt3B を含む OST 複合体は Stt3A による修飾を受けなかった部位を翻訳後にグリコシル化する機能を有している[14][15]。しかしながら、Dad1 の細胞死抑制メカニズムや細胞死に関連する Dad1 と OST 複合体との関係性については未だ明らかにされていない。

N 型糖鎖修飾の対象となる代表的なタンパク質として細胞接着タンパク質が挙げられる。細胞接着と細胞死との関連性についてはこれまでに数多くの研究が行われており、特に細胞と細胞外マトリックスとの接着障害により誘導されるアポトーシスはアノイキス (anoikis) と呼ばれている[16]。アノイキスを調節する経路は細胞によって異なるが、主に細胞-基底膜間の接着に関わるインテグリンや、接着に応答して活性化される非受容体型チロシンキナーゼである FAK が関与しているとされる[17]。しかしながら、Dad1 が細胞接着やアノイキスに関わるといった報告は他の細胞を含めても未だ存在しない。

そこで本研究では、Dad1 が細胞接着タンパク質の N 型糖鎖修飾を介してアノイキスを抑制しているという仮説を立て、Dad1 の心筋細胞死抑制機序の解明を実施した。

方法

実験動物の取り扱い

動物実験は大阪大学薬学研究科動物委員会の承認のもと施行した。実験動物の取り扱いは大阪大学薬学研究科動物実験指針に基づいて行った。

組換え DNA の取り扱い

組換え DNA の取り扱いは、大阪大学遺伝子組換え実験実施規則に基づいて行った。

試薬

本実験で用いた試薬を Table 1 に示す。H₂O₂、tunicamycin、Z-VAD-FMK は DMEM 中に添加した。adhesamine は心筋細胞の播種直前にプレート上に添加した。フィブロネクチンコートは、培養プレートに fibronectin を添加し、室温で 45 分間風乾した後、PBS で洗浄し心筋細胞を播種した。IV型コラーゲンコートでは、プレートに 10 µg/mL の collagen type IV を添加し、室温で 30 分間静置した後、PBS で洗浄し心筋細胞を播種した。

Table 1. The reagents used in this study

Target Name	Concentration	Manufacturer	Stimulate time
H ₂ O ₂	3 µg/mL	Nacalai Tesque	48 h
tunicamycin	0.1 µg/mL	Sigma-Aldrich	48 h
Z-VAD-FMK	100 µM	Selleck Biotech	96 h
		BD Biosciences	
adhesamine	50 µg/mL	NAGASE	96 h
fibronectin	5 µg/cm ²	Sigma-Aldrich	96 h
collagen type IV	10 µg/mL	Nippi	96 h

新生仔ラット心筋細胞 (NRCM) の単離・培養

1~2 日齢の新生仔 Wistar ラット（紀和実験動物研究所）から心室を単離し、細片に 3~4 等分に切断した後、PBS で洗浄した。0.1% trypsin (Thermo Fisher Scientific) と 0.1% collagenase type IV (Sigma-Aldrich) を含む digestion solution (0.953% HEPES、1.52% NaCl、0.045% KCl、0.031% NaH₂PO₄ H₂O、0.144% glucose、0.00023% phenol red、pH 7.6) 合計 33 mL を、1 回に

つき約 2.5 mL 加え 37 °C、140 min⁻¹ で 3 分振盪させ、上清を 50 mL の DMEM (Thermo Fisher Scientific) 中に溶解させる操作を組織が無くなるまで繰り返した。4 °C、1000 rpm、5 分で遠心後、上清を取り除き、10 mL の DMEM で懸濁した後、100 µm のセルストレーナーで不純物を除いた細胞を 10 cm カルチャーディッシュ (Iwaki) で 80 分間インキュベートした。ディッシュに付着していない細胞を心筋細胞 (NRCM) として回収した。単離した NRCM は 4 °C、1000 rpm、5 分で遠心後、上清を取り除き、10% FBS (Thermo Fisher Scientific) と 0.1 mM bromodeoxyuridine (Thermo Fisher Scientific) を含む DMEM 中で懸濁し、1.0×10⁶ cells/mL または 5.0×10⁵ cells/mL の細胞濃度で 6、12、24、96 well カルチャープレート (TrueLine) に播種した。NRCM は 10% FBS 含有 DMEM で 48 時間培養した後、FBS 無添加 DMEM で 48 時間培養し、実験に用いた。

siRNA トランスフェクション

siRNA トランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いた。Opti-MEM I Reduced Serum Media (Thermo Fisher Scientific) 中に 2% Lipofectamine RNAiMAX と添加した溶液と、Opti-MEM I Reduced Serum Media 中に siRNA を添加した溶液を同量混合し、室温で 20 分間静置した。NRCM を培養プレートに播種する直前に、上記の混合液と 10% FBS 含有 DMEM 中の NRCM を 1:4 の容量比で混合した。MISSION siRNA Universal Negative Control #1 (Sigma-Aldrich) を control siRNA (siCtrl) として用いた。全ての siRNA は Sigma-Aldrich から購入した。本実験で使用した siRNA の配列を Table2 に示す。

Table 2. The sequences of siRNAs used in this study

Name	Direction	Sequence
Ctrl		Proprietary sequence
Dad1 #1	Sense	5'-rCURCrCrArCrArGUrGrCrGrCrGUrCURGUTT-3'
	antisense	5'-rArCrArGrArCrGrCrArCURGUrGrGrArGTT-3'
Dad1 #2	Sense	5'-UUrCUUrGrArGrCURGrGrCrArGrCUUTT-3'
	antisense	5'-rArArGrCURGrCrCrArGrCURCrArArGrArATT-3'
Stt3A #1	Sense	5'-rGUrAUrAUUUrCURCrGrAUrCURGUrATT-3'
	antisense	5'-UrArCrArGrAUrCrGrArGrArAUrAUrArCTT-3'
Stt3A #2	Sense	5'-rGrArAUrGrArCURArCURAUrArCURCrCrATT-3'
	antisense	5'-UrGrGrArGUrAUrArGUrArGUrCrAUUrCTT-3'

ウエスタンブロッティング

タンパク質の回収は以下の手順で実施した。NRCM (1.0×10⁶ cells/mL または 5.0×10⁵ cells/mL) を PBS で 2 回洗浄後、1×SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl、10% glycerol、2% SDS、0.001% bromophenol blue、6% 2-mercaptoethanol、1% protease inhibitor cocktail、0.1% dithiothreitol、1 mM Na₃VO₄、1% NaF、pH 6.8) に溶解し、95 °Cで 5 分間タンパク質を変性させた。培養液中のタンパク質は培養液と 2×SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl、20% glycerol、4% SDS、0.002% bromophenol blue、12% 2-mercaptoethanol、2% protease inhibitor cocktail、0.2% dithiothreitol、2 mM Na₃VO₄、2% NaF、pH 6.8) を等量混合し、95°Cで 5 分間タンパク質を変性させることで得た。

タンパク質の脱 N-グリコシル化は PNGase F (New England Biolabs) を用いて行った。9 μL の 1×SDS sample buffer と 1 μL の 10×glycoprotein denaturing buffer (5% SDS、0.4 M dithiothreitol) 中のタンパク質を合わせ、100 °Cで 10 分間変性させた。2 μL の 10×glycobuffer 2 (0.5 M sodium phosphate、pH 7.5)、2 μL の 10% NP-40、6 μL の H₂O と混合した後、タンパク質溶液を 500 U の PNGase F と混合し、37 °Cで 1 時間インキュベートした。その後ウエスタンブロッティングにより脱 N-グリコシル化を評価した。

得られたタンパク質は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分子量ごとに分離した後、polyvinylidene fluoride membrane (Merck Millipore) に転写した。転写後のメンブレンを 2% skim milk または 2% bovine serum albumin で 1 時間ブロッキングし、一次抗体を 4°C over night もしくは室温 3 時間で静置した。0.05% tween 20 含有 TBS で 3 回洗浄後、標識二次抗体と室温で 90 分静置した。その後、0.05% tween 20 含有 TBS で 2 回洗浄した後、tween 20 非含有 TBS で 1 回洗浄した。化学発光試薬として、Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque) または ECL Western Blotting Substrate (Promega) を用いた。定量分析には、ImageQuant LAS 4010 (GE Healthcare) を用いてプロット画像を撮影し、ImageJ software Ver.1.51j8 (National Institutes of Health) を用いてバンド強度を定量した。内因性コントロールとして GAPDH を使用した。本実験で使用した抗体を Table 3 に示す。

ストリッピングは以下の手順で実施した。撮影後のメンブレンを 0.05% tween 20 含有 TBS で 3 回洗浄後、0.7% 2-mercaptoethanol を含む stripping buffer (2% SDS、7.57% Tris、pH 6.7) 中で 50 °C、30 分、40 min⁻¹ で振盪した。0.05% tween 20 含有 TBS で 3 回洗浄後、上記と同様の方法でブロッキング以降の操作を行うことで抗体を反応させ、撮影を行った。

Table 3. Antibodies used in this study

Target Name	Dilution	Manufacturer	Cat.
GAPDH	1:1000	Millipore	MAB374
Dad1	1:500	Abcam	ab173220
cleaved caspase3	1:250-1:500	Cell Signaling Technology	9664
caspase3	1:1000	Cell Signaling Technology	9662
GRP78	1:250	BD Transduction Laboratories	610978
integrin β 1	1:1000	Abcam	ab183666
integrin α 1	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-271034
integrin α 5	1:1000	Abcam	ab226816
phospho-FAK	1:500	Cell Signaling Technology	3283
FAK	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-558
	1:500	Cell Signaling Technology	3285
paxillin	1:1000	Cell Signaling Technology	2542
Stt3A	1:250	Atlas Antibody	HPA030735

Cell viability assay

細胞生存率は CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega) を用いて測定した。96 well プレートで培養した NRCM (1.0×10^6 cells/mL) に CellTiter-Blue Reagent を $20 \mu\text{L}$ 添加し、遮光条件で 3 時間インキュベートした。SpectraMAX M5e (Molecular Devices) を用いて蛍光産物の強度を励起波長 560 nm 及び蛍光波長 590 nm で測定し、蛍光強度から細胞生存率を推定した。

蛍光免疫染色

24 ウエルプレートに 12 mm のガラスを敷き、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の laminin (Thermo Fisher Scientific) を $400 \mu\text{L}$ 加えた。37°Cで 2 時間以上インキュベートした後、PBS で 2 回洗浄し、NRCM を播種した。コートしたガラスカバー上に培養した NRCM (5.0×10^5 cells/mL) を PBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde in PBS で 15 分間固定した。0.2% triton in PBS で 2 分間膜透過処理した後、3% bovine serum albumin in PBS で 30 分間ブロッキングした。心筋細胞の観察には、一次抗体として sarcomeric α -actinin 抗体 (1:400、Sigma-Aldrich、Cat. A7811) または cardiac troponin I 抗体 (1:400、abcam、Cat. ab56357) を用い、Alexa Fluor 546 標識二次抗体

(1:400、Invitrogen、Cat. A11030) または Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (1:400、Invitrogen、Cat. A11055) をそれぞれ用いた。核は DAPI (1:200, Nacalai Tesque) で染色した。蛍光顕微鏡 (BZ-X700 ; KEYENCE) を用いて細胞画像を得た。細胞表面積は ImageJ software Ver.1.51j8 (National Institutes of Health) を用いて定量した。

アポトーシス活性測定

96 ウェルプレートに培養した NRCM (1.0×10^6 cells/mL) を $5 \mu\text{M}$ NucView 488 Caspase-3 Substrates (Biotium) とともに 30 分間インキュベートした。生細胞内で cleaved caspase 3 によって切断された蛍光緑色基質を、蛍光顕微鏡 (BZ-X700 ; KEYENCE) を使用して観察した。

qRT-PCR

RNA の回収は以下の手順で実施した。NRCM (1.0×10^6 cells/mL) を PBS で 2 回洗浄後、 $500 \mu\text{L}$ の QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) を添加した。 $100 \mu\text{L}$ の chloroform を加えてボルテックスした後、 4°C 、15000 rpm、15 分遠心分離し上清を回収した。上清と等量の isopropanol を加え、 4°C 、15000 rpm、20 分遠心分離し上清を除去した後、 $500 \mu\text{L}$ の 70% ethanol を加えて再度 4°C 、15000 rpm、5 分遠心分離し上清を除去することで RNA を得た。得られた RNA は $11 \mu\text{L}$ の 0.1% diethylpyrocarbonate 処理水に溶解した。

cDNA は 100 units の ReverTra Ace (TOYOBO)、 $0.25 \mu\text{g}$ の oligo dT primer (Invitrogen)、 4 nmol の dNTP を用いて $1 \mu\text{g}$ の RNA を逆転写することで合成した。

得られた cDNA 溶液から $2 \mu\text{L}$ または $4 \mu\text{L}$ を取り、 $10 \mu\text{L}$ の Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) と 5 pmol のプライマーを用い $20 \mu\text{L}$ の溶液を作製し、StepOneReal-Time PCR System (Applied Biosystems)によるリアルタイム PCR により mRNA 発現量を測定した。内因性コントロールとして GAPDH を使用した。本実験で使用したプライマーの配列を table 4 に示す。

Table 4. Primer sequences used in this study

Name	Species	Direction	Sequence
GAPDH	Mouse/Rat	Forward	5'-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'
		Reverse	5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'
Stt3A	Rat	Forward	5'-AGGCAGTGAAGACTGGTTCC-3'
		Reverse	5'-TGAGCATTAGCACCAAGGACG-3'

cDNA マイクロアレイ

ホモジエナイズした C57BL/6 マウスの心臓から QIAzol Lysis Reagent を使用して上記と同じ方法で RNA を回収し、逆転写により RNA から cDNA を合成した。マイクロアレイ分析は Affymetrix ソフトウェア (Mouse Gene 1.0 ST Array) を使用して実施した。

統計解析

データは平均±標準偏差 (SD) で示した。ウエスタンブロッティングと qRT-PCR は、生物学的に独立したサンプルを使用して実施し、他の実験においては生物学的反復性を各図の凡例中に示した。2 群間の比較は Welch の t 検定を行った。多重比較は一元配置分散分析 (ANOVA) による Tukey-Kramer 検定を使用した。統計的有意性は $P < 0.05$ (両側) とした。統計解析には Statcel Ver. 3 (ISBN978-4-434-15413-3 ; OMS 出版) を使用した。

結果

Dad1 の発現抑制は心筋細胞のアポトーシスを誘導する。

新規細胞死抑制遺伝子の探索を行うため、当研究室で過去に実施した C57BL/6 マウスの健常な心臓を用いた cDNA マイクロアレイのデータベースを再解析した。Gene Ontology 解析において anti-apoptosis の term を有する遺伝子を選択し、心臓での発現量が多い順に候補遺伝子を抽出した (Table 5)。その後、心臓での報告が少ない遺伝子である Tpt1、Ciapin1、Birc6、Dad1 の 4 種類に関して、NRCM に siRNA をトランスフェクションすることで順次ノックダウンを行い、心筋細胞死を誘導するかを確認した。Cell viability assay の結果より、Dad1 の発現抑制が心筋細胞死を誘導することが明らかになった (Figure 1A–1C)。一方で、その他の 3 遺伝子に関しても同様の検討を行ったが、siRNA によるノックダウンによって心筋細胞死は誘導されなかった (data not shown)。

Dad1 は他の細胞においてアポトーシスを抑制することが報告されていることから[18–22]、Dad1 の発現抑制が caspase3 を活性化するかどうかを検証した。その結果、Dad1 発現抑制により活性化型である cleaved caspase3 の発現が増加した (Figure 1D)。また、ネクローシスやバイロプトーシスなどの細胞死は DAMPs の放出を伴う一方、アポトーシスは DAMPs の放出を伴わない細胞死であるとされる[8]。そこで、Dad1 発現抑制により培養液中に DAMPs が放出されるかを確認するため、培養液中の DAMPs として GAPDH の量を測定したが、Dad1 発現抑制により GAPDH の増加は見られなかった (Figure 1E)。したがって、Dad1 発現抑制により誘導される細胞死はアポトーシスであり、ネクローシスやバイロプトーシスのような DAMPs の放出を伴う細胞死ではないことが明らかになった。

Dad1 はショウジョウバエにおいて小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制することが報告されている[20]。そこで、小胞体ストレスが Dad1 ノックダウン誘導性アポトーシスの原因であるかどうかを検証した。その結果、主要な小胞体ストレスマーカーとして知られる GRP78 [23][24]の発現は Dad1 発現抑制によって増加しなかった (Figure 1F)。したがって、Dad1 発現抑制により誘導されるアポトーシスは小胞体ストレスによるものではないことが示唆された。

Table 5. The expression level of cell death-related genes

Gene Symbol	Name	Signal Intensity
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	12.66384
Tpt1	tumor protein, translationally-controlled 1	12.66348
Eef1a2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	12.14191
Dad1	defender against cell death 1	11.39131
Sod1	superoxide dismutase 1, soluble	11.31529
Cav1	caveolin 1, caveolae protein	11.237
Bag3	BCL2-associated athanogene 3	10.69732
Serbp1	serpine1 mRNA binding protein 1	10.67319
Clu	clusterin	10.66915
Prdx2	peroxiredoxin 2	10.62653
Dusp1	dual specificity phosphatase 1	10.60869
Hspd1	heat shock protein 1 (chaperonin)	10.52478
Pik3r1	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	10.49684
Akt1	thymoma viral proto-oncogene 1	10.46997
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	10.16187
Vegfa	vascular endothelial growth factor A	10.06685
Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	9.860845
Cited2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	9.801017
Bag1	BCL2-associated athanogene 1	9.771879
Lrp1	low density lipoprotein receptor-related protein 1	9.651178
Tek	endothelial-specific receptor tyrosine kinase	9.649228
Ciapin1	cytokine induced apoptosis inhibitor 1	9.615762
Ptma	prothymosin alpha	9.555673
Stradb	STE20-related kinase adaptor beta	9.461683
Birc6	baculoviral IAP repeat-containing 6	9.447658
Axl	AXL receptor tyrosine kinase	9.43721
Fn1	fibronectin 1	9.362098
Pgap2	post-GPI attachment to proteins 2	9.343326
Pik3ca	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	9.338035
Gsk3b	glycogen synthase kinase 3 beta	9.271261

The expression level of each gene was determined from signal intensity of cDNA Microarray analysis using total RNA isolated from the homogenized C57BL/6 murine hearts. Thirty anti-

apoptotic genes that were most highly expressed in the hearts and representative data of their signal intensity were shown. As a reference, the signal intensity of GAPDH showed 13.74002.

(主論文[45]より引用)

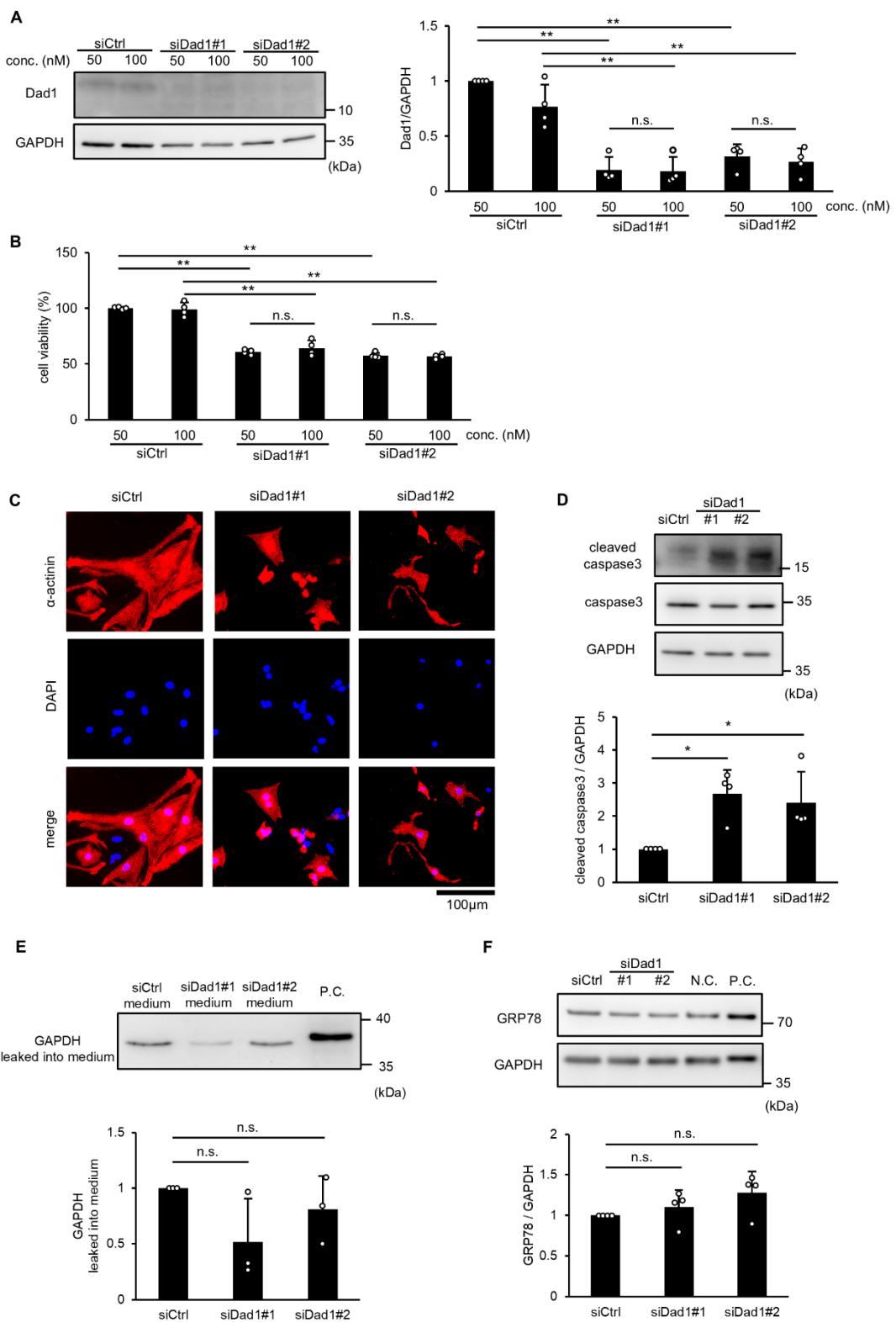


Figure 1. Suppression of Dad1 induced cardiomyocyte apoptosis independent of endoplasmic reticulum stress.

(A, B) NRCMs were transfected with siCtrl, siDad1#1 or siDad1#2 at the indicated concentrations for 96 h. (A) Dad1 protein expression was evaluated by immunoblotting (n = 4). GAPDH was used as an internal control. Left panel: representative images. Right panel: quantitative data. Band intensity was measured and normalized to that of GAPDH. (B) Cell viability was measured and normalized to that of siCtrl-treated cells. Representative results are shown (n=4), and the experiments were independently repeated four times with similar results. (C–F) NRCMs were transfected with siCtrl, siDad1#1 or siDad1#2 at 50 nM for 96 h. (C) Immunofluorescence microscopy was performed using an anti-sarcomeric α -actinin antibody. DAPI staining was performed to identify the nuclei. Representative images are shown. The experiments were independently repeated four times, and similar results were obtained. Notably, the cardiomyocytes treated with siRNA for Dad1 shrank and showed condensed nuclei. (D) Expression of cleaved caspase3 was estimated using immunoblotting analysis (n = 4). GAPDH was used as an internal control. The upper panel shows representative images. The lower panel shows quantitative data. The band intensity was quantified as described above. (E) Proteins were extracted from the culture media. Immunoblotting analysis was performed using an anti-GAPDH antibody as an indicator of cytosolic protein leakage (n = 3). The upper panel shows a representative image and the lower panel shows the quantitative data. Culture media from NRCMs treated with 3 μ g/mL H₂O₂ for 48 h were used as the positive control (P.C.). (F) Expression of GRP78 was evaluated by immunoblotting analysis (n = 4). GAPDH was used as an internal control. Upper panel: representative images. Lower panel: quantitative data. The band intensity was measured and normalized to that of GAPDH. Non-treated NRCMs were used as the negative control (N.C.), and NRCMs treated with tunicamycin for 48 h were used as the positive control (P.C.). Data are shown as the mean \pm SD. *P < 0.05, **P < 0.01 by one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer test. n.s., not significant.

(主論文[45]より引用改変)

Dad1 の発現抑制は筋原線維形成の損失と細胞面積の低下の形態変化を示す。

Dad1 発現抑制が心筋細胞の表現型に与える影響を明らかにするため、蛍光免疫染色を用いて心筋細胞の形態を観察した。その結果、Dad1 発現抑制により筋原線維形成 (myofibrillogenesis) の損失と細胞面積の低下が確認された (Figure 2A、2B)。Dad1 発現抑制による筋原線維形成損失がカスパーゼ切斷によるものかどうかを明らかにするために、カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK [25]で筋原線維形成損失が改善するかを検証した。Z-VAD-FMK がカスパーゼ活性を阻害できていることは、カスパーゼにより切斷され蛍光を発するカスパーゼ基質である NucView 488 Caspase-3 Substrates 由来の蛍光が、Z-VAD-FMK によって減少することから確認した (Figure 2C)。しかしながら、Z-VAD-FMK は Dad1 発現抑制による筋原線維形成損失を改善しなかった (Figure 2D)。したがって、Dad1 発現抑制はカスパーゼ活性とは無関係に心筋細胞の形態を変化させることが示唆された。一方で、integrin $\beta 1$ を欠損させた心筋細胞は同様の筋原線維形成損失の表現型を示すことから[26]、次に Dad1 と細胞接着との関係に着目した。

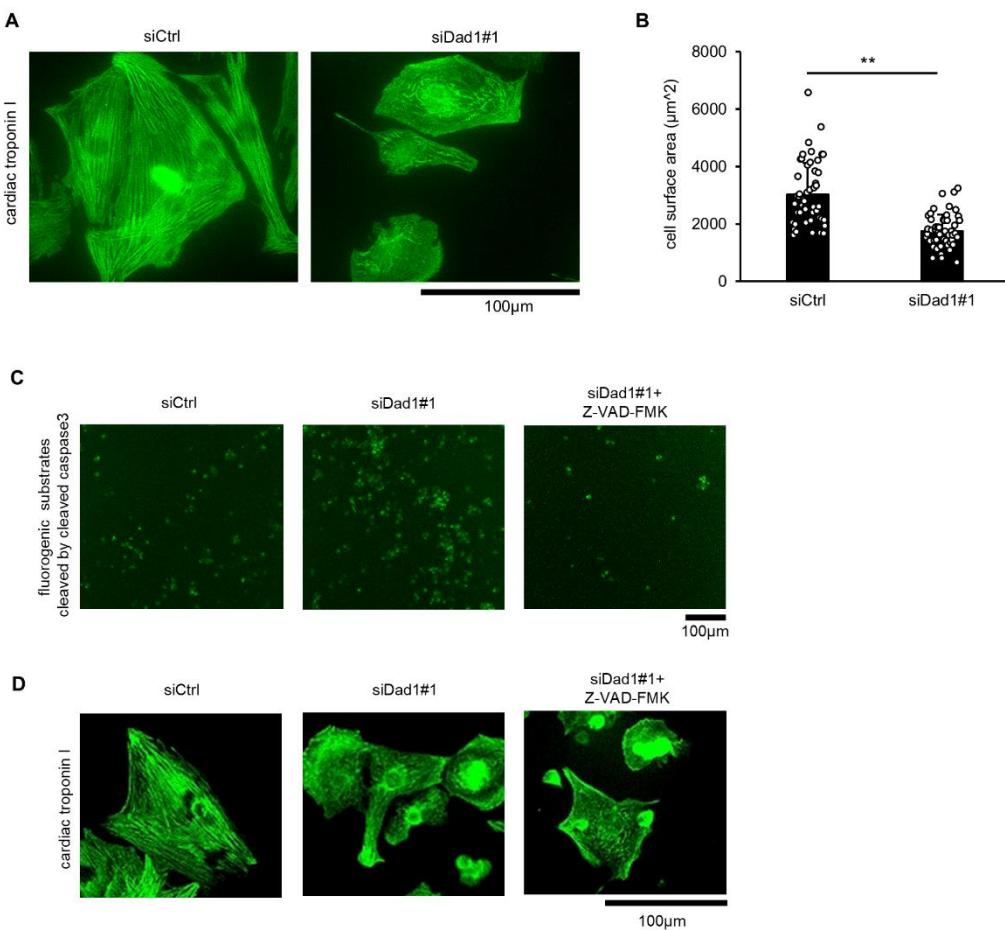


Figure 2. Dad1 knockdown reduced cell surface area with impaired myofibrillogenesis.

(A, B) NRCMs were transfected with 50 nM siCtrl or siDad1#1 for 96 h. (A) Immunofluorescence microscopy was performed using an anti-cardiac troponin I antibody (green). Representative images are shown, and the experiments were independently repeated three times with similar results. (B) Cell surface area of NRCMs stained with an anti-cardiac troponin I antibody was measured ($n = 50$). The experiments were independently repeated three times, and similar results were obtained. (C, D) NRCMs were transfected with 50 nM siCtrl or siDad1#1 in the presence or absence of 100 μM Z-VAD-FMK for 96 h. (C) Apoptotic cells were detected by the fluorescence of the enzymatic product from NucView 488 caspase-3 substrates in NRCMs (green). Representative images are shown, and the experiments were repeated three times with similar results. (D) Immunofluorescence microscopy was performed using anti-cardiac troponin I antibody (green). Representative images are shown, and the experiments were repeated three times with similar results. Data are shown as the mean \pm SD. * P < 0.05 , ** $P < 0.01$ by Welch's t-test.

(主論文[45]より引用改変)

Dad1 はインテグリンの N 型糖鎖修飾を調節し、その発現を制御する。

N 型糖鎖修飾は細胞接着タンパク質の重要な翻訳後修飾である[27]。Dad1 発現抑制時の心筋細胞は integrin $\beta 1$ 欠損心筋細胞と同様の表現型を示したため、細胞と基底膜間の接着を担うインテグリンの発現に対する Dad1 の影響を調べた。インテグリンは α サブユニットと β サブユニットの 2 量体を形成しており、心筋細胞では integrin $\alpha 1\beta 1$ 、integrin $\alpha 5\beta 1$ 、integrin $\alpha 7\beta 1$ が高度に発現している[28]。これらのインテグリン サブユニットのうち、integrin $\alpha 7$ は 生直後の心筋細胞では発現量が少ないため[29]、integrin $\beta 1$ 、integrin $\alpha 1$ 、integrin $\alpha 5$ の発現を評価した。その結果、Dad1 発現抑制により、integrin $\beta 1$ の分子量の低下が観察された。そこで、siCtrl の心筋細胞で観察された分子量の integrin $\beta 1$ を mature integrin $\beta 1$ とみなし、その発現量を定量化した結果、Dad1 発現抑制は mature integrin $\beta 1$ の発現を減少させた。また、脱 N グリコシル化酵素である PNGase F[30]で処理すると、integrin $\beta 1$ の分子量の低下が解消された (Figure 3A)。PNGase F 処理により N 型糖鎖を失った integrin $\beta 1$ の分子量は siCtrl 群と siDad1 群間で同一であることを踏まえると、PNGase F 未処理時の integrin $\beta 1$ の分子量の違いは、修飾された N 型糖鎖数の違いに由来するものであるといえる。また、PNGase F 未処理の siDad1 群においては integrin $\beta 1$ のバンドサイズが大きく広がっていることから、Dad1 の発現抑制により生じる不完全な integrin $\beta 1$ は、N 型糖鎖数がそれぞれ異なる様々な分子量の integrin $\beta 1$ から構成されていることが分かる。よって、Dad1 が integrin $\beta 1$ の N 型糖鎖修飾に重要な役割を果たしていることが明らかになった。インテグリンの α サブユニットに関しては、integrin $\alpha 5$ の分子量は Dad1 発現抑制によって低下したが、integrin $\alpha 1$ の分子量は低下しなかった (Figure 3B、3C)。これらのインテグリンの分子量は PNGase F によって著しく変化したことから、integrin $\alpha 1$ と integrin $\alpha 5$ は N 型糖鎖修飾されているが、Dad1 による N 型糖鎖修飾の影響を受けているのは integrin $\alpha 5$ のみであることが明らかになった。このように、Dad1 を含む OST 複合体はインテグリンの N 型糖鎖修飾において特異的かつ幅広い役割を果たしていることが明らかになった。

FAK はインテグリンなどからシグナルを伝達する非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞の増殖、移動、生存などの様々な生物学的プロセスを制御することが知られている[31]。Dad1 発現抑制により、FAK の活性型であるリン酸化 FAK (pFAK) の発現が減少したのに対し、FAK の総レベルは Dad1 ノックダウンによって変化しないことが明らかになった (Figure 3D、3E)。さらに、Dad1 ノックダウンにより、FAK との相互作用を介してインテグリンを介したシグナルを伝達するアダプタータンパク質である paxillin [31]の発現が低下した (Figure 3F)。以上より、Dad1 がインテグリンの N 型糖鎖修飾を調節し、pFAK を介して細胞生存シグナルを伝達することが明らかになった。

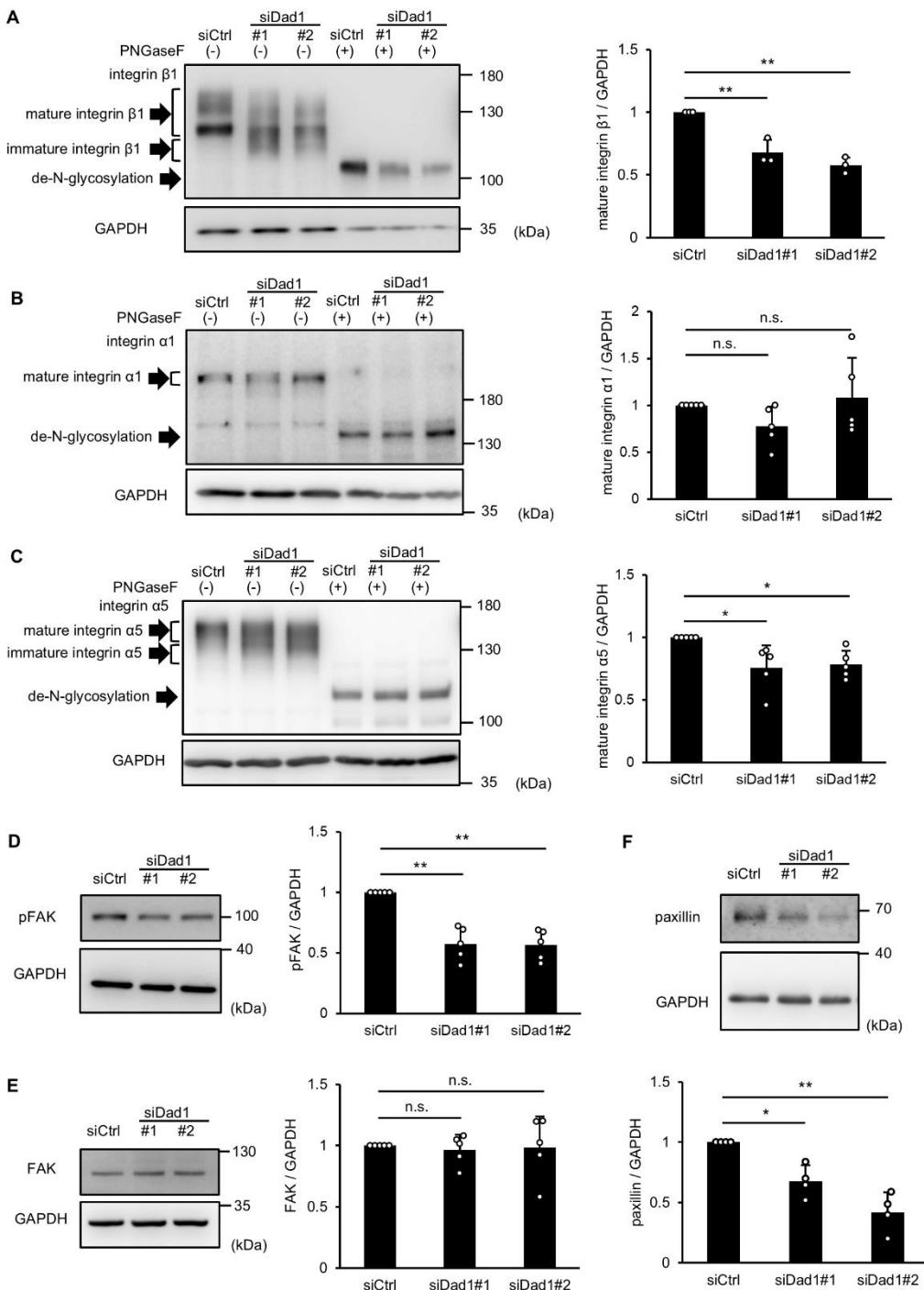


Figure 3. Dad1 knockdown altered the expression of integrin β1 and pFAK.

(A–F) NRCMs were transfected with 50 nM siCtrl or siDad1 for 96 h. Expression of mature integrin β1, mature integrin α1, mature integrin α5, pFAK, FAK, and paxillin was evaluated using immunoblotting analysis (A: n = 3, B: n = 5, C: n = 5, D: n = 5, E: n = 5 F: n=4). GAPDH was used as an internal control. PNGase F was used for de-N-glycosylation of integrin β1, integrin α1, and integrin α5. The band intensities were quantified as aforementioned. The band intensities of integrin

$\beta 1$, integrin $\alpha 1$, and integrin $\alpha 5$ with molecular weight higher than that observed in control siRNA-treated cells were quantified as mature integrin $\beta 1$, mature integrin $\alpha 1$ and mature integrin $\alpha 5$. Data are shown as the mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ using one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test. n.s., not significant.

(主論文[45]より引用)

Dad1 発現抑制による心筋細胞死は細胞接着の強化によって改善する。

Dad1 が細胞と基底膜間の接着を制御し、細胞生存率に影響を与えるかどうかを明らかにするため、細胞接着促進剤である adhesamine [32]を用いて検討を行った。Cell viability assay の結果より、Dad1 発現抑制によって誘導される心筋細胞死は adhesamine によって改善されることが示された (Figure 4A)。ウエスタンプロットティングの結果より、adhesamine が Dad1 発現抑制による cleaved caspase3 および pFAK の発現レベルの変化を改善することが示された (Figure 4B, C)。また、adhesamine は Dad1 の発現に影響を与えたかったことから (Figure 4D)、adhesamine による細胞死の改善は細胞接着の増強によるものであることが示唆された。

上記の結果に加えて、基底膜を構成する主要なタンパク質として fibronectin や collagen type IVがあることから、これらのタンパク質をコーティングした培養プレートを使用して細胞生存率を評価した。その結果、fibronectin や collagen type IVは Dad1 発現抑制によって誘導される心筋細胞死および cleaved caspase3 の発現増加を抑制した (Figure 4E–4H)。

Fibronectin や collagen type IVは siCtrl 群の細胞生存率も上昇させたため、細胞接着の増強による細胞生存の促進以外にも、接着心筋細胞数の増加に伴う細胞間コミュニケーションの変化により細胞生存が促進された可能性が挙げられる。そこで、心筋細胞死が誘導されていない播種 (siRNA 導入) 後 24 時間で接着細胞を増加させるかどうかを調べた。その結果、fibronectin または collagen type IVの有無で接着細胞数に有意な差はみられなかった (Figure 5A, 5B)。さらに、低密度での培養 (5.0×10^5 cells / mL) でも同様の結果が得られたことから (Figure 5C, 5D)、fibronectin や collagen type IVによる細胞死の改善は、細胞播種時の接着心筋細胞数とは関係がないことが明らかになった。

また、collagen type IVによる保護効果が、細胞密度に応じて変化した生存促進細胞間コミュニケーションに由来するものかどうかを更に調べるため、高密度および低密度細胞培養を用いて collagen type IVが caspase3 の活性化に及ぼす影響を調べた。その結果、cleaved caspase3 の発現は、高密度および低密度細胞培養のいずれにおいても同様の挙動を示した (Figure 5E)。したがって、collagen type IVの保護効果は細胞間コミュニケーションの変化によるものではなく、コラーゲンの生物学的活性によるものである可能性が高いことが示唆された。

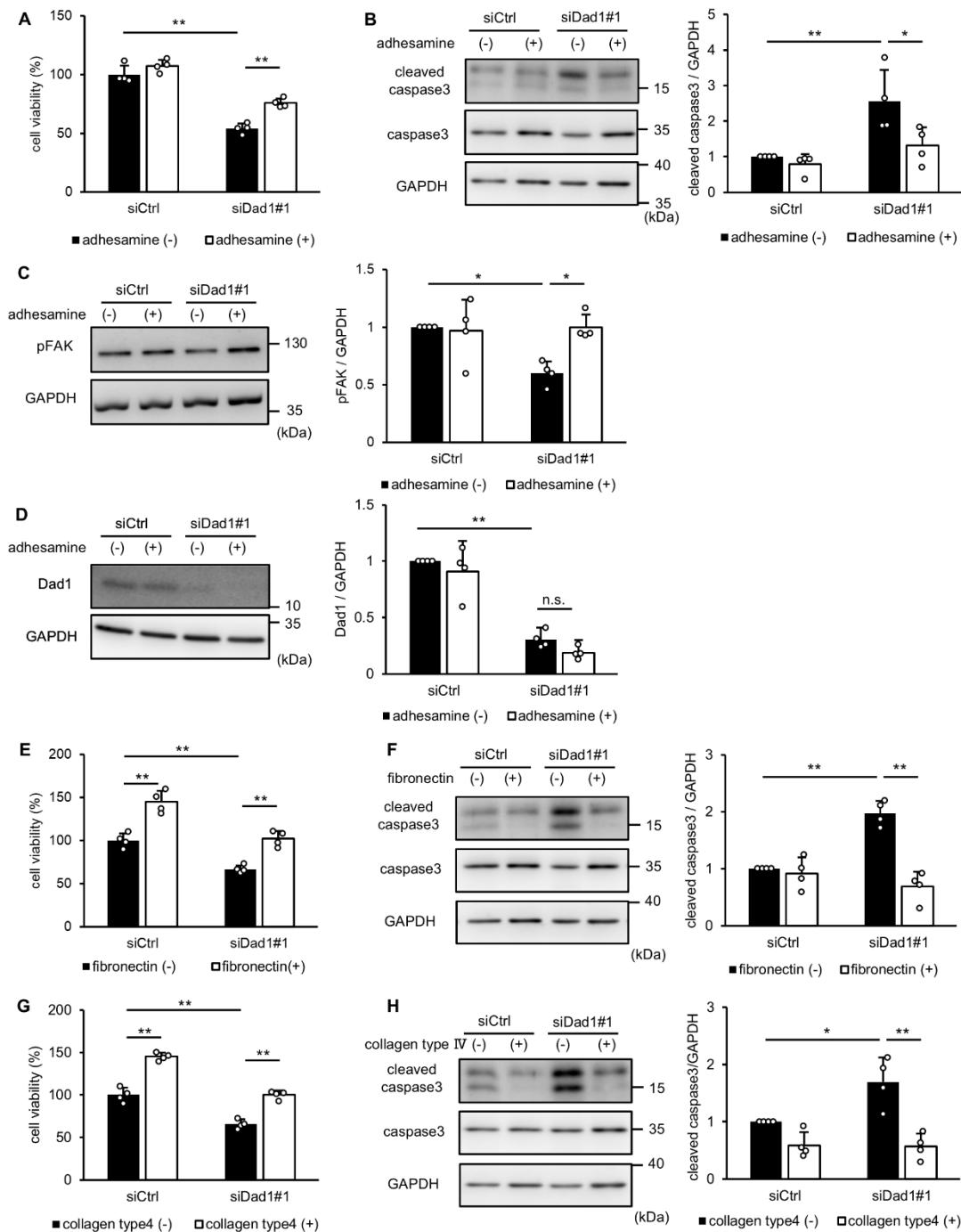


Figure 4. Enhancement of cell-ECM adhesion suppressed cardiomyocyte death by Dad1 knockdown.

NRCMs were transfected with 50 nM siCtrl or siDad1#1 for 96 h. The cell culture plate was treated with 50 μ g/mL adhesamine (A–D), 5 μ g/cm² fibronectin (E, F) or 10 μ g/mL collagen type IV (G, H) before seeding. (A, E, and G) Cell viability was estimated and normalized to that of siCtrl-treated cells in the absence of adhesamine, fibronectin, or collagen type IV. Representative results are shown (n=4).

The experiments were independently repeated four times, and similar results were obtained. (B–D, F, and H) Expression of cleaved caspase3 (B, F, and H), pFAK (C), and Dad1 (D) was evaluated by immunoblotting analysis ($n = 4$). GAPDH was used as an internal control. The left panels show representative images and the right panels show the quantitative data. The band intensity was measured and normalized to that of GAPDH. Data are shown as the mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ using one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer test. n.s., not significant.

(主論文[45]より引用)

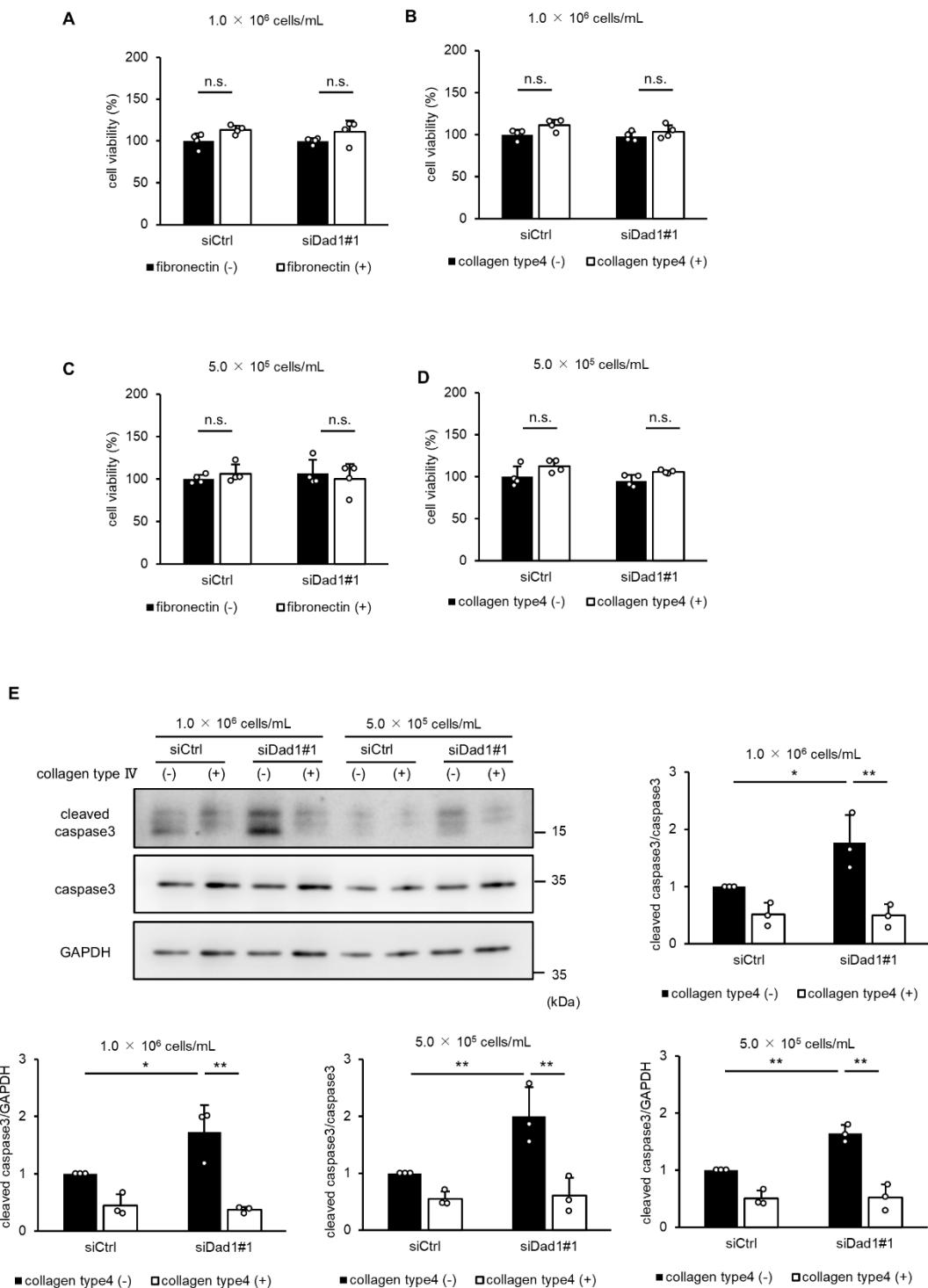


Figure 5. Fibronectin or collagen type IV coating did not increase adhered cell concentration.

(A–D) NRCMs were cultured at high density (1.0×10^6 cells/mL) (A, B) or low density (5.0×10^5 cells/mL) (C, D), and transfected with 50 nM siCtrl or siDad1#1 for 24 h. Cell culture plates were treated with $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin (A, C) or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen type IV (B, D) before seeding. Cell

viability was estimated and normalized to that of the siCtrl-treated cells in the absence of fibronectin or type IV collagen. Representative results are shown (n=4). The experiments were repeated three times with similar results. (E) NRCMs were cultured at high density (1.0×10^6 cells/mL) or low density (5.0×10^5 cells/mL), and transfected with 50 nM siCtrl or siDad1#1 for 96 h. The cell culture plate was treated with 10 μ g/mL collagen type IV before seeding. The expression of cleaved caspase 3 was evaluated by immunoblot analysis (n = 3). GAPDH was used as an internal control. The upper panels show representative images and the lower panels show the quantitative data. The band intensity was measured and normalized to that of caspase3 or GAPDH. Data are shown as the mean \pm SD. * P < 0.05, ** P < 0.01 using one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer test. n.s., not significant.

(主論文[45]より引用改変)

細胞接着の促進はインテグリンの N 型糖鎖修飾を回復させずに Dad1 発現抑制による心筋細胞死を抑制する。

インテグリンの N 型糖鎖修飾は細胞生存を含む様々な生物学的機能に影響を及ぼすことが知られている[33][34]。Dad1 発現抑制がインテグリンの N 型糖鎖修飾に影響を与えたことから、adhesamine、fibronectin、collagen type IVがインテグリンの N 型糖鎖修飾の異常の回復に関与しているかをウエスタンブロッティングによって調べた。その結果、adhesamine、fibronectin、collagen type IVのいずれにおいても、Dad1 発現抑制による integrin $\beta 1$ の N 型糖鎖修飾の異常は改善しなかった (Figure 6)。adhesamine が Dad1 の発現量を変化させずに Dad1 発現抑制による FAK の不活性化を改善させたことを踏まえると、細胞接着の強化はインテグリンの N 型糖鎖修飾異常を改善しないまま細胞・細胞外マトリックス間の解離を抑制した結果、FAK による細胞生存シグナルの活性化の維持が可能となり、Dad1 発現抑制による心筋細胞死を改善させることができた。

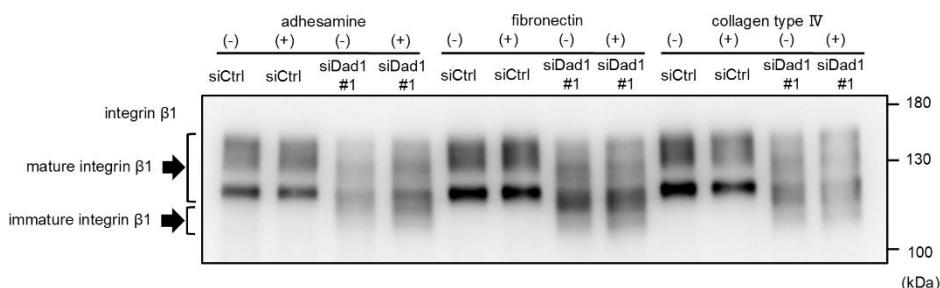


Figure 6. Enhancement of cell adhesion failed to rescue the expression of mature integrin $\beta 1$.

NRCMs, transfected with 50 nM siCtrl or siDad1#1, on the cell culture plates coated with adhesamine (50 μ g/mL), fibronectin (5 μ g/cm 2), or collagen type IV (10 μ g/mL) for 96 h. Immunoblot analysis was performed using an anti-integrin $\beta 1$ antibody. A representative image is shown.

(主論文[45]より引用)

Dad1 は Stt3A と相互依存的に心筋細胞死を抑制する。

Dad1 は OST 複合体のサブユニットの 1 つであるが、触媒活性は有さないことが知られている[14]。Dad1 発現抑制が N 型糖鎖修飾を制御するメカニズムを調べるために、OST の触媒サブユニットである Stt3A の発現に対する Dad1 の影響を調べた。その結果、Dad1 発現抑制によって Stt3A の発現は mRNA レベルでは変化しなかった一方で、タンパク質レベルで減少した (Figure 7A、7B)。

そこで、Stt3A を発現抑制する siRNA を使用し、Stt3A が心筋細胞死を制御するかどうかを検証した。ウエスタンブロッティング、cell viability assay、蛍光免疫染色の結果より、Stt3A の発現抑制は心筋細胞死を誘導し、cleaved caspase3 の発現を増加させることができた (Figure 7C–7F)。また、Dad1 発現抑制が Stt3A の発現量を減少させるのと同様に、Stt3A 発現抑制によっても Dad1 の発現量が減少することが明らかになった (Figure 7G)。最後に、Dad1 と Stt3A の両者を発現抑制した場合、Dad1 もしくは Stt3A の片方のみの発現抑制時と比較して、細胞生存率のさらなる低下は誘導されなかった (Figure 7H)。以上より、Dad1 と Stt3A は相互依存的に発現を維持し、心筋細胞死を抑制していることが示された。

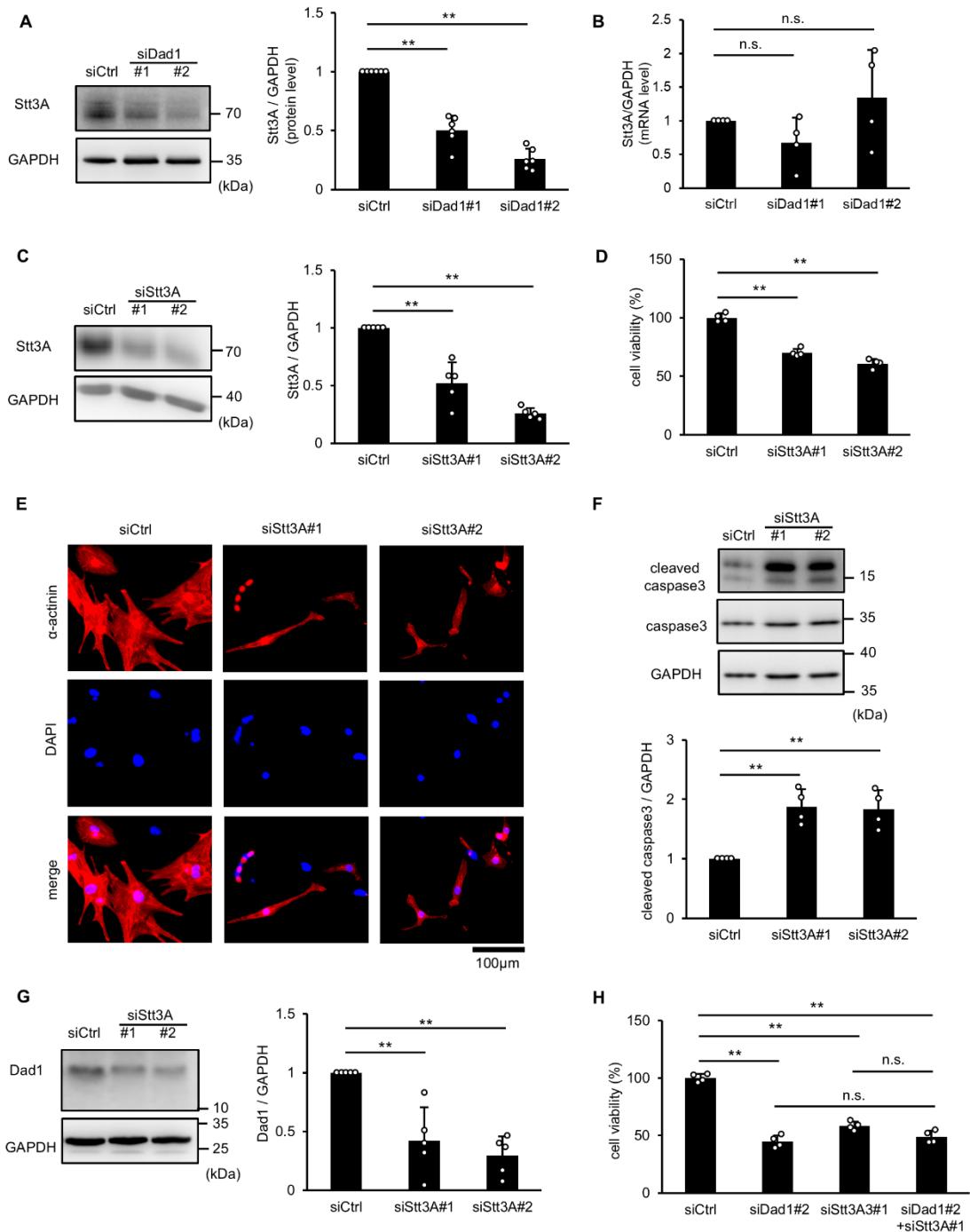


Figure 7. Dad1 suppressed cardiomyocyte death in cooperation with Stt3A.

NRCMs were transfected with 50 nM siCtrl, siDad1 (A, B, and H), and/or siStt3A (C–H) for 96 h. (A, C) Stt3A expression was evaluated by immunoblotting (A, n = 6; C, n = 5). GAPDH was used as an internal control. The left panels show representative images and the right panels show the quantitative data. The band intensity was measured and normalized to that of GAPDH. (B) Stt3A mRNA expression was evaluated by qRT-PCR (n=4). The mRNA expression of Stt3A was normalized to that

of GAPDH. (D, H) Cell viability was estimated and normalized to that of the siCtrl-treated cells. Representative results are shown (n=4). The experiments were independently repeated four times, and similar results were obtained. (E) Immunofluorescence microscopy analysis was performed using an anti-sarcomeric α -actinin antibody. DAPI staining was performed to identify nuclei. Representative images are shown. The experiments were independently repeated four times and similar results were obtained. The cardiomyocytes treated with siRNA against Dad1 shrank and showed condensed nuclei. (F, G) Protein expression of cleaved caspase3 (F) and Dad1 (G) was evaluated by immunoblotting analysis (F: n = 4, G: n = 5). GAPDH was used as an internal control. The band intensities were quantified as described above. (H) Effects of Stt3A knockdown on Dad1 knockdown-induced cell death (n=4). Similar results were obtained in the experiments using siDad1#1 and siStt3A#2. Data are shown as the mean \pm SD. *P < 0.05, **P < 0.01 using one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer test. n.s., not significant.

(主論文[45]より引用)

Stt3A は細胞接着タンパク質の発現を制御する。

Stt3A の細胞死抑制メカニズムが Dad1 と同様であることを確認するため、Stt3A がインテグリンの N型糖鎖修飾と FAK の活性化に影響を及ぼすかを検証した。その結果、Dad1 発現抑制時と同様に、Stt3A 発現抑制によって integrin $\beta 1$ 、integritin $\alpha 5$ 、pFAK の発現が変化したが、総 FAK の発現は変化しなかった (Figure 8A–8D)。したがって、Stt3A は Dad1 と同様に細胞接着タンパク質の発現を制御していることが明らかになった。

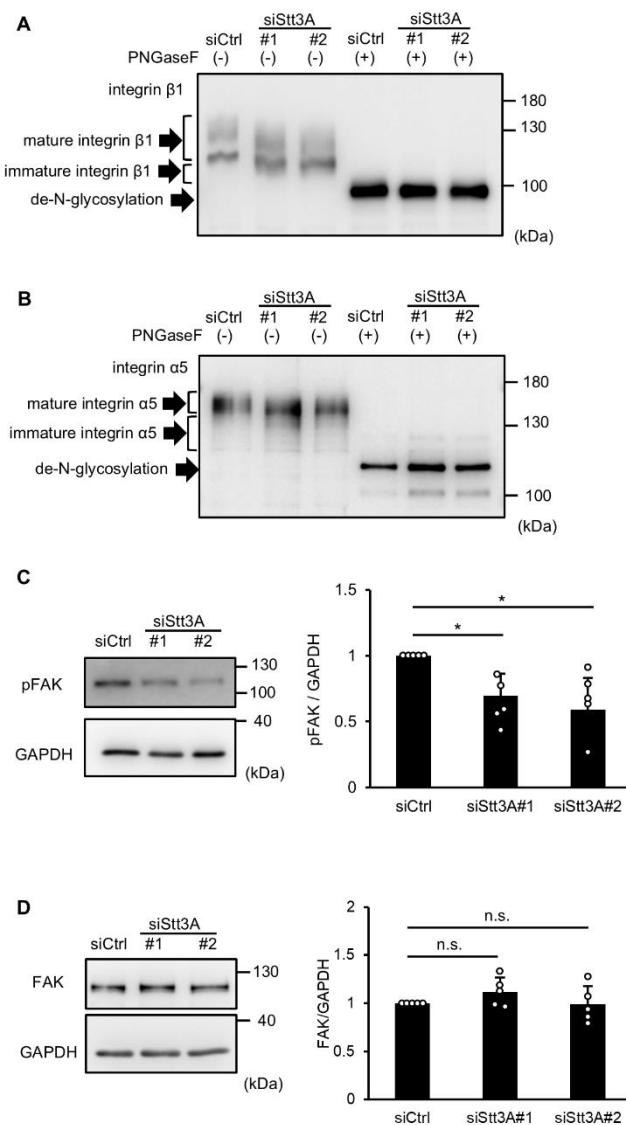


Figure 8. Stt3A regulated the expression of cell adhesion proteins.

NRCMs were transfected with 50 nM siCtrl or siStt3A for 96 h. (A, B) Representative image of immunoblot analysis obtained using an anti-integrin $\beta 1$ antibody and anti-integrin $\alpha 5$ antibody. PNGase F was used for de-N-glycosylation of integrin $\beta 1$ and integrin $\alpha 5$. The experiments were independently repeated three times and similar results were obtained. (C, D) Protein expression levels of pFAK and FAK were evaluated by immunoblot analysis (C: n = 5, D: n=5). GAPDH was used as an internal control. The band intensities were quantified as described above. Data are shown as the mean \pm SD. *P < 0.05, **P < 0.01 using one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer test. n.s., not significant.

(主論文[45]より引用)

考察

本研究では、Dad1 がインテグリンの N 型糖鎖修飾を制御することで心筋細胞の生存維持に寄与することを見出した。cDNA マイクロアレイおよび siRNA によるノックダウン実験から、Dad1 が心筋細胞のアポトーシスを抑制することを発見した。Dad1 発現抑制時の心筋細胞の形態変化から、integrin $\beta 1$ 欠損心筋細胞と同様の表現型である筋原線維形成損失に着目し、細胞接着タンパク質との関連性に着目した。その結果、Dad1 発現抑制はインテグリンの N 型糖鎖修飾の異常、pFAK、paxillin の発現低下を惹起させることが明らかになった。また、adhesamine、fibronectin、collagen type IV による細胞接着の増強は、Dad1 発現抑制による心筋細胞死を抑制した。これらの結果から、Dad1 の損失が細胞接着、すなわちアノイキスを損なうことで細胞死を誘導することを明らかにした。また、Dad1 と Stt3A の相互作用が心筋細胞の生存に不可欠な OST 複合体の構造を維持することを明らかにした。このように、Dad1 は心筋細胞の生存維持に重要な役割を果たすことが明らかになった。

Dad1 は他のいくつかの細胞で細胞死を抑制することが報告されているが[18–22]、その分子メカニズムは不明であった。過去の報告では、tsBN7 細胞で Dad1 機能の喪失が N 型糖鎖修飾の欠陥を引き起こしてアポトーシスを誘導することや[19]、キイロショウジョウバエで Dad1 の抑制が小胞体ストレスを介してアポトーシスを誘導することが示されている[20]。その一方で、本研究では Dad1 発現抑制は小胞体ストレスとは無関係に心筋細胞死を誘導すること、Dad1 の発現抑制が細胞接着タンパク質の N 型糖鎖修飾の異常を介して心筋細胞死を誘導することを明らかにした。Dad1 が細胞接着タンパク質の発現やアノイキスに関連するという報告はこれまでに存在しないことから、Dad1 が N 型糖鎖修飾を介して細胞接着に寄与し心筋細胞死を抑制するというメカニズムは、Dad1/OST 複合体の新たな役割に関する発見であるといえる。

OST 複合体はシークオン (sequon) 配列と呼ばれる Asp-X-Ser もしくは Asp-X-Thr (X は Pro 以外の任意のアミノ酸) 配列の Asp に対して N 型糖鎖修飾を行うことが知られている[14]。一方で、Stt3A を触媒サブユニットとする OST 複合体がポリペプチドに糖鎖の転移を触媒する条件は、糖鎖修飾部位がポリペプチドの伸長領域にあり、小胞体内腔表面から 12 ~ 14 アミノ酸の距離にある場合に限られる[35]。新生ポリペプチドは小胞体内腔に出るとすぐにフォールディングを始めるため、上記の配列を有している場合でもフォールディング構造によっては N 型糖鎖修飾を受けないことがある[35]。本研究では、心筋細胞では integrin $\beta 1$ と integrin $\alpha 5$ が Stt3A を含む OST 複合体による N 型糖鎖修飾を受けていることを明らかにした。integrin $\alpha 1$ も上記の配列を有していることを踏まえると、Dad1 及び Stt3A が制御す

る N 型糖鎖修飾の特異性はタンパク質のフォールディング過程における 3 次元構造の違いに由来するものであると考えられる。また、N 型糖鎖修飾は翻訳後においても Stt3B を触媒サブユニットとする OST 複合体によって転移される[14]。Dad1 の発現抑制によって Stt3B の発現量は低下しなかったことや、Stt3B の発現抑制では心筋細胞死を誘導しなかったことから、Dad1 は Stt3B を触媒サブユニットとする OST 複合体の N 型糖鎖修飾には影響しないと考えられる (data not shown)。よって、integrin $\alpha 1$ が Dad1 非依存的な N 型糖鎖修飾を受ける事を踏まえると、integrin $\alpha 1$ は Stt3B を触媒サブユニットとする OST 複合体により N 型糖鎖修飾を受けている可能性が高いと考えられる。

OST 複合体は、Dad1 と Stt3A を含む複数のサブユニットで構成されている[14]。Stt3A は N 型糖鎖修飾を実行する触媒サブユニットであるが、Dad1 は触媒サブユニットではないため[14]、Dad1 が OST 複合体依存的に細胞生存を促進するかどうかは不明であった。特に、過去の報告では、Dad1 は COS-7 細胞で bcl-2 ファミリータンパク質である Mcl-1 と相互作用することが報告されており[36]、Dad1 が OST 複合体に依存しない独自の役割も持ちうる可能性も予想された。本研究では、Dad1 と Stt3A が mRNA 発現量には影響を与えずにタンパク質レベルでお互いの発現を維持しており、心筋細胞において OST 複合体依存的に心筋細胞死を抑制することを明らかにした。OST 複合体の各構成要素の相互依存性が HeLa 細胞で慎重に調べられており、OST 複合体の安定化には OST48、Dad1、Stt3A もしくは Stt3B が必要であることが示されている[37]。本研究の結果と合わせると、OST 複合体の構成要素のうち OST48、Dad1、Stt3A が OST 複合体の安定化に必須であり、OST 複合体の安定化に由来する各サブユニットのタンパク質発現の維持及び N 型糖鎖修飾機能の維持が心筋細胞の生存性に必要である可能性が高いと考えられる。

細胞接着の障害は心血管疾患と密接に関連している。例えば、心筋細胞特異的 integrin $\beta 1$ ノックアウトマウスは異常な心機能と心不全病態を示すという報告や[38]、integrin $\beta 1$ ヘテロノックアウトマウスは心筋梗塞後にアポトーシスの増加と心筋機能障害を示すという報告が既にされている[39]。FAK に関しても、FAK ノックアウトマウスは生後 9 か月までに左室腔拡張を誘導するという報告があり[40]、これらの報告から、integrin $\beta 1$ /FAK を介した細胞接着の損失が心臓の病理学的状態を引き起こすと結論付けることができる。また、Dad1 ホモノックアウトマウスは異常な N グリコシル化タンパク質を発現し、胚発生時にアポトーシスを誘導することが過去に報告されていることから[41–43]、生体内においても Dad1 は細胞生存維持に必須な因子であると考えられる。

これまでに心筋細胞のアポトーシス抑制を機序とする心不全治療薬として caspase3 阻害剤を用いた治療が提案されてきたが、臨床試験での有効性は確認されていない[44]。Dad1 は

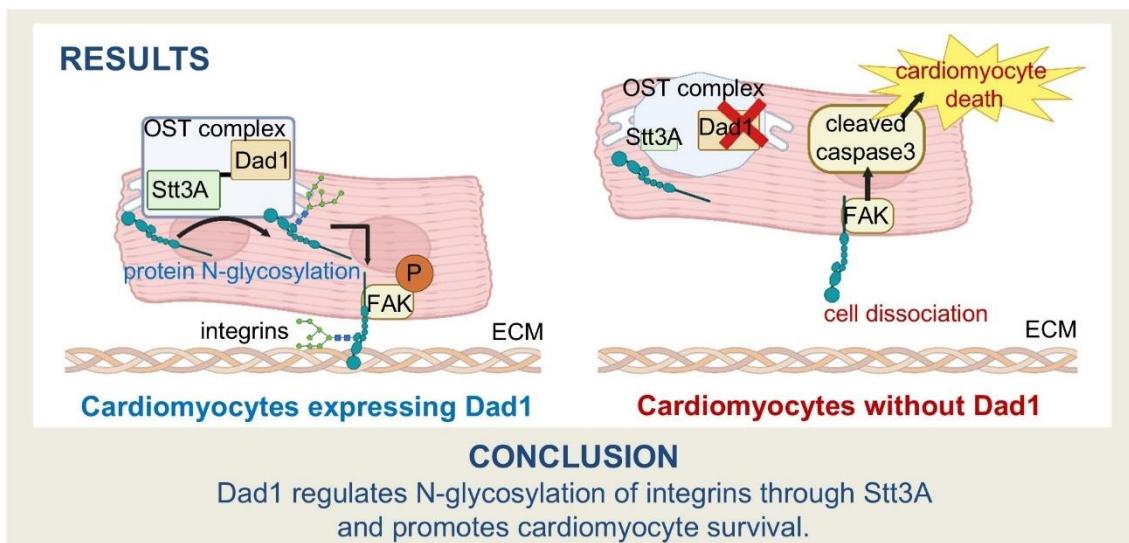
インテグリンのN型糖鎖修飾を制御しアノイキスを抑制するという特殊な機序であるため、Dad1 を標的とする新規治療薬の開発は従来の caspase3 阻害剤と異なる治療効果を示す可能性が期待される。今後、化合物ライブラリー等を用いて Dad1 の発現もしくは OST 複合体の触媒活性を制御する低分子化合物が取得できれば、Dad1 を用いた新規心不全治療薬の開発が実現できる可能性がある。

以上より、N 型糖鎖修飾や細胞接着の障害が心血管疾患に密接に関連していることを踏まえると、Dad1 による心筋細胞死の抑制は新規心不全治療標的となる可能性があると考えられる。

結論

心不全は先進国における主要な死因の1つであり、心不全患者数の増加は必至とされる。本研究では心不全に対する治療戦略として心筋細胞死に焦点を当て、治療標的となりうる新規因子の探索とその分子メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、新規心筋細胞死抑制因子としてDad1を同定した。Dad1がインテグリンのN型糖鎖修飾を制御することで、FAKやpaxillinを介して心筋細胞生存を維持していることを明らかにした。本研究の結果から、Dad1が心筋細胞死の抑制を機序とした心不全治療薬になりうる可能性を見出した。今後の研究により、Dad1による心筋細胞生存性シグナルを標的とする新規心不全治療薬の開発が実現することを期待する。

Cardiomyocyte survival mechanism regulated by Dad1



(主論文[45]より引用)

参考文献

1. 「急性・慢性心不全診療ガイドライン 2017 年改訂版」日本循環器学会/日本心不全学会
2. Ambrosy, A. P., Fonarow, G. C., Butler, J., Chioncel, O., Greene, S. J., Vaduganathan, M., Nodari, S., Lam, C. S. P., Sato, N., Shah, A. N., & Gheorghiade, M. (2014). The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(12), 1123–1133.
3. Shimokawa, H., Miura, M., Nochioka, K., & Sakata, Y. (2015). Heart failure as a general pandemic in Asia. *European journal of heart failure*, 17(9), 884–892.
4. 「令和 5 年(2023)人口動態統計月報年計(概数)の概況」厚生労働省
5. 「2021 年 JCS/JHFS ガイドライン フォーカスアップデート版急性・慢性心不全診療」日本循環器学会/日本心不全学会
6. Ejiri, K., Noriyasu, T., Nakamura, K., & Ito, H. (2019). Unprecedented crisis-Heart failure hospitalizations in current or future Japan. *Journal of cardiology*, 74(5), 426–427.
7. Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S., & Frisén, J. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5923), 98–102.
8. Park, W., Wei, S., Kim, B. S., Kim, B., Bae, S. J., Chae, Y. C., Ryu, D., & Ha, K. T. (2023). Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Experimental & molecular medicine*, 55(8), 1573–1594.
9. Moe, G. W., & Marín-García, J. (2016). Role of cell death in the progression of heart failure. *Heart failure reviews*, 21(2), 157–167.
10. Guo, X., Chen, Y., & Liu, Q. (2022). Necroptosis in heart disease: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 169, 74–83.
11. Chai, R., Xue, W., Shi, S., Zhou, Y., Du, Y., Li, Y., Song, Q., Wu, H., & Hu, Y. (2022). Cardiac Remodeling in Heart Failure: Role of Pyroptosis and Its Therapeutic Implications. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 9, 870924.
12. Yang, X., Kawasaki, N. K., Min, J., Matsui, T., & Wang, F. (2022). Ferroptosis in heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 173, 141–153.
13. Sanjay, A., Fu, J., & Kreibich, G. (1998). DAD1 is required for the function and the structural integrity of the oligosaccharyltransferase complex. *The Journal of biological chemistry*, 273(40), 26094–26099.

14. Mohorko, E., Glockshuber, R., & Aebi, M. (2011). Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(4), 869–878.
15. Schjoldager, K. T., Narimatsu, Y., Joshi, H. J., & Clausen, H. (2020). Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(12), 729–749.
16. Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology*, 124(4), 619–626.
17. Gilmore A. P. (2005). Anoikis. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, 1473–1477.
18. Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S., & Nishimoto, T. (1993). Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Molecular and cellular biology*, 13(10), 6367–6374.
19. Makishima, T., Nakashima, T., Nagata-Kuno, K., Fukushima, K., Iida, H., Sakaguchi, M., Ikehara, Y., Komiyama, S., & Nishimoto, T. (1997). The highly conserved DAD1 protein involved in apoptosis is required for N-linked glycosylation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2(2), 129–141.
20. Zhang, Y., Cui, C., & Lai, Z. C. (2016). The defender against apoptotic cell death 1 gene is required for tissue growth and efficient N-glycosylation in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 420(1), 186–195.
21. Silberstein, S., Collins, P. G., Kelleher, D. J., & Gilmore, R. (1995). The essential OST2 gene encodes the 16-kD subunit of the yeast oligosaccharyltransferase, a highly conserved protein expressed in diverse eukaryotic organisms. *The Journal of cell biology*, 131(2), 371–383.
22. Sugimoto, A., Hozak, R. R., Nakashima, T., Nishimoto, T., & Rothman, J. H. (1995). dad-1, an endogenous programmed cell death suppressor in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *The EMBO journal*, 14(18), 4434–4441.
23. Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., & Elfiky, A. A. (2019). GRP78: A cell's response to stress. *Life sciences*, 226, 156–163.
24. Matsuo, R., Morihara, H., Mohri, T., Murasawa, S., Takewaki, K., Nakayama, H., Maeda, M., & Fujio, Y. (2014). The inhibition of N-glycosylation of glycoprotein 130 molecule abolishes STAT3 activation by IL-6 family cytokines in cultured cardiac myocytes. *PloS one*, 9(10), e111097.

25. Slee, E. A., Zhu, H., Chow, S. C., MacFarlane, M., Nicholson, D. W., & Cohen, G. M. (1996). Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *The Biochemical journal*, 315 (Pt 1)(Pt 1), 21–24.
26. Fässler, R., Rohwedel, J., Maltsev, V., Bloch, W., Lentini, S., Guan, K., Gullberg, D., Hescheler, J., Addicks, K., & Wobus, A. M. (1996). Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *Journal of cell science*, 109 (Pt 13), 2989–2999.
27. Zielinska, D. F., Gnad, F., Wiśniewski, J. R., & Mann, M. (2010). Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell*, 141(5), 897–907.
28. Israeli-Rosenberg, S., Manso, A. M., Okada, H., & Ross, R. S. (2014). Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circulation research*, 114(3), 572–586.
29. Brancaccio, M., Cabodi, S., Belkin, A. M., Collo, G., Koteliansky, V. E., Tomatis, D., Altruda, F., Silengo, L., & Tarone, G. (1998). Differential onset of expression of alpha 7 and beta 1D integrins during mouse heart and skeletal muscle development. *Cell adhesion and communication*, 5(3), 193–205.
30. Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L., & Plummer, T. H., Jr (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical biochemistry*, 180(2), 195–204.
31. Franchini K. G. (2012). Focal adhesion kinase -- the basis of local hypertrophic signaling domains. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(2), 485–492.
32. Yamazoe, S., Shimogawa, H., Sato, S., Esko, J. D., & Uesugi, M. (2009). A dumbbell-shaped small molecule that promotes cell adhesion and growth. *Chemistry & biology*, 16(7), 773–782.
33. Hou, S., Hang, Q., Isaji, T., Fukuda, T., & Gu, J. (2020). Identification of the minimal N-glycosylation on integrin $\alpha 5\beta 1$ required for its inhibitory effect on EGFR signaling and cell proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, 523(1), 226–232.
34. Huang, Y. L., Liang, C. Y., Labitzky, V., Ritz, D., Oliveira, T., Cumin, C., Estermann, M., Lange, T., Everest-Dass, A. V., & Jacob, F. (2021). Site-specific N-glycosylation of integrin $\alpha 2$ mediates collagen-dependent cell survival. *iScience*, 24(10), 103168.
35. Harada, Y., Ohkawa, Y., Kizuka, Y., & Taniguchi, N. (2019). Oligosaccharyltransferase: A Gatekeeper of Health and Tumor Progression. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6074.
36. Makishima, T., Yoshimi, M., Komiya, S., Hara, N., & Nishimoto, T. (2000). A subunit of the

- mammalian oligosaccharyltransferase, DAD1, interacts with Mcl-1, one of the bcl-2 protein family. *Journal of biochemistry*, 128(3), 399–405.
- 37. Roboti, P., & High, S. (2012). The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation. *Journal of cell science*, 125(Pt 14), 3474–3484.
 - 38. Shai, S. Y., Harpf, A. E., Babbitt, C. J., Jordan, M. C., Fishbein, M. C., Chen, J., Omura, M., Leil, T. A., Becker, K. D., Jiang, M., Smith, D. J., Cherry, S. R., Loftus, J. C., & Ross, R. S. (2002). Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circulation research*, 90(4), 458–464.
 - 39. Krishnamurthy, P., Subramanian, V., Singh, M., & Singh, K. (2006). Deficiency of beta1 integrins results in increased myocardial dysfunction after myocardial infarction. *Heart (British Cardiac Society)*, 92(9), 1309–1315.
 - 40. Peng, X., Kraus, M. S., Wei, H., Shen, T. L., Pariaut, R., Alcaraz, A., Ji, G., Cheng, L., Yang, Q., Kotlikoff, M. I., Chen, J., Chien, K., Gu, H., & Guan, J. L. (2006). Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 116(1), 217–227.
 - 41. Brewster, J. L., Martin, S. L., Toms, J., Goss, D., Wang, K., Zachrone, K., Davis, A., Carlson, G., Hood, L., & Coffin, J. D. (2000). Deletion of Dad1 in mice induces an apoptosis-associated embryonic death. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 26(4), 271–278.
 - 42. Hong, N. A., Flannery, M., Hsieh, S. N., Cado, D., Pedersen, R., & Winoto, A. (2000). Mice lacking Dad1, the defender against apoptotic death-1, express abnormal N-linked glycoproteins and undergo increased embryonic apoptosis. *Developmental biology*, 220(1), 76–84.
 - 43. Nishii, K., Tsuzuki, T., Kumai, M., Takeda, N., Koga, H., Aizawa, S., Nishimoto, T., & Shibata, Y. (1999). Abnormalities of developmental cell death in Dad1-deficient mice. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 4(4), 243–252.
 - 44. Yang, B., Ye, D., & Wang, Y. (2013). Caspase-3 as a therapeutic target for heart failure. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(3), 255–263.
 - 45. Mori, S., Kimura, R., Morihara, H., Tomimatsu, M., Fuchigami, S., Matsumoto, K., Tanaka, S., Okada, Y., Maeda, M., Obama, M., & Fujio, Y. (2025). Suppression of Dad1 induces cardiomyocyte death by weakening cell adhesion. *American journal of physiology. Cell physiology*, 328(1), C95–C106.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧かつ熱心な御指導、御鞭撻並びに御協力を受け賜りました藤尾慈先生に厚く御礼申し上げます。

本研究において、多大なる御指導、御鞭撻並びに御助力を受け賜りました尾花理徳先生、岡田欣晃先生、前田真貴子先生、田中翔大先生に厚く御礼申し上げます。

本稿をまとめるに際し、貴重な御指導、御助力を受け賜りました橋本均先生、深田宗一朗先生に厚く御礼申し上げます。

最後に、日々の生活を温かく見守り支えてくださった木崎怜子様をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学分野の皆様に心より感謝いたします。