

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06981

研究課題名(和文) タンパク質のC-マンノシル化糖修飾が関わる上皮細胞接着制御機構の解明

研究課題名(英文) C-Mannosylation is involved in the regulation of epithelial-cell adhesion.

研究代表者

井原 義人 (Ihara, Yoshito)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70263241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：C-マンノシル(C-Man)化は、タンパク質中のトリプトファン特異的な糖修飾である。我々は化学合成C-Man化ペプチド(C-Man-Trp-Ser-Pro-Trp)が上皮系A549細胞のアドヘレンス-ジャンクション形成を抑制することを見出した。C-Man化ペプチド存在下ではE-カドヘリンの細胞内分解が促進された。C-Man化ペプチドはE-カドヘリンと直接作用せず、 β -アクチニン-4やミオシン-1Cへの作用を介して、E-カドヘリンと β -カテニンの複合体形成を阻害することが考えられた。本研究はC-Man化ペプチドが生理活性糖ペプチドとして上皮細胞接着の新たな制御機構に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：C-Mannosylation is a unique sugar modification on tryptophan residues in proteins. We found that chemically synthesized C-mannosyl peptides (i.e., C-Man-Trp-Ser-Pro-Trp) suppress the formation of adherens-junction structure in epithelial-like A549 cells. In the presence of C-mannosyl peptides, degradation of E-cadherin was accelerated in the cells. C-Mannosyl peptides also suppressed the complex formation between E-cadherin and β -catenin, through the interaction to β -actinin 4 or myosin-1c but not to E-cadherin. This study indicates that the C-mannosyl peptide is a bioactive glycopeptide, and exerts a novel role for the regulation of epithelial-cell adhesion.

研究分野：生物学

キーワード：糖タンパク質 C-マンノシル化 細胞接着分子 E-カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

C-マンノシル(C-Man)化は、タンパク質中のトリプトファン(Trp)に特異的な糖修飾である。C-Man 化では、マンノースが Trp-X-X-Trp モチーフの第1番目の Trp のインドール環 C2 に炭素-炭素結合により酵素的に付加される。近年、C-Man 転移酵素と考えられる遺伝子 DPY-19 やそのホモログが報告されたが、その性質については不明な点も多い。Trp-X-X-Trp モチーフは、Thrombospondin type 1 repeat (TSR) と呼ばれる機能ドメインをもつ TSR スーパーファミリーや、サイトカイン受容体ファミリーなどの分泌あるいは細胞外マトリックスタンパク質によく保存されている。特に TSR 部分は、グリコサミノグリカン、コラーゲン、TGF- β などの相互作用を通じて様々な細胞機能の調節に関与すると考えられる。C-Man 化が TSR ファミリーなど固有のタンパク質機能の調節にどのように関わるのかは不明であり、C-Man 化が関わる細胞生理機能に至ってもほとんど解析されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が発見した C-Man 化ペプチドによる上皮系細胞アドヘレンス-ジャンクション構造形成の抑制という知見をもとに、C-Man 化ペプチドの上皮系細胞接着過程における標的制御分子を明らかにし、この新たな生理作用の分子機構の解析を進める。また、本研究は上皮細胞接着異常が関わるがん細胞の転移・浸潤などの病態に関する C-Man 化糖修飾の生理的役割の解析へと発展させることで、C-Man 化糖タンパク質あるいは生理活性糖ペプチドとしての C-Man 化ペプチドがもつ新たな上皮細胞接着の分子機構解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) C-Man 化ペプチドの化学合成

ヒトトロンボスポンジン-1 の TSR2 に由来する C-Man 化付加配列をモデルに、C-Man-Trp-Ser-Pro-Trp を主要構造とした様々な変異アミノ酸配列ペプチドや、ビオチン化あるいは蛍光標識した C-Man 化ペプチドを化学合成した。C-Man 化関連化合物の合成は、研究分担者の眞鍋史乃博士(理化学研究所)が担当し、一部については合成の指導を受けた。

(2) C-Man 化ペプチドによるアドヘレンス-ジャンクション構造形成の抑制機構の解析

ヒト肺上皮細胞由来 A549 を用いて、C-Man 化ペプチド(C-Man-Trp-Ser-Pro-Trp など)が、TGF- β シグナルの共存、非共存下でアドヘレンス-ジャンクションの構成成分である E-カドヘリンや β -カテニンなどの分子の発現量に与える影響に関して、転写レベルとタンパク質レベルの発現については、それぞれ、RT-PCR と特異抗体を用いたイムノプロット

による解析を行った。また、アドヘレンス-ジャンクションの形態学的変化については、E-カドヘリン発現を指標に免疫蛍光抗体法とレーザー顕微鏡により解析した。

(3) C-Man 化ペプチド結合標的分子の単離と同定

C-Man-Trp-Ser-Pro-Trp-Biotin などの標識化合物を、A549 細胞へ取込ませた後、膜透過性の DSP による化学架橋剤処理を行い、細胞抽出サンプルを作製した。細胞抽出サンプルから、アビジンビーズを用いたプルダウンにより、ビオチン化ペプチドと結合標的分子を単離した。精製したタンパク質サンプルを2次元電気泳動により展開した。泳動ゲルの銀染色後、染色スポットについて、トリプシンによる In-Gel 消化を行い、マスのフィンガープリンティング解析へと進め、候補タンパク質を特定した。さらに候補タンパク質については、特異抗体を用いたイムノプロット法により確認、同定した。

(4) C-Man 化ペプチド結合標的分子とアドヘレンス-ジャンクション形成機能の解析

A549 細胞において、C-Man 化ペプチド結合標的分子(β -アクチニン4、ミオシン-1C、Hsc70)の発現を各々の siRNA を用いて抑制した。結合分子の発現抑制による E-カドヘリンや β -カテニンなどの分子の発現量への影響を中心に、免疫細胞染色法やイムノプロット法で解析した。さらに、細胞内での C-Man 化ペプチドと E-カドヘリンなどの分子間相互作用や複合体成分の変化について、プルダウン-アッセイや免疫沈降法とイムノプロット法等で解析検討した。

4. 研究成果

(1) C-Man 化ペプチドの TGF- β シグナルへの影響: 上皮系 A549 細胞に C-Man 化ペプチドやコントロールペプチドの共存下で TGF- β 処理を行ったところ、C-Man 化ペプチドの存在下ではコントロールに比べ、Smad2/3 のリン酸化の抑制されることがわかった(図1)。

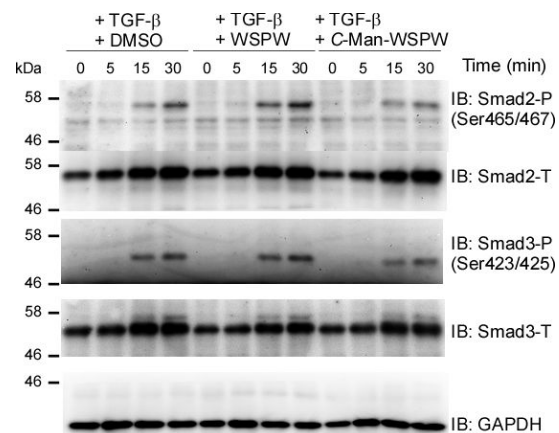


図1 .C-Man 化ペプチドは TGF- β シグナルを抑制する

次に、TGF- β による E-カドヘリン発現抑制に対する C-Man 化ペプチドの影響について解析した(図 2)。その結果、E-カドヘリンの発現量が TGF- β により減少するが、その減少が C-Man 化ペプチドの存在下ではさらに著しいことがわかった。この結果は、C-Man 化ペプチドが TGF- β 誘導性の Smad リン酸化シグナルを有為抑制した(図 1)こととは矛盾した。このことから、上皮系細胞では C-Man 化ペプチドが TGF- β シグナルへの作用とは別の独立した作用で、アドヘレンス-ジャンクションの機能や E-カドヘリン発現の調節に関わることが考えられた。

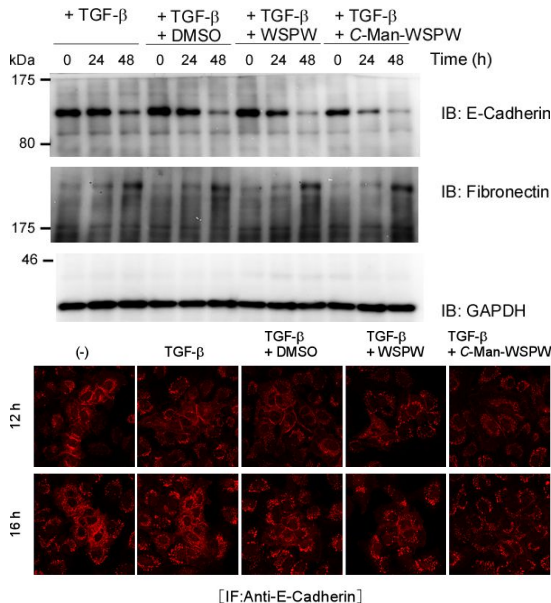


図 2 . C-Man 化ペプチドは TGF- β 誘導性の E-カドヘリン減少を亢進する

(2) C-Man 化ペプチドの E-カドヘリン発現への影響: A549 細胞に C-Man 化ペプチドで処理を行い、E-カドヘリンの発現についてイムノプロット法で解析した(図 3)。その結果、C-Man 化ペプチド存在下では、処理後 72 時間の段階で、E-カドヘリンの発現量が明らかに減少していた。また、形態学的解析で、C-Man 化ペプチド処理細胞では、細胞間の接着が減少していることも明らかとなった。E-カドヘリンの発現抑制について、転写レベルでは顕著な変化は見られなかった。次に、パルスチェイス実験により E-カドヘリンターンオーバーを解析したところ、C-Man 化ペプチド存在下では、E-カドヘリンタンパク質の減少が促進することがわかった(図 4)。このことから、C-Man 化ペプチド存在下では E-カドヘリンの細胞内での分解が促進されていることが明らか

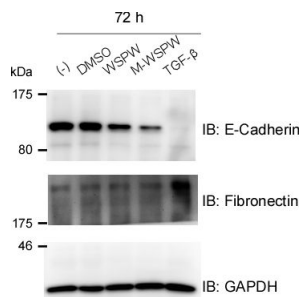


図 3 . C-Man 化ペプチドは E-カドヘリン発現を抑制する

かとなった。

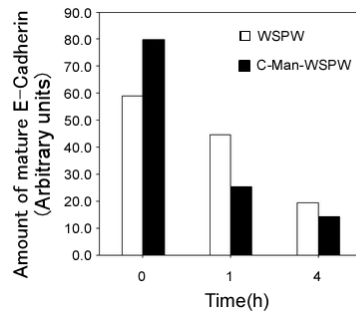
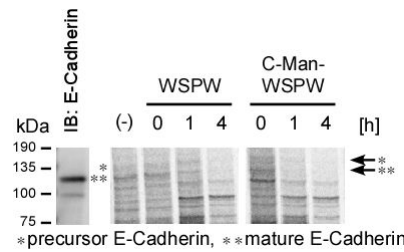


図 4 . C-Man 化ペプチドは E-カドヘリン分解を亢進する

(3) C-Man 化ペプチド結合標的分子の探索: ビオチン標識した C-Man 化ペプチドを細胞内に取込ませた後、プルダウン実験を経て結合標的分子を単離した。サンプルについては、還元条件下での SDS-電気泳動で分離し銀染色により解析した(図 5)。C-Man 化ペプチド結合タンパク質(矢頭印)として、 α -アクチニン-4 が同定された。また、これまでの研究で同定されていた、Hsc70 とミオシン-1C についても C-Man 化ペプチドへの特異的な結合がイムノプロット法で確認された(図 5)。以上より、C-Man 化ペプチドは α -アクチニン-4、Hsc70、ミオシン-1C などと A549 細胞内で結合することがわかった。

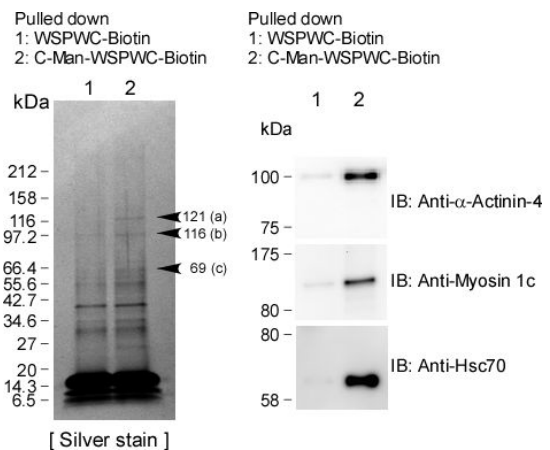


図 5 . C-Man 化ペプチド結合標的分子の同定

(4) C-Man 化ペプチド結合分子の発現抑制による E-カドヘリン発現への影響: A549 細胞に α -アクチニン-4 に対する siRNA 処理を 48 時間行い、 α -アクチニン-4 mRNA の発現量について real-time RT-PCR で解析したところ、 α -アクチニン-4 転写レベルの著しい抑制が見られた(図 6 A)。この細胞にお

いて、E-カドヘリン発現レベルの増加と β -カテニン発現レベルの減少が観察された(図 6B)。

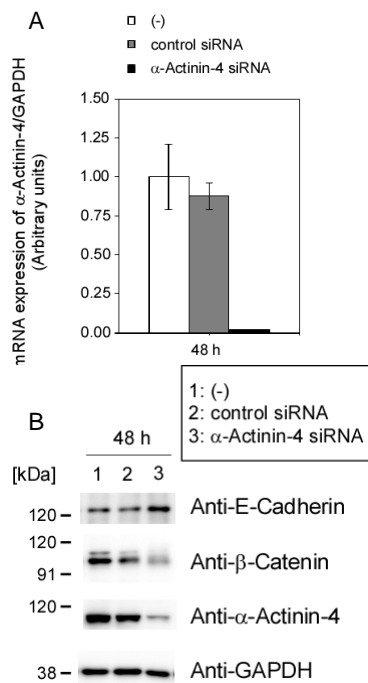


図 6. α -アクチニン 4 発現抑制による E-カドヘリンの変化

一方、ミオシン-1C についても同様の検討を行った。A549 細胞にミオシン-1C に対する siRNA 処理を 48 時間行い、ミオシン-1C mRNA の発現量を解析したところ、ミオシン-1C 転写レベルの著しい抑制が見られた(図 7A)。

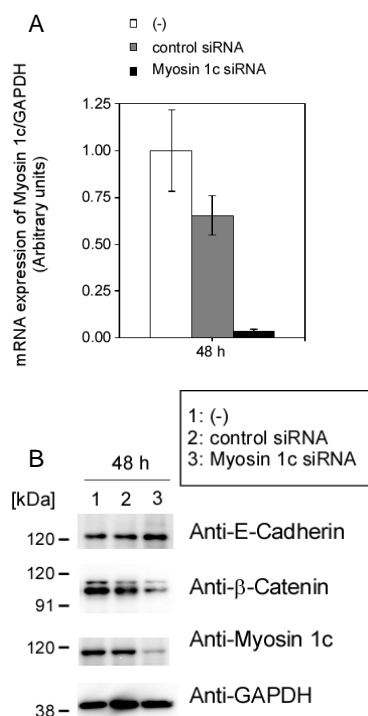


図 7. ミオシン-1C 発現抑制による E-カドヘリンの変化

この細胞において、E-カドヘリン発現レベルの増加と β -カテニン発現レベルの減少が観察された(図 7B)。以上の研究から、 α -アクチニン-4 とミオシン-1C は E-カドヘリンの発現を抑制的に調節していることが示唆された。

(5) C-Man 化ペプチド結合分子と E-カドヘリン間相互作用に対する C-Man 化ペプチドの影響

A549 細胞を C-Man 化ペプチドやコントロールペプチドで処理した細胞から、E-カドヘリンと結合するタンパク質を免疫沈降で単離し、複合体に含まれるタンパク質についてイムノプロット解析を行った(図 8A)。E-カドヘリンは未処理の状態では、 β -カテニンとは結合していたが、 α -アクチニン-4 やミオシン-1C と結合していない。しかし、C-Man 化ペプチドで処理した細胞では、E-カドヘリンと β -カテニンとの結合が減少し、ミオシン-1C との結合が増加することがわかった。一方、同様の処理をした細胞から、 α -アクチニン-4 と結合するタンパク質を免疫沈降で単離し、複合体に含まれるタンパク質についてイムノプロット解析を行った(図 8B)。

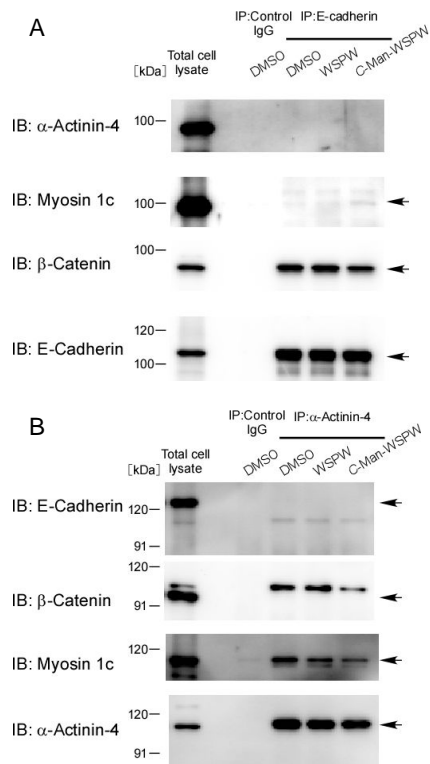


図 8. C-Man 化ペプチド存在下における E-カドヘリン相互作用分子の変化

その結果、 α -アクチニン-4 は未処理の状態では、 β -カテニンやミオシン-1C とは結合していたが、E-カドヘリンと結合していなかった。また、C-Man 化ペプチドで処理した細胞では、 α -アクチニン-4 と β -カテニンやミオシン-1C との結合は減少したが、E-カドヘリンとの直接作用は観察されなかった。以上の結果から、E-カドヘリンのアドヘレンス-ジ

ヤンクシオン構造の維持には、 α -カテニンとの結合が必要であり、C-Man 化ペプチドにより、その複合体形成が抑制されることが、E-カドヘリンの分解と発現減少に繋がることが考えられた。また、C-Man 化ペプチドは直接に E-カドヘリンと結合せず相互作用はしないが、 α -アクチニン-4 やミオシン-1C への作用を介して、E-カドヘリンと α -カテニンの複合体形成を阻害するような分子機構により上皮細胞間接着の調節に関わることが考えられた (図 9)。

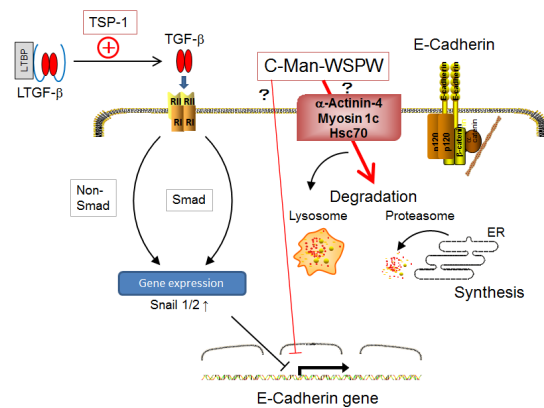


図 9 . C-Man 化ペプチドの作用機構 (仮説)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Yamamoto M, Ikezaki M, Toujima S, Iwahashi N, Mizoguchi M, Nanjo S, Minami S, Ihara Y, Ino K, Calreticulin is involved in invasion of human extravillous trophoblasts through functional regulation of integrin β 1. *Endocrinology.*, 158, 3874-3889, 2017. 査読有り
2. Ikezaki M, Higashimoto N, Matsumura K, Ihara Y, Hsc70 facilitates TGF- β -induced activation of Smad2/3 in fibroblastic NRK-49F cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 477, 448-453, 2016. 査読有り

[学会発表](計 17 件)

1. Midori Ikezaki, Shotaro Tabata, In-Sook L. Matsui, and Yoshito Ihara, Calreticulin is involved in a decrease of insulin in MIN6 cells under reductive stress condition, RIKEN Symposia: International Symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis and diseases, March 22-23, 2018, RIKEN(Wako, Saitama, Japan)
2. Midori Ikezaki, Madoka Yamamoto, Naoyuki Iwahashi, Kazuhiko Ino, and

Yoshito Ihara, Calreticulin regulates invasion of extravillous trophoblasts through N-glycosylation of integrin β 1, International Symposium "Systems Glycobiology and Beyond", November 16-17, 2017, RIKEN(Wako, Saitama, Japan)

3. 井原義人, 井内陽子, 池崎みどり, 南方志帆, 眞鍋史乃, 伊藤幸成, 「C-マンノシル化糖修飾と細胞生理機能への関与」, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会: ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会), 2017 年 12 月 6 日-9 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
4. 池崎みどり, 松村考, 東本菜月, 渋谷幸直, 和田芳直, 眞鍋史乃, 伊藤幸成, 井原義人, 「上皮細胞における C-Man-TSR 由来ペプチド結合分子の E-カドヘリン発現への関与」, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会: ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会), 2017 年 12 月 6 日-9 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
5. 山本円, 岩橋尚幸, 池崎みどり, 井篁一彦, 井原義人, 「カルレチキュリンはインテグリン β 1 への関与を介しヒト絨毛外栄養膜細胞浸潤を制御する」, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会: ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会), 2017 年 12 月 6 日-9 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
6. 井内陽子, 上田佳奈, 持田沙織, 村田顕優, 松井仁淑, 南方志帆, 田尻道子, 和田芳直, 井原義人, 「細胞外マトリックス mindin の細胞内移行における C-mannosyl 化の影響」, 第 36 回日本糖質学会年会、2017 年 7 月 19 日-21 日、旭川市民文化会館 (北海道旭川市)
7. 山本円, 池崎みどり, 東嶋左緒里, 岩橋尚幸, 南條佐輝子, 溝口美佳, 城道久, 太田菜美, 馬淵泰士, 八木重孝, 南佐和子, 井原義人, 井篁一彦, 「カルレチキュリンはインテグリンへの関与を介し絨毛外栄養膜細胞浸潤を制御する」, 第 24 回日本胎盤学会学術集会 / 第 34 回日本絨毛性疾患研究会、2016 年 11 月 25 日-26 日、ホテルアパローム紀の国(和歌山県和歌山市)
8. 井内陽子, 上田佳奈, 持田沙織, 村田顕優, 松井仁淑, 南方志帆, 田尻道子, 和田芳直, 井原義人, 「Mindin の C-mannosyl 化部位の変異は folding と分泌に影響する」, 第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日-27 日、仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)
9. 東本菜月, 池崎みどり, 松村考, 井原義人, 「ラット線維芽細胞の TGF- β シグナル

に対する Hsc70/Hsp70 の機能」, 第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日-27 日、仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

10. 池崎みどり、松村考、東本菜月、渋川幸直、和田芳直、眞鍋史乃、伊藤幸成、井原義人、「C-マンノシル化 TSR 由来ペプチド結合標的分子が E-カドヘリン発現に与える影響」, 第 35 回日本糖質学会年会、2016 年 9 月 1 日-3 日、高知市文化プラザ かるぽーと(高知県高知市)
11. 上田佳奈、井内陽子、持田沙織、村田顕優、松井仁淑、南方志帆、田尻道子、和田芳直、井原義人、「細胞外マトリクス mindin の分泌経路における C-mannosyl 化の作用」, 第 63 回日本生化学会近畿支部例会、2016 年 5 月 21 日、神戸薬科大学(兵庫県神戸市)
12. 山本円、池崎みどり、岩橋尚幸、南條佐輝子、井籠一彦、井原義人、「カルレテイクキュリンはヒト絨毛細胞株(HTR8/SVneo)において細胞浸潤能に関与する」, 第 63 回日本生化学会近畿支部例会、2016 年 5 月 21 日、神戸薬科大学(兵庫県神戸市)
13. 井内陽子、上田佳奈、持田沙織、村田顕優、松井仁淑、南方志帆、田尻道子、和田芳直、井原義人、「C-mannosyl 化による thrombospondin type-1 repeat タンパク質 mindin の分泌促進」, BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日-04 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
14. 松村考、池崎みどり、東本菜月、渋川幸直、和田芳直、眞鍋史乃、伊藤幸成、井原義人、「上皮細胞間接着に関わる C-Man-TSR 由来ペプチド標的分子の探索」, BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日-04 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
15. 池崎みどり、松村考、東本菜月、眞鍋史乃、伊藤幸成、井原義人、「C-Man-TSR 由来ペプチドの上皮細胞間接着への影響」, 第 34 回日本糖質学会年会、2015 年 07 月 31 日-08 月 02 日、東京大学安田講堂(東京都文京区)
16. 上田佳奈、井内陽子、持田沙織、村田顕優、松井仁淑、田尻道子、和田芳直、井原義人、「Mindin thrombospondin type-1 repeat ドメインにおける C-mannosyl 化による分泌促進」, 第 62 回日本生化学会近畿支部例会、2015 年 5 月 16 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)
17. 東本菜月、池崎みどり、松村考、井原義人、「ラット線維芽細胞における TGF- β シグナルの Hsc70 による制御について」, 第 62 回日本生化学会近畿支部例会、

2015 年 5 月 16 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Ihara Y, Inai Y, Ikezaki M, Matsui I.-L, Manabe S, and Ito Y, C-Mannosylation: a modification on tryptophan in cellular proteins. In "Glycoscience: Biology and Medicine" (Eds.) Taniguchi N., Endo T., Hart G.W., Seeberger P., and Wong C.-H., Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Germany, 1091-1099, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakuubu/160415/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 義人 (IHARA, Yoshito)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70263241

(2) 研究分担者

井内 陽子 (INAI, Yoko)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20316087

池崎 みどり (IKEZAKI, Midori)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40549747

南方 志帆 (MINAKATA, Shiho)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号: 90508574

眞鍋 史乃 (MANABE, Shino)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤細胞

制御化学研究室・専任研究員

研究者番号: 60300901

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者