

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07049

研究課題名(和文) インテグリン 3を介した新たなシアリル化糖鎖生成の制御と意義に関する研究

研究課題名(英文) Regulation and significance of new sialylated glycan biosynthesis via integrin alpha3

研究代表者

伊左治 知弥 (Isaji, Tomoya)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80433514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面のシアリル化糖鎖は癌化に伴い変化することが知られる。これまで、シアリル化N-型糖鎖の生合成に関わる制御因子として固形癌で上昇するGOLPH3とその上流のPI4KII¹を見いだした。しかし、どのようにPI4KII¹が糖鎖を制御するか不明点が多い。本研究により、インテグリン 3との複合体が特異的にシアリル化を制御することがわかった。さらには上皮細胞接着分子とインテグリンが複合体を形成し、細胞増殖・移動を調節すること、インテグリンの下流のFAKがシアリル化の調節因子であることが新たに示唆された。これらの研究結果は、シアリル化を制御する次世代の抗癌剤開発に新たな知見を与えると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌で変化する細胞表面の糖鎖は癌の悪性化に関わることが知られる。この糖鎖は糖転移酵素遺伝子の発現変化に加え、糖転移酵素が蛋白質の機能調節によっても制御される。蛋白質による制御は複雑であるが、疾病の治療の際、介入できるポイントが多く存在するため、特異的治療法の開発に役立つと考えられる。本研究から接着分子のシグナル伝達が癌における悪性化の原因の1つであることが強く示唆され、癌で変化する糖鎖の蛋白質による調節の理解が深まったことが学術的意義である。これらの研究成果は、全く新しい癌転移を抑制する治療薬の開発、さらには、iPS細胞やES細胞をもちいた再生医療における治療法の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sialylated N-glycans on the cell surface are known to change in several types of cancer. We have identified GOLPH3 and PI4KII¹ as the regulator of sialylated N-glycans. However, how PI4KII¹ regulates glycosylation remained unclear. A complex between integrin 3 and PI4KII¹ specifically regulates sialylation. EPCAM also forms a complex with integrins. Furthermore, FAK, which is downstream of integrin, was newly found to be a regulator of sialylation. These findings may provide new insights into the development of next-generation anticancer drugs that regulate sialylation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：シアリル酸 N-型糖鎖 インテグリン PI4K がん 転移

1. 研究開始当初の背景

癌、糖尿病、アルツハイマー病などの疾患ではゴルジ体における糖鎖修飾の破綻が認められる。また、多くのウイルスは細胞表面の糖鎖を侵入経路にしている。また、シアリル化修飾はES細胞やiPS細胞に高発現することや、上皮間葉転換と深く関わっている細胞間接着と細胞-細胞外マトリックス間接着に重要な役割を持っていることが報告されていた。従って、疾病の理解や細胞表面の受容体を標的とした創薬を考える際には糖鎖の理解が重要である。我々の研究室では、N-型糖鎖の構造変化によって、様々な生物機能が制御されることを明らかにしてきた。さらに、糖鎖の生合成に関わる制御因子を探索する過程で、Golgi phosphoprotein3(GOLPH3)を見いだした。GOLPH3はゴルジ体に発現する蛋白質で、様々な固形癌で高頻度に増幅され、癌の予後と負に相関する強力な癌遺伝子であるが、シアリル化N-型糖鎖を制御することで癌細胞の転移・浸潤に促進的に働くという新規な制御機構が申請者らの研究によって見いだされた(Isaji T. JBC2014)。他の研究者からも、シアル酸転移酵素の正常な局在を保つためにGOLPH3が必要であることが報告され(Eckert E. JBC2014)、糖鎖生合成においてこの経路の重要性が確認された。さらに、GOLPH3はフォスフォイノシトール4リン酸(PI4P)に結合するため、PI4Pの産生に関わるPI4KIIを高浸潤性の乳癌細胞株で発現抑制した。GOLPH3の発現抑制細胞と同様に、細胞表面のシアリル化N-型糖鎖の低下と癌浸潤性の著しい低下が観察された。さらに、PI4KIIとインテグリン3との複合体が糖鎖の生合成経路を調節することが3の遺伝子を欠失した実験から示唆された。しかし、これらの詳細な分子機序や具体的な機能については不明点が多くあった。そこで、申請者は糖鎖発現制御とその機能に着目し研究を行った。

2. 研究の目的

これまで我々は様々な固形癌で上昇するGOLPH3がシアル酸転移酵素と複合体を形成し、N-型糖鎖のシアリル化を促進することで、癌細胞の浸潤を促進することを発見した。さらに、GOLPH3の上流としてPI4Pの産生に関わるPI4KIIを発見した。PI4KIIとインテグリン3の複合体が知られていたため、3の遺伝子をCRISPR-cas9で欠失すると予想外にシアリル化が減少した。以上のことから、3とPI4KIIの複合体が糖鎖生合成の制御因子であることが示唆される。本研究では、N-型糖鎖に焦点を絞り、インテグリンの複合体の特異性、細胞局在、糖鎖構造を解析することで、シアリル化糖鎖生合成の新しい制御機構を明らかにする。糖転移酵素遺伝子の調節機構には多くの知見が報告されている。しかし、実際、糖転移酵素のはたらきがどのように調節されているのかは、あまり理解が進んでいない。そこで本研究では「インテグリン3からのシグナルによってシアリル化をはじめとするN-型糖鎖の生合成が調節される」という新たな分子機序の解明をめざした。

3. 研究の方法

インテグリン3がどのように糖鎖を制御するか以下の(1)~(4)を解析して、糖鎖の生合成の新しい制御機構とその意義を解明した。

(1) インテグリン3とPI4Kの結合特異性の検討

3をCRISPR-cas9で欠失すると、意外なことに、N-型糖鎖のシアリル化が抑制されることが分かった。3の欠失と同様にPI4KIIの発現抑制によってシアリル化が減少する。一方、インテグリン5欠失では糖鎖の変化が認められない。過去に、3とPI4KIIの複合体が報告されているため(Berdi tchevski, F. JBC1997)、糖鎖生合成には両者の相互作用が重要であることが示唆される。そこで、PI4KIIと3や5との相互作用を免疫沈降で解析し、PI4KIIとの相互作用の特異性を確認した。

(2) インテグリン3の複合体を介したPI4P産生や糖転移酵素の局在変化の解析

シアル酸転移酵素はPI4PとGOLPH3によってゴルジ体に係留されるため(Isaji T. JBC2014)、上記の実験で明らかになったインテグリンの複合体はPI4Pや糖転移酵素の局在を変化させることが予想される。PI4PはGFP融合型のPHドメインをつかい、トランス(TGN46)・メディアルゴルジ(GM130)のマーカーと共染色する。同時に、シアリル化糖鎖を生合成する糖転移酵素(例えば、シアル酸転移酵素ST6Gal-1やST3Gal-4)の局在変化を観察した。

(3) PI4Kがゴルジ体のpH環境に及ぼす影響の解析

ゴルジ体槽の分画はpH勾配をもつが、ゴルジのpHを人為的に変化させると糖鎖修飾に破綻がおきることが報告されている(Maeda, Y, et al. Nat Cell Biol. 2008)。実際、ゴルジのpH制御因子

である GolgiPHRegulator を欠失したマウス線維芽細胞では糖鎖発現が低下し、さらにゴルジ体の PI4P 量が低下している。これは PI4KII の発現抑制と非常によく似た表現型であるため糖鎖制御機構には pH 変化が伴う可能性があった。PI4KII の発現抑制細胞に pH 感受性のある蛍光蛋白質 pHluorin を導入し、ゴルジ体における pH を共焦点レーザー顕微鏡で測定した。

(4) インテグリンの欠失細胞における糖鎖構造の解析

N-型糖鎖のシアリル化はゴルジ体で主にシアリル酸転移酵素 ST6Gal-1 と ST3Gal-4 の 2 つの酵素が合成しているが、 $\alpha 3$ の欠失がこれらの酵素のシアリル酸修飾効率を減少させることが予想される。HPLC および LC-MS で $\alpha 3$ 欠失細胞の詳細な糖鎖構造を定量解析することで、 $\alpha 3$ がおもに制御している糖鎖構造を同定した。

4. 研究成果

細胞表面のシアリル化糖鎖は癌化に伴い変化することが知られ、糖鎖の構造変化によって受容体は調節され、癌の転移などの疾患に深く関わる。シアリル酸の異常はがん細胞の浸潤・転移と密接に関連すると言われている。我々は分岐型糖鎖の生合成に関わる GnT-III、GnT-V、1,6 フコース(コアフコース)転移酵素(Fut8)およびシアリル酸転移酵素などの機能に注目し、細胞接着分子であるインテグリンをモデル分子として研究を行ってきた。糖鎖構造のみならず糖鎖付加サイトも分子の機能に重要であることを明らかにした(Hang, et al. JBC. 2015; SciRep. 2016; MCB. 2017)。複数の $\alpha 2,3$ シアリル酸転移酵素の中にある特定な $\alpha 2,3$ シアリル酸転移酵素が選択的にインテグリンを修飾し、細胞接着などの機能制御に関わることが明らかとなった(Qi, et al. FASEB J. 2019)。

糖鎖の制御には遺伝子の発現と糖転移酵素の制御との 2 つあるが、これまで蛋白質による糖転移酵素の制御に着目し、GOLPH3 と PI4KII キナーゼがシアリル酸修飾に必須であることを明らかにした。興味深いことに、シアリル化 N-型糖鎖にはインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ ではなく、 $\alpha 3 \beta 1$ と PI4KII 間の相互作用が必要であることもわかった(Isaji, et al. JBC. 2019)。また、糖鎖構造を詳細に解析することで、この複合体は O-型糖鎖には影響をあまり与えないが、N-型糖鎖に特異的に影響を及ぼすことが分かった。また、ゴルジ体での pH 変化において少なくともトランスゴルジの pH の変化は認められなかった。

PI4KII とインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の複合体に加えて、細胞間接着分子である上皮細胞接着分子(EpCAM)とインテグリン $\alpha 1 \beta 1$ の複合体についても見いだした。EpCAM は、腫瘍関連抗原の中で最も発現頻度が高く、癌の悪性化に関与するが、EpCAM が癌細胞の増殖、接着、移動特性に果たす役割は不明なままである。いくつかの腫瘍細胞株をスクリーニングし、大腸がん CW-2 と A431 細胞が EpCAM を高発現していることを見出した。細胞接着・移動に EpCAM の生物学的機能を評価するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて、これら 2 種類の癌細胞で EpCAM 遺伝子欠損細胞(KO)を樹立した。EpCAM-KO 細胞は、細長い細胞形態を示した。細胞増殖や細胞外マトリックス上での細胞移動の減少、focal adhesion kinase (FAK)、AKT、ERK といった細胞内のリン酸化シグナルが低下していた。さらに、EpCAM-KO 細胞では、コロニー形成能が著しく低下していた。共免疫沈降法では、EpCAM がインテグリン $\alpha 1 \beta 1$ に結合していることが明らかになった。興味深いことに、細胞間の接着分子 EpCAM の遺伝子欠損によってインテグリン $\alpha 1 \beta 1$ の細胞表面の発現量と糖鎖が変化することから、この複合体も糖鎖の生合成に関わる可能性が示唆された。また、EpCAM-KO 細胞では、integrin $\alpha 5 \beta 1$ の発現量が野生型細胞と比べて減少していた。

さらに、シアリル化は N-型糖鎖の分岐にも影響を受けることが知られるが N-型糖鎖の分岐と O-GlcNAc との糖鎖修飾には相互関係があることがわかった。理論的には、O-GlcNAc 化が減少すれば、共通のドナー基質となる UDP-GlcNAc が余るために、分岐型の N 型糖鎖の生成量が増加する可能性がある。レクチンプロットング、HPLC、質量分析による解析の結果、N-アセチルグルコサミン転移酵素 IV (GnT-IV) が生合成する 1-4 GlcNAc 分岐の量が O-GlcNAc 転移酵素ノックダウン細胞(OGT-KD)で野生型細胞と比較して著しく減少していることが判明した。O-GlcNAc 転移酵素は UDP-GlcNAc トランスポーター(SLC35A3)を修飾し、O-GlcNAc 転移酵素-SLC35A3-GnT-IV を介した N 型糖鎖の生合成に関与することがわかった(Song, et al. FASEB J. 2022)。

インテグリンや PI4KII を介したシアリル化の制御メカニズムの詳細を明らかにするため、インテグリンの下流の重要なシグナル分子である FAK がシアリル化に及ぼす影響について検討した。HeLa 細胞および 293T において CRISPR/Cas9 システムを用いて FAK 遺伝子欠損細胞(KO)を樹立した。興味深いことに、レクチン染色、FACS、HPLC を用いた解析から、KO 細胞では野生型細胞に比べシアリル化が低下しており、KO 細胞に FAK を再導入するとシアリル化は回復した。これらのことから、インテグリンのシグナル自体がシアリル化を調節していることが示唆された(投稿準備中)。以上の研究は、シアリル酸に関連する次世代抗がん剤の開発に新たな知見を与えるだけでなく、iPS 細胞や ES 細胞を利用する再生医療の開発にも新知見を与えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Duan Chengwei, Fukuda Tomohiko, Isaji Tomoya, Qi Feng, Yang Jie, Wang Yuqin, Takahashi Shinichiro, Gu Jianguo	4. 巻 34
2. 論文標題 Deficiency of core fucosylation activates cellular signaling dependent on FLT3 expression in a Ba/F3 cell system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3239 ~ 3252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902313RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Qi Feng, Isaji Tomoya, Duan Chengwei, Yang Jie, Wang Yuqin, Fukuda Tomohiko, Gu Jianguo	4. 巻 34
2. 論文標題 ST3GAL3, ST3GAL4, and ST3GAL6 differ in their regulation of biological functions via the specificities for the 2,3 sialylation of target proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 881 ~ 897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901793R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yang Jie, Isaji Tomoya, Zhang Guowei, Qi Feng, Duan Chengwei, Fukuda Tomohiko, Gu Jianguo	4. 巻 522
2. 論文標題 EpCAM associates with integrin and regulates cell adhesion in cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 903 ~ 909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hou Sicong, Hang Qinglei, Isaji Tomoya, Fukuda Tomohiko, Gu Jianguo	4. 巻 523
2. 論文標題 Identification of the minimal N-glycosylation on integrin $\alpha 5$ 1 required for its inhibitory effect on EGFR signaling and cell proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 226 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Song Wanli、Isaji Tomoya、Nakano Miyako、Liang Caixia、Fukuda Tomohiko、Gu Jianguo	4. 巻 36
2. 論文標題 O GlcNAcylation regulates 1,4 GlcNAc branched N glycan biosynthesis via the OGT/SLC35A3/GnT IV axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101520R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liang Caixia、Fukuda Tomohiko、Isaji Tomoya、Duan Chengwei、Song Wanli、Wang Yuqin、Gu Jianguo	4. 巻 1865
2. 論文標題 1,6-Fucosyltransferase contributes to cell migration and proliferation as well as to cancer stemness features in pancreatic carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129870 ~ 129870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2021.129870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梁 彩霞, 福田 友彦, 伊左治 知弥, 顧 建国
2. 発表標題 FUT8の発現は膵がん細胞の移動・増殖・がん幹細胞性に重要な役割を果たす
3. 学会等名 第14回東北糖鎖研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大山 嘉順, 伊左治 知弥, 福田 友彦, 顧 建国
2. 発表標題 接着斑キナーゼ(FAK)のO-GlcNAc修飾による細胞機能への影響
3. 学会等名 第14回東北糖鎖研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 段 程偉, 福田 友彦, 伊左治 知弥, 高橋 伸一郎, 顧 建国
2. 発表標題 FLT3を介したシグナル伝達におけるコアフコシル化の重要性
3. 学会等名 第14回東北糖鎖研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 顧 建国, 伊左治 知弥, 福田 友彦
2. 発表標題 インテグリンとFLT3受容体における糖鎖機能と制御機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田 友彦, 梁 彩霞, 伊左治 知弥, 顧 建国
2. 発表標題 膵がん細胞の遊走・増殖・がん幹細胞的性質保持におけるFUT8発現の重要性
3. 学会等名 第39回日本糖質学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊左治 知弥, 顧 建国
2. 発表標題 シアリル化等による膜受容体の選別輸送ゾーンの特異性とその制御について
3. 学会等名 第2回オルガネラゾーン 若手の会オルガネラゾーン若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 顧 建国, 福田 友彦, 伊左治 知弥
2. 発表標題 糖鎖による膜受容体の選別輸送ゾーンの特異性とその制御機構の解明
3. 学会等名 第2回オルガネラゾーン 研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梁 彩霞, 福田 友彦, 伊左治 知弥, 黒田 喜幸, 顧 建国
2. 発表標題 膵がん細胞のがん幹細胞性の獲得と細胞移動・増殖におけるFUT8の役割
3. 学会等名 第15回東北糖鎖研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宋 万里, 伊左治 知弥, 中の 三弥子, 福田 友彦, 黒田 喜幸, 顧 建国
2. 発表標題 O-GlcNAcylation Regulates 1,4-GlcNAc-branched N-glycan Biosynthesis Via the OGT/SLC35A3/GnT-IV Axis
3. 学会等名 第15回東北糖鎖研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊左治 知弥
2. 発表標題 ゴルジ体におけるN-型糖鎖の多様性の制御とその意義
3. 学会等名 第19回生物化学若手研究者セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊左治 知弥, 大山 嘉順, 孫 玉涵, 黒田 喜幸, 福田 友彦, 顧 建国
2. 発表標題 Focal adhesion kinase (FAK)のO-GlcNAc 修飾による細胞接着斑の形成と細胞機能の制御
3. 学会等名 第40回日本糖質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宋 万里, 伊左治 知弥, 中の 三弥子, 福田 友彦, 黒田 喜幸, 顧 建国
2. 発表標題 O-GlcNAcylation regulates 1,4-GlcNAc-branched N-glycan biosynthesis via the OGT/SLC35A3/GnT-IV Axis
3. 学会等名 第40回日本糖質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊左治 知弥, 大山 嘉順, 孫 玉涵, 福田 友彦, 黒田 喜幸, 顧 建国
2. 発表標題 Focal adhesion kinaseのO-GlcNAc修飾による細胞機能の制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宋 万里, 伊左治 知弥, 中の 三弥子, 福田 友彦, 黒田 喜幸, 顧 建国
2. 発表標題 O-GlcNAcylation regulates 1,4-GlcNAc-branched N-glycan biosynthesis via the OGT/SLC35A3/GnT-IV Axis
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------