

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21370059

研究課題名(和文)細胞接着における糖鎖の変化とその意義

研究課題名(英文)Change of oligosaccharides in cell adhesion, and its roles

研究代表者

顧 建国 (Gu, Jianguo)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40260369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物においては、個々の細胞は独立して存在しているのではなく、細胞同士が接着、あるいは細胞が細胞外マトリックス(ECM)に接着している。細胞接着は、細胞接着分子の分子間相互作用によって担われ、細胞の骨格形成、細胞移動、細胞分化•増殖を制御する。本研究は、E-カドヘリンを介した細胞同士の接着が糖鎖修飾を通じて細胞-ECM間の接着を制御し、その意義と分子機構を解析した。

研究成果の概要(英文)：The functional units of cell adhesion are typically multiprotein complexes made up of three general classes of proteins; the adhesion receptors, the cell-extracellular matrix (ECM) proteins, and the cytoplasmic proteins. The cell adhesion receptors are usually transmembrane glycoproteins (for example E-cadherin and integrin) that mediate binding at the extracellular surface and determine the specificity of cell-cell and cell-ECM recognition. The most of these adhesive proteins are glycosylated. In the present study, we clearly demonstrated that N-glycosylation is important for integrin-mediated cell migration and intracellular signaling, a mutual regulation between the N-glycan expression and E-cadherin-mediated cell adhesion, and the underlying molecular mechanisms.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：N-glycosylation cell adhesion integrin E-cadherin

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物においては、個々の細胞は独立して存在しているのではなく、細胞同士が接着、あるいは細胞が細胞外マトリックス (ECM) に接着している。細胞同士の結合、および細胞の ECM への結合を細胞接着という。細胞接着は、細胞接着分子の分子間相互作用によって担われる。上皮では、一般に上皮細胞同士が強い接着を行い、E-カドヘリンを介するアドヘレンス・ジャンクションなどの接着構造を形成する一方、ECM である基底膜 (例えば、ラミニン) に接着しヘミデスマソームを形成している。結合組織内の間質細胞は、インテグリンを介して細胞周辺の ECM (例えば、フィブロネクチン) に接着している。また、接着分子の多くは、細胞内において細胞骨格と連結し、接着構造を安定化させ細胞の形態および組織構造の維持を担う一方、増殖因子受容体と協同して細胞内にシグナルを伝え細胞分化、増殖といった細胞形質の制御を行う。これら多彩な機能をもつ接着分子の多くは糖タンパク質である。近年、申請者らの研究により、アスパラギン結合型糖鎖 (N 型糖鎖) は、インテグリンやE-カドヘリンの機能制御に深く関わっていることが明らかとなった。従って、接着分子における糖鎖修飾の研究は、細胞接着を理解する上で重要であると考えられる。

これまで、申請者は、糖鎖遺伝子を用いて細胞の糖鎖を人為的に改変して細胞の性質を変換させる手法を用いて、糖鎖が単なる飾りではなく、さまざまな生物機能の発信源であることを明らかにしてきた。例えば、臨床的にもがん転移や予後と、最も相関が高いとされている N-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT-) を過剰発現させると実験的にもがん細胞

の移動が促進することを実証した。また、GnT- が作る糖鎖構造を、別の糖鎖遺伝子 N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) の過剰発現によって糖鎖工学的に破壊すると、がん細胞の移動が著しく抑制されることを証明した。これらの変化は、糖タンパク質である接着分子や成長因子受容体の機能改変によるところが大きいと考えられる。実際、E-カドヘリン、インテグリン等の接着分子や、EGF レセプター、TGF- レセプター等の成長因子受容体上の糖鎖の変化がこれら分子の機能を変え、さらには細胞内シグナルの変化をきたすことを明らかにしてきた。

また、申請者らは、E-カドヘリンを介する細胞間接着により特異的に GnT-III が強く誘導され、その結果、インテグリンの機能が低下し、細胞移動が抑制されることを発見した (Iijima, et al. JBC. 281: 13038-46, 2006 ; Akama, et al. Proteomics 8: 3221-3228, 2008)。このことから、E-カドヘリンを介した細胞-細胞間の接着が糖鎖変化を通じて細胞-ECM間の接着を制御できる可能性が示唆された。細胞間接着と細胞-ECM間接着との相互作用は、初期胚発生や器官形成の過程だけではなく、がんの転移・浸潤の過程においても重要である。つまり、それらの過程は Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT: 上皮間葉移行) と深く関わっている。EMT は、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、細胞間接着が弱くなる一方、細胞-ECM間接着が適度に促進されることが知られている。従って、細胞間接着により誘導された糖鎖遺伝子の発現とその機能解析は、細胞接着間のクロストークの理解に不可欠である。

2. 研究の目的

真核生物では、生合成されたタンパク質は細胞内で修飾およびプロセッシングを受けてはじめて機能を発揮するようになる。そのため、多くの生命現象を分子レベルで理解するためにはゲノム中心の研究だけでは不十分であり、これを補完する細胞内翻訳後修飾の研究が重要である。タンパク質の翻訳後修飾の中でも糖鎖付加はその構造的多様性から様々な生物学的プロセスに関与すると考えられている。本研究では『細胞接着における糖鎖の変化とその意義』という研究課題を掲げる。細胞接着分子に付加される糖鎖は、細胞接着、細胞間認識や細胞内シグナル伝達と言った細胞機能に密接に関わっていることが明らかになりつつある。しかし、細胞膜上の糖鎖はどのようにして細胞接着を制御するのか、または細胞接着によって糖鎖がどのように変化するのかという詳細な分子メカニズムは、多くが不明である。その分子的基盤の解明は生理的な細胞内情報伝達システムや、そのシステムの破綻によるがん化などの原因解明に不可欠である。本研究の目的は、糖鎖による細胞接着の制御および細胞接着による糖鎖発現の調節を統合的に理解し、細胞接着における糖鎖の本質的な機能を明らかにするところにある。

3. 研究の方法

本研究では、細胞間接着と細胞-ECM 間接着に焦点を絞って、細胞接着における糖鎖の機能発現とその意義を明らかに、以下の項目について詳しく解析した。

- (1) 細胞低密度培養および高密度培養システムを用いて、E-カドヘリンを介した細胞間接着による糖転移酵素の発現機構
- (2) 細胞間接着を破壊するモデルとして

TGF- 誘導した EMT において糖鎖遺伝子の発現

- (3) 逆に糖鎖遺伝子発現による細胞間接着への影響
- (4) 糖鎖変化によるインテグリンの機能制御
- (5) がん遺伝子による糖鎖とその変化によるインテグリンの機能制御

4. 研究成果

(1) これまで、申請者は、細胞低密度培養および高密度培養システムを用いて、糖転移酵素の発現を調べ、GnT-III の発現は E-カドヘリンを介する細胞間接着によって特異的に誘導されることを明らかにした。また、E-カドヘリンのアドヘレンス・ジャンクションを形成する一員である β -カテニンは、その GnT-III の発現誘導に必須であることも分かった。ところが、予想に反して、 β -カテニンの欠損細胞あるいはロックダウン細胞または化学物質によって β -カテニンの核への移行を阻害した時に GnT-III の発現が著しく増加した。Wnt3a の刺激または GSK-3 の活性化では GnT-III の発現が抑制された (Xu, Q. et al., JBC 286: 4310-8, 2011)。これらの結果は、 β -カテニンが正反対に GnT-III の発現を制御することを示しており、糖鎖変化を通じて細胞接着が緻密に制御されていることが強く示唆している。

(2) 細胞培養密度の変化で EMT を誘導するモデル細胞(乳がん細胞: MCF10A)を用いて、TGF- で誘導した EMT における糖鎖の発現変化を調べた。その結果、GnT-III の発現を強く抑制する一方、GnT-III の働きと反対する GnT-V の発現を逆に促進した。さらに、GnT-III の発現によって細胞表面に発現する E-カドヘリンの turnover 遅延などで EMT の形成

が抑制された (Xu,Q., et al. JBC 287:16563, 2012)。また、最近シアリル化糖鎖が劇的に変化することを見出した。さらに、そのシアリル化の増加がインテグリン機能の向上およびがん細胞移動の促進に大事であることを明らかになった (Lu, et al., 投稿中)

(3) GnT-IIIの発現はインテグリン 6 4、6 1 およびラミニンなどの細胞接着分子の機能 (Kariya,et al. JBC,285:3330, 2010) また、インテグリン-ラミニン-EGF 受容体形成 (PLoS ONE, 6: e27084, 2011) を制御することが明らかになった。

(4) がん遺伝子 GOLPH3(Golgi phosphoprotein 3) が種々の固形癌において増加し、AKT・mTOR 経路が亢進していること、酵母の相同分子 (VPS74) は糖転移酵素のゴルジ体局在に必須であることが報告された。申請者らは、GOLPH3 が細胞表面のシアリル化糖鎖の変化を通じてインテグリンを介した細胞浸潤活性や癌の悪性度に関与していることが明らかとなった (Isaji,T., et al. JBC, in press, 2014)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 件)

- (1) N-glycosylation of the I-like domain of beta1 integrin is essential for beta1 integrin expression and biological function: Identification of the minimal N-glycosylation requirement for alpha 5beta 1. Isaji, T., Sato, Y., Fukuda, T. and Gu, J. *J. Biol. Chem.* 284:12207-16, 2009
- (2) An N-glycosylation site on the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. Sato, Y., Isaji, T., Tajiri, M., Yoshida-Yamamoto, S., Yoshinaka, T.,

- Somehara, T., Fukuda, T., Wada, Y. and Gu, J. *J. Biol. Chem.* 284:11873-81, 2009
- (3) Bisecting GlcNAc residues on laminin-332 downregulates galectin-3 dependent keratinocyte motility. Kariya, Y., Kawamura, C., Tabei, T., Gu, J. *J. Biol. Chem.* 285:3330-3340, 2010
- (4) Wnt/ β -catenin Signaling Down-regulates N-Acetylglucosaminyltransferase III Expression:The implication of two mutually exclusive pathways for regulation. Xu, Q., Akama, R., Isaji, T., Lu, Y., Hashimoto, H., Kariya, Y., Fukuda, T., Du, Y., and Gu, J. *J. Biol. Chem.* 286: 4310-8, 2011
- (5) α 1,6-Fucosyltransferase-deficient mice exhibit multiple behavioral abnormalities associated with a schizophrenia-like phenotype: importance of the balance between the dopamine and serotonin systems. Fukuda, T., Hashimoto, H., Okayasu, N., Kameyama, A., Onogi, H., Nakagawasai, O, Nakazawa, T., Kurosawa, T., Hao, Y., Isaji, T., Tadano, T., Narimatsu, H., Taniguchi, N. and Gu, J. *J. Biol. Chem.* 286: 18434-43, 2011
- (6) N-glycosylation of β 4 integrin controls the adhesion and motility of keratinocytes. Kariya, Y. and Gu, J. *PLoS One.* 6:e27084. 2011
- (7) Core fucosylation of mu heavy chains regulates the assembly of precursor B cell receptors and its intracellular signaling. Li, W., Liu, Q., Pang, Y., Jin, J., Wang, H., Cao, H., Li, Z., Wang, X., Ma, B., Chi, Y., Wang, R., Kondo, A., Gu, J. and Taniguchi, N. *J Biol Chem.* 287:2500-2508, 2012
- (8) Roles of N-acetylglucosaminyltransferase III in epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in epithelial cell lines. Xu, Q., Isaji, T., Lu, Y., Gu, W., Kondo, M., Fukuda, T., Du, Y. and Gu, J. *J Biol Chem.* 287:16563-74, 2012
- (9) α 1,6-Fucosylation regulates neurite formation via the activin/phospho-Smad2

pathway in PC12 cells: the implicated dual effects of Fut8 for TGF- β /activin-mediated signaling. Gu, W., Fukuda, T., Isaji, T., Hashimoto, H., Wang, Y and Gu, J. *FASEB J.*, 27:3947-3958, 2013

(10) An oncogenic protein Golgi phosphoprotein 3 up-regulates cell migration via sialylation. Isaji, T., Im, S., Gu, W., Wang, Y., Hang, H., Lu, J., Fukuda, T., Hashii, N., Takakura, D., Kawasaki, N., Miyoshi, H. and Gu, J. *J Biol. Chem.* in press, 2014

〔学会発表〕(計 61 件)

(1) Core fucose and its relationship with diseases、Jianguo Gu、Fudan University Medical School、上海、2014 年 3 月

(2) がん遺伝子 GOLPH3 による N 型糖鎖および細胞接着の制御とその意義、顧建国、第 11 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、宮城、2013 年 10 月

(3) Functional crosstalk between cell-cell adhesion and cell-ECM adhesion via different expression of N-glycans、Jianguo Gu、GLYC022、大連、2013 年 6 月

(4) 細胞接着における N-結合型糖鎖の発現調節とその意義、顧建国、第 85 回日本生化学大会、福岡、2012 年 12 月

(5) Molecular mechanism for the regulation of GnT-III expression and its roles in epithelial-mesenchymal transition、顧建国、8th International Symposium on Glycosyltransferases、ドイツ、2012 年 6 月

(6) 4 インテグリンの機能発現における N-結合型糖鎖の役割、苅谷慶喜、顧建国、第 84 回日本生化学会、京都国際会議場、2011 年 9 月

(7) インテグリンに付加された糖鎖の意義について、伊左治知弥、陸瑩瑩、福田友彦、顧建国、第 77 回日本生化学会東北支部会、東北大学、2011 年 7 月

(8) インテグリンの機能を制御する N-結合型糖鎖、伊左治知弥、川村千尋、陸蛸蛸、福田友彦、顧建国 第 69 回日本癌学会、大阪 2010 年 9 月

〔図書〕(計 7 件)

(1) Laminin-332 and Integrins: Signaling Platform for Cell Adhesion and Migration and its Regulation by N-glycosylation. Kariya, Y., Kariya, Y and Gu, J. Nova Science Publishers Inc., NY, P29-51, 2013

(2) 1,6-Fucosyltransferase 欠損マウスに見られた統合失調症様行動とその解析、顧建国、谷口直之、福田友彦、実験医学 (羊土社) P34-39, 2013

(3) がん転移と EMT における糖鎖の役割、顧建国、医学書院、61:97-103, 2010

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

顧建国 (Gu, Jianguo)
東北薬科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 40260369

(2) 研究分担者

福田友彦 (Fukuda, Tomohiko)
東北薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 40433510

(3) 研究分担者

伊左治知弥 (Isaji, Tomoya)
東北薬科大学・薬学部・助教
研究者番号 : 80433514