

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570142

研究課題名(和文)膜結合型糖鎖修飾酵素NEU3の細胞内輸送機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism for intracellular trafficking of the membrane-bound NEU3 sialidase

研究代表者

山口 壹範 (Yamaguchi, Kazunori)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：80373215

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文):膜結合型の糖鎖代謝酵素NEU3シアリダーゼに関して、EGF受容体刺激後にこの酵素が細胞質から細胞膜近傍に移行するという、糖鎖修飾酵素としてはユニークな性質をわれわれは見出した。本研究ではこのようなNEU3の細胞内輸送機構を明らかにするため、NEU3と相互作用するタンパク質同定を目指した。結果、evectin、CAMK1G、MAP1A、ITM2Cを同定し、また相互作用に必要なドメインを一部明らかにした。以前より、NEU3がシグナル伝達系を調節し、その結果がんや糖尿病の発症に関与することが明らかとなっており、本研究で得られた結果は、その分子機構の詳細を明らかにするための基盤となる事が期待される。

研究成果の概要(英文):We previously found that activation of EGF receptor signaling triggers translocation of the membrane-bound NEU3 sialidase from cytoplasm to cell membrane, which had not been reported for other glycoenzymes. To gain an insight into the molecular mechanism underlying NEU3 intracellular trafficking, we attempted to identify proteins which can interact with NEU3 in cells. We identified evectin, CAMK1G, MAP1A, and ITM2C as potent candidates for NEU3-binding proteins and got structural information about the interaction. These results could provide an important clue for understanding how NEU3 modulates signal transductions and subsequently affects on pathological conditions such as cancer or diabetes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：シアリダーゼ ガングリオシド 細胞内輸送 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

われわれが cDNA を単離した NEU3 シアリダーゼは、糖脂質ガングリオシドに特異的な脱シアリル化酵素で、本研究開始以前の解析から、神経細胞分化、がん細胞のアポトーシス回避と転移能亢進、糖尿病の発症等に関与することが明らかになっていた。糖鎖代謝酵素の多くはリソソームに局在し、糖鎖の恒常性を担っているが、本酵素はラフトやカベオラ等のマイクロドメインに集積し(Wang, *J. Biol. Chem.* 2002)、シグナル伝達系の制御に関与するというユニークな性質を持っていることも示されていた。

われわれは、がんにおける NEU3 のシグナル調節機能に関する研究を進めている中で、血清飢餓条件下で細胞質内に分布していた NEU3 が EGF 刺激後に細胞膜近傍にリクルートされることを見出した (Yamaguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006)。このような細胞内での局在変化が NEU3 の機能を調節し、最終的に細胞増殖、分化、あるいは、がんをはじめとする病態発現に影響を及ぼす可能性が考えられた。

NEU3 の細胞内局在の分子機構に関して、われわれは酵母 two hybrid スクリーニングにより NEU3 結合タンパク質として evectin を同定していた。その後このタンパクが recycling endosome に局在し、その輸送を調節していることが他グループから報告された。従って NEU3 の細胞内局在が recycling endosome を構成要素とする輸送系によって制御されている可能性が高いものと推定された。

2. 研究の目的

NEU3 シアリダーゼの細胞内局在制御機構を明らかにするため、以下の解析を進めた。

NEU3 シアリダーゼと evectin の結合様式を解析する。このために相互作用に寄与するそれぞれのタンパクのドメインを同定する。

evectin 以外で NEU3 と相互作用するタンパクを同定する。

3. 研究の方法

Evectin との結合領域を同定するため、NEU3 の部分配列を GFP (オワンクラゲ由来 green fluorescein protein) の C 末端側に融合させた発現ベクターを複製し、これを evectin 発現ベクターと共に 293T 細胞で発現させ、免疫沈降の際に融合タンパクと evectin が共沈するか確認した。

Evectin 以外の NEU3 と相互作用する分子をスクリーニングするため、evectin との結合に関与しない NEU3 の C 末端側の部分配列を bait に用いた

酵母 two-hybrid 法により、ヒト脳 (NEU3 の発現が高い) 由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。

4. 研究成果

NEU3 のアミノ酸配列 2-212 の領域が evectin と共沈した。さらにこの領域を 1-130 と 131-224 の 2 つの領域に分割しそれぞれの結合能を検討したところ、両ドメイン共に結合活性を示し、これら独立した 2 つのドメインがそれぞれ evectin との結合に寄与している事が示唆された。一方 evectin に関しては同様の解析から 147-C 末の領域が NEU3 との結合に関与している事が示された。evectin は N 末端側に、細胞膜リン脂質と相互作用すると予想される PH ドメインを持っている。従って evectin の C 末端側と結合した NEU3 が evectin の PH ドメインを介して細胞膜と相互作用する可能性が考えられた。

NEU3 と相互作用する分子として CAMK1G, MAP1A, ITM2C が新たに同定された。CAMK1G/CLICK-III

(Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I G) に関しては上記と同様に NEU3 の部分配列との相互作用を GFP 融合タンパクとの共沈により確認したところ NEU3 の C 末端 (341-427) の領域が CAMK1G との相互作用に関与する事が示された。CAMK1G は Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase の一種で、細胞膜のラフトに局在することが知られている。MAP1A (Microtubule-Associated Protein 1A) は微小管に会合する分子で、微小管に沿った物質輸送への関与を示唆する報告がある。ITM2C (Integral Membrane Protein 2C) は機能未知の膜タンパクで脳での発現が高い事が知られている。これらの分子との相互作用が NEU3 の細胞内輸送調節に関与するか、今後、解析を進める予定でいる。

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 11 件)

Shiozaki, K., Takeshita, K., Ikeda, M., Ikeda, A., Harasaki, Y., Komatsu, M., Yamada, S., Yamaguchi, K. and Miyagi, T.: Molecular cloning and biochemical characterization of two novel Neu3 sialidases, neu3a and neu3b, from medaka (*Oryzias latipes*). *Biochimie.* 95(2), 280-289, 2013. 査読有

Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Moriya, S., Koseki, K., Wada, T., Tateno, H., Sato, I., Asano, M., Iwakura, Y. and Miyagi, T.: Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase. *PLoS One*, 7, e41132, doi: 10.1371/journal.pone.0041132, 2012 査読有

Takahashi, K., Mitoma, J., Hosono, M., Shiozaki, K., Sato, C., Yamaguchi, K., Kitajima, K., Higashi, H., Nitta, K., Shima, H. and Miyagi, T.: Sialidase NEU4 hydrolyzes polysialic acids of neural cell adhesion molecules and negatively regulates neurite formation by hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 287, 14816-14826, 2012 査読有

Koseki, K., Wada, T., Hosono, M., Hata, K., Yamaguchi, K., Nitta, K. and Miyagi, T.: Human cytosolic sialidase NEU2-low general tissue expression but involvement in PC-3 prostate cancer cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428, 142-149, 2012. 査読有

Miyagi, T., Takahashi, K., Moriya, S., Hata, K., Yamamoto, K., Wada, T., Yamaguchi, K. and Shiozaki, K.: Altered expression of sialidases in human cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 749, 257-267, 2012. 査読無

Miyagi, T., Takahashi, K., Hata, K., Shiozaki, K. and Yamaguchi, K.: Sialidase significance for cancer progression. *Glycoconj. J.* 29, 567-577, 2012. 査読無

Miyagi, T. and Yamaguchi, K.: Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology*. 22, 880-896, 2012. 査読無

〔学会発表〕(計8件)

宮城妙子, 高橋耕太, 細野雅祐, 塩崎一弘, 山口壹範: シアリダーゼはがんの発がん過程と進展に関与する. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014.9

山口壹範, 那須健太郎, 玉井恵一, 佐藤賢一, 井根省二, 佐々木治, 張替秀郎, 田中伸幸, 菅村和夫: 免疫不全 NOG マウスにより分画された高造腫瘍性 ATL

細胞の性状解析. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014.9

高橋耕太, 細野雅祐, 和田正, 山口壹範, 仁田一雄, 宮城妙子: シアリダーゼ NEU3 による Wnt シグナルを介した大腸がん細胞の造腫瘍能制御機構. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10

宮城妙子, 高橋耕太, 細野雅祐, 山本晃司, 和田正, 秦敬子, 森谷節子, 塩崎一弘, 山口壹範, 仁田一雄: シアリダーゼ NEU3 によるがん化能の制御. 第32回日本糖質学会年会, 大阪, 2013.8

山口壹範, 玉井恵一, 佐藤賢一, 井根省二, 佐々木治, 田中伸幸, 菅村和夫: 免疫不全 NOG マウスを用いた高造腫瘍性 ATL 細胞の単離. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10

4) 高橋耕太, 和田正, 細野雅祐, 山口壹範, 仁田一雄, 宮城妙子: シアリダーゼ NEU3 は Wnt/beta-catenin シグナリングの調節を介してがん幹細胞性の維持に関与する. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9

宮城妙子, 高橋耕太, 細野雅祐, 和田正, 森谷節子, 秦敬子, 山本晃司, 山口壹範, 仁田一雄: シアリダーゼ異常による大腸がんの進展機構と治療への応用. 第31回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2012.9

高橋耕太, 細野雅祐, 和田正, 秦敬子, 山口壹範, 仁田一雄, 宮城妙子: シアリダーゼ NEU3 は大腸がん細胞の Wnt/beta-catenin シグナリングを制御する. 第85回日本生化学会福岡, 2012.12

〔図書〕(計2件)

Miyagi T., Takahashi K., Shiozaki K., Yamaguchi K. *Mammalian Sialidase Assays. Glycoscience: Biology and Medicine* (Eds. Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G.W., Seeberger, P.H., Wong, C.-H.) Springer 1395-1402, 2014

Suzuki, T. and Yamaguchi, K.: *Mammalian Sialidases in Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*, 188-208 Joe Tiralongo and Ivan Martinez-Duncker (Eds), Bentham Science Publishers, 2012,

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.miyagi-pho.jp/mcc/kenkyu/hatugan-seigyoh.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 壹範 (YAMAGUCHI, Kazunori)

宮城県立がんセンター研究所 上席主任
研究員

研究者番号：80373215

(2) 連携研究者

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)

宮城県立がんセンター研究所 部長

研究者番号：60280872

(3) 連携研究者

宮城 妙子 (MIYAGI Taeko)

東北薬科大学 分子生体膜研究所 教授

研究者番号：50006110