

令和元年6月19日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04354

研究課題名（和文）シアル酸による細胞機能制御の分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of sialylation on cell biological functions

研究代表者

顧 建国（GU, Jianguo）

東北医科薬科大学・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） 11,900,000円

研究成果の概要（和文）：これまで、シアル酸の機能に関する研究では、主に 2,3と 2,6結合様式を区別せずにその解析がなされてきた。従って一見矛盾に見える結果が多く報告されてきた。本研究は、細胞接着及びEMTにおける糖鎖、特にシアル酸の発現調節機構、2,3と 2,6シアル酸によるEMT獲得、がんの転移・浸潤・生存への寄与を明らかにした。これらの結果がシア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と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まず、2,3と 2,6シアル酸による細胞機能の緻密な制御を明らかにし、シアル酸の機能に対してその重要性を再認識すること、そして、異なるシアル酸によるEMTおよびがん細胞の転移・浸潤・生存の制御機構を解明することができた。これらの研究は、がん研究のみならず、ESやiPS細胞を利用する再生医療の開発にも新知見を与えるのであろうと考えられる。

研究成果の概要（英文）：So far, many studies on the function of sialic acid on cell biology have not clearly distinguished linkages of 2,3 and 2,6. Therefore, many seemingly contradictory results have been reported. The present study elucidated the regulatory mechanism of expression of N-glycans, especially 2,3 and 2,6 sialylation in cell adhesion and EMT, as well as cancer cell metastasis, invasion and survival. These findings are considered to contribute to the development of next-generation anticancer agents related to sialic acid.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：シアル酸 細胞接着

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内のシアル酸の多くは細胞表面から外に突き出す糖鎖の末端に見出されている。そのシアル酸糖鎖は、周囲に位置する細胞や細胞外からのシグナルを最初に感知する場であり、環境の変化に鋭敏に対応する場とも考えられる。シアル酸を含む糖鎖の生合成・分解は、主にシアル酸を付加するシアリルトランスフェラーゼとシアル酸を除去するシアリダーゼによって触媒され、その産物が少なくとも3種類の結合様式 (Gal/GalNAc に 2,3 or 2,6 結合、またはシアル酸に 2,8 結合) で、糖タンパク質の N 型または O 型糖鎖に存在している。細胞膜タンパク質のシアル酸増加は、がん転移・浸潤に関連する現象とされ、細胞表面のシアル酸含量が転移能と相関するという報告も多くなされていた。しかし、必ずしもシアル酸の量とがん浸潤・転移能が相関するとは限らない例も見出されたことによって、シアル酸の機能に関する研究は下火になりつつある。一方、2,6 シアル酸は、ES や iPS 細胞に高発現することや、EMT (epithelial mesenchymal transition: 上皮間葉移行) と深く関わっている細胞間接着と細胞-細胞外マトリクス (ECM) 間接着における重要な役割を持っていることが報告されていた。また、Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) は、多くの固形癌に高頻度で増幅され、がんの予後と負に相関する強力ながん遺伝子であるが、シアル酸修飾を制御することでがん細胞の転移・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出された (Isaji, et al., JBC. 2014)。しかし、それらの詳細な分子機序や具体的な機能については殆んど不明であった。そこで、申請者は、糖鎖発現制御 (特にシアル酸) とその機能を着目し研究を行った。

### 2. 研究の目的

がん化に伴い、細胞表面のタンパク質や脂質上の糖鎖構造は変化することがよく知られている。特に、酸性糖であるシア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きた。しかし、その実体についてはいまだに不明な点が多い。本研究は、「シアル酸による細胞機能制御の分子機構の解明」という課題を掲げ、申請者らの知見を踏まえ、ほとんど知られていない細胞接着による糖鎖発現の変化とその意義に加え、シアル酸によるがん細胞の浸潤・転移・生存の制御機構を解明し、今後のがん研究、がんの予防や治療に貢献する新知見の提示を目指す。

### 3. 研究の方法

がん細胞の 2,3 と 2,6 シアル酸の異なる機能に注目し、シアル酸による細胞機能制御の分子機構の解明を目指すため、以下の3点について詳しく解析する。

- (1) がん細胞の転移・浸潤と深く関わる N 型糖鎖分岐構造の主な糖鎖遺伝子である GnT-III, Fut8 や GnT-V の発現、シアル酸発現及び複合型 N-型糖鎖の有無との関連性に注目し、EMT におけるシアル酸発現とその機能調節を明らかにする。
- (2) 遺伝子欠損や強発現の手法を用いて、2,3 と 2,6 シアル酸による標的分子の修飾や各 2,3 シアル酸転移酵素の特異性に注目して、シアル酸付加によるがん細胞の転移・浸潤・生存への影響およびその分子メカニズムを解明する。
- (3) 免疫沈降や免疫染色法を用いて GOLPH と結合する Phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) によるシアル酸付加の制御機構の解明を目指す。

### 4. 研究成果

がん化に伴い、細胞表面のタンパク質や脂質上の糖鎖構造は変化することがよく知られている。特に、酸性糖であるシア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がモデル分子として研究を行ってきた。その結果、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; Sci Rep. 2016; MCB. 2017)。インテグリンを介したがん細胞の増殖・移動の制御に 2,6 シアル酸の修飾も重要であることを明らかにした (Hou, et al. Sci Rep. 2016; FASEB J. 2016; Lu, et al., JBC. 2016)。また、我々は高マンノース型と複合型およびハイブリッド型の N-型糖鎖の機能を明確に区別するために、高マンノース型の糖鎖しか作れない GnT-I 欠失細胞を樹立し、解析した。高マンノース型糖鎖が主に細胞間接着に寄与し、シアル酸を含む複合型糖鎖が ECM 接着や癌の悪性化や転移に重要な役割を果たす EMT に働くことが明らかとなった (Zhang, et al., FASEB J. 2019)。また、複数の 2,3 シアル酸転移酵素の中にある特定の 2,3 シア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 (投稿準備中)。

さらに、GOLPH3のPHドメインと結合するPI4Pに注目し、PI4キナーゼがシア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、その修飾にはインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ ではなく、 $\alpha 3 \beta 1$ とPI4キナーゼ間の相互作用が必要であることも明らかになった (Isaji, et al., JBC. 2019)。 $\alpha 3 \beta 1$ とPI4キナーゼのどちらか欠失またはノックダウンさせるとシアル酸修飾が著しく低下した。今後、他の糖鎖構造の生合成への影響を含めた詳細な分子機序を解明して行く。これらの研究は、シア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がん研究のみならず、ESやiPS細胞を利用する再生医療の開発にも新知見を与えるのであろうと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Isaji, T., Im, S., Kameyama, A., Wang, Y., Fukuda, T. and Gu, J., A complex between phosphatidylinositol 4 kinase II and integrin  $\alpha 3 \beta 1$  is required for N-glycan sialylation in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 査読有, 2019, 294: 4425-4436.

Xu, Z., Isaji, T., Fukuda, T., Wang, Y. and Gu, J., O-GlcNAcylation regulates integrin-mediated cell adhesion and migration via formation of focal adhesion complexes. *J. Biol. Chem.* 査読有, 2019, 294: 3117-3124.

Zhang, G., Isaji, T., Xu, Z., Lu, X., Fukuda, T. and Gu, J., N-Acetylglucosaminyltransferase I as a novel regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *FASEB J.*, 査読有, 2019, 33: 2823-2835. doi: 10.1096/fj.201801478R.

Kariya, Y., Oyama, M., Hashimoto, Y., Gu, J. and Kariya, Y.,  $\alpha 4$  integrin/PI3K Signaling Promotes Tumor Progression through Galectin-3-N-glycan Complex. *Mol. Cancer Res.*, 査読有, 2018, 16:1024-1034. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0365.

Zhou, Y., Fukuda, T., Hang, Q., Hou, S., Isaji, T., Kameyama, A., and Gu, J., Inhibition of fucosylation by 2-fluorofucose suppresses human liver cancer HepG2 cell proliferation and migration as well as tumor formation. *Sci Rep.* 査読有, 2017, doi: 10.1038/s41598.

Hang, Q., Isaji, T., Hou, S., Wang, Y., Fukuda, T. and Gu, J., A key regulator of cell adhesion: Identification and characterization of important N-glycosylation sites on integrin  $\alpha 5$  for cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 査読有, 2017, 37: e00558-16.

Hou, S., Hang, Q., Isaji, T., Lu, J., Fukuda, T. and Gu, J., The importance of membrane-proximal N-glycosylation on integrin  $\alpha 1$  in its activation and complex formation. *FASEB J.* 査読有, 2016, 30: 4120-31.

Hang, Q., Isaji, T., Hou, S., Zhou, Y., Fukuda, T. and Gu, J., N-Glycosylation of integrin  $\alpha 5$  acts as a switch for EGFR-mediated complex formation of integrin  $\alpha 5 \beta 1$  to  $\alpha 6 \beta 4$ . *Sci. Rep.* 査読有, 2016, doi: 10.1038/srep33507.

Lu, J., Isaji, T., Im, S., Fukuda, T., Kameyama, A. and Gu, J., Expression of N-acetylglucosaminyltransferase III suppresses  $\alpha 2,3$  sialylation and its distinctive functions in cell migration are attributed to  $\alpha 2,6$  sialylation levels. *J. Biol. Chem.* 査読有, 2016, 291: 5708-20.

Hou, S., Isaji, T., Hang, Q., Im, S., Fukuda, T. and Gu, J., Distinct effects of  $\alpha 1$  integrin on cell proliferation and cellular signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Sci. Rep.* 査読有, 2016, Doi: 10.1038/srep18430.

Gu, W., Fukuda, T., Isaji, T., Hang, Q., Lee, H., Sakai, S., Morise, J., Mitoma, J., Higashi, H., Taniguchi, N., Yawo, H., Oka, S. and Gu, J., Loss of  $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase decreased hippocampal long-term potentiation: implications for core fucosylation in the regulation of AMPA receptor heteromerization and cellular signaling. *J. Biol. Chem.* 査読有, 2015, 290:17566-75.

Wang, Y., Fukuda, T., Isaji, T., Lu, J., Im, S., Hang, Q., Gu, W., Hou, S., Ohtsubo, K. and Gu, J., Loss of  $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase inhibits chemical-induced hepatocellular carcinoma and tumorigenesis by down-regulating multiple cellular signaling. *FASEB J.*, 査読有, 2015, 29:3217-27.

Wang, Y., Fukuda, T., Isaji, T., Lu, J., Gu, W., Ohkubo, Y., Kamada, Y., Taniguchi, N., Miyoshi, E. and Gu, J., Loss of  $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase Suppressed Liver Regeneration: Implication of Core Fucose In The Regulation of Growth Factor Receptor-mediated Cellular Signaling. *Sci. Rep.* 査読有, 2015, DOI: 10.1038/srep08264.

Hang, Q., Isaji, T., Hou, S., Im, S., Fukuda, T. and Gu, J., Integrin  $\alpha 5$  suppresses the phosphorylation of epidermal growth factor receptor and its cellular signaling of cell proliferation via N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 査読有, 2015, 290:29345-60.

〔学会発表〕(計 18 件)

顧 建国, PTM of glycosylation in cell adhesion and EMT of cancer cells and diseases, 北京大学・生命科学学院学术セミナー, 北京市, 2019年3月, 招待講演

顧 建国, Functions of N-glycan in EMT and cancer cells: switching of EMT by N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I), 第 10 回南京腫瘍診断治療国際会議, 南京市, 2018 年 11 月, 要旨集 p22, 招待講演

張 国偉, 伊左治知弥, 陸需, 徐志偉, 福田友彦, 顧建国, GnT-I は上皮間葉転換と間葉上皮転換を制御する, 第 37 回日本糖質学会年会, 仙台, 2018 年 8 月, 演題番号 P-016

伊左治知弥, 徐志偉, 福田友彦, 顧建国, O-GlcNAc修飾による細胞接着と細胞移動の制御, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 2018年9月, 演題番号3P-050

顧 建国, Functional expression of N-glycans in cell adhesion and EMT, The 11<sup>th</sup> International Symposium on Glycosyltransferases, 青島, 2018 年 6 月, 要旨集 p22, 招待講演

顧 建国, Importance of N-glycosylation in cell adhesion and EMT, IUBMB Special Meeting Frontiers in Glycoscience II: Oncology, 台北市, 2017 年 12 月, 要旨集 p45

顧 建国, N-glycosylation in cancer cells and towards application, 第 9 回南京腫瘍診断治療国際会議, 南京市, 2017 年 11 月, 要旨集 p102, 招待講演

顧 建国, 杭慶雷、伊左治知弥、侯思聡、福田友彦, インテグリン 5 の糖鎖が細胞増殖・運動の鍵となる, 第 36 回日本糖質学会年会, 旭川, 2017 年 7 月, 要旨集 P83

杭 慶雷、伊左治 知弥、侯 思聡、福田 友彦、顧 建国, N-glycosylation on Integrin 5 define active integrin 5 1 internalization to regulate cell migration, 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016 年 9 月, プログラム集 P111

Jianguo Gu, Roles of N-glycan in EMT and cellular signaling, 2016 年中国糖生物学学术会議, 2016 年 8 月, 南通, 招待講演

杭 慶雷、伊左治 知弥、侯 思聡、福田 友彦、顧 建国, N-glycosylation on Integrin 5 serve as an on/off switch to regulate EGFR signaling, 日本生化学会東北支部、弘前大学、2016 年 5 月、要旨集 P20

顧 建国, がん細胞接着と EMT における糖鎖の機能発現とその制御, 東北薬学支部会総会学术講演会、2016 年 6 月、東北大学、招待講演

侯 思聡、伊左治 知弥、杭 慶雷、任 翔壘、福田 友彦、顧 建国, Functions of integrin 1 in the cellular signaling for cell proliferation and importance of N-glycosylation, 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, 神戸 2015 年 12 月, 要旨集 P500

Jishun Lu, Tomoya Isaji, Sanghun Im, Tomohiko Fukuda, and Jianguo Gu, The interplay of N-acetylglucosaminyltransferase III and sialyltransferases in the regulation of cell motility, 7<sup>th</sup> Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG), Miyagi, Nov. 2015, 要旨集 P58

Sanghun Im, Tomoya Isaji, Tomohiko Fukuda and Jianguo Gu, PIKII regulates sialylation on glycoproteins, 7<sup>th</sup> Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG), Miyagi, Nov. 2015, 要旨集 P100

Jianguo Gu, Roles for glycans in cell adhesion and migration, 7<sup>th</sup> Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG), Miyagi, Nov. 2015, 要旨集 P56

顧 建国, N-glycosylation in cancer cells, 2015 年南京腫瘍生物学診断治療国際研討会, 2015 年 10 月、南京、keynote 要旨集 P12, 招待講演

杭 慶雷、伊左治 知弥、侯 思聡、任 翔壘、福田 友彦、顧 建国, Integrin 5 suppresses the phosphorylation of EGFR and its cellular signaling of cell proliferation via N-glycosylation, 第 9 回東北糖鎖研究会, 宮城, 2015 年 9 月, 要旨集 P73

〔図書〕(計 3 件)

福田 友彦, 顧 建国, 統合失調症, 未来を創るグライコサイエンス(株式会社エム・ディー・オー), p74-76, 2018 年

顧 建国, 糖タンパク質, 未来を創るグライコサイエンス(株式会社エム・ディー・オー), p213-215, 2018 年

顧 建国, 糖タンパク質-構造・生合成・代謝: N 結合型糖鎖、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック, 創薬・医療から食品開発まで、エヌ・ディー・エス社, p13-17, 2015 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/drg/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：陸 吉順  
ローマ字氏名：(LU, Jishun)  
所属研究機関名：東北医科薬科大学  
部局名：薬学部  
職名：ポストドクター  
研究者番号(8桁)：00649056

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：伊左治 知弥  
ローマ字氏名：(ISAJI, Tomoya)  
研究協力者氏名：福田 友彦  
ローマ字氏名：(FUKUDA, Tomohiko)