

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号： 82626
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010~2012
 課題番号： 22590198
 研究課題名（和文）ムチン型糖蛋白質による微絨毛形成機構と細胞接着におよぼす機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of microvillous formation mechanism and cell adhesion regulation by mucin-type glycoproteins

研究代表者

立花 宏一 (TACHIBANA KOUICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学部門・主任研究員

研究者番号：80216986

研究成果の概要（和文）：白血球表面ムチン型糖蛋白質である CD43、CD34 などを HEK293T 細胞に発現させると細胞の球状化および細胞表面微絨毛形成促進が起こることを発見した。さらに、この細胞表面形態変化は、ムチン型糖蛋白質の細胞接着阻害による細胞骨格蛋白質 ERM 活性化を介することを明らかにした。一方、細胞表面構造はそれ自身が細胞接着を阻害することが示唆された。これらは白血球の形態形成および接着制御機構の一端であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found expression of leukocyte surface mucin such as CD43 or CD34 resulted in microvillus formation and spherical cell shape in HEK293T cells. These phenomena were induced by the inhibition of cell adhesion by mucins via activation of ERM proteins. Meanwhile, such cell surface structure itself appears to inhibit cell adhesion. These are potential mechanisms for the cell shape formation and cell adhesion regulation in leukocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：6901-2

キーワード：ムチン型糖蛋白質、細胞接着、微絨毛、ERM 蛋白質、リン酸化、細胞骨格、細胞球状化

1. 研究開始当初の背景

微絨毛（マイクロビライ）は動物細胞の一部にある直径 0.1~0.2 μ m の毛様の特徴的な細胞表面構造である。小腸上皮細胞や尿細管上皮細胞において微絨毛は brush border を形成し、細胞膜面性を拡げて物質吸収を促進すると共に、微生物等の上皮細胞への接着・侵

入を阻害していると考えられている。一方、白血球や卵細胞においては細胞接着制御に関与しているのではないかと考えられていたが、接着における微絨毛の機能は明確にされていなかった。また、微絨毛は中心縦方向に伸びている数本のアクチン繊維束が細胞膜に覆われている構造をしているが、その形

成メカニズム、特に白血球表面微絨毛の形成機序については明らかになっていなかった。当時他のグループより、gicerin、あるいは、podocalyxin という蛋白質を細胞に発現させると微絨毛形成を促進するという報告があった。一方、研究代表者は白血球表面抗原である CD43 や CD34 を HEK293T 細胞に発現させると細胞表面に微絨毛形成を促進する事を発見していた。CD43 および CD34 は gicerin や podocalyxin と同じくムチン型細胞表面糖蛋白質であり、特に白血球表面に多く発現している事がわかっていた。そこでこれら白血球表面抗原ムチン型糖蛋白質が、白血球表面の微絨毛形成に何らかの関わりを有しているのではないかと考えられた。CD43 は細胞接着阻害因子であることが知られており、CD43 等の細胞接着制御機構と微絨毛との関係についても興味を持たれた。CD43 は白血球に広く発現しているのに対し、CD34 は造血前駆細胞など限られた種類の白血球および一部血管内皮細胞に発現していることが判っていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

(1) CD43, CD34 等白血球で発現の見られるムチン型糖蛋白質の細胞表面微絨毛形成や細胞球状化における役割を明らかにする。また、細胞接着制御部位であると言われているムチン型糖鎖結合部位が上記細胞表面形態形成に及ぼす機能について明らかにする。

(2) 上記ムチン型糖蛋白質による微絨毛形成および細胞球状化のメカニズムを明らかにする。特に細胞形態を決定する細胞骨格の変化、および、その変化をもたらす細胞内シグナル伝達機構について生化学的解析により明らかにする。

(3) 細胞形態、特に微絨毛と、細胞接着制御の関係を明らかにする。CD43 等ムチン型糖蛋白質はしばしば細胞接着制御因子と考えられているが、微絨毛や細胞の球状化がこの細胞接着制御機構の一部であるか明らかにする。

ことである。

3. 研究の方法

(1) ムチン型糖蛋白質の微絨毛形成における機能を明らかにする為に、発現ベクターに結合した CD43, CD34 等のムチン型糖蛋白質遺伝子を HEK293T 細胞に導入する事でムチン型糖蛋白質やその欠失ミュータント、他の膜蛋白質とのキメラ蛋白質などを発現させ、細胞表面の微絨毛形成や細胞の球状化、細胞接着の阻害を見る。特に微絨毛については電顕以外に観察する良い方法が無かったので、走査・透過電顕にて確認しつつ、蛍光色素・蛍光蛋白質と蛍光顕微鏡の組み合わせで微絨

毛を観察する方法を開発して解析に用いる。また、ムチン型糖蛋白質のどの部分が微絨毛形成等に必要十分か欠失ミュータントやキメラ蛋白質などの解析結果から明らかにすると共に、ムチン型糖蛋白質の細胞接着抑制部位の微絨毛形成・細胞球状化など細胞形態制御における役割を明らかにする。一方、細胞表面のムチン型糖蛋白質やインテグリン等接着因子の細胞での局在を、特異抗体等を用いて蛍光顕微鏡で解析する。

(2) 内在性の CD43, CD34 等ムチン型糖蛋白質を発現している白血球系細胞の表面構造を電顕および蛍光顕微鏡で観察し、微絨毛等細胞表面形態を明らかにする。また、上記ムチン型糖蛋白質の細胞表面発現を遺伝子ノックダウンや特異切断酵素処理による切断で除去した場合の細胞接着および細胞表面形態の変化を観察する。これらのアプローチにより白血球表面ムチン型糖蛋白質の細胞接着と細胞表面形態形成における役割を明らかにする。

(3) ムチン型糖蛋白質の細胞形態制御メカニズムを明らかにする為に、ムチン型糖蛋白質発現時の各種細胞内シグナル伝達の変化を生化学的解析により明らかにする。特に細胞形態の主な細胞内因子である細胞骨格蛋白質に着目し、ムチン型糖蛋白質発現による細胞骨格蛋白質のシグナル制御について解析する。また、ムチン型糖蛋白質がそのシグナル伝達を引き起こすメカニズムについて細胞生物学的・生化学的手法を用いて明らかにする。

(4) 微絨毛などの細胞表面形態が細胞接着に及ぼす影響を細胞生物学的方法で解析する。具体的には上記(2)の方法でムチン型糖蛋白質ないしその一部分を除去した場合、あるいは、薬剤や生理活性物質処理で微絨毛等を変化させた場合の細胞接着の変化を明らかにし、ムチン型糖蛋白質ムチン領域による細胞接着阻害とは別に、微絨毛や球形の細胞形態が細胞接着制御に関与しているか調べる。

4. 研究成果

本研究期間中に以下の成果が得られた。

(1) ①CD43, CD34 等ムチン型糖蛋白質発現により付着細胞である HEK293T 細胞の細胞-基質接着は減少し、細胞は球状化する。また、細胞表面の微絨毛形成が数、長さ共に著しく促進される。細胞表面の毛状突起増加は走査電顕ならびに細胞膜付着蛍光蛋白質を用いた蛍光顕微鏡観察により結果が得られており、この毛状突起が微絨毛であることは透過電顕およびアクチンポリマーに結合する蛋白質を用いた蛍光顕微鏡観察により達成している。CD43 および CD34 は球状の細胞表面ならびに微絨毛上に一様に局在する事

を、特異抗体による免疫染色ならびに蛍光蛋白質とのキメラ蛋白質発現により明らかにしている。また、ムチン型糖蛋白質発現による細胞接着阻害は、 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンを発現させた HEK293T 細胞およびそれに CD43, CD34 等を発現させた細胞を一度はがした後 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンのリガンドをコーティングした基質に結合させる実験により判定した。その結果、ムチン型糖蛋白質発現により、HEK293T 細胞の $\alpha 4\beta 1$ インテグリンを介する再接着は強く阻害されていた。

②CD43 の欠失ミュータントおよび CD43 と他の膜蛋白質とのキメラ蛋白質を用いた解析より、上記①の現象はすべて CD43 の細胞外および膜貫通ドメインの発現で引き起こされることがわかった。また、CD43 発現細胞をムチン型糖蛋白質のムチン領域を切断する *O*-sial glycoprotein endopeptidase (OSGEPase) で処理すると、インテグリンを介した細胞接着が一部認められるようになることから、CD43 の細胞接着阻害作用の少なくとも一部は細胞外ムチン領域によると考えられる。CD43 の細胞外ムチン領域は細胞接着阻害機能を有する事から、細胞接着阻害にリンクして微絨毛形成や細胞球状化が誘導されることが考えられた。

(2) CD43, CD34 等ムチン型糖蛋白質発現により HEK293T 細胞表面に形成された微絨毛を免疫染色すると、微絨毛はアクチンポリマー以外に Ezrin 蛋白質に対する抗体に強く反応した。また、CD43 あるいは CD34 を HEK293T 細胞で発現させると、細胞骨格蛋白質 ERM (Ezrin/Radixin/Moesin の 3 つの蛋白質の略称) C 末 Thr 残基のリン酸化を誘導した。ERM 蛋白質は細胞膜蛋白質とアクチン繊維をつなぐリンカーであることが知られており、ERM 蛋白質 C 末 Thr 残基のリン酸化は ERM 蛋白質のリンカー機能の活性化を意味する。微絨毛は中央にアクチン繊維束を持ち、また、球状化細胞の細胞膜下にはアクチンネットワークがある。微絨毛でも球状化細胞表面でも、アクチン繊維と細胞膜をリンクさせているのは ERM 蛋白質である事が判っている。従って、この ERM 蛋白質の C 末リン酸化がムチン型糖蛋白質による細胞形態制御のメカニズムの一部ではないかと考えられる。一方、上記 (1) で述べた様に CD43 の細胞外領域発現は HEK293T 細胞での微絨毛形成促進に必要十分であった。CD43 の細胞外ムチン領域は細胞接着阻害部位として知られているので、細胞接着阻害が ERM 蛋白質 C 末リン酸化の原因ではないかと考えられた。そこで、HEK293T 細胞を単にトリプシン処理で基質よりはがし、基質に接着しない様に swirling しながら培養すると、ERM 蛋白質 C 末リン酸化が認められ、基質に接着させるとリン酸化は減少した。この結果より、ムチン型糖蛋白質発現

に限らず細胞接着を阻害すると ERM 蛋白質のリン酸化が亢進することが明らかになった。これらの結果より、ムチン型糖蛋白質は細胞接着を阻害することにより ERM 蛋白質 C 末リン酸化を介して細胞形態を制御するのではないかと考えられた。

(3) 内在性に発現しているムチン型糖蛋白質の機能を調べるため、内在性 CD34 を高発現している KG-1 細胞の解析を行った。走査電顕で観察すると KG-1 細胞は球状で細胞表面は微絨毛で覆われている。免疫染色によ細胞表面に $\alpha 4\beta 1$ インテグリンを発現していることが明らかになったが、 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンを介する細胞接着は阻害されていた。この KG-1 細胞をムチン型糖蛋白質のムチン領域を切断する OSGEPase で処理すると、インテグリンを介した接着が一部認められる。このことから、CD34 においてもムチン領域が細胞接着阻害機能を有していることが明らかになった。

(4) しかし、その一方で、OSGEPase 処理により KG-1 細胞表面の CD34 ムチン領域を除去しても、インテグリンを介する細胞接着は一部の細胞に留まる。また、接着した OSGEPase 処理 KG-1 細胞を高倍の顕微鏡で観察すると、細胞は球状で接着部位にも微絨毛が認められ、細胞は spread して基質に結合していない。一方、KG-1 細胞を薬剤で分化誘導すると基質に接着する様になるが、その場合には上記とは異なり、微絨毛は崩壊し細胞は spreading して球状ではなくなる。これらの結果より、CD34 ムチン領域の細胞接着阻害機能とは別に、一度微絨毛等の細胞表面形態が形成されると、その形態そのものが細胞接着を制御する要因になることが考えられる。

上記 (1) -①のムチン型糖蛋白質の微絨毛形成・細胞球状化機能に関しては、CD43, CD34 に関しては初めての知見である。一方、(2) の細胞接着阻害による ERM 蛋白質 C 末リン酸化の誘導およびその細胞形態形成との関係、(4) の微絨毛等細胞表面形態による細胞接着制御、および、(1) -②、(3) に関しては全く新規の発見である。これらの知見は白血球等の細胞表面形態形成および細胞接着制御のメカニズムを理解する上で重要であると共に、免疫現象や疾患のメカニズムを理解することや白血球の遊走を抑制する事で炎症を制御する手法の開発に貢献することが考えられる。

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 1 件)

Yamane J, Ohnishi H, Sasaki H, Narimatsu

H, Ohgushi H, Tachibana K. Formation of microvilli and phosphorylation of ERM family proteins by CD43, a potent inhibitor for cell adhesion. *Cell Adhesion & Migration* 5;119-132, 2011, DOI: 10.4161/cam.5.2.13908 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 立花宏一、山根順子、細胞接着阻害因子 CD43 によるマイクロブライ形成機序の解析, CD43. BMB2010, 2010年12月7日、神戸
- ② Tachibana K, Yamane J. Cell surface sialomucin, CD43, induces Microvillous formation via inhibition of cell adhesion. 日本生物物理学会年会、2010年9月22日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 宏一 (TACHIBANA KOUICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：80216986