

平成21年 6月 1日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2007~2008

課題番号:19790068

研究課題名(和文) インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の機能糖鎖モジュールの同定研究課題名(英文) Identification of functional module of N-glycans on $\alpha 5 \beta 1$ integrin

研究代表者

伊左治 知弥(ISAJI TOMOYA)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号:80433514

研究成果の概要:

インテグリンの鎖と鎖の機能発現に最低限必須であるN-結合型糖鎖付加部位を決定した(Isaji et al J.Biol.Chem.,284,12207-12216,2009)。これにより、元来非常に困難であったこの受容体に基づいた薬物デザインに有益である結晶構造解析が可能になるかもしれない。さらに特定のN-結合型糖鎖付加部位が機能調節に重要であることを世界で初めて明らかにした(Sato et al J. Biol.Chem.,284,11873-1188,2009)。糖鎖は、ランダムに修飾され、ヘテロな構造を示すと考えられてきたが、リン酸化のように付加部位に特異的な構造と機能を持っている可能性がある。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野:

科研費の分科・細目:薬学・生物系薬学

キーワード:糖鎖、インテグリン、細胞接着、がん

1. 研究開始当初の背景

我々のグループでは、がん転移・浸潤に最も深く関わる糖転移酵素のターゲット分子が細胞の増殖や接着・移動に関わると考えられている増殖因子レセプターや接着分子インテグリンであることを明らかにしている。さらに、これらの糖蛋白質の糖鎖構造が変化することで接着やそれに伴うシグナル伝達を制御できることを明らかにし、糖鎖とがん転移に関わる分子基盤の解明に近づきつつある(Gu J, Zhao Y, Isaji

T et al. *Glycobiology*. 14, 177-186, 2004)。細胞表面に存在する糖鎖構造の変化による細胞の機能調節が明らかになるにつれ、個々の糖鎖付加と蛋白質の特異性を考慮することが糖鎖機能やがん転移のメカニズムの理解に不可欠になってきている。インテグリンは $\alpha\beta$ 二量体の糖タンパク質である。 $\alpha 5$ 鎖を含めてインテグリン $\beta 1$ 鎖は、12種類もの α 鎖と $\alpha\beta$ 二量体を形成することが知られ、その組み合わせによりインテグリンのリガンド特異性が決定されると考えられている。研究代表者は、(1)インテグリン

$\alpha 5\beta 1$ の α 鎖の機能糖鎖部位を解析し、 β -プロペラドメインにヘテロダイマーの形成と構造の維持に重要な糖鎖付加部位が存在し、特異的な構造を持つことを見出した(Isaji T et al. *J Biol Chem.* 281,33258-33267,2006)、(2)インテグリン $\alpha 5\beta 1$ と $\alpha 3\beta 1$ は同一の $\beta 1$ 鎖をもつが、両者のリガンド特異性も両者を介するシグナル伝達も大きく異なることが知られるが、予備的実験から同じ細胞から得たインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と $\alpha 3\beta 1$ の $\beta 1$ 鎖の糖鎖構造は大きく異なる(3)インテグリンの糖鎖構造はリガンド親和性に関わることを明らかにした。(Isaji T et al. *J Biol Chem.* 279,19747-19754,2004)。これは、糖鎖修飾の違いがこのインテグリンに大きな違いをもたらしていることを示唆する。しかし、 $\beta 1$ 鎖の糖鎖構造と機能に関してはまったく不明であるし、個々の糖鎖付加部位の機能に関しても十分に理解されていない。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ の機能糖鎖モジュールを用いて、がん転移抑制に繋がる薬剤のグランドデザインを構築することである。すなわち、部位特異的な糖鎖構造と機能を明らかにし、26本以上も付加されている糖鎖がインテグリンの細胞膜へのターゲティングや接着・シグナルといった本質的な機能に関わるか検討し、その特異的な糖鎖構造を用いることでがんの浸潤のコントロールをめざすことである。

3. 研究の方法

(1)インテグリンの付加部位特異的な糖鎖構造をMALDI-TOF MASSを用いて解析する。精製インテグリンをSDS-PAGE電気泳動を行い、切り出したバンドをプロテアーゼ消化後、MALDI-TOF MASSによりシーケンスの確認を行うのと同時に、インテグリンの部位特異的な糖鎖構造解析を行う。

(2)インテグリン $\beta 1$ に修飾付加されている糖鎖機能を部位特異的変異導入法を用いて明らかにする。インテグリン $\beta 1$ の複数ある推定糖鎖付加部位のうちそれぞれのドメインごとに糖鎖を欠損させたcDNAをインテグリン欠損細胞にレトロウィルスをもちい遺伝子導入を行う。このようにして得られたドメイン特異的な糖鎖付加変異体を用いて、糖鎖欠損によりその特異的な基質であるフィブロネクチンやラミニン上での細胞の伸展・移動・細胞の形態等を観察する。さらにインテグリン $\alpha 5$ 鎖と二量体を形成するかどうか、組になる α 鎖が変わらないかを免疫沈降法したサンプルを用いて検討する。もし細胞表面にまったく発現しなくなるミュータントがあれば、パ

ルスチェイス法などを用い合成段階について検討する。

(3) $\alpha 5$ 鎖に関しては発現に機能に関わる糖鎖付加部位と構造は同定済み(Isaji T et al. *J Biol Chem.* 281,33258-33267,2006)であるが、糖鎖ミュータントをもちいて、部位特異的な糖鎖改変にインテグリンの機能が調節されるかどうかを $\alpha 5$ 鎖の糖鎖ミュータントを発現している細胞に糖転移酵素GnT-V,GnT-IIIを過剰発現することで検討する。

4. 研究成果

インテグリンの鎖と鎖の機能発現に最低限必須であるN-結合型糖鎖付加部位を決定した。糖鎖は、ランダムに修飾され、ヘテロな構造を示すと考えられてきたが、リン酸化のように付加部位に特異的な機能を持っている可能性があることを世界で初めて明らかにした。具体的な個々の成果に関して以下に示す。

(1)インテグリン $\alpha 5$ の質量分析による糖鎖付加部位特異的な糖鎖構造の同定を試みた。ヒト胎盤から精製したインテグリン $\alpha 5$ を酵素的にペプチドに消化したあと、HPLCでペプチドを分離し、MALDI-TOF MSによる質量分析によって糖鎖構造を決定した。その結果、site-3とsite-4には種々の複合型糖鎖が検出された。しかし、興味深いことにsite-5には、高マンノース型の糖鎖しか検出されなかった。このことにより、インテグリンの数多く付加される糖鎖は付加部位により、構造や機能が異なることが示唆された。

(2)部位特異変異導入法を用いて、インテグリン $\beta 1$ サブユニットの機能糖鎖部位について検討した。部位特異的変異導入法によりインテグリン $\beta 1$ サブユニットの糖鎖付加部位のAsnをGlnに置換した変異体を作成し、レトロウィルスを用いインテグリン $\beta 1$ 欠損GE11細胞に遺伝子導入を行い、変異インテグリンの安定発現株を得た。SDS-PAGEからI-likeドメインの三カ所の糖鎖は $\beta 1$ 鎖の発現、 $\alpha 5$ 鎖との二量体形成およびサブユニットの成熟化に重要であることが分かった。FN上の細胞の伸展活性を比較したところ、I-likeドメインの3カ所の糖鎖に変異を導入することで($\Delta 4-6$)、細胞の伸展活性は著しく低下したが、逆にI-likeドメインに3カ所糖鎖をもつ変異体(I mutant)も細胞の伸展活性を認めたと、他の場所に糖鎖をもつ変異体では細胞の伸展活性は認められなかった。さらに、I mutantは $\alpha 5$ 鎖の β -propellerドメインにそれぞれ3および1カ所の糖鎖付加部位をもつS3-5、S5変異体と二量体を形成することができた。以上のことから、インテグリン $\beta 1$ 鎖のI-likeドメインに付加された3カ所の糖鎖は機能発現に重要であることが示さ

れた。

(3) インテグリン $\alpha 5$ のGnT-IIIによる修飾によって、細胞接着、細胞移動の障害のメカニズムをより詳細に解析した。 $\alpha 5$ 鎖に糖鎖が3~2本、存在する糖鎖変異体 S3-5, S4,5, S3,5の糖鎖変異体を発現している細胞に糖転移酵素 GnT-IIIを導入して、各付加部位の修飾効率について検討をした。E4-PHAによるレクチンプロットにより、S3,5はGnT-IIIによる修飾を受けないが、S4,5とS3,4,5は効率よく修飾を受けた。site4は他の部位より効率的な修飾を受ける可能性が示された。さらに、FN上の細胞接着の比較より、S4,5では、GnT-III導入による接着障害が起こるが、S3,5では起こらないことから、site4のGnT-IIIによる修飾が支持された。加えて、site4のみを欠損させた糖鎖変異体($\Delta 4$)では、WTやsite3のみを欠損させた糖鎖変異体($\Delta 3$)より、E4-PHAの反応性が著しく減弱していることからsite4のGnT-IIIによる修飾の重要性が示された。以上の結果より、GnT-IIIによるsite4の部位特異的修飾が、インテグリン $\alpha 5$ を介するFN上での細胞接着や細胞移動を阻害的に制御するというメカニズムが明らかになった。

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4件)

(1) Isaji, T., Sato, Y., Fukuda, T. and Gu, J.

N-glycosylation of the I-like domain of beta 1 integrin is essential for beta 1 integrin expression and biological function

J. Biol. Chem. 査読有, 284, 12207-12216, 2009

(2) Sato, Y., Isaji, T., Tajiri, M., Yoshida-Yamamoto, S., Yoshinaka, T., Somehara, T., Fukuda, T., Wada, Y. and Gu, J.

An N-glycosylation site on the beta-propeller domain of the integrin $\alpha 5$ subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III.

J. Biol. Chem. 査読有, 284, 11873-11888, 2009

(3) Kotani, N., Gu, J., Isaji, T., Udaka, K., Taniguchi, N., and Honke, K.

Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 査読有 105: 7405-9, 2008

(4) Akama, R., Sato, Y., Kariya, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Lu, L., Taniguchi, N., Ozawa, M. and Gu, J.

N-Acetylglucosaminyltransferase III Expression Is Regulated by Cell-Cell Adhesion via the E-cadherin-catenin-actin Complex. *PROTEOMICS*. 査読有 8: 3321-8, 2008

[学会発表](計4件)

(1) N-glycosylation on I-like domain of beta1 integrin is essential for its expression and biological functions.

Tomoya Isaji, Yuya Sato, Tomohiko Fukuda and Jianguo Gu

2008 Annual Meeting of the Society for Glycobiology, 4. Fort Worth, Texas 5.2008, NOV

(2) インテグリン $\alpha 5\beta 1$ のN-結合型糖鎖修飾の機能解析

伊左治知弥, 佐藤裕也, 福田友彦, 顧建国

日本糖質学会 第28回年会, 筑波, 2008年8月, 口頭

発表, 3B-01

(3) N-Glycans of beta-propeller domain of $\alpha 5$ subunit are essential for $\alpha 5\beta 1$ dimer formation and its biological functions.

Tomoya Isaji, Yuuya Sato, Naoyuki Taniguchi and Jianguo Gu

14th EUROCARBO2007, Lubeck Germany, 2007/Sep/6.

4. N-Glycans of beta-propeller domain of $\alpha 5$ subunit are essential for $\alpha 5\beta 1$ dimer formation and its biological functions,

Tomoya Isaji

HGPI Meeting, Lubeck, Germany, 2007/Sep/7

[図書](計3件)

(1) インテグリンのN-結合型糖鎖による細胞接着機能の調節

顧建国, 伊左治知弥

蛋白質核酸酵素(共立出版) 53(12): 1508-1512, 2008

(2)

細胞接着

佐藤 裕也、伊左治 知弥、顧 建国
The Lung perspectives.(メディカルレビ
ュー社), 15(3):91-94, 2007

(3)細胞移動

伊左治 知弥、佐藤 裕也、顧 建国
The Lung perspectives.(メディカルレビ
ュー社), 15(3):95-98, 2007

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6.研究組織

(1)研究代表者

伊左治 知弥(ISAJI TOMOYA)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号:80433514

(2)研究分担者

(3)連携研究者