

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570169

研究課題名(和文) インテグリン 5 1 を介した超分子複合体の特異性と細胞増殖における意義

研究課題名(英文) Functional analysis of N-glycan on integrin alpha5beta1 for supramolecular assembly and cell proliferation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに、これまでにインテグリン 5 1の2量体形成や細胞接着に重要な糖鎖付加部位を同定した。本研究は接着分子インテグリンに付加された糖鎖を介した複合体形成の機能面における特異性を明らかにすることを目指した。インテグリンに付加された糖鎖は細胞接着や二量体の形成のみならず、超分子複合体を形成や増殖シグナルを制御する糖鎖付加部位を同定した。さらに癌遺伝子GOLPH3がシアルル化糖鎖の調節に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Integrin 5 1-mediated cell adhesion regulates a multitude of cellular responses, including proliferation, survival and cross-talk between different cellular signaling pathways. Here we analyzed whether N-glycosylation on integrin involved cell proliferation and supramolecular assembly. We identified specific N-glycosylation sites regulating cell proliferation and supramolecular assembly. Furthermore, we found that Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) regulates an efficient synthesis of N-glycosylation and cell migration.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：インテグリン 接着 細胞増殖 超分子複合体

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾はタンパク質の翻訳後修飾の中でも最も多く、糖タンパク質が機能分子として振る舞うために不可欠である。細胞表面の受容体は、複雑な糖鎖モジュールを介して超分子複合体を形成することで、適切なシグナル伝達をできるようになると考えられている。実際、申請者らが開発した方法で接着分子インテグリンの周囲 100~300nm に増殖因子受容体が数十種類存在することを報告している。インテグリンは、細胞接着・移動、骨格形成を制御すると同時に様々な増殖因子受容体と複合体を形成して細胞内のシグナル伝達を調節している。研究代表者はこれまでに、これまでにインテグリン 5 1 の 2 量体形成や細胞接着に重要な N-型糖鎖付加部位を同定した。また、糖鎖リモデリングの手法を用いて糖鎖を改変すると接着の機能が制御されることを明らかにしてきた。予備検討から接着や細胞移動に関与していない糖鎖付加部位もインテグリンのシグナル伝達や増殖因子受容体のシグナルを調節することが予想された。さらに、種々の固形癌において GOLPH3 が過剰発現していることが研究の開始当初に報告された。GOLPH3 の酵母における相同遺伝子 VPS74 は糖転移酵素と複合体を形成し糖鎖合成に関与することも知られていた。しかし、ヒトの細胞において GOLPH3 が糖鎖合成に関わるか糖転移酵素と超分子複合体を形成するか全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究は 接着分子インテグリンに付加された糖鎖を介した複合体形成の機能面における特異性を N-型糖鎖変異体を用いて明らかにすること。癌遺伝子 GOLPH3 がヒト細胞において超分子複合体の形成や糖鎖合成に関わるかインテグリンを介するシグナル伝達に関わるかを明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

上皮成長因子を過剰発現している種々の細胞に野生型および糖鎖変異型インテグリンを導入し、細胞増殖、細胞内シグナル、複合体形成について生化学的手法を用いて詳細に解析した。GOLPH3 遺伝子をノックダウンした細胞の細胞移動やシグナル伝達を解析した。また N-結合型糖鎖の構造を HPLC により解析した。超分子複合体の特異性について GOLPH3 と糖転移酵素の共免疫沈降により調べた。

4. 研究成果

インテグリンは細胞接着や浸潤のみならず細胞膜上で様々な分子と相互作用することで細胞増殖やシグナル伝達経路を調節していると考えられている。インテグリンに付加された糖鎖は細胞接着や細胞表面への発

現に関わることを我々は報告している。数多く付加している糖鎖は細胞膜表面の超分子複合体の形成に関わるのではないかと予想して研究を行った。上皮成長因子受容体を過剰発現している種々の細胞に野生型および糖鎖変異型インテグリンを過剰発現し細胞の増殖を比較した。既知の多くの報告から予想される結果とは異なり、野生型インテグリンと糖鎖変異型インテグリンを発現した場合の細胞増殖能は異なった。ここで調べた細胞増殖能の違いが生体内で十分寄与するか、ヌードマウスに野生型および糖鎖変異型インテグリンを播種し、癌の形成を比較し、プラスチックシャーレで比較したのと同じ傾向の差を認めた。超分子複合体の特異性を確認するために変異型インテグリンの糖鎖欠損部位に対して部位特異変異導入法を用いて糖鎖が導入されるように付加部位に変異を戻したレスキュー変異体を作成し複合体形成に関わる糖鎖付加部位を同定した。以上からインテグリンに付加された特定部位の糖鎖は細胞接着や二量体の形成のみならず、増殖因子受容体等と超分子複合体を形成することで増殖シグナルの制御に重要であることが示唆された。

GOLPH3 に関して、GOLPH3 を抑制する shRNA を発現する HeLa 細胞株を作成した (図 1A)。インテグリンは細胞移動や様々なシグナル伝達経路に影響を及ぼすことが知られているので、まずノックダウン細胞において細胞移動能をボイデンチャンバー法で比較した (図 1B)。ノックダウン細胞はコントロール細胞と比較して有意差をもって細胞移動が低下していることが分かった。ここで観察し

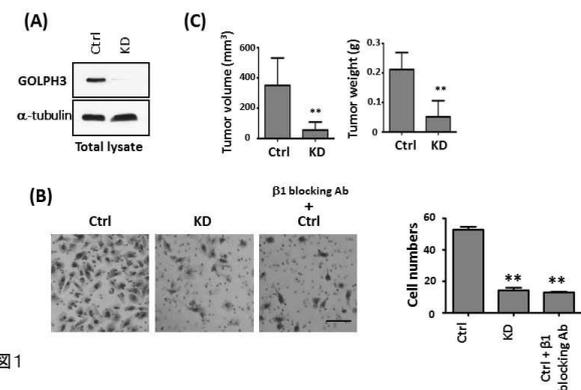


図 1

た細胞移動がインテグリン依存性であるかどうか確かめるために抗インテグリン 1 抗体の存在化同様な実験を行うと細胞移動は有意に低下した、従って GOLPH3 ノックダウン細胞はインテグリン依存的な細胞移動が低下していることが分かった。GOLPH3 は種々の固形癌で発現が上昇している癌遺伝子として報告されたが、我々が使用した細胞株において癌の形成能を比較するため両者の細胞をヌードマウスに播種し、癌の形成能を比較した (図 1C)。既知の報告の通り GOLPH3 をノックダウンした細胞は癌の重量および

サイズが有意に低下していることが分かった。

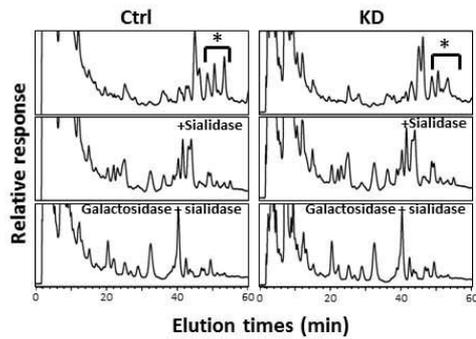


図2

GOLPH3 の酵母における相同分子は糖転移酵素と複合体を形成し、酵母において糖鎖合成に関わることが報告されている。そこで、GOLPH3 ノックダウン細胞において N-型糖鎖構造が変化するかどうかが細胞全体の糖鎖をピリジルアミノ化して HPLC において比較した(図2)。ノックダウン細胞では*で示したピークがコントロール細胞と比較して低下していた。このピークはシアリダーゼ処理により消失したため GOLPH3 ノックダウン細胞はシアリル化糖鎖が低下していることが分かった。糖鎖構造の変化に関してコントロール、ノックダウンおよび GOLPH3 遺伝子を再導入した細胞の糖鎖を LC-MS で解析したところ HPLC で行った実験と同様の結果を示した。糖鎖合成に与える GOLPH3 の影響を超分子複合体に注目して以下の解析を行った。N-型糖鎖の合成に関わるシアル酸転移酵素 ST3GAL4 および ST6GAL1 を GOLPH3 と共発現し、共免疫沈を用いて糖転移酵素と GOLPH3 の複合体形成の特異性を検討した(図3)。

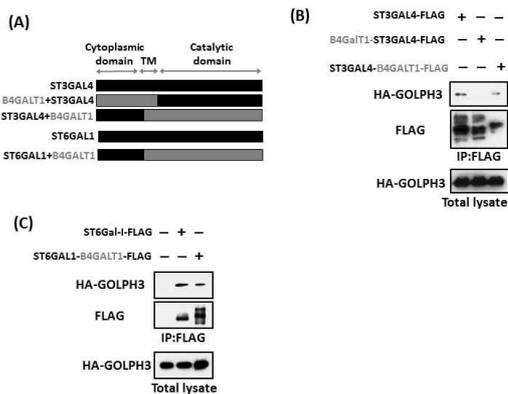


図3

図に示すように糖転移酵素 ST3GAL1 および ST6GAL1 は GOLPH3 と特異的に相互作用することが分かった。

以上をまとめると GOLPH3 はシアル酸転移酵素と相互作用することでシアリル化糖鎖の効率的な合成に寄与しインテグリンなどの膜蛋白質上の糖鎖合成を促進する。シアリル

化された糖鎖によりインテグリンを介した細胞移動や増殖シグナルが亢進することで癌の悪化に関与することが示唆された(図4)。

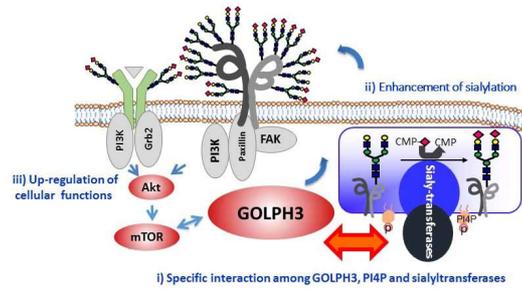


図4

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

(雑誌論文)(計8件)

1. Isaji, T., Im, S., Gu, W., Wang, Y., Hang, Q., Lu, J., Fukuda, T., Hashii, N., Takakura, D., Kawasaki, N., Miyoshi, H., and Gu J. An Oncogenic Protein Golgi Phosphoprotein 3 Up-regulates Cell Migration via Sialylation. *J. Biol. Chem.* 289: 20694-20705, 2014 (査読あり), doi: 10.1074/jbc.M113.542688

2. Lu, J., Isaji, T., Im, S., Fukuda, T., Hashii, N., Takakura, D., Kawasaki, N. and Gu, J. β -Galactoside α 2,6 Sialyltransferase 1 Promotes Transforming Growth Factor- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Biol. Chem.* 289: 34627-34641, 2014 (査読あり), doi: 10.1074/jbc.M114.593392

3. Zhao, Y., Miao, G., Li, Y., Isaji, T., Gu, J., Li, J., Qi, R. MicroRNA 130b suppresses migration and invasion of colorectal cancer cells through downregulation of integrin. *PLoS One.* 9(2):e87938, 2014 (査読あり), doi: 10.1371/journal.pone.0087938

4. Gu, W., Fukuda, T., Isaji, T., Hashimoto, H., Wang, Y and Gu, J. 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. *FASEB J.*27:3947-3958, 2013 (査読あり), doi: 10.1096/fj.12-225805

5. Pinho, SS., Figueiredo, J., Cabral, J., Carvalho, S., Dourado, J., Magalhães, A., Gärtner, F., Mendonça, AM., Isaji, T., Gu, J., Carneiro, F., Seruca, R., Taniguchi, N., Reis, CA. E-cadherin and adherens-junctions stability in

gastric carcinoma: Functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. *Biochim. Biophys. Acta* 1830: 2690-700, 2013 (査読あり), doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.021

6 . Wang, H., Isaji, T., Satoh, M., Li, D., Arai, Y. and Gu, J.

Anti-tumor effects of exogenous ganglioside GM3 on bladder cancer in an orthotopic cancer model.

Urology 81, 210.e11-15, 2013 (査読あり), doi:10.1016/j.urology.2012.08.015

7 . Gu, J., Isaji, T., Xu, Q., Kariya, Y., Gu, W., Fukuda, T. and Du, Y.

Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion.

Glycoconj. J. 29: 599-607, 2012 (査読あり), doi:10.1007/s10719-012-9386-1

8 . Xu Q, Isaji T. Lu Y, Gu W, Kondo M, Fukuda T, Du Y, Gu J.

Roles of N-acetylglucosaminyltransferase III in epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in epithelial cell lines

J. Biol. Chem. 287:16563-74, 2012 (査読あり), doi: 10.1074/jbc.M111.262154

〔図書〕(計1件)

1 . Jianguo Gu, Qinglei Hang, Tomohiko Fukuda, Tomoya Isaji.

Glycoscience: Biology and Medicine (Integrin α 5 β 1 and its N-glycosylation.)

Springer, 2014, doi:10.1007/978-4-431-54841-6_53

〔学会発表〕(計5件)

1 . 伊左治知弥、福田友彦、顧建国

GOLPH3による糖鎖を介したインテグリンの機能調節

第86回日本生化学会シンポジウム パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2013年9月12日

2 . 伊左治知弥、顧建国

細胞接着における糖転移酵素の発現制御とその意義

第39回日本応用酵素協会研究発表会(招待講演) ホテル阪急インターナショナル(大阪府大阪市)

2013年11月18日

3 . Tomoya Isaji

GOLPH3 regulates integrin mediated cell migration via up-regulation of sialylation of β 1 integrin

Glyco22 大連 中国

2013年6月27日

4 . 伊左治知弥

N-型糖鎖による細胞-基質間接着の機能制御
第11回化学系薬学若手研究者セミナー(招待講演) 東北大学薬学部(宮城県仙台市)
2012年9月12日

5 . 伊左治知弥、竹原雅子花、小林沙織、近藤
藤円、福田友彦、橋井則貴、高倉大輔、川崎ナナ、顧建国

GOLPH3はシアル酸転移酵素と相互作用し糖鎖構造とインテグリンの機能を制御する
第31回日本糖質学会年会 鹿児島市民文化ホール(鹿児島県鹿児島市)
2012年9月

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 なし

(3)連携研究者 なし