The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Transglutaminase 2-dependent Deamidation of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Promotes Trophoblastic Cell Fusion
Author(s)	岩井, 香織
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34311
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	岩井　香織
論文題名 Title	Transglutaminase 2-dependent Deamidation of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Promotes Trophoblastic Cell Fusion （グリセルアルデヒド３リン酸脱水素酵素のトランスグルタミナーゼ２依存的脱アミド化による栄養膜細胞の細胞融合）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

生体内の細胞融合は受精の他、筋芽細胞、骨芽細胞、さらに胎盤栄養膜細胞において見られる特徴ある細胞現象であり、栄養膜細胞の細胞融合異常は流産など発生生殖障害につながると考えられている。ヒト胎盤の胎盤絨毛表面を覆う合胞体栄養膜細胞は、細胞性栄養膜細胞（ラングハンス細胞）が分化し細胞融合することで形成される。細胞性栄養膜細胞膜には細胞融合に関わる分子としてレトロウイルスenv由来のsyncytinが知られているが、細胞内の分子機構は未解明であるため、細胞融合に関わる細胞内分子機構を明らかにすることで細胞融合現象をより深く理解することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

栄養膜細胞の分化誘導モデルであるBeWo細胞（ヒト絨毛癌由来細胞株）にフォルスコリンを添加することで細胞融合による多核体を誘導し、コロイダルシリカ法によりその膜画分を分離し、二次元電気泳動を行い、細胞融合に伴って質的あるいは量的に変化するタンパク分子をプロテオーム解析により同定した。そのようにして得た十数種類の候補分子のうちglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)に注目した。膜画分に局在するGAPDHにはフォルスコリンによる分化誘導に伴って等電点が酸性側にシフトする複数のアイソフォームがみられた。OFFGEL fractionatorを用いて等電点の異なるアイソフォームを分画分離し、それぞれについて質量分析（LC/ESI-MS）を行った結果、この荷電変化は１Daの質量増加を伴う翻訳後修飾であると考えられた。衝突誘起解離によりアミノ酸配列を解析したところ、酸性側にシフトしたGAPDHではGln78、Gln204をはじめとするグルタミン残基がグルタミン酸残基に部分的に脱アミド化しており、この結果は等電点と質量の変化をともに説明できるものであった。Glnの脱アミド化は酵素的に起こることから、脱アミド化を触媒するトランスグルタミナーゼ（TG）の関与を考えてTG阻害剤存在下で細胞融合を誘導したところ、GAPDHの等電点変化は抑制された。次に、BeWo細胞に発現しているTG2をshRNA によってノックダウンしたところ、GAPDHの等電点変化は顕著に抑制され、細胞融合も抑制された。次に、野生型（WT）GAPDHと、Gln78、Gln204および配列上に存在する７か所全てのGlnをGluに置き換えたGAPDHを過剰発現させたBeWo細胞をフォルスコリンで分化誘導したところ、変異体、特に７か所全てのGlnをGluに置換したGAPDHはWTと比較してより多く膜に局在していたことから、GAPDH は脱アミド化を受けることによって膜に集積することが示唆された。GAPDHをノックダウンすると細胞融合が亢進したのに対し、WT-GAPDHを過剰発現すると細胞融合は抑制されたが、GlnをGluに置き換えた変異体では細胞融合に対する抑制の程度がWTよりも軽度であった。

〔総　括(Conclusion)〕

BeWo細胞において、GAPDHは細胞融合に対して抑制的であるが、フォルスコリンにより細胞融合を誘導するとTG2依存的に脱アミド化されて細胞膜に集積し、細胞融合を促進することが明らかになった。GAPDHには解糖系酵素としての他にさまざまな機能が報告されているが、新たに細胞融合に関わる機能を発見した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　岩井　香織

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	和田　芳直
	副　査	大阪大学教授	三善英知
	副　査	大阪大学教授	高島　成二

論文審査の結果の要旨

胎盤絨毛表面を覆う栄養膜は細胞融合によって合胞多核体となる。モデル細胞であるBeWo細胞のフォルスコリンによる細胞融合誘導後に細胞膜分画から回収されるグリセルアルデヒド３リン酸脱水素酵素（GAPDH）は複数のグルタミン残基がグルタミン酸に変換（脱アミド）していた。トランスグルタミナーゼ２（TG2）を発現抑制するとGAPDHの脱アミド化が抑制され、細胞融合は低下した。一方、GAPDHの発現抑制は細胞融合を促進し、GAPDHの強制発現では細胞融合が低下したが、グルタミンをグルタミン酸に置換したGAPDH変異体ではこの細胞融合の低下が軽度であった。以上により、GAPDHは脱アミド化を介して細胞融合に関わることが明らかになった。この研究成果はGAPDHおよび脱アミド化の新機能を提示し、胎盤に起因する流産等の病態にGAPDHやTG2が関わる可能性を示すものであることから、学位に値すると考える。