



Title	The Addition of Bisecting N-Acetylglucosamine Residues to E-cadherin Down-regulate the Tyrosine Phosphorylation of $\beta$ -catenin
Author(s)	北田, 学利
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43773">https://hdl.handle.net/11094/43773</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名	きた だ たか とし 北 田 学 利
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 8 1 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	The Addition of Bisecting N-Acetylglucosamine Residues to E-cadherin Down-regulate the Tyrosine Phosphorylation of $\beta$ -catenin (E-cadherinの糖鎖にバイセクティング GlcNAc を付加することによって、 $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化が低下する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之  (副査) 教 授 松 澤 佑 次    教 授 宮 坂 昌 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

癌転移の最初のステップの1つとして、E-cadherinを介したホモフィリックな細胞間接着の減弱が重要視されている。癌細胞におけるE-cadherinの機能障害の原因として(1)E-cadherin自体の変異/発現低下(2)E-cadherinの裏打ち蛋白である $\beta$ -cateninの変異/発現低下(3) $\beta$ -cateninのチロシンリン酸化に伴うE-cadherinとの相互作用の消失という三つの機序が知られている。生化学教室では、以前、糖転移酵素N-アセチルグルコサミン転移酵素(GnT-III)を過剰発現させたマウスメラノーマ細胞で、E-cadherinの発現量増加により肺転移が抑制されることを報告した。そこで、BGF刺激後、GnT-III遺伝子導入細胞とコントロール細胞の形態変化を観察したところ、GnT-III遺伝子導入細胞で細胞間の接着能が亢進していた。そこで、このメカニズムを明らかにするために、GnT-IIIによるE-cadherinの糖鎖改変が、 $\beta$ -cateninのチロシンリン酸化に与える影響とその生物学的意義を検討した。

#### 【方法】

マウスメラノーマ細胞B16-hm、ヒト大腸癌細胞WiDrとヒト肝臓癌細胞Huh7に $\beta$ -アクチンをプロモーターとするGnT-III遺伝子発現ベクターを導入し、G418で選択した。糖鎖構造の変化は、GnT-IIIの産物であるbisecting GlcNAcを認識するE4-PHAレクチンを用いて解析した。 $\beta$ -cateninのチロシンリン酸化は、EGF(50ng/ml)の添加後、 $\beta$ -cateninを免疫沈降し、PY20によるウエスタンブロットで経時的に検討した。同時に、この時の $\beta$ -cateninの細胞内局在を蛍光免疫染色法にて検討した。さらに、527番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した活性型Src遺伝子をGnT-III遺伝子導入細胞とMock細胞に導入し、EGF刺激とは異なるシグナルからの $\beta$ -cateninのチロシンリン酸化を検討した。糖鎖合成阻害剤として、ツニカマイシン0.5 $\mu$ g/mlを用い、上記と同様の検討を行った。

#### 【成績】

GnT-IIIを高発現するマウスB16-hmでは、E-cadherinの発現量増加を認めたが、ヒトWiDr、Huh7では、GnT-III遺伝子導入細胞とコントロール細胞で、E-cadherinの発現量に差は見られなかった。GnT-III遺伝子導入細胞では、レクチンブロットでE-cadherin、EGFレセプターの糖鎖修飾が確認された。これらの細胞をEGFで刺激する

と、コントロール細胞では、 $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化が15分後から著明に上昇した。このとき、膜表面に局在していた  $\beta$ -catenin は、そのチロシンリン酸化に伴い、細胞内へ移動し、細胞間の接着が減弱した。一方、GnT-III 遺伝子導入細胞では、コントロール細胞に比べ  $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化が抑制され、 $\beta$ -catenin が細胞膜にとどまる傾向を示し、細胞間の接着や形態は変わらなかった。この GnT-III 遺伝子導入細胞における  $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化の抑制は、活性化 Src 遺伝子導入でも見られた。さらに、糖鎖合成阻害剤ツニカマイシン処理により、GnT-III 遺伝子導入細胞とコントロール細胞の  $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化の差は消失した。また、EGF 刺激後の EGF レセプターのリン酸化は、両者で差は見られなかった。

#### 【総括】

本研究により GnT-III 遺伝子導入による E-cadherin の糖鎖改変は、その裏打ちタンパクである  $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化を抑制し細胞間の接着を保持した。この結果は、糖鎖による癌転移の新しい制御機構と考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、糖転移酵素 N-acetylglucosaminyltransferase (GnT-III) を遺伝子導入したヒト大腸癌細胞の EGF 刺激による細胞間接着の違いに注目した。この原因が、糖鎖修飾を受ける E-カドヘリンの発現量の増減によるものではなく、E-カドヘリンと複合体を形成している  $\beta$  カテニンのチロシンリン酸化の抑制が原因であることを3種類の癌細胞を用いて証明した。この事は、E-cadherin の細胞外の糖鎖改変が、細胞内情報伝達を変え細胞間の接着を制御するという点で非常に新しい知見であり、癌転移の新しい制御機構と考えられる。以上、本論文の研究内容は医学博士の学位を授与するのに値すると認定する。