



Title	Introduction of Bisecting GlcNAc into Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Reduces Ligand Binding and Down-regulates Cell Adhesion and Cell Migration
Author(s)	伊左治, 知弥
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46257
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、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

氏 名 伊 左 治 知 弥

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20077 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 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 Introduction of Bisecting GlcNAc into Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Reduces Ligand Binding and Down-regulates Cell Adhesion and Cell Migration
(インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 上のバイセクティング GlcNAc 付加はリガンド親和性および細胞接着・移動の低下をもたらす)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 谷 口 直 之

(副査)

教 授 木 下 タ ロ ウ 教 授 高 井 義 美

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

細胞表面の蛋白質は、多くが糖鎖付加を受けている。古くから糖鎖は、蛋白質の安定性やフォールディングに関わると考えられてきた。近年、細胞-細胞間や細胞-基質間のシグナル伝達にも関係すると考えられるようになってきた。しかし、その分子レベルでの詳細な機構は不明な点が多い。 $\beta 1,4$ -*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は、*N*-結合型糖鎖のコアの $\beta 1,4$ -マンノースに $\beta 1,4$ -結合で *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を転移し、バイセクティング GlcNAc の生合成を触媒する。以前我々は、GnT-III を導入して細胞表面の糖鎖を人為的に改変した癌細胞を用いてヌードマウスの転移実験を行ったところ、肺への癌転移能が有意に低下していることがわかった。この癌転移抑制のメカニズムの一つは、細胞表面の E-カドヘリン発現上昇や β -カテニンのリン酸化の減少によって、細胞-細胞間接着が亢進するためと考えられた。今回我々は、GnT-III 過剰発現細胞をもちい、細胞-基質間接着に及ぼす影響を細胞表面糖鎖の重要なキャリアー蛋白質の一種であるインテグリンに着目して検討した。

[方法ならびに成績]

GnT-III 過剰発現細胞由来のインテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ および $\alpha 5$ サブユニットには、免疫沈降法およびバイセクティング GlcNAc を特異的に認識する E₄-PHA レクチン染色から、バイセクティング GlcNAc が増加していることがわかった。細胞の表面をビオチン化して抗インテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ および $\alpha 5$ 抗体にて免疫沈降後にウェスタンブロットと抗インテグリン抗体を用いたフローサイトメトリーを用い、GnT-III の遺伝子導入により細胞表面のインテグリンの発現量が変化しないことを確かめた。GnT-III 過剰発現細胞は、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の特異基質であるフィブロネクチン上での接着・伸展および移動が抑制された。抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体でこの細胞の伸展や移動が完全に抑制されたことから、この細胞の伸展や移動は主にインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を依存的であると考えられた。また細胞の伸展や移動の抑制効果は、活性をもたない GnT-III 変異体 (D323A) の過剰発現細胞では認められないことから、GnT-III の糖転移活性がインテグリン依存的な細胞接着・移動を抑制すると考えられた。さらに、インテグリンを介するシグナル伝達で中心的な役割を担う focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化をフィブロネクチン接着後にウェスタンブロッ

トにより検討したところ、GnT-III 過剰発現細胞は、フィブロネクチンへの接着に伴う FAK のリン酸化が低下していた。GnT-III 過剰発現細胞においてインテグリンを介するシグナルが低下していると考えられたが、この分子レベルでの機構を明らかにするために、コントロール細胞と GnT-III 過剰発現細胞からフィブロネクチンアフィニティークラムを用いインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を精製した。精製したインテグリンは電気泳動的に均一であり、レクチン染色より、GnT-III 過剰発現細胞から精製したインテグリン $\alpha 5$ サブユニットはバイセクティング GlcNAc が多く導入されていることが分かった。さらにこれらの精製インテグリンをリボソームの系と ELISA の系を用いフィブロネクチンに対する親和性を比較したところ、GnT-III 過剰発現細胞から精製したインテグリンはコントロール細胞から精製したものと比べ、リガンド親和性が低下していることがわかった。

〔 総 括 〕

インテグリンにバイセクティング GlcNAc が導入されると、基質に対する親和性が低下し、その結果、インテグリンを介したシグナル伝達が抑制されることが示唆された。糖鎖修飾により、細胞接着・浸潤といったインテグリンの本質的機能が制御できることを実際に細胞から精製したタンパク質を用いて証明した。

論文審査の結果の要旨

糖タンパク質の糖鎖はゴルジ装置等に存在する糖転移酵素により様々な修飾を受ける。この糖転移酵素の1つである N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は、動物転移モデル実験から癌転移抑制的に働くと考えられる。この分子メカニズムに関して細胞-細胞間の E-カドヘリンの関与が示唆されていたが、細胞と細胞外マトリックスの相互作用に関しては不明点が多かった。そこで本研究では細胞-細胞外マトリックスの相互作用に中心的な役割を果たすインテグリンに着目し、糖鎖構造の変化がどのようにこの相互作用に影響を与えるかについて検討したものである。GnT-III を導入し糖鎖を改変した細胞ではインテグリンの糖鎖にバイセクティング GlcNAc 構造が導入され、インテグリンは本酵素の基質となることが分かった。さらに GnT-III を導入した細胞は、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 依存的に細胞の伸展・浸潤が低下し、下流のシグナルが抑制された。この GnT-III による細胞の伸展の阻害効果は酵素活性をもたない GnT-III 変異体では見られなかった。さらに GnT-III 導入細胞から精製したインテグリンの糖鎖構造は GnT-III の産物であるバイセクティング GlcNAc 構造が増加しており、またこのインテグリンの細胞外マトリックスに対する親和性が低下していた。申請者の研究室では、これまで糖鎖改変動物、細胞を用いて糖転移酵素の標的分子の同定と細胞レベルでの機能解析から糖鎖の機能を明らかにしてきた。本研究は GnT-III の標的分子であるインテグリンを精製してタンパク質のレベルで解析した初めての研究といえる。以上の理由により、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。