

インテグリンのアスパラギン型糖鎖修飾の重要性と糖鎖による機能制御

伊左治 知弥

1. はじめに

インテグリンを介した細胞接着は細胞外マトリックス (ECM) と細胞骨格の間の橋渡しをするだけではなく、細胞外の情報を増殖・分化・生存などのシグナルに解釈し、細胞内に伝えるために重要である。インテグリンは α と β の二量体からなり、*N*結合型糖鎖 (Asn結合型糖鎖) の修飾を多く受ける分子である。*N*結合型糖鎖は Asn-X-Ser/Thr (XはPro以外) のシグナル配列を小胞体のオリゴ糖転移酵素が認識し Asn 残基に付加される。*N*結合型糖鎖の修飾はインテグリンの $\alpha\beta$ 二量体の形成、細胞表面への発現、タンパク質の安定性などの品質管理に密接に関わっている。一方、がん化することで細胞の糖鎖構造が変化することがよく知られているが、*N*結合型糖鎖の修飾部位を多数持つために、インテグリンは糖鎖変化の影響を鋭敏に受ける。我々はこれまでインテグリンの *N*結合型糖鎖修飾に注目し、*N*結合型糖鎖がタンパク質の安定性のみならず、細胞接着や細胞移動を制御することを明らかにしつつある。本稿では、インテグリンの糖鎖リモデリングによる機能調節、がん細胞での糖鎖変化の機構、といったインテグリンの糖鎖修飾部位に着目した研究について紹介する。

2. 糖鎖リモデリングによるインテグリンの機能解析

我々のグループを含め複数のグループが、糖転移酵素の発現量を変化させて人為的に糖鎖を改変させる手法 (糖鎖リモデリング) から、糖鎖がインテグリンを介した細胞接着や細胞遊走を調節することを報告している。たとえば、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) の遺伝子発現とその産物である β 1,6GlcNAc 分岐型糖鎖構造は転移性の高いがん細胞で増加し、インテグリンを介した細胞遊走

を促進する¹⁾ (図1A)。一方 GnT-III は β 1,6GlcNAc 分岐型糖鎖構造を抑制し、インテグリンを介した細胞接着、細胞遊走および focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を低下させ、がん転移抑制的に働くと考えられる¹⁾ (図1B)。インテグリンの活性化には分岐型構造に加えて、糖鎖末端に付加する酸性糖であるシアル酸との関連が指摘されている。特に、 β 1 インテグリン上の α 2-6 結合でシアリル化された *N*結合型糖鎖は、マウス乳がん組織において FAK のリン酸化を亢進させて上皮細胞の脱分化に関与することが示唆されている²⁾。興味深いことに、 α 2-6 結合のシアリル化 *N*結合型糖鎖が少ない細胞株に GnT-III を過剰発現するとインテグリンの α 2-3 結合のシアル酸が低下し、細胞遊走が強く阻害されたが (図1B)、シアル酸転移酵素 ST6GAL1 を過

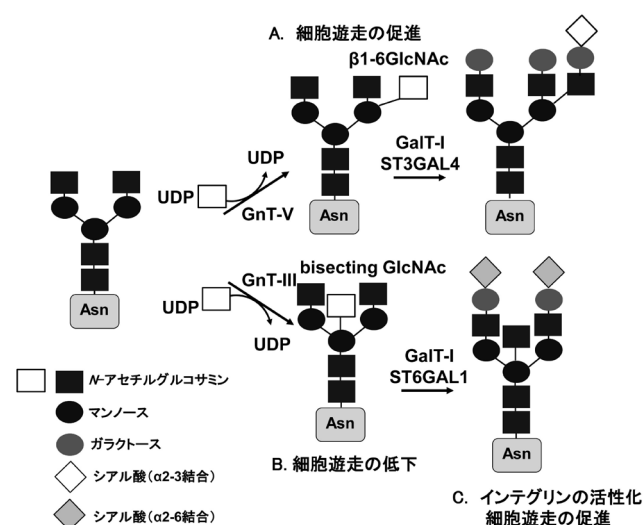


図1 GnT-V, GnT-III およびシアル酸転移酵素による *N*結合型糖鎖の修飾の過程と細胞移動に及ぼす影響

GnT-V と GnT-III は分岐型糖鎖構造を決定する鍵酵素である。GnT-V の発現が上昇しているがん細胞株では β 1-6GlcNAc 分岐型の糖鎖が増加して、細胞遊走が促進される。インテグリン、カドヘリン、マトリプターゼなどが GnT-V の基質となる。 α 2-3 結合でシアル酸を転移する ST3GAL4 は β 1-6GlcNAc 分岐した糖鎖に付加しやすいことが酵素学的に知られている。GnT-III の産物である bisecting GlcNAc はインテグリン、EGFR、カドヘリンなどでみられる。bisecting GlcNAc の修飾があると β 1-6GlcNAc 分岐型の糖鎖が減少することで、細胞遊走は抑制される。しかし、 α 2-6 結合でシアル酸を転移する ST6GAL1 を bisecting GlcNAc の構造が多い細胞に過剰発現すると GnT-III による細胞遊走の抑制は打ち消される。

東北医科薬科大学分子生体膜研究所細胞制御学教室 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島4-4-1)

The Importance of *N*-glycosylation on integrins for its biological functions

Tomoya Isaji (Division of Regulatory Glycobiology, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Tohoku Medical and Pharmaceutical University, Komatsushima 4-4-1, Aobaku, Sendai, Miyagi 981-8558, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890298

© 2017 公益社団法人日本生化学会

剰発現させて α 2-6結合のシアリル化を増やすとGnT-IIIの細胞遊走の阻害作用が消失した³⁾ (図1C). このことはN結合型糖鎖による細胞遊走の調節には β 1,6GlcNAc分岐型糖鎖構造と末端のシアリル化の両方が重要であることを示している.

3. がん遺伝子GOLPH3による β 1インテグリンの糖鎖変化による細胞遊走の調節

糖鎖構造は糖転移酵素や糖鎖分解酵素の発現量, ドナー基質, ターゲットタンパク質の濃度, 酵素の局在などさまざまな要因で変化する. 実際, GnT-VやST6GAL1遺伝子の発現量はc-Ets-1などのがん遺伝子産物やRasタンパク質あるいはmiRNAなどで調節されることが報告されている⁴⁾. 一方, 糖転移酵素の局在を制御するタンパク質Vps74pが最近出芽酵母において報告された. Vps74pは糖転移酵素のゴルジ体におけるアンカリングに必要で, VPS74遺伝子をノックアウトした出芽酵母はマンノースを含む糖鎖修飾が減少していた⁵⁾. 興味深いことに, VPS74遺伝子のヒトにおけるオルソログはGolgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) 遺伝子であり, GOLPH3はさまざまな固形がんにおいて増加しているがん遺伝子産物であることが明らかになった⁶⁾. GOLPH3はトランスゴルジからの小胞輸送や細胞表面受容体のリサイクリングを促進し, mammalian target of rapamycin (mTOR) やAKTシグナルを増強することが報告された⁶⁾.

がん細胞においてGOLPH3がAKTシグナルを増強することから, GOLPH3は細胞移動やN結合型糖鎖を変化させることが予想された. がん細胞においてGOLPH3はコア2分岐形成 β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素と相互作用しO結合型糖鎖を介した細胞間接着を制御することが報告されたものの, GOLPH3とN結合型糖鎖修飾の関連は不明であった⁷⁾. そこで, 我々は, N結合型糖鎖構造やインテグリンを介した細胞遊走に注目してGOLPH3遺伝子のノックダウン細胞を解析した. 我々は, ECMをトランスウェルに固定化したBoyden chamberアッセイを細胞遊走の解析に用いている. この細胞遊走は抗インテグリン β 1抗体ではほぼ完全に阻害されるためインテグリン依存的な細胞遊走だと考えることができる. この系を用いると予想どおり, GOLPH3ノックダウン細胞では細胞遊走が著しく低下しており, この細胞遊走の低下はGOLPH3遺伝子の再導入により回復した. ノックダウン細胞ではインテグリンの発現量は変化しなかったが, シアリル化N結合型糖鎖構造が特異的に低下していることがわかった. 出芽酵母のVps74pとがん細胞のGOLPH3は共通して糖鎖の制御に関わるが, 酵母のVps74pはマンノース糖転移酵素と相互作用する一方で, がん細胞のGOLPH3は酵母には存在しないシアル

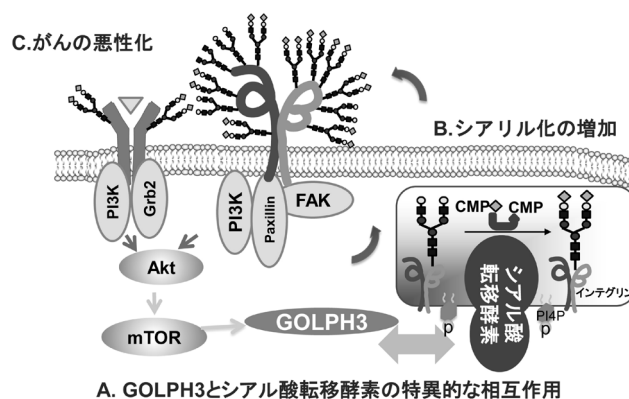


図2 ゴルジ体中存在するがん遺伝子産物GOLPH3によるN結合型糖鎖の変化とインテグリンの機能調節

GOLPH3とシアル酸転移酵素, PI4Pが特異的に相互作用して (A), インテグリンなどのさまざまな糖タンパク質上の α 2-6結合シアリル化N結合型糖鎖修飾を増加させる (B). 細胞表面のN結合型糖鎖変化の相乗効果によって細胞内のAKT経路などのシグナルが劇的に変化することでがん悪性化を促進する (C). Isaji, T., et al. (2014). *J. Biol. Chem.*, **289**, 20694–20705 より改変.

酸転移酵素 (ST6GAL1およびST3GAL4) と相互作用していた. GOLPH3遺伝子をノックダウンして, N結合型糖鎖のシアリル化が減少した細胞にシアル酸転移酵素であるST6GAL1を過剰発現すると, インテグリン依存的な細胞遊走が回復した. インテグリン上のシアリル化N結合型糖鎖を変化させ, がん細胞の転移・浸潤に促進的に働くというまったく新規な分子機構であると考えられる⁸⁾ (図2). 我々の報告の直後にST6GAL1の細胞質内の塩基性アミノ酸がGOLPH3との相互作用に関わることが報告された⁹⁾. これらのことから, GOLPH3は糖転移酵素を制御することで細胞の移動能を制御することが明らかとなった.

4. TGF- β によるEMT誘導時の結合型糖鎖の変化

N結合型糖鎖は上皮間葉転換 (EMT) においても重要であると考えられる. インテグリンを介した細胞移動はEMTを起こして転移するがん細胞と深いつながりがある. マウス細胞株においてトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) によってEMTを誘導すると, シアリル化N結合型糖鎖が著しく増加した. この原因はST6GAL1をコードする*St6gal1*遺伝子の発現増加であった. *St6gal1*のプロモーター領域に転写因子SP1が結合することで遺伝子発現が亢進して, その結果シアリル化N結合型糖鎖が増加した¹⁰⁾. さらに, 乳がん細胞株 (MDA-MB-231細胞) でST6GAL1をノックダウンするとEMT誘導は低下し, β 1インテグリンを介した細胞遊走も著しく低下していた. 興味深いことに, シアル酸の動態を詳細に解析すると, EMTは複数の過程から構成されており, シアリル化N結合型糖鎖の亢進は細胞質ATP濃度が上昇するEMT後期の成熟化

過程であることが報告された¹¹⁾。複数のインテグリン分子種がシアリル化N型糖鎖のターゲットとして同定されている。したがって、EMTによって生じるインテグリン分子種の糖鎖リモデリングは、がん転移に重要であると考えられる。

5. インテグリンN結合型糖鎖変異体の機能スクリーニング

糖転移酵素の基質特異性は広く、基質になる糖鎖は細胞全体に分布している。そのため、糖転移酵素の過剰発現やノックアウトによる糖鎖リモデリング解析は細胞全体の糖鎖の構造が変化してしまうため、機能調節メカニズムの詳細は不明な点が多い。その解決手段の一つとして特定の糖タンパク質に注目した以下のアプローチを行った。我々は、インテグリンに付加しているN結合型糖鎖の機能の詳細を明らかにするため $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのN結合型糖鎖付加モチーフに変異を導入して、細胞表面への発現や細胞接着に関わる糖鎖の付加位置をスクリーニングした。 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンは α 鎖に14か所、 β 鎖に12か所の糖鎖付加モチーフがあり、その複数に変異を導入した糖鎖変異体をそれぞれインテグリン $\alpha 5$ 鎖欠損細胞(CHO-B2)、および $\beta 1$ 鎖欠損細胞(GE11)に導入して解析した(図3A)。 $\alpha 5$ 鎖の β プロペラドメインの糖鎖付加は細胞接着に¹⁾(図3B)、 $\beta 1$ 鎖のI-likeドメインの糖鎖は二量体の形成や細胞表面への発現に必須であることがわかった¹⁾(図3C)。さらに、GnT-IIIによる細胞遊走阻害には $\alpha 5$ 鎖の β プロペラドメインにある4番目の糖鎖変化が特に関与することがわかった¹⁾。これらの詳細な検討によって、インテグリンのN結合型糖鎖は修飾部位によって、細胞接着・遊走や細胞表面への発現といった特徴的な機能を持っていることが示唆された。実際にインテグリンと細胞外マトリックスの結合の際にインテグリンのN結合型糖鎖部分が結合をガイドしているようですがX線結晶構造解析によってとらえられ、糖鎖やその構造変化が分子間相互作用に重要な役割を果たしていることが確認された¹²⁾。

インテグリンを介する細胞遊走・増殖・生存シグナルは単独で働くものではなく、インテグリンとさまざまな受容体が複合体を形成して調節すると考えられる。事実、EMARS法(細胞膜上で分子間相互作用を生化学的に可視化する方法)を用いて、 $\beta 1$ インテグリンの近傍に増殖因子受容体が存在することが明らかになっている¹³⁾。さらに、 $\beta 1$ インテグリン遺伝子をノックアウトしたがん細胞では細胞移動がほぼ完全に喪失するだけでなく、生存シグナルや多くの受容体を介するシグナルが著しく低下していた¹⁴⁾。興味深いことに、ごく最近の糖鎖変異体を用いた解析から、インテグリンの細胞膜近傍にあるN結合型糖鎖は

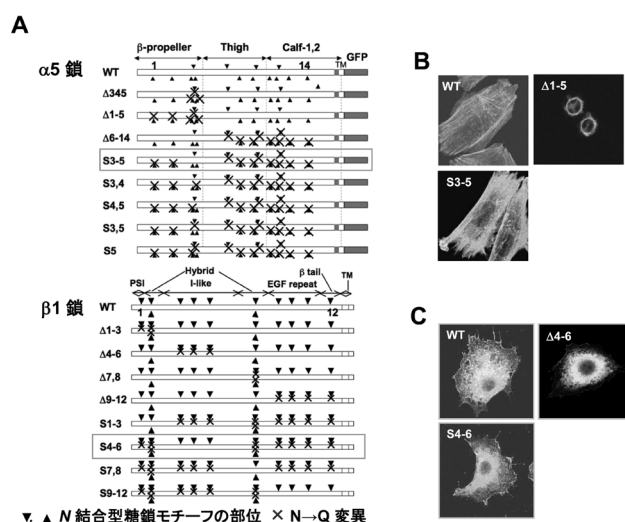


図3 N結合型糖鎖修飾の変異体の作製と細胞接着、細胞表面の発現の比較

(A) インテグリン $\alpha 5$ 鎖と $\beta 1$ 鎖のN結合型糖鎖修飾モチーフの位置と糖鎖欠損変異体。(B)細胞接着に重要な $\alpha 5$ 鎖のN結合型糖鎖修飾の位置。 $\alpha 5$ 鎖欠損細胞(CHO-B2)に各種 $\alpha 5$ 変異体を導入した。 $\Delta 1-5$ 変異体ではまったく細胞が伸展できなかった。一方で野生型(WT)およびS3-5では伸展がみられた。(C)細胞表面への発現に重要な $\beta 1$ 鎖のN結合型糖鎖修飾の位置。 $\beta 1$ 鎖欠損細胞(GE11)に各種 $\beta 1$ 変異体を導入した。WTおよびS4-6では細胞表面に $\beta 1$ インテグリンが発現していたが、 $\Delta 4-6$ では膜表面への分布がみられなかった。Isaji, T., et al. (2006). *J. Biol. Chem.*, **281**, 33258–33267, Isaji, T., et al. (2009). *J. Biol. Chem.*, **284**, 12207–12216より改変。

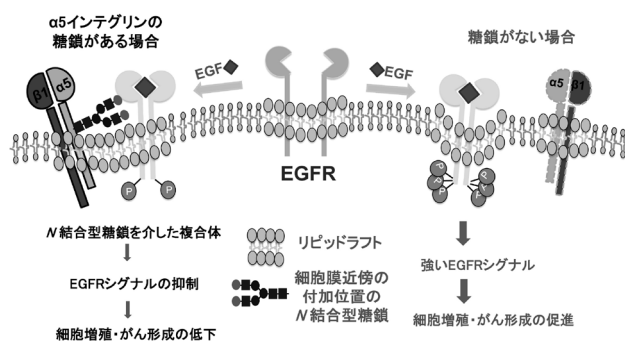


図4 N結合型糖鎖を介した細胞増殖の抑制機構

インテグリン $\alpha 5$ 鎖の細胞膜近傍の糖鎖(Calf domainにある11番目の糖鎖)がある場合(左)、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ はEGFRやリポッドラフトと糖鎖を介した複合体を形成する。EGF刺激後のEGFRのエンドサイトーシスやシグナル経路が阻害されるために細胞増殖が抑制される。一方で、インテグリン $\alpha 5$ 鎖が発現していない場合や細胞膜近傍の糖鎖がない場合(右)、多くのEGFRは $\alpha 5$ 鎖とは独立しており、EGFの刺激により十分な増殖シグナルが伝わり、細胞増殖を促進する。Hang, Q., et al. (2015). *J. Biol. Chem.*, **290**, 29345–29360より改変。

上皮増殖因子受容体(EGFR)やリポッドラフトとの相互作用に関与し、特定の付加位置のN結合型糖鎖がEGFRと複合体を形成することでがんの形成を抑制していることを

見いだした (図4)¹⁵⁾。

6. おわりに

接着分子インテグリンのN結合型糖鎖をモデル分子として取り上げた研究から、インテグリンの糖鎖は細胞移動の調節に重要であること、その糖鎖変化はがんの悪性化やEMTの過程において重要であること (図1) が明らかになった。さらには、インテグリンの特定の位置の糖鎖修飾に注目することで (図2) 糖鎖は細胞接着や細胞遊走の制御のみならず細胞表面の糖鎖を介した複合体形成に対しても重要で、細胞のシグナルを制御していること (図3) が明らかになった。糖鎖構造が異なる細胞株で同様の解析を行うと細胞増殖の抑制は弱くなるため、膜近傍の特別な構造が重要であると考えられる。今後、複合体に関わる重要なN結合型糖鎖の構造や糖鎖を介した相互作用の様式を明らかにすることで、N結合型糖鎖の重要性をより深く明らかにしてゆきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、東北医科薬科大学細胞制御学教室で行ったものです。研究を遂行するにあたり終始御指導いただきました顧建国教授、実験に協力してくださった研究室のメンバーたちに深く感謝致します。共同研究者の谷口直之先生 (理化学研究所)、川崎ナナ先生 (横浜市立大学)、橋井則貴先生 (国立医薬品食品衛生研究所)、成松久先生、佐藤隆先生 (産総研)、三好浩之先生 (慶應義塾大学) に深く感謝します。

著者寸描

●伊左治 知弥 (いさじ ともや)

東北医科薬科大学分子生体膜研究所細胞制御学教室講師。博士 (医学)。

■略歴 2000年岐阜薬科大学薬学部卒業。02年同大学院修士課程修了。06年大阪大学大学院医学系研究科博士課程終了。同年4月より東北薬科大学助手、08年より助教、16年から現職。

■研究テーマと抱負 どのようにして複雑な糖鎖を作りあげるのか、また多様な糖鎖はいかに機能を発現するのか、糖鎖の秘密を解き明かしたいと考えています。

■ウェブサイト <http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/drg/index.html>

■趣味 食べること・子供と遊ぶこと。

文 献

- 1) Gu, J., Isaji, T., Xu, Q., Kariya, Y., Gu, W., Fukuda, T., & Du, Y. (2012) *Glycoconj. J.*, **29**, 599–607.
- 2) Hedlund, M., Ng, E., Varki, A., & Varki, N.M. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 388–394.
- 3) Lu, J., Isaji, T., Im, S., Fukuda, T., Kameyama, A., & Gu, J. (2016) *J. Biol. Chem.*, **291**, 5708–5720.
- 4) Minami, A., Shimono, Y., Mizutani, K., Nobutani, K., Momose, K., Azuma, T., & Takai, Y. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 11845–11853.
- 5) Tu, L., Tai, W.C., Chen, L., & Banfield, D.K. (2008) *Science*, **321**, 404–407.
- 6) Scott, K.L. & Chin, L. (2010) *Clin. Cancer Res.*, **16**, 2229–2234.
- 7) Pereira, N.A., Pu, H.X., Goh, H., & Song, Z.W. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 14762–14770.
- 8) Isaji, T., Im, S., Gu, W., Wang, Y.Q., Hang, Q.L., Lu, J.S., Fukuda, T., Hashii, N., Takakura, D., Kawasaki, N., Miyoshi, H., & Gu, J.G. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 20694–20705.
- 9) Eckert, E.S.P., Reckmann, I., Hellwig, A., Rohling, S., El-Battari, A., Wieland, F.T., & Popoff, V. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 31319–31329.
- 10) Lu, J.S., Isaji, T., Im, S., Fukuda, T., Hashii, N., Takakura, D., Kawasaki, N., & Gu, J.G. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 34627–34641.
- 11) Du, J., Hong, S., Dong, L., Cheng, B., Lin, L., Zhao, B., Chen, Y.G., & Chen, X. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 12000–12013.
- 12) Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y., & Takagi, J. (2012) *J. Cell Biol.*, **197**, 131–140.
- 13) Kotani, N. & Honke, K. (2011) *Seikagaku*, **83**, 754–758.
- 14) Hou, S., Isaji, T., Hang, Q., Im, S., Fukuda, T., & Gu, J. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, 18430.
- 15) Hang, Q., Isaji, T., Hou, S., Im, S., Fukuda, T., & Gu, J. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 29345–29360.