

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博士	氏名	市川 英俊
学 位 論 文 題 目			
<b>Overexpression of Fucosyltransferase 8 decreases the EGF-induced ERK phosphorylation in WiDr cells</b> (WiDr 細胞におけるフコース転移酵素 8 の過剰発現は EGF による ERK のリン酸化を抑制する)			
共著者名 大隅大介、高橋素子、渋谷幸直、野田勝久、横江俊一、李承豪、三善英知 石川陸男、谷口直之			
未公表			
研 究 目 的			
<p>Epidermal growth factor receptor (以下 EGFR) によるシグナル伝達は、癌や動脈硬化など、多くの疾患において重要な役割を担っている。細胞外ドメインでリガンドと結合した EGFR は二量体化、自己リン酸化し、下流のシグナル経路を活性化する。EGFR は 170kDa の I 型膜タンパクで、その細胞外ドメインには 12ヶ所の N 型糖鎖付加部位が存在する。EGFR の N 型糖鎖は、細胞の種類によって様々な数やパターンを示し、リガンドとの結合、二量体化、細胞膜への sorting など受容体の機能において必要不可欠な役割を果たしている。しかしながら、N 型糖鎖の構成と EGFR の機能とがどのように関連しているかは、いまだよくわかっていない。</p> <p>N 型糖鎖の構成は糖転移酵素によって決定される。<math>\alpha</math>1-6 fucosyltransferase (以下 FUT8) は N 型糖鎖の最もタンパク質に近い N-アセチルグルコサミン残基に、GDP-fucose から <math>\alpha</math>1-6 結合で fucose を転移させる反応を触媒する。<math>\alpha</math>1-6 fucose の転移は肝細胞癌のマーカー AFP をはじめ、癌遺伝子の分野で研究されてきている。我々は以前、LEC ラットや肝細胞癌、卵巣漿液性腺癌の患者の組織で、FUT8 の発現が著明に亢進することを報告した。しかしながら、シグナル伝達における、<math>\alpha</math>1-6 fucose 付加の生物学的役割は十分に解明されていない。</p> <p>今回我々は、EGFR の N 型糖鎖に <math>\alpha</math>1-6 fucose が付加による EGF signaling への影響を解明するため、FUT8 を transfection した細胞株を用いて検討した。</p>			
材 料 ・ 方 法			
ヒト大腸癌細胞株 WiDr にヒト FUT8 を transfection し、Mock transfectant と共に使用した。			
1. 60~80%confluent に培養した WiDr 細胞を可溶化して回収、遠心したのち上清を回収、			

Protein Assay CBB kitにてタンパク濃度を測定した。whole cell lysate を 10%SDS-PAGE し、ニトロセルロース膜へ転写、抗 FUT8 抗体 15C6 を用いて western blotting を行った。

2. 同様の方法で得られた whole cell lysate と、whole cell lysate に抗 EGFR 抗体と Protein G Sepharose 4 fast flow を用いて免疫沈降を行ったものをそれぞれ抗 EGFR 抗体で western blotting した。細胞表面ビオチン化には s-NHS—biotin、lectin blotting には LCA(Lens culinaris agglutinin)を用いた。
3. 前述の手法で得られた whole cell lysate を抗チロシンリン酸化抗体、抗 MEK(MAPK or ERK kinase) 抗体、抗 ERK(extracellular signal-regulated kinase)抗体、抗リン酸化 MEK 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体を用いて western blotting した。
4. 前述の手法で得られた whole cell lysate を抗 EGFR 抗体で免疫沈降し、抗チロシンリン酸化抗体で western blotting した。
5.  $^{125}\text{I}$ -EGF を用いて endocytosis rate を測定した。

western blotting には ECL kit、ビオチン化したものと lectin blotting には Vectastain ABC kit を用いて可視化した。

## 成績

### 1. FUT8 を安定して発現する WiDr 細胞株クローンの樹立

抗 FUT8 抗体 15C6 を用い western blot を行った。Mock transfectant ではバンドが認められなかったが、selection されたクローンは FUT8 を安定して高発現していた。

### 2. FUT8 transfectant の EGFR の解析

whole cell lysate による western blotting では EGFR の total の発現量は、Mock transfectant と FUT8 transfectant の間で差が見られなかった。次に細胞表面をビオチン化し、免疫沈降を行ったが、細胞表面の EGFR の発現量に関しても、Mock transfectant と FUT8 transfectant との間に差は認められなかった。しかしながら  $\alpha$  1-6 fucose を認識するレクチンである LCA を用い lectin blotting を行うと、Mock transfectant に比べ、FUT8 transfectant で  $\alpha$  1-6 fucose が著明に増加していることが確認された。

### 3. FUT8 transfectant での EGF signaling に関する検討

EGF 刺激後、whole cell lysate を回収、抗チロシンリン酸化抗体を用い western blotting を行った。Mock transfectant と FUT8 transfectant との間で、リン酸化された total のタンパク質に差は認められなかった。しかしながら、抗 MEK 抗体、抗 ERK 抗体を用いて western blotting を行ったところ、MEK のリン酸化、ERK のリン酸化は FUT8 transfectant で著明に抑制されることがわかった。

#### 4. EGFR の自己リン酸化についての検討

EGF 刺激後、抗 EGFR 抗体で免疫沈降を行い、抗チロシンリン酸化抗体を用いて western blotting を行った。Mock transfectant と FUT8 transfectant との間で、EGFR の自己リン酸化について明らかな差は認められなかった。

#### 5. FUT8 transfectant における EGFR の endocytosis rate についての検討

Mock transfectant に比べ、FUT8 transfectant では、<sup>125</sup>I-EGF による EGFR の internalization rate が減少していた。

### 考 察

糖タンパク質の糖鎖部分が増加することで、糖タンパク質の立体構造や他の分子に対する親和性が変化し、それにより糖タンパク質の機能が変化する。EGFR の N 型糖鎖は EGFR の機能に影響し、EGF signaling を変化させる。ERK は細胞増殖のみならず、血管新生、卵成熟、未受精卵の M 期停止など様々な機能を持つ MAPK(mitogen-activated protein kinase)であるが、FUT8 を高発現させ、WiDr の EGFR の N 型糖鎖に  $\alpha$ 1-6fucose を付加させることにより、著明に ERK のリン酸化が抑制された。EGFR の自己リン酸化は差がなかったが、EGFR の internalization rate は、FUT8 transfectant で著明に減少していた。すなわち、internalization の減少により、ERK のリン酸化が抑制されたものと考えられる。




### 結 論

EGFR の N 型糖鎖に  $\alpha$ 1-6 fucose が付加することで、EGFR の internalization が減少した結果、EGF による ERK のリン酸化が抑制される。

#### 引用文献

1. Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase III enhances the epidermal growth factor-induced phosphorylation of ERK in HeLaS3 cells by up-regulation of the internalization rate of the receptors. Sato Y. *J Biol Chem.* 2001 Apr 13;276(15):11956-62.
2. alpha1,6fucosyltransferase is highly and specifically expressed in human ovarian serous adenocarcinomas. Takahashi T. *Int J Cancer.* 2000 Dec 15;88(6):914-9.
3. Gene expression of alpha1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: a possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein. Noda K. *Hepatology.* 1998 Oct;28(4):944-52.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	市川 英俊
審査委員長 谷口 隆信 			
審査委員 石川 睦男 			
審査委員 柏柳 誠 			
学位論文題目			
Overexpression of fucosyltransferase 8 decreases the EGF-induced ERK phosphorylation in WiDr cells. (WiDr細胞におけるフコース8の過剰発現はEGFによるERKのリン酸化を抑制する)			
共著者名 大隈大介、高橋素子、渋川幸直、野田勝久、横江俊一、李承豪、三善英知、石川睦男、谷口直之			
未公表			

糖鎖によるタンパク質の修飾は、タンパク質の溶解性を上げ、抗原性を被覆し、またプロテアーゼによる分解を防ぐとともに、神経細胞接着分子(N-CAM)に結合したポリシアル酸のようにN-CAM同士による結合を調節するなど、タンパク質の機能発現に極めて重要である。また糖鎖の異常は糖尿病、アルツハイマー病、炎症、癌などの様々な病態と関連していることが明らかにされており、最近では異種移植において糖鎖の改変を行い拒絶反応を軽減させる試みも行われている。著者らは肝癌や卵巣癌で発現の亢進することが知られている $\alpha$ 1-6フコシルトランスフェラーゼに着目し、この糖転移酵素の発現がほとんど認められないヒト大腸癌細胞株WiDrに強制的に発現させ、この糖転移酵素の発現によって細胞にどのような変化が現れるかについて検討している。著者らは癌や動脈硬化など様々な疾患に関わっている上皮性増殖因子受容体(EGF-R)を取り上げている。EGF-Rは膜貫通型のタンパク質で、その細胞外ドメインには12箇所のN型糖鎖付加部位が同定されており、この受容体とリガンドとの結合親和性や2量体化、受容体のソーティングなど受容体の基本的機能に糖鎖が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。 $\alpha$ 1-6フコシルトランスフェラーゼはN型糖鎖の最もタンパク質に近いNアセチルグルコサミン残基へのフコース転移を触媒し、この酵素の強制発現は糖鎖の構成に変化をもたらすと予想され、このことは実験的にも確認された。即ちEGF-Rの細胞全体及び細胞表面における発現量には糖転移酵素の発現によって変化は見られなかったが、フコースを特異的に認識するレクチンのEGF-Rに対する結合は大幅に増加していた。この状態で細胞をEGFで刺激し、細胞内情報伝達経路について検討したところ、ERK並びにその上流のタンパク質キナーゼであるMEKのリン酸化が著明に抑制され、ERKの系路が抑制されていると考えられた。EGFとEGF-Rとの結合性には変化が認められなかったため、EGF-R以下の情報伝達経路に違いがあると考え、EGF-R活性化後早期に起こる受容体のインターナリゼーションについて検討したところ、糖転移酵素発現細胞ではEGF-Rのインターナリゼーションが有意に低下しており、このことが受容体以下のERK経路のリン酸化抑制につながっていると結論づけられた。

この現象が癌や炎症などの病的な状態においてどのような意義を持つのか、病態との関連性について今後の解明が期待される。

以上この論文で述べられている実験結果並びに考察は、EGF-Rの糖鎖修飾と機能の関連に一定の理解を与えるものです。

申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識/経験/見識は課程博士に相応しいものであると判断しました。以上、論文/諮問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告申し上げます。