



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

腸管上皮細胞におけるヘパラン硫酸の硫酸化構造と機能に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-12-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西田, 光貴 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/49104

氏 名 (本 国 籍)	西 田 光 貴 (岐 阜 県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 甲 第 6 2 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 6 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 3 条 第 1 項 該 当
研 究 科 及 び 専 攻	連 合 農 学 研 究 科 生 物 資 源 科 学 専 攻
研 究 指 導 を 受 け た 大 学	岐 阜 大 学
学 位 論 文 題 目	腸 管 上 皮 細 胞 に お け る ヘ パ ラ ン 硫 酸 の 硫 酸 化 構 造 と 機 能 に 関 す る 研 究
審 査 委 員 会	主 査 岐 阜 大 学 教 授 石 田 秀 治 副 査 岐 阜 大 学 准 教 授 矢 部 富 雄 副 査 静 岡 大 学 教 授 森 誠

論 文 の 内 容 の 要 旨

ヘパラン硫酸は、線虫からほ乳類に至る動物細胞の表面や細胞外マトリクスに普遍的に存在する直鎖上の糖鎖で、分子内に存在する硫酸化修飾構造に応じて生理活性タンパク質と相互作用し、種々の生理機能の調節に関与することが知られている。また、近年小腸上皮の正常な発達にヘパラン硫酸が関与することが報告されたことから、本研究では、長い間作用機構が明らかにされていなかった、水溶性食物繊維のペクチンが小腸絨毛の形態変化を誘導する分子メカニズムを解明する糸口として、腸管上皮細胞表面のヘパラン硫酸の硫酸化修飾に注目した。そして、ペクチンが小腸絨毛へ生理作用を及ぼす際に、細胞表面のヘパラン硫酸に対して与える影響を解析することで、腸管上皮細胞におけるヘパラン硫酸の硫酸化構造と機能との相関を明らかにすることを目的として実験を行い、以下の成果を得た。

(1) 細胞表面ヘパラン硫酸が細胞外刺激に応答する機構の解明

細胞表面ヘパラン硫酸が細胞外の刺激に応答する機構は解明されていないため、マウス線維芽細胞 (L-M 細胞) を用いて、細胞がアドレナリンに応答して神経成長因子 (NGF) を分泌する際の細胞表面ヘパラン硫酸の応答機構の存在を調べた。アドレナリンを添加した3時間後の細胞からヘパラン硫酸を回収して精製した後、ヘパラン硫酸分解酵素によって構成単位二糖を得た後、HPLC に供して二糖組成をアドレナリン無添加群と比較した結果、アドレナリンの刺激により GlcNAc の C6 位のみが硫酸化された二糖の割合が有意に増加することを明らかにした。また、L-M 細胞に存在し、その部位の硫酸化を触媒する酵素遺伝子 6-O-sulfotransferase (6-OST-1) の発現量も増加していること、さらに、この酵素の発現は Src-ERK1/2 経路によって制御されていることを阻害剤を用いた実験により明らかにした。これにより、L-M 細胞表面ヘパラン硫酸は、

アドレナリンの刺激によって 6-OST-1 の発現を Src-ERK1/2 経路を介して誘導し、糖鎖の硫酸化構造を変化させる応答機構を有していることが明らかとなった。

(2) 小腸上皮細胞様モデル細胞におけるペクチン刺激に対する細胞表面ヘパラン硫酸構造変化の分子メカニズムの解明

ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を小腸上皮細胞様に分化させ、ペクチン添加による細胞表面ヘパラン硫酸構造への影響を調べたところ、構成単位二糖の GlcNAc の N 位と C6 位、ウロン酸の C2 位が硫酸化された二糖 (Δ Di-TriS) が減少し、細胞表面ヘパラン硫酸の硫酸化構造の大きな変化が認められた。この構造変化に影響を与えると考えられる脱硫酸化酵素 HS 6-O-endosulfatase (HSulf) に注目し、ペクチン添加時の Caco-2 細胞内発現をリアルタイム RT-PCR により確認したところ、Caco-2 において発現する 2 種類の HSulf のうち、HSulf-1 の発現はペクチン添加により抑制され、一方、HSulf-2 の発現は増加することが明らかとなった。このことから、分化 Caco-2 細胞へのペクチン添加によって HSulf-2 の発現が誘導され、それにより分化 Caco-2 細胞表面ヘパラン硫酸の硫酸化構造が変化したことが示唆された。また、ペクチンと相互作用する細胞外マトリクスタンパク質のフィブロネクチンとその受容体である $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンに注目し、抗体を用いて分化 Caco-2 細胞における発現分布を免疫染色法により検討したところ、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンはペクチンの添加によらず広く発現しているものの、ペクチンと相互作用が可能なタイトジャンクションより上部にも一部発現していること、また、ペクチン添加によりアピカル側のフィブロネクチンの発現量が増加することを明らかにした。そこで、ペクチンによる HSulf-2 の発現誘導にフィブロネクチンや $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンが関与しているかを調べるため、フィブロネクチンのペクチンとの結合部位である III₁C ペプチドやフィブロネクチンのインテグリンとの結合部位である RGD ペプチドを用いて、阻害実験を行った。その結果、ペクチンによる HSulf-2 の発現誘導は、それぞれの阻害剤により阻害されることが明らかとなり、ペクチンはこれらのタンパク質を介して HSulf-2 の発現を制御し、ヘパラン硫酸の構造変化をもたらしていることが示唆された。

さらに、小腸上皮を *in vitro* で再現するために、小腸陰窩細胞の IEC-6 細胞と Caco-2 細胞とを用いて複合培養系を構築した。トランスウェルの分化 Caco-2 細胞のアピカル側にペクチンを添加すると、アウターウェルの IEC-6 細胞の生育数が、ペクチンの濃度依存的に増加することを見出した。これは、ペクチンにより Caco-2 細胞が産生する細胞増殖因子等のバソラテラル側からの分泌が誘導され、IEC-6 細胞の増殖が促進されたことを示唆している。そこで、小腸上皮の発達に重要な役割を果たす Wnt タンパク質に注目し、Wnt3a と Wnt11 を IEC-6 細胞に投与すると、細胞増殖が誘導されることを明らかにした。また、ペクチン添加時には Caco-2 細胞内 Wnt3a タンパク質の発現量が上昇すること、さらに、ペクチン添加により Caco-2 細胞表面のヘパラン硫酸の硫酸化構造は、Wnt タンパク質に対して結合力を著しく減少させることを明らかにした。すなわち、ペクチンに誘導される小腸上皮細胞表面のヘパラン硫酸の硫酸化構造の変化は、陰窩細胞の増殖を促す Wnt タンパク質の分泌を効率化する役割を担っており、その結果絨毛が伸長する可能性が考えられた。

以上、本学位論文で、動物細胞の表面に普遍的に発現するヘパラン硫酸糖鎖は、細

胞外刺激に応じてシグナル伝達経路を介した生合成酵素発現系が調節され、その結果糖鎖の構造変化が制御されていることを明らかにし、この硫酸化構造調節機構が、腸管上皮細胞において食品成分の化学情報を認識して絨毛の形態変化をもたらす生理機能の鍵となっている可能性を提案した。

審査結果の要旨

ヘパラン硫酸は、線虫からは乳類に至る動物細胞の表面や細胞外マトリクスに普遍的に存在する直鎖上の糖鎖で、分子内に存在する硫酸化修飾構造に応じて生理活性タンパク質と相互作用し、種々の生理機能の調節に関与することが知られている。申請者は、長い間作用機構が明らかにされていなかった、水溶性食物繊維のペクチンが小腸絨毛の形態変化を誘導する分子メカニズムを解明する糸口として、近年小腸上皮の正常な発達に関与することが報告された、腸管上皮細胞表面のヘパラン硫酸の硫酸化修飾に注目した。すなわち、ペクチンが小腸絨毛へ生理作用を及ぼす際に、細胞表面のヘパラン硫酸に対しても影響を与えるならば、ヘパラン硫酸の硫酸化構造変化を指標として、絨毛の形態変化の分子機構を考察することができると考えた。そこで、本論文では、マウス線維芽細胞を用いて、細胞表面ヘパラン硫酸が細胞外の刺激に応答する機構を解明した後、小腸上皮様モデル細胞を用いて、ペクチンの刺激によるヘパラン硫酸の硫酸化構造と機能に与える影響について考察した。

まず、細胞表面ヘパラン硫酸が細胞外の刺激に応答する機構を明らかにするためにマウス線維芽細胞がアドレナリンに反応して神経成長因子を分泌する際の細胞表面ヘパラン硫酸の反応機構を調べた。糖鎖を構成する二糖単位の分析の結果、アドレナリン添加後3時間で、GlcNAcのC6位のみが硫酸化された二糖の割合が有意に増加すること、その硫酸化を触媒する酵素遺伝子の発現量も増加していること、さらに、この酵素の発現はSrc-ERK1/2経路によって制御されていることを明らかにした。これにより、細胞表面ヘパラン硫酸は、細胞外の刺激によって硫酸化構造を変化させる反応機構を有していることが明らかとなった。

次に、小腸上皮細胞様モデル細胞のCaco-2細胞を用いて、ペクチン添加による細胞表面ヘパラン硫酸構造への影響を調べたところ、硫酸化構造の変化が認められ、その構造変化に重要と考えられる特定の脱硫酸化酵素の発現が誘導されていた。また、ペクチンと相互作用する細胞外マトリクスタンパク質のフィブロネクチンとその受容体である $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンに注目し、それぞれの阻害剤を用いた実験により、これらのタンパク質を介して脱硫酸化酵素の発現が誘導されていることを明らかにした。さらに、小腸陰窩細胞のIEC-6細胞とCaco-2細胞との複合培養において、トランスウェルのCaco-2細胞のアピカル側にペクチンを添加すると、アウトターウェルのIEC-6細胞がペクチンの濃度依存的に増加することを見出した。

最後に、小腸上皮の発達に重要な役割を果たすWnt(ウィント)タンパク質をIEC-6細胞に投与すると、細胞増殖が誘導されること、また、ペクチン添加時にはCaco-2細胞内Wntタンパク質の発現が上昇すること、さらに、ペクチン添加によりCaco-2細胞表面のヘパラン硫酸の硫酸化構造は、Wntタンパク質に対して結合力を著しく減少さ

せることを明らかにした。すなわち、ペクチンに誘導される小腸上皮細胞表面のヘパラン硫酸の硫酸化構造の変化は、陰窩細胞の増殖を促す Wnt タンパク質の分泌を効率化する役割を担っており、その結果絨毛が伸長する可能性が考えられた。

以上、本研究は、食品成分による分子レベルでの生理作用機序を、細胞表面に普遍的に存在する糖鎖の構造変化を指標にするという新しい視点で明らかにしたことから、審査委員会は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

以上の結果は、以下の論文にまとめられ、学位論文の基礎となる公表論文となっている。

- Nishida, M., Kozakai, T., Nagami, K., Kanamaru, Y. and Yabe, T.: Structural alteration of cell surface heparan sulphate through the stimulation of the signaling pathway for heparan sulphate 6-*O*-sulphotransferase-1 in mouse fibroblast cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
- Nishida, M., Murata, K., Kanamaru, Y. and Yabe, T.: Pectin of *Prunus domestica* L. alters sulfated structure of cell-surface heparan sulfate in differentiated Caco-2 cells through stimulation of heparan sulfate 6-*O*-endosulfatase-2, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.