

学 位 論 文 題 名

ラット線維肉腫細胞株のインスリン様成長因子Ⅱ
／マンノース 6 リン酸受容体に関する研究

学位論文内容の要旨

I 研究目的

インスリン様成長因子Ⅱ（IGFⅡ）／マンノース 6 リン酸（Man-6-P）受容体は、単一の糖蛋白質でありながら、IGFⅡ とリソゾーム酵素のリソゾームへの移行シグナルである Man-6-P の、二つの異なるリガンド結合部位を持つ多機能受容体である。IGFⅡ をリガンドとした結合には受容体の糖鎖が必須であるが、糖鎖の性状について詳しいことは知られておらず、また受容体を介した作用機作についても知見は必ずしも一定していない。

本研究は本受容体を強く発現するラット線維肉腫細胞について、低発現細胞との比較において、本受容体の糖鎖と IGFⅡ 結合の関連を調べ、このリガンドが受容体を介してイノシトールリン脂質代謝回転を活性化することを明らかにしたものである。

II 実験方法

1) 細胞株の培養

ラット線維肉腫細胞株（KMT-17）は、北大癌研病理より供与され、10%ウシ胎仔血清を含む培地 RPM1640にて、ラット線維芽細胞株（NRK-49F）は、5%血清を含む Dulbecco 変法 Eagle 培地により継代培養した。

2) 受容体の精製

酵母変異株よりホスホマンナンを精製し、弱酸水解により得られたリン酸化オリゴ糖を固定化しアフィニティーカラムとした。このカラムを用いて本受容体を精製した。さらに精製受容体に対する家兎抗体を作製した。

3) 受容体のメタボリックラベリング

[^{35}S] メチオニンあるいは [$2-^3\text{H}$] マンノースで細胞を30分間ラベルし、完全培地に交換した後、一定時間チェイスした。その後細胞を界面活性剤で可溶化し、抗受容体抗体で免疫沈

降させた受容体をドデシル硫酸ナトリウム存在下で電気泳動 (SDS-PAGE) し、オートラジオグラフィーによって受容体を検出した。ツニカマイシン処理は、終濃度 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ で2時間行った後、 ^{35}S ラベリングを行った。

4) 受容体糖鎖の解離

^{35}S 標識細胞から免疫沈降で得られた受容体をエンドー β -N-アセチルグルコサニミダーゼ (EndoH) で 37°C , 16時間処理した。

5) 糖鎖パターンの解析

[2- ^3H] マンノース標識細胞から SDS-PAGE で標識受容体を分離し、プロナーゼ E 消化で得られた糖ペプチドを Con A カラムにより、未吸着 (三および四分岐複合糖鎖), 10 mM α -メチルグルコシド溶出 (二分岐複合糖鎖), 100 mM α -メチルマンノシド溶出 (高マンノース型糖鎖) 画分に分画し、 ^3H 活性値から量比を求めた。

6) フローサイトメトリー

細胞を抗受容体抗体と反応させた後、蛍光標識抗家兎 IgG 抗体を結合させ、抗体強度をフローサイトメーターで測定した。

7) 細胞表面受容体と IGF II の結合実験

^{125}I -IGF II と細胞を 4°C , 16時間反応させ、結合した IGF II の放射活性を測定し、Scatchard 解析により細胞表面の受容体数および解離定数 (K_d) を求めた。

8) イノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C (PLC) 活性の測定

無血清培養液中の KMT-17細胞 (5×10^5) に、IGF II を加え、 37°C で一定時間反応後、氷冷過塩素酸で反応を停止した。遠心上清を中和後、イノシトール-1, 4, 5-三リン酸 (IP_3) アッセイシステム (Amersham) により測定した。

III 結 果

1) IGF II / Man-6-P 受容体の精製

ホスホオリゴマンナンアフィニティークラムを用いて、高収量、高純度で受容体を精製した。ラット肝および NRK-49F 細胞の受容体分子量は 250,000 (250K) であるのに対し、KMT-17細胞受容体は 240K であり 10K の違いが見られた。

2) KMT-17細胞と NRK-49F 細胞受容体の糖鎖構造の比較

ツニカマイシンで両細胞の受容体の糖鎖結合を阻害すると、分子量は共に 225K となり、受容体の蛋白質部分には分子量的な差はなかった。EndoH による分子量の変化は両者とも同じ (10

K)であったことから、両細胞の受容体分子量の相違は、糖鎖とくに複合型糖鎖の違いによる事が示された。そこで、複合型糖鎖を ConA のアフィニティークロマトグラフィーによって検討すると、NRK-49F 細胞の複合型糖鎖タイプは三および四分岐の高分岐化糖鎖が多いのに対し、KMT-17細胞では複合型糖鎖のほぼ半分が二分岐構造であった。

3) KMT-17細胞の本受容体発現量およびリガンド結合能

受容体抗体で調べた細胞表面受容体の発現量は、KMT-17細胞では NRK-49F 細胞に比較し10倍以上高かった。IGF II リガンドの結合でも KMT-17細胞の受容体数は細胞当たり 7.3×10^5 個であるのに対し、NRK-49F 細胞では 2.0×10^4 個であった。Kd 値は、KMT-17細胞が 1.5 nM 、NRK-49F 細胞は 0.6 nM であり、IGF II に対する結合親和性は KMT-17細胞で低かった。

4) KMT-17細胞の IGF II / Man-6-P 受容体を介した PLC の活性化

KMT-17細胞において IGF II は濃度依存的に IP_3 産生を促進し、 10 nM で最大活性を示した。その IP_3 産生量は IGF II 刺激後15秒でピークに達する速やかな反応であり、PLC の活性化は抗受容体抗体により特異的に抑制された。

IV 考 案

本受容体の IGF II 結合には、受容体に結合するアスパラギン糖鎖が必須であるとされるが、糖鎖のタイプは知られていなかった。本研究において、ラット線維肉腫細胞 (KMT-17) より精製した IGF II / Man-6-P 受容体の分子量は、ラット肝あるいは線維芽細胞 (NRK-49F) の受容体より10K小さく、その違いは糖鎖の違いによることが分かった。糖鎖分析によって、KMT-17細胞の受容体の複合型糖鎖は NRK-49F 細胞に比較して低分岐化糖鎖が多いことが明らかとなり、他方 KMT-17細胞の IGF II 結合親和性は NRK-49F 細胞より低かった。これらの結果は、IGF II / Man-6-P 受容体の高分岐化複合型糖鎖が、受容体の親和性に大きく寄与していることを強く示唆するものである。

IGF II 刺激による本受容体のシグナル伝達については、用いた細胞が異なるためか、統一した見解に至っていない。マウス 3T3 細胞では本受容体は G 蛋白質 (G_{i2}) を介して細胞外カルシウムの取り込みを亢進することが、またラット腎尿細管細胞膜では本受容体を介した PLC の活性化が知られている。本研究において、KMT-17細胞は、結合親和性の低い受容体が大量に発現しており、IGF II のシグナルは、KMT-17細胞受容体を介してイノシトールリン脂質代謝回転を亢進する事が明らかとなった。これらの知見が本細胞の特性とどう関連するか、今後の検討

課題であろう。

V 結 語

ラット線維肉腫細胞株における IGF II／Man－6－P 受容体の性状について、ラット線維芽細胞との比較において検討し、以下の結果を得た。

- 1. 本受容体は、ホスホマンナンアフィニティークロマトにより高収量高純度で精製し得た。
- 2. 両細胞の受容体蛋白サイズに差は認められなかったが、線維肉腫細胞受容体は糖鎖含量も、高分岐複合型糖鎖の割合も低かった。
- 3. ラット線維肉腫細胞は IGF II との結合親和性の低い受容体を大量に発現していた。従って、受容体のリガンド結合能には、高分岐複合型糖鎖が寄与することが強く示唆された。
- 4. 線維肉腫細胞では、IGF II の刺激は、本受容体を介して PLC を活性化することによって情報伝達されることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 牧 田 章

I 研究目的

インスリン様成長因子 II（IGF II）／マンノース 6 リン酸（Man－6－P）受容体は、単一の糖蛋白質でありながら、IGF II とリソゾーム酵素のリソゾームへの移行シグナルである Man－6－P の、二つの異なるリガンド結合部位を持つ多機能受容体である。IGF II をリガンドとした結合には受容体の糖鎖が必須であるが、糖鎖の性状について詳しいことは知られておらず、また受容体を介した作用機作についても知見は必ずしも一定していない。

本研究では本受容体を強く発現するラット線維肉腫細胞について、低発現細胞との比較において、本受容体の糖鎖と IGF II 結合能との関連を検索し、さらに線維肉腫細胞における本受容体の細胞情報伝達系への関与を検討した。

II 実験方法

1) 細胞株：ラット線維肉腫細胞株 (KMT-17) は北大癌研病理より、ラット線維芽細胞株 (NRK-49F) は国立衛生研究所細胞バンクより供与された。

2) 受容体の精製：酵母変異株より得られたリン酸化オリゴ糖を固定化しアフィニティーカラムとし、本受容体を精製した。さらに精製受容体に対する家兎抗体を作製した。

3) 受容体のメタボリックラベリング： $[^{35}\text{S}]$ メチオニンあるいは $[2-^3\text{H}]$ マンノースで細胞をラベルし、一定時間チェイスした。抗受容体抗体で免疫沈降させた受容体をドデシル硫酸ナトリウム存在下で電気泳動 (SDS-PAGE) し、オートラジオグラフィーによって検出した。さらにツニカマイシンにより糖鎖結合を阻害して検討した。

4) 受容体糖鎖の解離： ^{35}S 標識細胞から免疫沈降で得られた受容体をエンドー β -N-アセチルグルコサニミダーゼ H (EndoH) で処理した。

5) 糖鎖パターンの解析： $[2-^3\text{H}]$ マンノース標識細胞から免疫沈降、SDS-PAGE で標識受容体を分離し、プロナーゼ E 消化で得られた糖ペプチドを Con A カラムにより未吸着 (三および四分岐複合糖鎖)、10nM α -メチルグルコシド溶出 (二分岐複合糖鎖)、100mM α -メチルマンノシド溶出 (高マンノース型糖鎖) 画分に分画し、 ^3H 活性値から量比を求めた。

6) フローサイトメトリー：細胞を抗受容体抗体次いで蛍光標識抗家兎抗体を結合させ、蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。

7) 細胞表面受容体と IGF II の結合実験： ^{125}I IGF II を用いた Scatchard 解析により細胞表面の受容体数および解離定数 (Kd) を求めた。

8) イノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C (PLC) 活性の測定：IGF II 刺激に伴う、PLC の活性化を細胞内イノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP_3) の変動により検討した。

III 結果ならびに考察

ホスフォオリゴマンナンアフィニティーカラムを用いて、受容体を精製し得た。ラット肝および NRK-49F 細胞の受容体分子量は 250,000 (250K) であるのに対し、KMT-17 細胞受容体は 240K であり 10K の違いが見られた。両細胞の分子量の違いを明らかにするため、ツニカマイシンにより受容体の糖鎖結合を阻害すると、分子量は共に 225K となり、受容体の蛋白質部分には分子量的な差はなかった。EndoH による分子量の変化は両者とも同じ (10K) であったことから、両細胞の受容体分子両の相違は、糖鎖とくに複合型糖鎖の違いによる事が示された。そこで、複合型糖鎖を ConA アフィニティークロマトによって検討すると、NRK-49F 細胞の複合

型糖鎖タイプは高分岐化糖鎖が多いのに対し、KMT-17細胞では複合型糖鎖のほぼ半分が低分岐構造であり、KMT-17細胞の本受容体の細胞内プロセッシングはNRK-49F細胞とは異なっている事が明らかとなった。さらに、この複合糖鎖パターンの違いが分子量の差になっている可能性が示唆された。

抗受容体抗体を用いた細胞表面受容体の発現量の検索では、KMT-17細胞ではNRK-49F細胞に比較し10倍以上多く、IGF II リガンドの結合でもKMT-17細胞の受容体数はNRK-49F細胞の35倍も多かった。一方、IGF II に対する結合親和性はKMT-17細胞で低かった。これらの結果からKMT-17細胞には糖鎖パターンの異なる分子量の低い本受容体が多量に発現している事が明らかになり、糖鎖パターンとリガンド結合能との関係では、IGF II は高分岐複合型糖鎖に富む受容体と高い親和性を有する事が示唆された。

本受容体を高発現しているKMT-17細胞において、IGF II 刺激に伴うPLCの変化を検討すると、IGF II は濃度依存的にIP₃産生を促進し、さらにIP₃はIGF II -刺激後15秒でピークに達する速やかな反応を示した。これらの反応は抗受容体抗体によって特異的に抑制されたことから、KMT-17細胞では、本受容体を介したイノシトールリン脂質代謝回転の亢進が明らかとなった。これらの知見が本細胞の特性とどう関連するのかは、今後の検討課題と考えられた。

以上、本研究所は、ラット線維肉腫細胞株において、糖鎖パターンの異なるIGF II /Man-6-P受容体が高発現されている事を見だし、本受容体とイノシトールリン脂質代謝回転との関与を明らかにし、さらにリガンド結合に必須と言われている本受容体の糖鎖構造とリガンド結合能との関係を検討したものであり、博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。