

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07339

研究課題名(和文)糖鎖によるErbBレセプターの物性制御メカニズムとその応用

研究課題名(英文)The mechanisms of conformational regulation of ErbB receptors by N-glycans

研究代表者

高橋 素子(Takahashi, Motoko)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：00303941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：増殖因子受容体ErbBの糖鎖が受容体の物性と機能にどのように影響するかを検討した。EGFR N420、ErbB3 N418、ErbB4 N333の糖鎖は受容体の活性化に関与していることが示唆された。これらはすべてCHOK1細胞では付加率100%でフコースのない複合型糖鎖であった。sEGFR N420QおよびsErbB3 N418Q糖鎖欠損変異体は野生型と比較してシグナル抑制作用が増強していた。示差走査熱量測定によって、sErbB3 N418Qは熱安定性が低下していることがわかった。N418の糖鎖はsErbB3の構造安定性に寄与しており、その糖鎖欠損変異体は構造変化しやすいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ErbBはがん治療のターゲットであり、その制御機構を明らかにすることは社会的にも重要である。研究代表者は糖鎖によるErbBの制御について調べているが、その根本的なメカニズムは「糖鎖による受容体の物性制御」にあると考えている。本研究の結果、特定の糖鎖がErbBの構造変化に関与していることが示唆された。同時に、それらの糖鎖に共通する特徴も見出した。以上の結果は糖鎖の機能の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The functional regulation and conformational regulation of growth factor receptors ErbB by N-glycans were examined. N-glycans on EGFR N420, ErbB3 N418, ErbB4 N333 were involved in receptor activation. We examined the site-specific glycosylation status and glycan structures of ErbBs and found that their glycan occupancies were 100% and they were a complex type with little fucose. The signaling inhibitory effects were increased in sEGFR N420Q and sErbB3 N418Q mutants. Although the crystal structure of sErbB3 was not altered by the deletion of N-glycan on N418 by N418Q mutation, the melting temperature of sErbB3 N418Q decreased compared to the wild type, suggesting that this N-glycan contributes to the conformational stability of sErbB3. Taken together, our results suggested that N-glycan on N418 of sErbB3 is involved in the stabilization of structure and that deletion of this glycan increases the structural flexibility which results in facilitation of dimer formation.

研究分野：生化学、糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 増殖因子受容体 ErbB EGFR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

増殖因子受容体は発がんおよびがんの進展に深く関与しており、がん治療のターゲットとなっている。受容体分子は多くの場合、糖鎖修飾を受けており、糖鎖による機能制御メカニズムを明らかにすることは重要である。研究代表者は以前より増殖因子受容体の糖鎖について研究してきた。その過程で、糖タンパク質の糖鎖の機能は、レクチン様物質との相互作用をすることと、タンパク質の立体構造に影響することの2つに帰結するという仮説を持つに至った。前者に関しては国内外で優れた研究が進んでいるが、後者に関しては明確な証明をされている例はほとんどない。

ErbB ファミリーには EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 の4つの分子が属し、それぞれ10本前後のN型糖鎖をもつが、そのうちEGFRのN420とErbB3のN418に結合する糖鎖は、レセプターの二量体形成と活性化に関与することを報告してきた。また、ErbB3の細胞外ドメイン(sErbB3)はシグナル抑制作用を有するが、N418の糖鎖を欠損した変異体ではその作用が著しく増強する。以上の結果は、特定のN型糖鎖がErbBレセプターの分子間相互作用および立体構造変化に関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、糖鎖によるErbBの物性制御メカニズムを解明することを目的とする。これまでの研究の結果、特定のN型糖鎖がErbBレセプターの分子間相互作用および立体構造変化に関与している可能性が示唆された。ErbBの細胞外ドメインおよびその糖鎖欠損変異体を調製し、その物性を解析することによって、糖鎖によるタンパク質の物性制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ErbBの糖鎖欠損変異体におけるシグナル変化とそのメカニズムの解析

ErbBの細胞外ドメインの糖鎖付加部位にアミノ酸変異を導入することによって作製した糖鎖欠損変異体のシグナルを観察した。EGFRとErbB3についてはすでに解析が終了しているため、ErbB4について解析を行った。CHOK1細胞を用いて、ErbB4の糖鎖欠損変異体の安定発現細胞を作製し、リガンド刺激に対するシグナルを解析した。

(2) ErbBの糖鎖構造解析

sEGFR、sErbB2、sErbB3、sErbB4を大量精製し、マスマスペクトロメトリーを用いて各糖鎖付加部位の糖鎖の付加率と糖鎖構造を決定した。この時、MALDI-TOF-MSとOrbitrap LC-MS/MSを用いて解析し、結果を比較検討した。

(3) sErbBのシグナル抑制作用の解析

sEGFRとsErbB3の糖鎖欠損変異体について、シグナル抑制作用を検討した。sEGFRとsErbB3の糖鎖欠損変異体のEGFシグナルおよびヘレグリンシグナル抑制作用を検討した。

(4) sErbBの物性

sEGFR N420Q糖鎖欠損変異体と野生型、またsErbB3 N418Q糖鎖欠損変異体と野生型について、物性を解析し、比較検討した。具体的にはsEGFRとsErbB3の糖鎖欠損変異体と野生型を大量精製し、X線結晶構造解析と示差走査熱量測定を行った。

4. 研究成果

(1) ErbBの糖鎖欠損変異体におけるシグナル変化とそのメカニズムの解析

ErbB4の糖鎖欠損変異体のシグナルを解析した。N333Q変異体ではリガンド刺激なしでレセプターのリン酸化が認められた(図1)。一方、N523Q変異体ではレセプターのリン酸化が減少することがわかった。そのメカニズムについては、現在実験中である。

(2) ErbBの糖鎖構造について

Orbitrap LC-MS/MSを用いた解析にて、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4の部位特異的な糖鎖付加率と糖鎖構造を明らかにした(図2)。EGFRでは12か所のポテンシャル部位のうち10か所が、ErbB2では7か所のうち3か所が、ErbB3では10か所のうち8か所が、ErbB4は11か所のうち4か所が95%以上の糖鎖付加率を示した。以前報告したEGFRのN420やErbB3のN418といった、欠損させると二量体形成が増加する糖鎖は、付加率が100%でフコースのないコンプレックス型であることがわかった。また、(1)で述べたErbB4のN333もまた、付加率が100%でフコースのないコンプレックス型であった。MALDI-TOF-MSの解析では、付加率を計算できないという欠点があるが、糖鎖構造はほぼ同じ結果が得られた。

(3) sErbBのシグナル抑制作用の解析

sEGFRとsErbB3のシグナル抑制作用を検討した。ヒト乳がん細胞MCF7のEGFシグナルに対する作用を観察したところ、sEGFRはsErbB2-4と比較してAktリン酸化、Erkリン酸化抑制作用が著しく強いことがわかった。sEGFR N420Q糖鎖欠損変異体ではシグナル抑制作用が著明に増強した(図3)。ヒト肺がん細胞A549のヘレグリンシグナルに対する作用を観察したところ、sErbB3はsEGFR、sErbB2、sErbB4と比較してAktリン酸化、Erkリン酸化抑制作用が著しく強いことがわかった。sErbB3 N418Q糖鎖欠損変異体ではシグナル抑制作用が著明に増強した。

(4) sErbBの物性

sEGFRとsErbB3の物性について解析を行った。sEGFRとErbB3を大量精製し、X線結晶構造解析および示差走査熱量測定を行った。sEGFRではX線結晶構造解析、示差走査熱量測定ともに、

はっきりした結果が得られなかった。sErbB3 について示差走査熱量測定を行ったところ、N418Q 糖鎖欠損変異体において変性温度の低下が認められ、構造安定性の低下が示唆された (図 4)。

以上の結果は、これまで不明であった糖鎖による受容体分子の物性制御メカニズムの解明につながると考えられ、意義は大きい。なお、ErbB3 N418 の糖鎖の構造上の特徴、すなわちフコースのないコンプレックス型であることが、その機能に関係しているかどうかは不明である。しかしながら、同様の特徴を持つ EGFR N420 の糖鎖や ErbB4 N333 の糖鎖が、受容体の活性化を制御する機能を持つことは非常に興味深い。さらに他の受容体の糖鎖を解析し、糖鎖の構造と機能の関係についてさらに詳細を明らかにしたい。

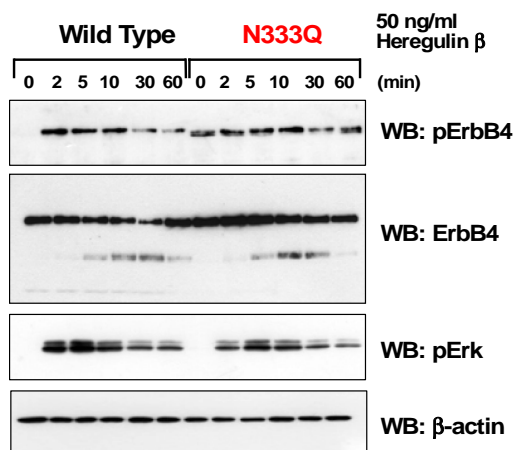


図 1 : ErbB4 N333Q のへレグリンシグナル変化
リガンド刺激のない状態で、ErbB4 のリン酸化が認められた。

Domain	Site	sEGFR, Orbitrap	
I	N32	87	Complex
	N104	39	Complex
	N151	84	Complex
II	N172	42	Complex
III	N328	100	High mannose
	N337	100	High mannose
	N389	100	Complex
	N420	100	Complex
IV	N504	100	Complex
	N544	100	Complex
	N579	98	Complex
	N599	60	Complex

Domain	Site	sErbB2, Orbitrap	
I	N46	100	Complex
	N102, 103	(Partial)	Complex
	N165	54	Complex
II	N237	97	High mannose
IV	N508	94	Complex
	N549	100	Complex
	N607	75	Complex

Domain	Site	sErbB3, Orbitrap	
I	N107	100	Complex
II	N231	96	Complex
	N334	100	Complex
III	N389	100	High mannose
	N395	100	High mannose
	N418	100	Complex
	N450	99	Complex
IV	N503	100	Complex
	N547	79	High mannose/Complex
	N597	68	Complex

Domain	Site	sErbB4, Orbitrap	
I	N113	100	High mannose
	N149	23	Complex
	N156	93	Complex
II	N228	85	High mannose
III	N333	100	Complex
	N385	90	Complex
	N448	49	Complex
	N470	86	Complex
IV	N523	98	High mannose/Complex
	N551	95	Complex
	N595	94	Complex

図 2 : ErbB の部位特異的糖鎖付加率と糖鎖構造
最も代表的な糖鎖構造を示した。
表中の数字は糖鎖付加率を表す。

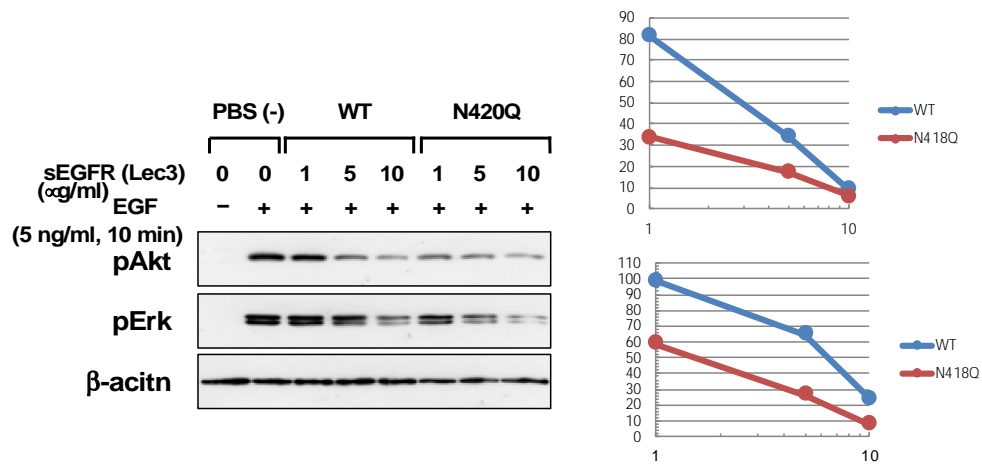


図 3 : sEGFR N420Q 糖鎖欠損変異体における EGF シグナル抑制作用の増強
 野生型に比較して、N420Q 糖鎖欠損変異体ではシグナル抑制作用が 5 倍程度増強していた。

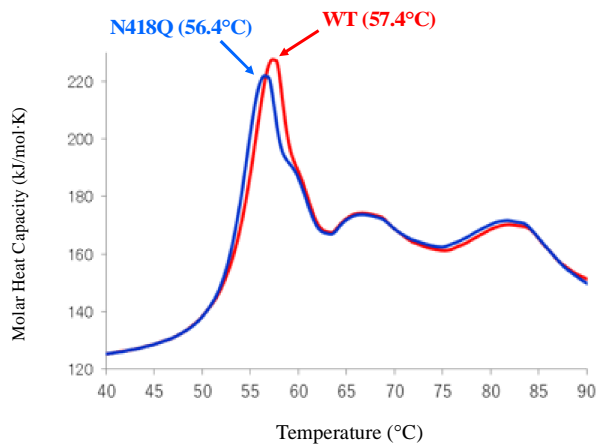


図 4 : 示差走査熱量測定による変性温度の比較
 野生型に比較して、sErbB3 N418Q 糖鎖欠損変異体では変性温度の低下を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Tomofumi, Kuronuma Koji, Saito Atsushi, Ikeda Kimiyuki, Ariki Shigeru, Saitou Atsushi, Otsuka Mitsuo, Chiba Hirofumi, Takahashi Satoshi, Takahashi Motoko, Takahashi Hiroki	4. 巻 20
2. 論文標題 Insufficient serum L-ficolin is associated with disease presence and extent of pulmonary Mycobacterium avium complex disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-019-1185-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Y., Saito A., Chiba H., Kuronuma K., Ikeda K., Kobayashi T., Ariki S., Takahashi M., Sasaki Y., Takahashi H.:	4. 巻 19
2. 論文標題 Impaired Diversity of the Lung Microbiome Predicts Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respir. Res.	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-018-0736-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Homma T., Shirato T., Akihara R., Kobayashi S., Lee J., Yamada K., Miyata S., Takahashi M., Fujii J.	4. 巻 294
2. 論文標題 Mice deficient in aldo-keto reductase 1a (Akr1a) are resistant to thioacetamide-induced liver injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicol. Lett.	6. 最初と最後の頁 37-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2018.05.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Saito A, Uehara Y, Takamiya R, Kuronuma K, Chiba H, Sakuma Y, Takahashi H, Kuroki Y.	4. 巻 292
2. 論文標題 Surfactant protein A down-regulates epidermal growth factor receptor by mechanisms different from those of surfactant protein D.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 18565-18576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.800771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takamiya Rina, Uchida Koji, Shibata Takahiro, Maeno Toshitaka, Kato Masaki, Yamaguchi Yoshiki, Ariki Shigeru, Hasegawa Yoshihiro, Saito Atsushi, Miwa Soichi, Takahashi Hiroki, Akaike Takaaki, Kuroki Yoshio, Takahashi Motoko	4. 巻 7
2. 論文標題 Disruption of the structural and functional features of surfactant protein A by acrolein in cigarette smoke	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08588-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Umeda Y, Hasegawa Y, Otsuka M, Ariki S, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Saijo H, Kuronuma K, Chiba H, Ohnishi H, Sakuma Y, Takahashi H, Kuroki Y, Takahashi M.	4. 巻 36
2. 論文標題 Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR and affects clinical outcomes of patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 6432-6445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/onc.2017.253.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Jiro, Takahashi Motoko, Saito Atsushi, Murata Masaki, Kurimura Yuichiro, Nishitani Chiaki, Takamiya Rina, Uehara Yasuaki, Hasegawa Yoshihiro, Hiyama Yoshiki, Sawada Norimasa, Takahashi Satoshi, Masumori Naoya, Kuroki Yoshio, Ariki Shigeru	4. 巻 198
2. 論文標題 Surfactant Protein A Inhibits Growth and Adherence of Uropathogenic Escherichia coli To Protect the Bladder from Infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 2898 ~ 2905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1502626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uehara Y, Takahashi M, Murata M, Saito A, Takamiya R, Hasegawa Y, Kuronuma K, Chiba H, Hashimoto J, Sawada N, Takahashi H, Kuroki Y, Ariki S.	4. 巻 485
2. 論文標題 Surfactant protein A (SP-A) and SP-A-derived peptide attenuate chemotaxis of mast cells induced by human α -defensin 3.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 107-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.02.028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長谷川喜弘、梅田泰淳、大塚満雄、有木茂、高宮里奈、齋藤充史、黒沼幸治、千葉弘文、高橋弘毅、黒木由夫、高橋素子	4. 巻 21
2. 論文標題 SP-Dによる変異型EGFR肺がんの制御機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 分子呼吸器病	6. 最初と最後の頁 80-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋素子、加藤公児、藤谷直樹、齋藤充史、和田芳直、姚閔
2. 発表標題 ErbB3の糖鎖による構造制御メカニズム
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋素子、藤谷直樹、和田芳直、加藤公児、姚閔
2. 発表標題 ErbB受容体の糖鎖の構造と機能
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋素子、和田芳直、浅川大樹、有木茂、齋藤充史
2. 発表標題 ErbB受容体の糖鎖の機能
3. 学会等名 日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋素子、和田芳直、浅川大樹、有木茂、齋藤充史
2. 発表標題 ErbB4のN型糖鎖の機能解析
3. 学会等名 第37回日本糖質学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋素子、和田芳直、浅川大樹、有木茂、高宮里奈、齋藤充史
2. 発表標題 ErbB4の糖鎖による機能制御メカニズム
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川喜弘、梅田泰淳、大塚満雄、有木茂、高宮里奈、齋藤充史、高橋弘毅、黒木由夫、高橋素子
2. 発表標題 肺サーファクタントタンパク質Dは変異型EGFRの活性化を阻害し、肺腺がんの進展を抑制する
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----