

平成21年5月18日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370050
 研究課題名（和文） 細胞増殖因子受容体のエンドソームにおける選別輸送制御とシグナル伝達
 研究課題名（英文） Regulation of the endosomal sorting and intracellular signaling of growth factor receptors
 研究代表者
 喜多村 直実（KITAMURA NAOMI）
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
 研究者番号：80107424

研究成果の概要：

細胞増殖因子受容体のエンドソームでの選別輸送とシグナル伝達の関係について、選別輸送制御因子である Hrs の過剰発現細胞および UBPY の欠損マウスを用いて解析を行った結果、受容体の選別輸送の制御が受容体からのシグナル伝達に関わり細胞増殖制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また Hrs の結合蛋白質ミオシン重鎖9と UBPY の結合蛋白質 CHMP4 が、増殖因子受容体のエンドソームでの選別輸送を制御していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞増殖因子受容体、エンドソーム、選別輸送、シグナル伝達、Hrs、ERK 経路、脱ユビキチン化酵素 UBPY、ミオシン重鎖9

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖因子が細胞表面に存在する受容体に結合すると受容体が活性化され、活性化された受容体を介して種々のシグナル伝達経路が活性化され細胞の増殖応答が導かれる。また増殖因子が受容体に結合すると、両者はクラスリン小胞輸送により内在化し、まず初期エンドソームに運ばれる。その後細胞表面へはリサイクルされずにリソソームに選別輸送され分解される(リソソーム経路)。この受容体のリソソームへの選別輸送と分

解の過程は、受容体のdown-regulationを導き、活性化された受容体を除去し過度の細胞増殖を防ぐための増殖制御の機構の1つとして重要な役割を果たしている。

増殖因子受容体を介するシグナル伝達は、受容体が初期エンドソームに運ばれた後も継続すると考えられている。初期エンドソームに運ばれた増殖因子受容体は、エンドソーム膜が内側に陥入して形成する内部小胞によりエンドソーム内に取り込まれる。このような内部小胞を含むエンドソームは 後期エ

ンドソームと呼ばれ、この後期エンドソームが最終的にリソソームと融合することにより受容体はリソソームに入り分解される。したがって増殖因子受容体を介するシグナル伝達は、内部小胞形成により受容体がエンドソーム内に取り込まれることにより停止すると考えられている。

初期エンドソーム上における増殖因子受容体を介するシグナル伝達の制御については、選別輸送を制御する機構が明らかでなかったため解析がほとんど進んでいない。しかし最近選別輸送およびその制御に関わる分子の解析が進み、シグナル伝達への応用ができる状況になりつつある。われわれはHGFやEGFなどの増殖因子で細胞を刺激した時に、強くチロシンリン酸化される蛋白質（Hrsと命名）を見出し(Komada & Kitamura: *Mol. Cell. Biol.* (1995))、またHrsの細胞内局在が初期エンドソームであることを明らかにした(Komada, Kitamura et al.: *J. Biol. Chem.* (1997))。さらにHrsに結合する新規蛋白質としてSTAM2を同定した(Takata, Kitamura et al.: *Genes Cells* (2000))。われわれ自身の研究を含むこれまでの国内外の多くの研究により、HrsとSTAMは初期エンドソーム上で構成的複合体を形成し、初期エンドソームに輸送されたユビキチン化増殖因子受容体のユビキチンを認識して結合し、その後ESCRTと呼ばれる蛋白質複合体に受容体を受け渡すことが明らかにされた。すなわちHrs/STAM複合体は、初期エンドソーム上における増殖因子受容体の選別輸送の開始において中心的な役割を果たしている(reviewed in Komada & Kitamura: *J. Biochem.* (2005))。ESCRTに受け渡された受容体は、内部小胞形成により初期エンドソーム内に取り込まれる。したがってESCRTを構成する蛋白質群は選別輸送を進めるために重要な役割を果たしている。

初期エンドソームにおける増殖因子受容体の選別輸送の制御については、最近受容体のユビキチン化レベルの調節が関わっていることが明らかになってきた。われわれはSTAMに結合する蛋白質として新たに脱ユビキチン化酵素の1つであるUBPYを同定している(Kato, Miyazawa & Kitamura: *J. Biol. Chem.* (2000))。そして最近UBPYが初期エンドソーム上でHrs/STAM複合体によって選別されたEGF受容体を脱ユビキチン化することにより、その分解を遅延させることを見出した(Mizuno, Kitamura et al.: *Mol. Biol. Cell* (2005))。この結果は、過度のユビキチン化によってEGF受容体の選別輸送が進み過ぎ、細胞内でのシグナル伝達が十分に行われる前に受容体が分解されてしまうことのないようにUBPYが受容体の選別輸送の速度を調節していることを示唆している。

以上のように増殖因子受容体の初期エンドソームにおける選別輸送の制御機構について明らかにされつつあり、シグナル伝達の制御との関わりについて解析が可能な状況になってきている。

2. 研究の目的

本研究では、増殖因子受容体の選別輸送の制御がどのようにシグナル伝達の制御に関わっているかを明らかにすることを目的とする。まずわれわれが解析を進めてきた肝癌細胞株HepG2を用いたHGF受容体(c-Met)を介するシグナル伝達系を用いて、Hrs/STAM複合体がこのシグナル伝達制御にどのように関わっているかを明らかにする。またわれわれはすでにUBPYのノックアウトマウスの作成に成功しているため、これを利用してUBPYが欠損した時の増殖因子受容体のシグナル伝達がどのように変化するかを明らかにする。さらにHrs/STAM複合体やUBPYと結合する数種類の分子を単離しているため、これらの分子が増殖因子受容体の初期エンドソームでの選別輸送の制御およびシグナル伝達の制御に関わっているかを明らかにする。

受容体を介するシグナル伝達の制御は、細胞の増殖制御に関与する重要なプロセスである。しかし受容体の選別輸送の制御がどのようにシグナル伝達の制御に関わっているかは、ほとんど解析が進んでいない。したがって本研究の遂行により、生体にとって重要な細胞機能の分子機構の解明に向けての新たな展開が期待される。

3. 研究の方法

(1) エンドソームにおける選別輸送制御とシグナル伝達制御との関係を解析するためには、シグナル伝達を的確に解析できる系が必要である。われわれは肝癌由来細胞株HepG2を用いてHGFで刺激した時のシグナル伝達について詳細に解析してきた。HepG2細胞はHGF刺激により増殖が抑制される。この増殖抑制に関わるシグナル伝達経路が明らかにされた。ここではこのシグナル伝達系を用いて解析を行う。Hrsを過剰発現した細胞あるいはRNAi法によりHrsをノックダウンした細胞では増殖因子受容体の輸送が遅延することが明らかにされているので、この遅延がシグナル伝達に及ぼす影響について解析する。

(2) UBPYは初期エンドソームに存在し、EGF受容体のユビキチン化レベルを調節することによりEGF受容体の選別輸送の制御に関わっていると考えられている。われわれはUBPYのin vivoでの役割を明らかにするためにノックアウトマウスの作成を試み、すでに作成に成功している。このマウスの解析の結果、

UBPYのホモ欠損マウスは胎生致死であった。したがってUBPYはマウスの発生において必須の分子であることが明らかになった。現在までのところ胎生致死の原因は不明であるが、増殖因子受容体の選別輸送の異常とそれに伴うシグナル伝達の異常が原因となっている可能性が考えられる。そこでノックアウトマウスを用いて初期エンドソームの形態、ユビキチン化蛋白質の蓄積および増殖因子受容体のシグナル伝達について解析する。

(3) Hrs/STAM複合体は他の蛋白質と結合して相互作用することにより、増殖因子受容体の選別輸送を制御している。たとえばUBPYはSTAMに結合する蛋白質として見出され、選別輸送制御に関わっていることが明らかにされた。したがって他にも選別輸送制御に関わる結合蛋白質が存在する可能性が考えられる。われわれはすでにHrsに結合する蛋白質としてミオシン重鎖9を、またUBPYに結合する蛋白質としてESCRTの構成因子の1つであるCHMP4Bを同定している。そこでまずこれらの蛋白質がHrsあるいはUBPYを介して初期エンドソームに局在するかについて、またお互いの分子の結合様式について解析し、初期エンドソームでの選別輸送の制御に関与する可能性を探る。

4. 研究成果

(1) エンドソームでの EGF 受容体の選別輸送制御に重要な役割を果たしている Hrs が、HepG2細胞での HGF 受容体 (c-Met) の選別輸送にも同様に関わっているかについて解析した。Hrs を過剰発現した HepG2 細胞では HGF 刺激した時に c-Met の分解が遅延した。この結果は Hrs は c-Met の選別輸送制御にも関わっていることを示している。HGF で刺激した HepG2 細胞では ERK シグナル伝達経路が強く活性化され、この活性化が HGF による HepG2 細胞の増殖抑制に必要であることが明らかにされている。そこで c-Met の分解が遅延した Hrs を過剰発現した HepG2 細胞での ERK 経路について解析を行った。その結果、ERK 経路の活性化が高レベルで持続することがわかった。これらの結果は、c-Met のエンドソームでの選別輸送の制御がシグナル伝達制御と密接に関係していることを示唆している。

次に c-Met の選別輸送と関係する ERK 経路の強活性化の分子機構について解析を行った。c-Met の下流で ERK 経路を制御する分子としてアダプター蛋白質 Gab1 が知られているので、この分子について検討を行った。HepG2細胞における Gab1 の蛋白質量について、HGF により増殖が促進する細胞である MKN74 細胞と比較したところ、HepG2 細胞における

蛋白質量は高いレベルであった。また HGF 刺激による Gab1 のチロシンリン酸化も HepG2 細胞では MKN74 細胞に比較して高レベルであった。これらの結果は Gab1 が HGF 刺激した HepG2 細胞における ERK 経路の強活性化に関与する可能性を示唆している。そこで実際に Gab1 が関与するかについて解析を行った。Gab1 は別のアダプター蛋白質である Grb2 を介して c-Met に結合する。Grb2 を結合できない変異型 c-Met キメラ受容体を HepG2 細胞に発現して調べたところ、HGF 刺激したこの細胞での Gab1 のチロシンリン酸化は非常に弱いレベルであった。またこの細胞における ERK の活性化も弱いレベルであった。次に RNAi 法により Gab1 の発現を抑制した HepG2 細胞を用いて解析を行った。Gab1 をノックダウンした細胞では HGF 刺激による ERK の活性化が抑制された。また Gab1 をノックダウンした細胞では HGF 刺激による増殖の抑制が緩和した。これらの結果は、HGF 刺激による Gab1 の c-Met への結合が ERK 経路の強活性化と細胞増殖の抑制に必要であることを示している。したがってエンドソームでの c-Met の選別輸送が Gab1 からのシグナル伝達の制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(2) UBPY ノックアウトマウスは胎生致死であるので、まず胎生期のどの時期からノックアウトの表現型が現れるのかについて調べた。胚の形態観察で調べたところ、胚齢 6.5 日目の UBPY ホモ変異マウス胚の大きさは野生型と違いがなかった。しかし胚齢 7.5 日目ではホモ変異マウス胚の大きさは野生型に比べて小さく、胚齢 8.5 日目ではホモ変異マウス胚は発育が著しく遅れていることが観察された。また胚のパラフィン切片を HE 染色により調べたところ、胚齢 6.5 日目ではホモ変異マウスの胚を構成する細胞数は野生型と違いがなかった。しかし胚齢 7.5 日目ではホモ変異マウス胚は野生型と比べて胚の細胞数が少なかった。さらに中胚葉の誘導が起きていないことがわかった。以上の結果から、UBPY ノックアウトマウス胚の表現型は胚齢 6.5 日目以降 7.5 日目までの間に発現してくることが示唆された。

UBPY ノックアウトマウスが胎生致死である原因を探るために、胚の初代培養を行うことにより解析した。胚齢 3.5 日目胚を取り出し培養したところ、培養 2~3 日目から細胞の増殖が始まった。しかし UBPY ホモ変異マウス胚では野生型に比べて培養 5 日目からは細胞数が増えなかった。さらに培養 7 日目から 9 日目には細胞数に大きな違いが観察された。UBPY ノックアウトマウス胚において細胞増殖が抑えられる原因としてアポトーシスの可能性を検討した。胚齢 7.5 日目胚のパラ

フィン切片を用いて TUNEL 法で調べたところ、野生型と同様に UBPY ホモ変異マウス胚でもアポトーシスは検出されなかった。これらの結果は、UBPY が欠損した胚では細胞の増殖が不全になり表現型が現れることを示唆している。

UBPY がエンドソームでの増殖因子受容体の選別輸送を制御していることから、次に UBPY ノックアウト細胞におけるエンドソームの機能について解析した。胚齢 3.5 日目胚を 7 日間培養した細胞を用いて免疫蛍光染色法により調べたところ、初期エンドソームが凝集肥大化し、そこにユビキチン化蛋白質が蓄積していた。これらの結果は、UBPY は胚細胞のエンドソームの機能維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

以上の結果を総合すると、UBPY ノックアウトマウス胚の細胞ではエンドソームの機能不全が起り、また増殖が抑制されることから、UBPY は増殖因子受容体のエンドソームでの選別輸送を制御し、細胞増殖に必要な受容体からのシグナル伝達の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

(3) Hrs に結合する蛋白質であるミオシン重鎖 9 (MYH9) について、選別輸送における役割について解析を行った。まず GST-pull down 法を用いて結合ドメインの解析を行った結果、Hrs は VHS ドメインを介して MYH9 に結合することが明らかになった。さらに共免疫沈降法により HeLa 細胞において内在性の Hrs と MYH9 が結合することが確認され、免疫蛍光染色法により Hrs と MYH9 が細胞内で共局在することが観察された。また Hrs と MYH9 の結合量は EGF 刺激した細胞において増加した。Hrs は EGF 刺激によってチロシンリン酸化され、また MYH9 も EGF 刺激によりリン酸化されることが報告されている。そこでそれぞれのリン酸化部位を置換した変異体を用いて結合実験を行った。その結果、Hrs と MYH9 の結合には両者のリン酸化が必要であることが明らかになった。

次に MYH9 と EGF 受容体 (EGFR) との結合について共免疫沈降法により調べた。その結果、MYH9 と EGFR は結合していること、またその結合が EGF 刺激によって速やかに解離することが示された。また EGFR 以外の受容体との結合について調べたところ、MYH9 は EGFR と同様のチロシンキナーゼ型受容体である HGF 受容体や PDGF 受容体に結合したが、チロシンキナーゼ型受容体でない TNF 受容体には結合しなかった。さらに MYH9 をノックダウンした細胞でトランスフェリン受容体 (TR) のエンドサイトーシスとリサイクルについて免疫蛍光染色法で観察したところ、TR の取り込みやリサイクルは正常細胞と同様であった。これらの結果は MYH9 はチロシンキナー

ゼ型受容体と特異的に結合することを示唆している。

MYH9 をノックダウンした細胞を用いて EGFR のエンドサイトーシスと分解についてウエスタンブロッティング法と免疫蛍光染色法により調べたところ、EGFR のエンドサイトーシスは影響されなかったが、エンドサイトーシス後の EGFR の分解が抑制された。以上の結果から、MYH9 は無刺激の状態では EGFR と結合しており、EGF 刺激によりリン酸化されると EGFR と解離し、リン酸化した Hrs と結合するようになると考えられる。これらのことから MYH9 はエンドサイトーシスされたチロシンキナーゼ型受容体をエンドソーム上の Hrs へと導く役割を持つことが予想されたが、MYH9 はチロシンキナーゼ型受容体の選別輸送において初期段階で機能していると考えられる。

(4) Yeast two-hybrid 法により単離された UBPY 結合蛋白質である CHMP4B について、選別輸送における役割について解析を行った。CHMP4 には互いに相同性を有する CHMP4A、4B、4C が存在する。GST-pull down 法を用いて UBPY との結合について調べたところ、CHMP4A、4B、4C はすべて UBPY と結合することが明らかになった。また同様の方法を用いて結合ドメインの解析を行った結果、CHMP4A、4B、4C は UBPY の MIT ドメインを介して結合することが明らかになった。さらに共免疫沈降法により Cos 細胞で発現させた CHMP4A、4B、4C が UBPY と結合することが確認された。また免疫蛍光染色法により HeLa 細胞で発現させた CHMP4A、4B、4C と UBPY は後期エンドソームに共局在することが観察された。これらの結果は、CHMP4 は UBPY と結合してその細胞内局在を制御する因子であることを示唆している。

次に CHMP4 が UBPY の脱ユビキチン化活性を制御しているかについて解析を行った。精製した UBPY をポリユビキチン鎖ミックスと反応させるとモノユビキチンが検出された。この反応液に精製した CHMP4A、4B、4C を加えるとすべての CHMP4 においてモノユビキチンの生成が阻害された。これらの結果は CHMP4 は UBPY の脱ユビキチン化活性を抑制することを示している。

CHMP4 の選別輸送における機能を探るため、HeLa 細胞に CHMP4B を過剰発現して解析を行った。まず抗ユビキチン化蛋白質抗体で免疫蛍光染色法により調べたところ、CHMP4B ポジティブなエンドソームにユビキチン化蛋白質が蓄積することが観察された。そこで次に EGFR の選別輸送に対する影響について調べた。CHMP4B を過剰発現した細胞では、EGFR は CHMP4B ポジティブな肥大化したエンドソームに蓄積した。また CHMP4B 過剰発現細胞

では、EGF 刺激後 15 分から 30 分において EGFR のユビキチン化レベルが上昇し、EGFR の分解が遅れることが示された。

以上の結果から、CHMP4 は UBPY に結合してその脱ユビキチン化活性を抑制することにより EGFR のユビキチン化レベルを調節し EGFR の選別輸送を制御していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① K. Ushio, T. Hashimoto, N. Kitamura, and T. Tanaka: Id1 is downregulated by hepatocyte growth factor via ERK-dependent and -independent signaling pathways, leading to increased expression of p16^{INK4a} in human hepatoma cells. *Mol. Cancer Res.* **in press** (2009) 査読有
- ② A. Endo, M. Matsumoto, T. Inada, A. Yamamoto, K. I. Nakayama, N. Kitamura, and M. Komada: Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitinating enzyme USP36. *J. Cell Sci.* **122**, 678-686 (2009) 査読有
- ③ M. Osabe, J. Sugatani, A. Takemura, Y. Yamazaki, A. Ikari, N. Kitamura, M. Negishi, and M. Miwa: Expression of CAR in SW480 and HepG2 cells during G1 associated with cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 1027-1033 (2008) 査読有
- ④ A. Mukai, E. Mizuno, K. Kobayashi, A. Yamamoto, M. Matsumoto, K. Nakayama, N. Kitamura, and M. Komada: Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Sci.* **121**, 1325-1333 (2008) 査読有
- ⑤ A. Kondo, N. Hirayama, Y. Sugito, M. Shono, T. Tanaka, and N. Kitamura: Coupling of Grb2 to Gab1 mediates hepatocyte growth factor-induced high intensity ERK signal required for inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **283**, 1428-1436 (2008) 査読有
- ⑥ E. Shirako, N. Hirayama, Y. Tsukada, T. Tanaka, and N. Kitamura: Up-regulation of p21^{CIP1} expression mediated by ERK-dependent and -independent pathways contributes to hepatocyte growth

factor-induced inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* **104**, 176-188 (2008) 査読有

⑦ E. Mizuno, N. Kitamura, and M. Komada: 14-3-3-dependent inhibition of the deubiquitinating activity of UBPY and its cancellation in the M phase. *Exp. Cell Res.* **313**, 3624-3634 (2007) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 遠藤彬則、山本章嗣、松本雅記、中山敬一、稲田利文、喜多村直実、駒田雅之：脱ユビキチン化酵素 USP36 による核小体機能の制御；第 31 回日本分子生物学会年会；2008. 12. 11；神戸国際会議場
- ② 鈴木弟、長沼誠二、木村相泰、喜多村直実、藤枝重治、伊藤浩史：重層扁平上皮における肝細胞増殖因子 HGF 刺激による microRNA 発現変化；第 31 回日本分子生物学会年会；2008. 12. 11；神戸国際会議場
- ③ 長沼誠二、鈴木弟、木村相泰、喜多村直実、伊藤浩史：HGF 刺激による大腸癌細胞株の形態変化に関与する miRNA の発現変動；第 31 回日本分子生物学会年会；2008. 12. 11；神戸国際会議場
- ④ 田中利明、喜多村直実：ツメガエル初期胚の尾部形成における母性 CyclinE 蛋白質分解によるエピジェネティックな制御；第 31 回日本分子生物学会年会；2008. 12. 12；神戸国際会議場
- ⑤ 潮和敬、喜多村直実、田中利明：肝癌細胞株 HepG2 における肝細胞増殖因子による Cdk インヒビター p16^{INK4a} の発現制御の分子機構；第 30 回日本分子生物学会年会；2007. 12. 11；パシフィコ横浜
- ⑥ 田中利明、喜多村直実：ツメガエル初期発生過程における母性 CyclinE 蛋白質の分解による形態形成の制御；第 30 回日本分子生物学会年会；2007. 12. 11；パシフィコ横浜
- ⑦ 橋本富男、加藤稔、福島剛、田中弘之、片岡寛章、喜多村直実、下村猛：HAI-1 標的模型プロテアーゼの探索；第 30 回日本分子生物学会年会；2007. 12. 13；パシフィコ横浜
- ⑧ 遠藤彬則、喜多村直実、駒田雅之：脱ユビキチン化酵素 USP36 の機能解析；第 30 回日本分子生物学会年会；2007. 12. 14；パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ

<http://www.kitamura-lab.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多村 直実 (KITAMURA NAOMI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：80107424

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし