

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590291

研究課題名 (和文) ミッドカイン受容体複合体の構成と作用様式

研究課題名 (英文) Composition and mode of action of the midkine receptor

研究代表者

村松 喬 (MURAMATSU TAKASHI)

愛知学院大学・心身科学部・教授

00030891

研究成果の概要：ヘパリン結合性の成長因子であるミッドカインの受容体は細胞膜分子の複合体であることが判明している。オリゴデンドロサイト前駆体様細胞 CG-4 のミッドカイン依存性突起伸張にかかわる受容体である **neuroglycan C** もやはりインテグリンを含む複合体で作用し、複合体形成はミッドカインによって促進された。ミッドカイン受容体複合体の新成分候補としてニューロピリン1が見出された。ALK キナーゼも受容体複合体にリクルートされて作用すると示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：ミッドカイン、受容体、ニューログリカンC, receptor-like protein tyrosine phosphatase- ζ 、インテグリン、anaplastic leukemia lymphoma kinase、膜内複合体、オリゴデンドロサイト前駆体細胞

1. 研究開始当初の背景

1) ミッドカインはヘパリン結合性の成長因子あるいはサイトカインで、細胞の生存、移動などを促進する。ミッドカインは引き続いて発見されたプレイオトロフィンと共にタンパク質のファミリーを形成する。その生

理的意義を反映して、ミッドカインとプレイオトロフィンを共に欠くマウスは生まれにくく、小さく、幼弱期に死に易く、難聴で、さらに雌性不妊である。ミッドカインは大多数のヒト癌で発現が上昇し、癌の進展に寄与すると考えられている。ことに抗がん剤抵抗

性との関連が注目されている。そして、ミッドカインはリウマチ、腎障害、手術後の癒着、さらに多発性硬化症など免疫関連の疾患に関与することが実験動物レベルで見出されている。また、ミッドカインは障害を受けた組織の修復を促進し、心筋梗塞そして脳梗塞時の障害治癒との関係でも興味を持たれている。

2) ミッドカインはプロテオグリカンのグリコサミノグリカン鎖に強く結合する。ヘパラン硫酸のトリ硫酸化ユニット、そしてコンドロイチン硫酸の E ユニットが強く結合する構造であり、ミッドカインは過硫酸化構造に結合すると結論されている。

3) プロテオグリカンの中で、receptor-like protein tyrosine phosphatase- ζ (PTP ζ)がミッドカイン受容体として最も確立されたものとなっている。さらに、インテグリンそして低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP)もミッドカイン受容体を構成する。これらは複合体を作って作用することが判明したが、複合体の構成そして作用様式は不明の点が多い。ことに、ニューログリカン C と anaplastic leukemia lymphoma kinase (ALK チロシンキナーゼ)はミッドカイン受容体であると同定されたが、他の受容体との関係が不明であった。

4) 多くの分子からなる細胞表面受容体については、研究はまだ発展期にあり、今後広く注目される課題と考えられる。サイトカイン受容体をはじめ、2つのタンパク質からなる細胞表面受容体は例が多いが、3分子以上となるとリーリン受容体以外には研究が乏しい

2. 研究の目的

ミッドカインのシグナルを伝える受容体複合体について理解を深める。具体的には、ニューログリカン C が作用する時、複合体として作用するかどうか明らかにする。マウス胎仔脳を用いて受容体複合体の新成分を検索する。受容体複合体からのシグナル伝達経路をチロシンキナーゼに着目して明らかにする。ALK チロシンキナーゼが受容体複合体の中で作用するかどうか明らかにする。

3. 研究の方法

1) ミッドカインとしては酵母で生産されたヒトミッドカインとバキュロウィルス系で生産したマウスミッドカインを用いた。いずれの標品も SDS-PAGE で単一バンドを示す高純度なものである。ミッドカイン・アガロースはヒトミッドカインを 5 mg/ml の濃度で臭化シアン活性化アガロー

スに結合させて作成し、同様な操作によりウシ血清アルブミンを結合させコントロールとした。

2) 13日マウス胚の脳、あるいは UMR 106細胞を Triton X-100 を含む緩衝液で可溶化し上清を適宜前処理した後ミッドカイン・アガロースカラムにかけ、緩衝液で洗浄した後、0.5M あるいは 1M NaCl を含む緩衝液でタンパク質を溶出した。このタンパク質を SDS-PAGE にかけ、CBB で軽く染色し、各バンドを含むゲルを切り出し、Tween/消化バッファー中でトリプシン消化した。消化産物を Michrom BioResources 社の MAGIC2002 ナノカラム逆相 HPLC にかけ、蟻酸とアセトニトリル系で溶出し、分離されたペプチドをイオントラップ質量分析計 (ALQ アドバンテージ、サーモクウェスト社) によって同定し、MASCOTSearch システムを使ったデータベース・サーチによりタンパク質を同定した。

3) ヒト HEK293 細胞、ラット神経芽腫細胞 B104 は 10% FCS を含む Dulbecco 修飾 Minimum Essential Medium(DMEM)に培養した。ラットオリゴデンドロサイト前駆体様細胞 CG-4 は市原啓子らが 2006 年に発表した論文 (J. Biol. Chem., 281, 30857-30864)のように培養した。

4) C 末端にヘマグルチニン (HA) タグをつけたニューログリカン C, N 末端に FLAG タグをつけたニューログリカン C などはそれぞれのプライマーを用いてラットのニューログリカン C を鋳型として PCR で作成した。PCR 産物は pGEM-TEasy ベクターにサブクローニングし、塩基配列確認後 BamHI-EcoRI 断片としてベクターから切り出し、これをラットニューログリカン C の HindIII - BamHI 断片と共に HindIII と EcoRI で開いた pcDNA3.1 に挿入した。インテグリンの標識体は村松壽子らが 2004 年に報告した方法 (J. Cell Sci., 117, 5405-5415) によって作成したものを使用した。

5) ミッドカインを作用させる時、細胞は一晩無血清培地で培養し、ミッドカイン添加 1 時間前に DMEM に交換し、100 ng/ml のミッドカインをその後に添加した。アガロース結合ミッドカインも同様に添加した。

6) 発現ベクターのトランスフェクションはリポフェクトアミン 2000 によって行った。複数の発現ベクターをトランスフェクトする時はそれぞれの発現ベクターの量は同一にし、かつ、これらを加えた DNA の総量は推奨された量になるようにした。細胞はトラ

ンスフェクション後 48-72 時間で可溶化した。可溶化用の緩衝液は 10 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.6 % CHAPS, プロテアーゼ阻害剤混合液 (AEBSF、ロイペプチン、アプロチニン) である。可溶化上清から一次抗体とプロテイン G-セファロースを用いて免疫沈降を行い、沈降物を SDS-PAGE にかけた。

7) 間接免疫染色においては二次抗体として FITC 標識とローダミン標識抗体を用い、必要に応じ二重染色を行った。

8) CG-4 細胞の神経突起様の突起伸張はトリプシン消化によって遊離させた細胞をミッドカインでコートした Falcon プレートに撒き、0.5 時間後に観察した。細胞の酵素消化は播種前に行い、さらにミッドカインコートしたプレートで培養中にも酵素の添加を続けた。

4. 研究成果

1) オリゴデンドロサイト前駆体様細胞 CG-4 のミッドカインによる突起伸張においてはニューログリカン C を受容体と同定した (市原ら, J. Biol. Chem., 2006)。この細胞における、これ以外の受容体候補分子の発現を RT-PCR で調べると、LRP1, PTP ζ , ALK, ヘパリン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン-3 の存在を確認できた。また免疫染色により α 6-インテグリンと β 1-インテグリンの細胞表面発現も検出できた。

2) 受容体複合体候補分子が実際に複合体を作っているかどうかは CG-4 細胞では発現量が少なく確認できなかった。そこで、タグつき分子の強制発現系を利用した。HEK293 細胞にトランスフェクション、発現させた後、抗 FLAG 抗体により FLAG 標識ニューログリカン C を免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE 後、抗 HA 抗体でプロットすると、HA 標識 α 6-インテグリンの明確なバンドが検出された。いっぽう、ヒスチジン (His) 標識の PTP ζ で免疫沈降し、SDS-PAGE 後、抗 HA 抗体でプロットすると、 α 6-インテグリンの明確なバンドが検出された。また抗 FLAG 抗体で FLAG 標識ニューログリカン C を免疫沈降し、SDS-PAGE 後、抗 myc 抗体でプロットすると、mycHis-PTP ζ は弱く検出されただけであった。同様に、抗 His タグ抗体で PTP ζ mycHis を免疫沈降し、SDS-PAGE 後、抗ニューログリカン C 抗体でプロットしても、弱いバンドが検出されるだけであった。

この結果はニューログリカン C がインテグリンと PTP ζ を含む複合体で働くことを示している。さらに、複合体の中心はインテグリンであり、ニューログリカン C と PTP ζ

はおそらくインテグリンを介して弱くしか結合していないことも判明した。

また LRP に類似するアポ E 受容体 2 (ApoER2)-HA もニューログリカン C と共沈し、受容体複合体には LRP に関連分子が含まれると結論した。

3) PTP ζ と α 6-インテグリンを発現する B104 細胞にニューログリカン C の主要ドメイン (NGCIII) を強制発現した安定なトランスフェクタントを作成した。この細胞株を使ってニューログリカン C と PTP ζ の存在を調べた。ミッドカイン・アガロースと 1 時間インキュベートすると、ニューログリカン C と PTP ζ が細胞表面に共存する像が二重免疫染色の結果、明らかになった。いっぽう、ビーズに接触させる前、あるいはウシ血清アルブミン・アガロースとインキュベートした後には、このような 2 分子の共存像は観察されなかった。

これらの結果は、ミッドカインが個々の受容体成分に結合することによりニューログリカン C を含む受容体複合体の形成を促進していることを示している。

4) NGCIII を強制発現させた、B104 細胞を SDS-PAGE 後抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロットすると、NGCIII を強制発現させた細胞では 50kDa のタンパク質のリン酸化が亢進していた。さらに、100 ng/ml のミッドカインを添加すると、75 kDa のタンパク質のリン酸化が亢進された。分子量から 50kDa タンパク質は Src ファミリーキナーゼ、75 kDa タンパク質はパキシリンと考えられた。ニューログリカン C からのシグナル伝達にこれらのタンパク質が関与する可能性が高い。

4) ミッドカインによって突起伸張する CG-4 細胞において発現されている src ファミリーのキナーゼは特異抗体を用いたウェスタンブロットにより、Src, Fyn と同定された。このうち、どれがミッドカインシグナルの伝達に関わっているかを、各キナーゼ特異的な siRNA の導入によって調べたが標的細胞への siRNA の導入効率が悪く明確な結果は得られなかった。

5) CG-4 細胞のミッドカイン依存性突起伸張に関し、様々な阻害剤の効果を調べた。ヘパリンやコンドロイチン硫酸 E に阻害効果があるにもかかわらず、ヘパリチナーゼあるいはコンドロイチナーゼ消化してもミッドカイン活性を阻害することはできなかった。CG-4 細胞上のグリコサミノグリカン鎖は酵素消化を受けにくい可能性があり、構造解析が必要である。

また、今回得られた結果と従来得られた結果を総合すると、CG-4 細胞の突起伸張系においてもチロシン酸化の重要性が確認された。そして Src 阻害剤である PP1 と PKC 阻害剤である chelerythrine が共にミッドカイン作用を阻害したので、受容体複合体においてニューログリカンCの下流にある PKC とインテグリンの下流にある Src ファミリーキナーゼが相互に影響しあう可能性を考える必要がある。またチロシンホスファターゼの阻害剤である vanadate が阻害効果を持つことは PTP ζ の活性そのものがシグナル伝達に関与することを示唆している。いっぽう $\alpha 6$ -インテグリンが突起伸長に直接関与するかどうかを調べるため、 $\alpha 6$ -インテグリンに対する抗体を用いたが、阻害効果を検出できなかった。抗体によっては細胞と基質の接着面に作用しがたいものもあるので、さらなる検討が必要である。

6) 細胞に強制発現した ALK チロシンキナーゼはミッドカインカラムに結合したが 0.3M NaCl を含む緩衝液で溶出され、強い結合力を示さなかった。ALK は $\alpha 6$ -インテグリン、LRP の細胞外ドメインと共沈するが、PTP ζ とは共沈しないことも確認された。すなわち、ALK はやはり受容体複合体で作用するのであり、受容体複合体の中心はインテグリンと LRP であり、ALK、PTP ζ などのシグナル分子は複合体の外縁分子と考えられた。

8) ミッドカイン結合タンパク質を検索して、ニューロピリン1を同定した。ニューロピリン1がミッドカインと結合することも確認した。ニューロピリン1はミッドカインのシグナル伝達に関与し、受容体複合体の構成成分となる可能性があり、研究を続けたが、明確な結論を得るには至っていない。今後の重要な課題と考える。また翻訳開始因子複合体の構成成分もミッドカインと強く結合した。癌細胞などで細胞内にミッドカインが存在することが判明しているが、細胞内ミッドカインの作用機構との関連で興味深い知見である。

9) 本研究の結果、ミッドカインのシグナル受容は受容体複合体を通すことが確立された。単独で作用する可能性があった受容体も複合体で作用することが判明したからである。ミッドカインが複合体形成を促進することも、異なった系で確認された。さらに、複合体の中核分子と辺縁分子という考えが生まれた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Takashi Muramatsu, Hisako

Muramatsu,
Glycosaminoglycan-binding cytokines as tumor markers, Proteomics, Vol 16, 3350-3359 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Takashi Muramatsu, Midkine and pleiotrophin as molecular targets for cancer therapy, Clinical and Translational Research on Cancer: Glycomics Applications, March 27, 2009, Toba, Japan

2. 市原啓子、村松喬、ミッドカインによるオリゴデンドロサイト前駆体細胞CG-4 におけるニューログリカンCとインテグリンの膜受容体複合体形成、第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 12 日、神戸

〔その他〕

ミッドカインに関するホームページ (管理者: 村松喬) www.midkine.org

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 喬

愛知学院大学心身科学部教授

研究者番号: 00030891

(2) 研究分担者

市原 啓子

愛知学院大学心身科学部准教授

研究者番号: 60335031

