

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390127

研究課題名(和文)

shRNA ライブラリーを用いたジフテリア毒素毒性発現に関与する宿主因子の解析

研究課題名(英文)

Identification of host cell factors involved in diphtheria toxin sensitivity by using shRNA library.

研究代表者

目加田 英輔 (MEKADA EISUKE)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20135742

研究成果の概要(和文)：

ジフテリア毒素の毒性発現に関わる宿主側因子を明らかにするために、ジフテリア毒素感受性に関与する遺伝子を shRNA ライブラリーを用いた網羅的遺伝子同定法で探索した。その結果既知の遺伝子を含む 11 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子についてさらに解析を加え、コレステロール合成に関わる遺伝子がジフテリア毒素感受性に重要な働きをしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We performed a large scale screening of genes encoding host cell factors involved in cell sensitivity to diphtheria toxin by using shRNA library. Total 11 genes were identified as genes which are possibly involved in DT sensitivity. Among them, genes encoding enzymes in cholesterol biosynthesis pathway were confirmed to be involved in DT sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：ジフテリア毒素 shRNA エンドサイトーシス 宿主因子 網羅的遺伝子同定法

1. 研究開始当初の背景

ジフテリア毒素はジフテリア菌が分泌するタンパク質性の毒素である。ジフテリア毒素は宿主細胞内に侵入して始めて毒性を発揮する。ジフテリア毒素の細胞内侵入には毒素の侵入を助け

る宿主側因子が深く関与している。細胞内侵入に関与する宿主側因子として、これまでに以下の分子が知られている。

- 1) ジフテリア毒素受容体 (HB-EGF)、
- 2) CD9、
- 3) ヘパラン硫酸プロテオグリカン (CD9 とヘパラン硫酸プロテオ

グリカンは直接ジフテリア毒素には結合しないが、ジフテリア毒素と HB-EGF の結合の補助因子として作用する)、4) 膜型セリンプロテアーゼ furin ; シングルポリペプチドとして合成されたジフテリア毒素をフラグメント A とフラグメント B に解裂する、5) V-ATPase ; エンドソームを酸性化しジフテリア毒素の構造変化を起こすために必要、6) DPH1 ; ジフテリア毒素のターゲットである EF2 に、ジフテリア毒素による ADP-リボシル化がなされるようにモディフィケーションを引き起こす。しかしながら、これらの分子以外、多くの過程で関与する宿主因子は考えられるが、未だ未同定である。とりわけ、ジフテリア毒素がどのような経路でエンドソームに取り込まれるのか、それに関わる因子は何か、エンドソームからフラグメント A が脂質膜を通過して細胞質に出る過程でどのような因子が関係するのか、これらのことについて未だほとんど明らかではなく、ジフテリア毒素研究では重要な研究テーマとして残されたままである。本研究代表者である目加田はジフテリア毒素が毒性を発現するために関与する宿主側因子について多くの研究を行ってきた。DPH1 を除く上記に述べた分子全ては目加田の研究グループによって明らかにされたものである。申請者はこの 10 年間は、ジフテリア毒素受容体である HB-EGF の宿主細胞での本来の機能について重点的に解析してきたため、「ジフテリア毒素が毒性を発現するために関与する宿主側因子」を主目的とする研究課題は一時中断していたが、先に述べたジフテリア毒素のエンドサイトーシスや膜通過について、この間に研究の大きな進展はなく、未だ重要な課題として残されたままであること、RNAi 技術の開発により宿主側因子を効率よく解析できる条件が整ったことから、本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

ジフテリア毒素の毒性発現に関わる宿主側因子を明らかにし、ジフテリア毒素の細胞内侵入機構と毒性発現のメカニズムを解明することである。

本研究計画の意義は、二つある。一つは、本研究で解明を目指す宿主側因子を主眼にしたジフテリア毒素の毒性発現機構解

析の成果は、ジフテリア毒素に限らず、他のタンパク毒素あるいはウイルス等の感染機構の理解にきわめて有用であり、感染症制圧への新たな戦略を提供することである。また、細胞生物学などの基礎分野においては、タンパク質の細胞内輸送という重要課題に重要な知見をもたらすことができると考えられる。二つめの意義は、ここで開発する shRNA を用いた遺伝子同定技術が、他の研究課題にも応用可能な汎用性の高い技術であることである。解析が進んでいない毒素の受容体や標的分子を明らかにするためにはすぐにでも応用可能である。

3. 研究の方法

本研究課題で使用する基本技術は shRNA ライブラリーを用いる遺伝子同定法である。本研究では、ヒト遺伝子をターゲットにした shRNA がレンチウイルスベクターに組み込まれている shRNA ライブラリーを使用した。

1) ヒト卵巣癌由来 OVCA47 細胞、SKOV3 細胞に shRNA 発現ライブラリーを組み込まれたレンチウイルスベクターを感染し、セクションマーカーを用いて shRNA 発現細胞だけの集団を得た。2) ジフテリア毒素あるいはその変異体である CRM176 を加えて、ジフテリア毒素耐性細胞を濃縮した。3) 得られた細胞群から mRNA を回収し、cDNA を作製し、DNA アレイの手法で発現が低下している遺伝子を同定した。4) DNA アレイの結果挙げられた遺伝子について個別に検証し、どのような機構で細胞機能に影響を与えたかを解析した。

4. 研究成果

ジフテリア耐性となった細胞群とコントロール群の発現比較を行い、ジフテリア耐性群で発現が顕著に低下している遺伝子の網羅的解析を行ったところ、以下のような遺伝子がピックアップされた。

- (1) 受容体 : HB-EGF
- (2) ベシクル輸送 : CLTC, YME1L1, ARL1, SEC14L2
- (3) シャペロン : HSPA1B, PDIA5, DNAJB6
- (4) コレステロール合成 ; DHCR7, NSDHL
- (5) 蛋白修飾 : DPH1

上記の遺伝子の中で HB-EGF はジフテリア毒素受容体、DPH1 は EF2 の His 残基をジフタマイドに修飾するために必要な酵素、と

して知られており、これらの遺伝子が本スクリーニングでピックアップされたことから本スクリーニング法が確かに機能することが示された。

上記の中でコレステロール合成に関わる重要な遺伝子2種類がピックアップされたことから、コレステロールとジフテリア毒素の細胞内侵入機構との関連を解析し、コレステロールがジフテリア毒素の細胞内侵入に必須であること、コレステロールを膜から引き抜く作用があるMBCDがジフテリア毒素の毒性を阻害する作用があることを明らかにした。

ピックアップされたシャペロン遺伝子については、その後解析が十分に進まず、これらの因子がジフテリア毒素の細胞内侵入に関連するか否かの結論が出ていない状況にあり、今後の課題である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T. Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. **J Control Release** (2012) 査読有 印刷中
- ② Masuda H, Nakamura K, Takata N, Ito B, Hirose T, Moribe H, Mekada E, Okada M. MIG-13 controls anteroposterior cell migration by interacting with UNC-71/ADM-1 and SRC-1 in *Caenorhabditis elegans*. **FEBS Letters** 586:740-746 (2012) 査読有
- ③ Murata T, Mizushima H, Chinen I, Moribe H, Yagi S, Hoffman RM, Kimura T, Yoshino K, Ueda Y, Enomoto T, Mekada E. HB-EGF and PDGF mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers. **Cancer Research** 71:6633-6642 (2011) 査読有
- ④ Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, Takahashi K, Sasaki Y, Ando H, Yotsumoto F, Yoneda T, Hamaoka M, Yagi H, Murakami T, Hori S, Shitara K, Mekada E. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple antitumor mechanisms against ovarian cancer cells. **Clinical**

Cancer Research 17:6733-6741 (2011) 査読有

- ⑤ Hikita S, Yotsumoto F, Fukami T, Horiuchi S, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Tsujioka H, Ueda T, Shirota K, Yoshizato T, Maeda K, Ishikawa T, Okuno Y, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S. Assessment of HB-EGF levels in peritoneal fluid and serum of ovarian cancer patients using ELISA. **Anticancer Res.** 31:2553-2559 (2011) 査読有
- ⑥ Koshikawa N, Mizushima H, Minegishi T, Eguchi F, Yotsumoto F, Nabeshima K, Miyamoto S, Mekada E, Seiki M. Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase -1 in ovarian carcinoma cells. **Cancer Science** 102:111-116 (2011) 査読有
- ⑦ Koshikawa N, Mizushima H, Minegishi T, Iwamoto R, Mekada E, Seiki M. MT1-MMP cleaves off the NH2-terminal portion of HB-EGF and converts it into a heparin-independent growth factor. **Cancer Res.** 70:6093-6103 (2010) 査読有
- ⑧ Iwamoto R, Mine N, Kawaguchi T, Minami S, Saeki K, Mekada E. HB-EGF function in cardiac valve development requires interaction with heparan sulfate proteoglycans. **Development** 137:2205-2214 (2010) 査読有
- ⑨ Hamaoka M, Chinen I, Murata T, Takashima S, Iwamoto R, Mekada E. Anti-human HB-EGF monoclonal antibodies inhibiting ectodomain shedding of HB-EGF and diphtheria toxin binding. **J. Biochem.** 148:55-69 (2010) 査読有
- ⑩ Ichise T, Adachi S, Ohishi M, Ikawa M, Okabe M, Iwamoto R, Mekada E. Humanized Gene Replacement in Mice Reveals the Contribution of Cancer Stroma-Derived HB-EGF to Tumor Growth. **Cell Struct Funct.** 35:3-13 (2010) 査読有
- ⑪ Mizushima H, Wang X, Miyamoto S, Mekada E. Integrin signal masks growth-promotion activity of HB-EGF in monolayer cell cultures. **J. Cell Sci.** 122:4277-4286 (2009) 査読有
- ⑫ Yagi H, Yotsumoto F, Sonoda K, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S. Synergistic antitumor effect of paclitaxel with CRM197, an inhibitor of

- HB-EGF, in ovarian cancer. **Int J Cancer** 124:1429-1439 (2009) 査読有
- ⑬ Mekada E, Iwamoto R. HB-EGF. **UCSD-Nature Molecule Pages**. Published online: 13 Nov 2008/ doi:10.1038/mp.a002932.01 査読有
- ⑭ Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a new target molecule for cancer therapy. **Adv Exp Med Biol**. 622:281-295 (2008) 査読有
- ⑮ Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105:12921-12926 (2008) 査読有
- ⑯ Takeda Y, He P, Tachibana I, Zhou B, Miyado K, Kaneko H, Suzuki M, Minami S, Iwasaki T, Goya S, Kijima T, Kumagai T, Yoshida M, Osaki T, Komori T, Mekada E, Kawase I. Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes COPD-like phenotype in mice. **J Biol Chem**. 283:26089-26097 (2008) 査読有
- ⑰ Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. **Mol Reprod Dev**. 75:150-155 (2008) 査読有
- ⑱ Minami S, Iwamoto R, Mekada E. HB-EGF decelerates cell proliferation synergistically with TGF- α in perinatal distal lung development. **Dev. Dyn**. 237:247-258 (2008) 査読有
- ⑲ Yotsumoto F, Yagi H, Suzuki SO, Oki E, Tsujioka H, Hachisuga T, Sonoda K, Kawarabayashi T, Mekada E, Miyamoto S. Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. **Biochem Biophys Res Commun**. 365:555-561 (2008) 査読有
- ① 村田卓也、水島寛人、吉野潔、上田豊、榎本隆之、木村正、目加田英輔 子宮頸癌ではHB-EGFとPDGFを介して癌細胞と癌関連線維芽細胞が相互作用し、癌細胞の増殖を促進する 第70回日本癌学会学術総会 名古屋 2011.10.3-5
- ② Mekada E. The role of tetraspanins in the dual oxidase system of *C. elegans* and humans. **Membrane Organization by Molecular Scaffolds**. Saxtons River, Vermont. July 17-22, 2011
- ③ 水島寛人、船越絳希、目加田英輔 FAKのFERMドメインのリン酸化によるHB-EGF依存的細胞増殖制御 第63回日本細胞生物学会大会 札幌 2011.6.27-29
- ④ 中村尚志、伊藤ちひろ、北川教弘、岩本亮、竹家達夫、目加田英輔 HB-EGF細胞質内フラグメントは破骨細胞の分化を負に制御する 第63回日本細胞生物学会大会 札幌 2011.6.27-29
- ⑤ 森部弘樹、小央良二、中村邦明、目加田英輔 テトラスパニンによる活性酸素産生の制御 第63回日本細胞生物学会大会 札幌 2011.6.27-29
- ⑥ Mekada E. Clinical development of the diphtheria toxin mutant CRM197 for cancer therapy. ETOX15 European Workshop on Bacterial Protein Toxins. Oslo, Norway. June 18-22, 2011
- ⑦ 目加田英輔 HB-EGFの作用機構と癌分子標的としての解析 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010.9.23
- ⑧ 船越絳希、水島寛人、目加田英輔 FAKはHB-EGF依存的な細胞増殖に必要である 第62回日本細胞生物学会大会 大阪 2010.5.19-21
- ⑨ 村田卓也、水島寛人、榎本隆之、木村正 目加田英輔 癌随伴線維芽細胞はHB-EGFおよびPDGFを介して子宮頸癌細胞の増殖を促進する 第62回日本細胞生物学会大会 大阪 2010.5.19-21
- ⑩ 中村尚志、北川教弘、岩本亮、竹家達夫 目加田英輔 HB-EGF-EGFRシグナルは多重の経路を介して骨芽細胞の分化を制御する 第62回日本細胞生物学会大会 大阪 2010.5.19-21
- ⑪ 森部弘樹、小央良二、中村邦明、目加田英輔 線虫外骨格形成においてテトラスパニンにより制御される分子経路の同定 第62回日本細胞生物学会大会 大阪 2010.5.19-21
- ⑫ Eisuke Mekada "HB-EGF is a novel therapeutic target for ovarian cancer:"

Development of an HB-EGF inhibitor as an anticancer drug." at 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, 2010. 2. 5-9, Hawaii, USA.

- ⑬ 水島寛人、宮本新吾、目加田英輔、インテグリン^αはEGFファミリー増殖因子の増殖因子活性を単層培養において不顕在化する
第61回日本細胞生物学会大会 名古屋
2009. 6. 2-4
- ⑭ 岩本亮、目加田英輔、HB-EGFの生理機能発揮におけるエクスト^αメイン^βシグナリング^γの役割
第60回日本細胞生物学会大会 横浜
2008. 6. 29

[その他]

ホームページ等

<http://cell-biology.biken.osaka-u.ac.jp/MekadaLabHP/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目加田 英輔 (MEKADA EISUKE)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：20135742

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無