

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570122

研究課題名（和文）膜結合型シアリダーゼによる EGFR シグナル伝達系の新奇調節機構の解明

研究課題名（英文）Investigation on the molecular mechanism modulating EGFR signal transduction via the membrane-associated sialidase

研究代表者

山口 壹範 (YAMAGUCHI KAZUNORI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・上席主任研究員

研究者番号：80373215

研究成果の概要（和文）：

膜結合型シアリダーゼ NEU3 は細胞膜に局在する糖鎖分解酵素の一種で、上皮増殖因子受容体 (EGFR) を活性化し腫瘍形成を促進する。この NEU3 による EGFR の活性化機構として両分子の相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究では Neu3 ノックアウトマウスを用いて NEU3 の腫瘍形成への関与を検討するとともに、NEU3-EGFR 間の相互作用に関して分子レベルでの解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

The membrane-associated sialidase NEU3, a kind of glycolytic enzyme, localizes at cell membrane and promotes tumor formation through activation of EGFR. We previously showed that interaction between NEU3 and EGFR plays role in the activation. In this study, we investigated an involvement of NEU3 in colon tumor formation by using Neu3 knock out mice. We also analyzed interaction between NEU3 and EGFR at molecular level

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖質、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

シアリダーゼは複合糖質糖鎖の非還元末端に結合したシアール酸（酸性糖の一種）を遊離させる酵素で、哺乳類では細胞内局在や基質特異性が異なる 4 種のシアリダーゼが存在している。このうち細胞膜画分に局在する NEU3 シアリダーゼは細胞膜成分である糖脂質の一種ガングリオシドを良い基質とす

る。糖鎖代謝酵素の多くはリソソームに局在するが、我々が世界に先駆けて cDNA をクローニングした NEU3 シアリダーゼは細胞膜のカベオラやラフトに局在する。このような局在は NEU3 が細胞膜上で何らかの生理機能を果たしていることを示唆している。実際これまでの我々の解析から、EGFR 等細胞膜上の受容体が関与するシグナル伝達を

NEU3が修飾し、細胞の増殖/分化に影響を及ぼし、その異常ががんや糖尿病等の病態の原因になりうる事が明らかとなった。例えばヒト大腸がんの臨床検体を用いた検討ではNEU3の酵素活性及びmRNAレベルが上昇していることが示され、その生理的意義を明らかにするため大腸がん由来細胞株においてNEU3発現を抑制するとEGFRシグナル伝達系の活性化が抑制され最終的にアポトーシスが誘導されることが示された。このことは大腸がんで異常亢進したNEU3がEGFRシグナル伝達系の活性化を通してがん細胞のアポトーシス回避に寄与していることを示唆している。この点はより生理的な条件、すなわちNeu3ノックアウトマウスを用いてさらに解析する必要があった。EGFRシグナル伝達系は腫瘍の増殖・悪性化において最も重要なシグナル伝達系であり、その制御によりがんを治療する分子標的薬の重要な対象となっている(Zhang, *J. Clin. Invest.* 2007)。従ってNEU3によるEGFRシグナル伝達系の制御機構を明らかにすることは、新たながん治療法の開発に資することが期待される。この制御の分子機構として、一つはNEU3の基質である糖脂質ガングリオシドの関与が考えられた。特定のガングリオシドのレベルがEGFRの活性化に影響を及ぼすことが報告されていた。一方我々の予備的な検討ではNEU3がEGFRと相互作用し、この相互作用によりEGFRの活性化が亢進する可能性も示唆された。

2. 研究の目的

本研究ではNEU3によるEGFRシグナル伝達調節の分子機構を明らかにするため、以下の項目の解明を目的とした。

(1) ノックアウトマウスを用いたNeu3の生理機能解明

これまでNEU3によるシグナル伝達調節は培養細胞あるいはヒトNEU3を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いて解析されてきた。本研究ではNeu3ノックアウトマウスを用いて、より生理的条件に近い条件で、大腸がん発症やガングリオシド代謝の変動を検討した。

(2) NEU3-EGFR分子間相互作用の解析
これまでに明らかにされたNEU3とEGFR間の相互作用に関して、その分子メカニズムを明らかにするため、相互作用に必要なドメインの同定を目指した。

(3) NEU3と相互作用する新規因子の同定
これまでにNEU3と直接あるいは間接に相互作用するシグナル分子としてEGFR以外にGrb2、Rac1、caveolin-1等のシグナル分子が同定されている。これらの分子との相互

作用もEGFRシグナル伝達の調節に関与している可能性もあり別に解析を行っている。本研究ではさらに新たな相互作用分子の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) Neu3ノックアウトマウスを用いた検討

化学発がん剤(azoxymethane, AOM)単独、あるいは化学発がん剤と起炎剤(dextran sulfate sodium, DSS)との併用により大腸がんを発症させ、その際の腫瘍形成頻度や腫瘍成長を調べ、Neu3欠損の影響を検討した。またガングリオシド代謝に及ぼすNeu3欠損の影響を確認するため、マウス各組織からガングリオシドを調製し、その組成を薄層クロマトグラフィーにより確認した。

(2) NEU3-EGFR分子間相互作用の解析
NEU3及びEGFRの欠失変異体を作製し培養細胞で発現させ、特異抗体を用いた免疫沈降の共沈実験により相互作用の有無を検出した。

(3) NEU3と相互作用する新規因子の同定
NEU3と相互作用する分子を探索するため、NEU3の部分配列をbaitとして、ヒト脳由来cDNAライブラリーを酵母two hybrid系によりスクリーニングした。スクリーニングで陽性であったクローンに関しては免疫沈降の共沈により、相互作用を確認した。

4. 研究成果

(1) Neu3ノックアウトマウスにおける炎症性大腸がん発症の抑制

発がん剤AOMと起炎剤DSSの併用により発症する大腸がんの発生がノックアウトマウスで有意に低下していた。一方で発がん剤単独投与による大腸がんの発生及び大腸がんの初期段階と考えられている異常な大腸クリプト(aberrant crypt foci)の発生に関してはノックアウトとコントロールマウス間で有意差は認められなかった。以上の結果はマウスにおいてNeu3が炎症性シグナルを介して大腸がん発症に関与しているという、これまで知られていなかったNeu3機能の存在を示唆している(論文投稿中)。炎症性大腸がんの発症にEGFRシグナル伝達系が関与していることが報告されていることから、マウスNeu3がEGFRシグナル伝達系を介して炎症性シグナルの調節に関与している可能性もあり、今後の検討課題である。

また、脳及び大腸粘膜におけるガングリオシド組成は、ノックアウト及びコントロールマウス間で明らかな差は認められなかった。他のシアリダーゼファミリーにより補償されている、あるいはNeu3のガングリオシド代

謝への寄与が限定的である可能性が考えられる。この点を明らかにすることは今後の重要な課題である。

(2) NEU3-EGFR 分子間相互作用に関与するドメインの同定

NEU3 及び EGFR の欠変異体の共沈実験から NEU3 の中間領域及び EGFR の細胞膜貫通ドメイン近傍の領域が相互作用に関与していることが明らかになった。現在、相互作用に必要な最小領域の絞り込みとともに、両ドメインが直接相互作用しているのかあるいは他の分子を介して相互作用しているのか、表面プラズモン共鳴測定装置で測定する等、更なる検討を進めている。

(3) NEU3 と相互作用する新規因子の同定
NEU3 の部分配列を bait とした酵母 two hybrid 系による一次スクリーニングで、ヒト脳由来 cDNA ライブラリーより 300 程度の陽性クローンが単離された。スクリーニング条件を種々検討したが酵母 two hybrid 系ではこれ以上の陽性クローンの絞り込みは不可能であった。そこで得られたクローンすべての DNA 配列を決定し、それぞれの機能をデータベースあるいは文献情報から推定し、NEU3 との相互作用が推定されるクローン、11 クローンをピックアップした。当該クローンを培養細胞で発現させ免疫沈降を行い NEU3 と共沈する 1 クローンを同定した。当該クローンは細胞内輸送に関与することが最近明らかになった。EGFR をはじめとする多くの受容体シグナルの調節に細胞内輸送系が関与していることが明らかになっており、NEU3 がこの輸送系を介して広くシグナル伝達系に関与している可能性が考えられた。現在相互作用に関与するドメインの同定など、さらに検討を進めている。

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 8 件)

- ① *Cell Death. Differ.* (査読有) in press Kawamura, S., Yamaguchi, K., Miyagi, T. (他 12 名、4 番目)
Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling.
- ② *J. Biol. Chem.* (査読有) 286: 21052-21061 (2011) Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Moriya, S., Miyagi, T. Regulation of Sialyl Lewis Antigen Expression in Colon Cancer Cells by Sialidase NEU4
- ③ *Biochem. J.* (査読有) 430: 107-117, (2010) Yamaguchi, K., Koseki, K., Shiozaki, M.,

Shimada, Y., Wada, T., Miyagi, T. Regulation of plasma-membrane-associated sialidase NEU3 gene by Sp1/Sp3 transcription factors.

- ④ *Clin. Exp. Immunol.* (査読有) 161: 233-241, (2010) Katoh, S., Maeda, S., Fukuoka, H., Yamaguchi, K., Senda, S., Miyagi, T. (他 3 名、7 番目) A crucial role of sialidase Neu1 in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model.
- ⑤ *J. Biol. Chem.* (査読有) 284: 21157-21164, (2009) Shiozaki, K., Koseki, K., Yamaguchi, K., Miyagi, T. (他 2 名、3 番目) Developmental change of sialidase neu4 expression in murine brain and its involvement in the regulation of neuronal cell differentiation.
- ⑥ *Cancer Sci.* (査読有) 100: 588-594, (2009) Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Sato, I., Miyagi, T.; Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) promotes formation of colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-treated transgenic mice.
- ⑦ *J. Org. Chem.* (査読有) 74: 6382-6385, (2009) Takahashi, S., Takahashi, R., Hongo, Y., Koshino, H., Yamaguchi, K., Miyagi, T.; Synthesis of All Possible Isomers Corresponding to the Proposed Structure of Montanacin E, and Their Antitumor Activity.
- ⑧ *Oncogene* (査読有) 28: 1218-1229, (2009) Uemura, T., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., Kato, K., Sakuraba, H., Miyagi, T.; Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin beta4.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Shiozaki, K., Hata, K., Yamaguchi, K., and Miyagi, T.: Activation of plasma membrane-associated sialidase NEU3 by phospholipid. The 28th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [I] Functions and Disease Mechanisms, 2010.7.27, Hayama, Japan.
- ② Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., and Miyagi, T.: Sialidase NEU4 attenuates E-selectin derived signaling in colon cancer cells. Sialoglyco meeting, 2010.8.21,

- Potsdam, Germany.
- ③ 塩崎一弘, 山口壹範, 宮城妙子: シアリダーゼ NEU3 はフォスファチジン酸により活性化される. 生理学研究所研究会 糖鎖機能研究会, 2010.7.1, 岡崎.
 - ④ 高橋耕太, 塩崎一弘, 山口壹範, 森谷節子, 宮城妙子: シアリダーゼ Neu4 による神経接着分子 NCAM ポリシアル酸分解の制御. 第 83 回日本生化学会大会, 2010.12.7, 神戸.
 - ⑤ 秦敬子, 和田正, 山口壹範, 高橋耕太, 森谷節子, 塩崎一弘, 宮城妙子: シアリダーゼ NEU3 による EGFR シグナリング活性化機構の解析. 第 83 回日本生化学会大会, 2010.12.7, 神戸.
 - ⑥ Kawamura S., Sato I., Wada T., Yamaguchi K., Moriya S., Miyagi T.; Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling. 21st International Symposium on Glycoconjugates 2011. 8.21, Vienna, Austria.
 - ⑦ 秦敬子, 和田正, 橋井則貴, 川崎ナナ, 塩崎一弘, 山口壹範, 高橋耕太, 森谷節子, 細野雅祐, 仁田一雄, 宮城妙子; 形質膜シアリダーゼ NEU3 の膜トポロジーに関する研究. 第 84 回日本生化学会大会, 2011.09.21, 京都.
 - ⑧ 塩崎一弘, 竹下一輝, 池田真子, 小松正治, 山田章二, 山口壹範, 宮城妙子; メダカシアリダーゼ Neu3 のクローニングおよび性状解析. 第 84 回日本生化学会大会, 2011.09.21, 京都.
 - ⑨ 宮城妙子, 高橋耕太, 和田正, 山口壹範, 塩崎一弘, 細野雅祐, 仁田一雄; シアリダーゼ NEU3 の異常亢進は EGFR シグナリング活性化を介してがんの進展に導く. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.3, 名古屋.
 - ⑩ 高橋耕太, 和田正, 山口壹範, 細野雅祐, 仁田一雄, 宮城妙子; 形質膜シアリダーゼ (NEU3) は癌幹細胞性を制御する. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.3, 名古屋.
 - ⑪ 佐藤郁朗, 川村貞文, 栃木達夫, 和田正, 山口壹範, 高橋耕太, 宮城妙子; シアリダーゼ NEU3 は AR シグナリング修飾を介して前立腺癌のアンドロゲン非依存性増殖への進展を制御する. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.3, 名古屋.

[図書] (計 1 件)

山口壹範, 宮城妙子 (分担執筆者) エル・アイ・シー, シアリダーゼ、生物機能モデルと新

しいリソース・リサーチツール、(2011), p340-p345

[その他]

ホームページ等

<http://www.cbt.med.tohoku.ac.jp/member2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 壹範 (YAMAGUCHI KAZUNORI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・首席主任研究員

研究者番号: 80373215

(2) 研究分担者

立野 紘雄 (TATENO HIROO) (2009)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・病理部・部長

研究者番号: 70004744

(3) 連携研究者

なし