

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31日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659060

研究課題名（和文）分子間相互作用が生み出す膜マイクロドメイン生物情報

研究課題名（英文）Bioinformation Produced by Molecular Interactions in The Membrane Microdomains

研究代表者

本家 孝一（HONKE KOICHI）

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：80190263

研究成果の概要（和文）：最近我々が独自に開発した生体膜分子間相互作用解析法 EMARS 法を改良するため、第二世代標識試薬を開発し、質量分析を基盤技術とするプロテオミクスによって標識タンパク質を同定することを可能にした。また、EMARS 法を用いて、細胞外マトリクスタンパク質や抗体医薬品の刺激による膜環境変化に伴う細胞膜分子間相互作用の変容を見出し、生物情報発信に繋がる新たな分子の関与を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to improve the recently established method to analyze molecular interactions in the plasma membranes, called EMARS, we developed the second generation labeling reagent and enabled to identify proteins labeled by the EMARS method by using mass spectrometry-based proteomics technology. Furthermore, we found changes in molecular interactions in the plasma membranes elicited by stimulations with extracellular matrix proteins or therapeutic antibodies and elucidated the involvement of novel molecules in the signal pathway leading to the biological effects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学、分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

シンガー、ニコルソンの『流動膜モザイクモデル』(1972年)は広く受け入れられてきたが、その後、生体膜の流動性には不均一性が存在することがわかってきた。生体膜上の他と異なる部分を膜マイクロドメインと呼ぶが、ここは、受容体タンパク質や膜脂質等の生体膜構成要素が動的秩序体を形成して生物情報を発信する場である。自己組織化したシステム

が形成する生物情報は、個々の構成要素を調べ尽くしても解明できない。要素間の相互関係を理解することが前提となる。

従来、膜マイクロドメインは、密度勾配超遠心法を用いて中性界面活性剤不溶画分

(DRM)として分離されてきたが、これでは細胞膜上に存在する多様な膜マイクロドメインを十把一絡げに集めていることになるので、DRMに回収された分子が同じ機能クラスターにいないとは限らない。DRMに回収されるタンパ

ク質をプロテオミクスで網羅的に同定する研究が行われているが、種類と量は判明するものの機能解析には至っていない。

最近、我々は、生体膜分子間相互作用解析法を開発し、EMARS (Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources) と命名した (Kotani et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:7405-7409, 2008; 特願2007-017667)。この方法は、アリールアジド基を、紫外線ではなく西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の酵素作用でナイトレンラジカルに活性化することに特徴がある。生細胞の細胞表面の任意分子にHRPを固定した後、アリールアジド-ビオチン (または他のタグ) を添加すると、HRPによりアリールアジド基が活性化され、近接分子が標識される (図1)。

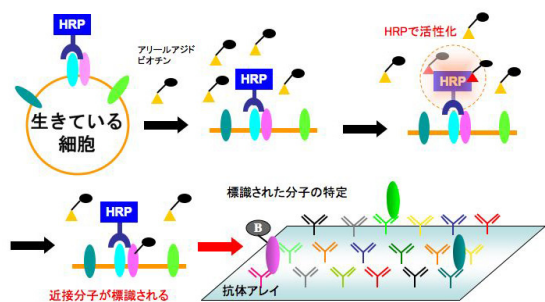


図1 EMARS法の原理

EMARS 法は、特別な機器を必要としない簡便な方法であるが、未完成な部分を含み、誰もが使える技術とはなっていなかった。このため、EMARS 法に改良を重ねて、生命科学における有用性を実証することにより、幅広く医学者や細胞生物学者に普及させたいと考えていた。

2. 研究の目的

EMARS 法を改良して標識タンパク質の質量分析による同定法を確立するとともに、外的刺激や膜環境の変化に応じて細胞表面に局在する特定分子と相互作用する分子群がどのように変化するかを調べ、その変化に起因して発信シグナルにどのような違いが生じるかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 第二世代 EMARS 標識試薬の使用と質量分析による標識タンパク質同定法の確立

従来、EMARS 標識試薬として、市販品のアリールアジド-ビオチン (Pierce 社) を使用していた。この化合物のビオチン部分を蛍光化合物のフルオレセインに置き換えたアリールアジド-フルオレセインを合成した (図2)。

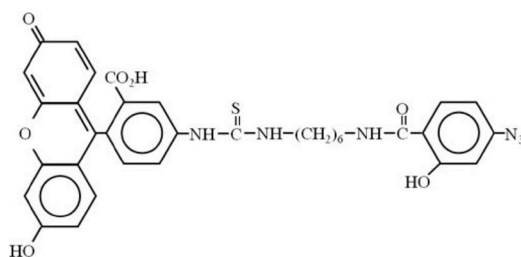


図2 アリールアジドフルオレセイン

アリールアジド-フルオレセインで標識すると、標識タンパク質を蛍光イメージアナライザーで直接検出することが可能になった。さらに、アリールアジド-フルオレセインは、アリールアジド-ビオチンと異なり、細胞内酵素 (たぶんペルオキシダーゼ) では活性化されにくい特性を有していた。このため、非特異的標識が消失し、HRP に依存する特異的標識のみを検出することが可能になった。

アリールアジド-フルオレセインを用いて EMARS 法で近接分子を標識した後、界面活性剤で細胞膜を可溶化して、フルオレセイン標識タンパク質を、抗フルオレセイン抗体ビーズを用いて精製濃縮した。精製したフルオレセイン標識タンパク質をトリプシンで限定分解して、HPLC で蛍光標識ペプチドを分離した後、MALDI-TOF/TOF MS 分析で標識タンパク質を同定した (図3)。

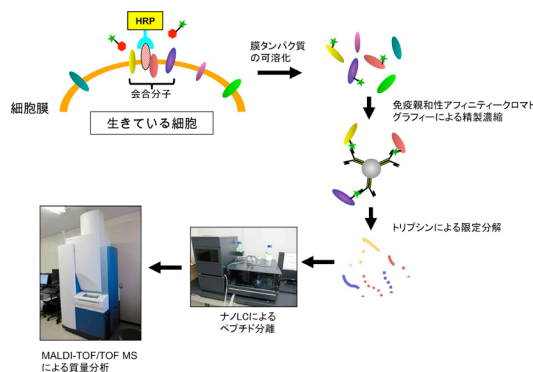


図3 EMARS 反応産物の免疫親和性クロマトグラフィーによる精製濃縮と質量分析による同定

(2) 外的刺激や膜環境の変化に伴う細胞膜分子間相互作用の変容と生物情報発信への影響

三種類の細胞外マトリクス (ECM) タンパク質 (フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン) を別々にコートしたディッシュ上で HeLa S3 細胞を培養し、時間経過を追ってインテグリンの近傍に会合する分子を、EMARS 法と受容体チロシンキナーゼ群を対象とする抗体アレイを用いて調べた。この方法により候補分子として見出された ErbB4 について、細胞内局在、リン酸化、細胞伸展における阻

害剤や中和抗体の効果を調べた。

B細胞リンパ腫細胞表面に発現しているCD20分子に対して、rituximab 他抗CD20単クローン抗体を結合させ、それぞれの抗体についてCD20の近傍に会合する分子を、EMARS法と受容体チロシンキナーゼ群を対象とする抗体アレイを用いて調べた。この方法により候補分子として見出されたFGFR3について、細胞膜における局在、リン酸化状態を調べ、細胞増殖阻害における阻害剤の効果を調べた。

4. 研究成果

(1) 第二世代 EMARS 標識試薬の開発と質量分析による標識タンパク質同定法の確立

従来、EMARS法の標識試薬として市販のアリールアジド-ビオチンを使用していたが、第二世代標識試薬としてアリールアジド-フルオレセインを開発した(特願2010-157181)。この試薬を用いると二つの利点がある、第一は、標識されたタンパク質を蛍光イメージ装置で直接検出することができる(図4)。

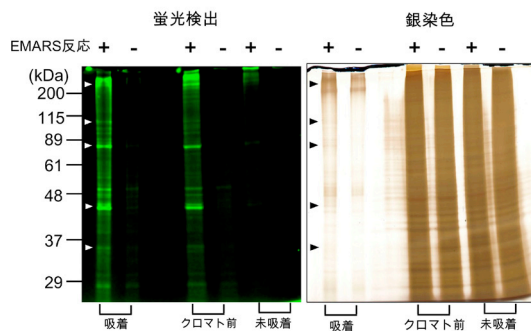


図4. 蛍光イメージャーによる標識分子の検出

第二は、アリールアジド-ビオチンを使用していたときの問題点であった内在性酵素による活性化(ノイズ)を減らす効果がみられた。フルオレセインで標識されたタンパク質は、抗フルオレセイン抗体で分離濃縮できた(図4)。

免疫沈降で分離した標識タンパク質をトリプシン分解した後、MALDI-TOF/TOF質量分析装置で解析した結果、約30種類の会合候補分子を同定することができた(Proteomics 2012)。

(2) 外的刺激や膜環境の変化に伴う細胞膜分子間相互作用の変容と生物情報発信への影響

HeLa S3細胞において、 β 1インテグリンと三種類の細胞外マトリクス(ECM)タンパク質(フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン)間の結合により、接着後時間依存的に

どのような受容体チロシンキナーゼ(RTK)が β 1インテグリンと相互作用するかを、EMARS法を用いて網羅的に解析した。その結果、 β 1インテグリンと相互作用するRTKは、ECMの種類及び接着後時間依存的に変化していた。中でも、 β 1インテグリンとErbB4の相互作用は接着後2時間で最大になり、同時にErbB4のチロシン残基の自己リン酸化も接着後2時間で最大になることが分かった(図5)。

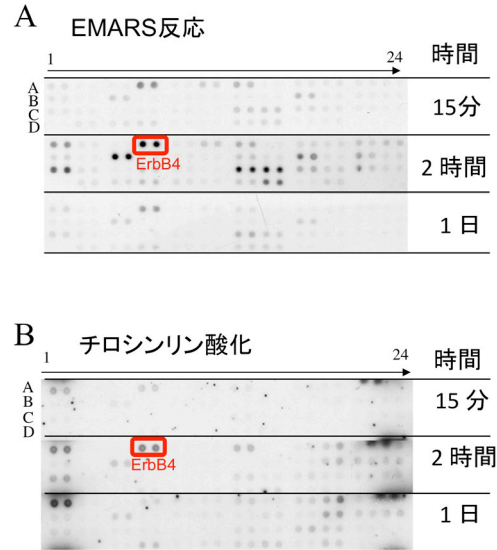


図5 ErbB4の β 1インテグリンとの相互作用と自己リン酸化の相関

細胞播種後2時間は細胞が移動する時期にあたるので、ErbB4の細胞移動への影響を調べた。ErbB4のリガンドであるニューレグリン(NRG1)、ErbB4阻害剤、ErbB4阻害抗体を用いたマイグレーションアッセイにより、ErbB4が細胞移動に関与することが確かめられた。細胞播種後2時間後の β 1インテグリンとErbB4との相互作用は、免疫組織化学と化学架橋剤を用いた生化学実験でも確かめられたので、 β 1インテグリンとErbB4の相互作用が細胞移動に関与している可能性が示された。これらの結果は、ダイナミックな細胞膜上分子間相互作用が細胞応答を惹起することを示唆している(J. Biochem. 2011)。

抗体医薬品の効能に関与すると予想される細胞膜上シグナル分子の探索を目的として、B細胞リンパ腫治療抗体である抗CD20抗体、rituximabをモデル抗体として用い、rituximab-CD20複合体と相互作用する分子を探索した。その結果、複数の受容体チロシンキナーゼ(RTK)が相互作用することが分かった。その中で、rituximabの作用機序の一つであるB細胞リンパ腫アポトーシス誘導シグナルに関与する分子候補としてFGFR3が同定された。FGFR3の機能的関与を調べるためPD173074でFGFR3を阻害すると、

rituximab 依存性 B 細胞リンパ腫アポトーシスが減弱された。この結果は、FGFR3 が抗体医薬 rituximab のアポトーシス誘導に関与する分子であり、ひいては rituximab の効能を制御する分子標的となりうることを示唆された（第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月、論文投稿中）。

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 4 件）

- ① Jiang S, Kotani N, Ohnishi T, Miyagawa-Yamaguchi A, Tsuda M, Yamashita R, Ishiura Y, Honke K: A proteomics approach to the cell-surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction. *Proteomics* 12:54-62 (2012) 査読有
doi: 10.1002/pmic.201100551
- ② Yamashita R, Kotani N, Ishiura Y, Higashiyama S, Honke K: Spatiotemporally-regulated interaction between β 1 integrin and ErbB4 that is involved in fibronectin-dependent cell migration. *J. Biochem.* 149: 347-355 (2011) 査読有
doi: 10.1093/jb/mvq148
- ③ Honke K, Kotani N: The enzyme-mediated activation of radical source reaction: a new approach to identify partners of a given molecule in membrane microdomains. *J. Neurochem.* 116:690-695 (2011) 査読有
doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07027.x.
- ④ Ishiura Y, Kotani N, Yamashita R, Yamamoto H, Kozutsumi Y, Honke K: Anomalous expression of Thy1 (CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thy1 antibody treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 329-334 (2010) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.092>

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 小谷典弘、本家孝一：抗体医薬の効能や安全性を向上させる分子標的治療の標

的分子探索、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都国際会議場

- ② Honke K, Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N: Analysis of molecular clustering on the living cell membrane. *Glycobiology Japan-Netherland Joint Seminar 2011*, 2011 年 10 月 11 日、名古屋大学
- ③ 本家孝一、小谷典弘：EMARS 反応 一生きている細胞の表面で任意の分子と会合する分子を同定する。第 61 回日本電気泳動学会 (JES) シンポジウム/第 7 回日本臨床プロテオーム研究会 (JSCP) 2011 連合大会、2011 年 5 月 10 日、山口大学
- ④ Honke K, Kotani N: A new approach to identify partners of a given molecule in membrane domains. The 4th ISN Special Neurochemistry Conference on "Membrane Domains in CNS physiology and pathology" May 22-26, 2010, Erice, Sicily, Italy

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：細胞膜上分子と相互作用する化合物の検出方法

発明者：本家孝一、小谷典弘

権利者：高知大学

種類：特願

番号：2010-157181

出願年月日：平成 22 年 7 月 9 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本家 孝一 (HONKE KOICHI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：80190263