

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830080

研究課題名(和文)細胞増殖・癌病態を制御する受容体型チロシンキナーゼの新規寿命調節機構の分子基盤

研究課題名(英文)Turnover of receptor tyrosine kinases regulated by membrane trafficking

研究代表者

植村 武文(ueamura, takefumi)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80548925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体・エンドソームに局在する小胞輸送関連分子GGA(1,2,3の3種)およびAP-1複合体の機能についてタンパク質の品質管理という観点からこれらの分子の詳細な機能解析を行った。その結果、哺乳動物細胞においてGGA2やAP-1複合体のノックダウンによりEGFRがリソソームへ輸送され分解される事を見出した。この結果はGGAやAP-1複合体などのアダプター分子が膜蛋白質のポストゴルジ交通網における輸送調節に深く関わっている事を示しており、これらの分子機能の破綻が様々な疾患の原因となりうる事を示唆している。

研究成果の概要(英文)：GGAs (GGA1,2,3) and AP-1 are membrane trafficking associated molecules and they function as clathrin adaptors. Their functions have been investigated in terms of quality control of protein using cell lines. Depletion of GGA2 or AP-1 complex decreased EGFR expression at protein level, reflecting enhanced lysosomal degradation of EGFR. This result suggests that GGA2 and AP-1 complex are involved in protein transport of transmembrane protein at the post-Golgi compartments to regulate the turnover. Also, this raises a possibility that the malfunction of GGAs and AP-1 could influence pathologies such as neurodegenerative diseases or cancer.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 エンドソーム 受容体型チロシンキナーゼ 小胞輸送 タンパク寿命調節 ノックダウン
細胞増殖 癌

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 EGFR などの受容体型チロシンキナーゼ(RTK)はそのリガンドと結合することで活性化し、MAP キナーゼなどの増殖シグナルを介して細胞増殖を制御する。RTK の活性化とともにそのダウンレギュレーションも発動されるが、一般的にこの過程では活性化 RTK がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、多胞性エンドソームを経てリソソームに運ばれ分解される。一方、細胞内に取り込まれた活性化 RTK の一部が細胞膜にリサイクリングされることが数グループから報告されており、“寿命調節機構”と考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、ゴルジ体・エンドソームに存在する小胞輸送関連分子の生理機能について、積み荷蛋白質の品質管理という観点から解析する。具体的にはヒト由来培養細胞系を用いてノックダウン実験を行い、EGFR など細胞の維持、増殖などに重要な積み荷蛋白質の細胞内輸送に対する影響を解析する。

3. 研究の方法

(3-1) ARPE19(ヒト網膜色素上皮)等の細胞株を用いて GGA1,2,3 及び AP-1 複合体のノックダウン実験系の確立を行い、EGFR をはじめとする様々な積み荷蛋白質分子の発現様式に対する影響を調べた。

(3-2) GGA2 が EGFR と直接相互作用するかどうかを GST-プルダウンアッセイにより検討した。GFP-EGFR domain 蛋白質(全細胞質領域、juxtamembrane 領域、kinase 領域、及び tail 領域)を発現させた細胞抽出液と大腸菌で発現、精製した GST-GGA2 domain (VHS, GAT, 及び GAE) 蛋白質の組み合わせで実験を行った。

(3-3) EGFR の細胞内輸送に GGA2 がどのように関わっているかを調べるために、GGA2 ノックダウン細胞、AP-1 ノックダウン細胞をリソソーム酵素阻害剤である E64d+Leupeptin で処理した後、抗 EGFR 抗体及び抗 Cathepsin D 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

(3-4) Rab5 変異体などを発現させることでエンドソーム/リソソームの蛋白質輸送をブロックし、EGFR が GGA2、AP-1 ノックダウンによりリソソームに運ばれる経路を解析した。

(3-5) PLA 法 (Proximity Ligation Assay) により、細胞内での EGFR-GGA2、EGFR-AP-1 の結合場所を解析した。

(3-5) GGA2 を恒常的に発現抑制した LoVo 細胞 (ヒト大腸癌由来) をヌードマウスに移植

し、腫瘍形成能・増殖能を解析した。

(3-5) GGA2、AP-1 の発現を数種類の癌組織において、免疫染色およびウェスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

ヒト細胞におけるクラスリンアダプター分子群の生理機能を明らかにする目的で、ARPE19 細胞 (ヒト網膜色素上皮細胞) などの培養細胞で GGA1, 2, 3 や AP-1 複合体の siRNA によるノックダウンを確立した (AP-1 複合体の場合は gamma-adaptin をノックダウンした)。その結果、GGA2 あるいは AP-1 複合体の発現低下により上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現量が顕著に減少する事を見出した。この時、EGFR の mRNA 量の有意な減少は見られず、また同 RNAi 実験においてリソソームプロテアーゼ阻害剤 (E64d+Leupeptin) を添加して免疫蛍光染色すると EGFR がカテプシン D 陽性のリソソームに検出された。このことより、GGA2、AP-1 複合体の発現低下は EGFR のリソソームへのミスソーティングを来し、このため EGFR 分解が促進されることが示唆された。

これまで、AP-1 複合体と EGFR の結合に関する報告はあるが、GGA2-EGFR 間の結合は知られていない。そこで、GST プルダウン法を用いて解析した。GFP を融合した EGFR 細胞質領域を HEK293 細胞に発現させ、その細胞抽出液を、グルタチオンビーズと結合した GST 融合型の GGA2 VHS+GAT 領域 (積み荷認識領域) と反応させた。GGA2 VHS+GAT 内の積み荷認識に必要な N108 をアラニンに置換した変異体をネガティブコントロールとして用い、結合実験のポジティブコントロールとして MPR の一種である CIMPR と GGA2 VHS+GAT 間の結合も解析した。その結果、GGA2 VHS+GAT が CIMPR のみならず、EGFR 細胞質領域にも結合することが確認され、さらに N108 に変異を持つ GGA2 VHS+GAT では結合が観察されなかった。GGA2 に認識される部位を詳細に解析するため、EGFR 細胞質領域を jxt domain, kinase domain, tail domain に分け、上記と同じように結合解析を行ったところ、GGA2 VHS+GAT が EGFR jxt domain を認識することが明らかとなった。次に、GGA2、AP-1 のノックダウン細胞に Rab5 変異体を発現させ、エンドソーム/リソソーム間の蛋白質輸送をブロックしたところ、Rab5 変異体により肥大した初期エンドソームに EGFR が蓄積した。このことから、GGA2、AP-1 の減少により EGFR がリソソームに運ばれる原因は初期エンドソームでのミスソーティングであることが示唆された。PLA 法により GGA2-EGFR、AP-1-EGFR の結合部位を解析したところ (図 1)、細胞質中で結合が見られた。一方、MPR-GGA2、MPR-AP1 の結合は核近傍 (ゴルジ体と考えられる) に観察されたことから、GGA2、AP-1 のカーゴ認識場所はカーゴの種類によって異なることが示唆され

た。

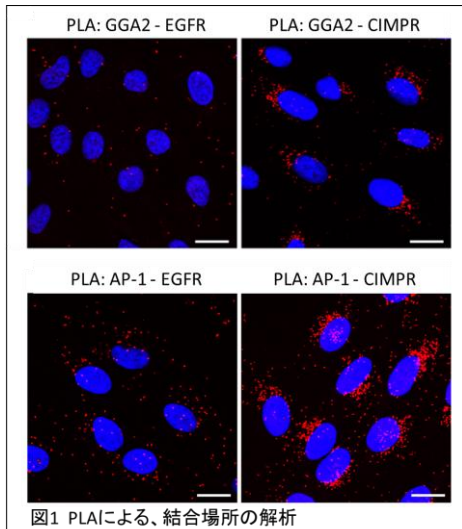


図1 PLAによる、結合場所の解析

EGFR は細胞増殖を制御する因子であることから、GGA2、AP-1 の減少が細胞増殖に影響するかどうか解析した。In vitro の実験系では GGA2、AP-1 の減少により、細胞増殖が明らかに低下することを観察した(図 2)。また、GGA2 においては、恒常的に発現抑制した LoVo 細胞を作製し、ヌードマウスに移植した。GGA2 発現抑制は腫瘍の増殖が顕著に低下した。また、GGA2、AP-1 の発現を数種類の癌組織で解析したところ、癌組織において GGA2、AP-1 が高発現していた(図 3)。

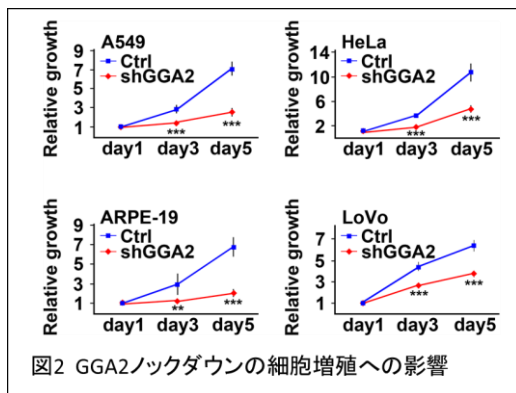


図2 GGA2ノックダウンの細胞増殖への影響

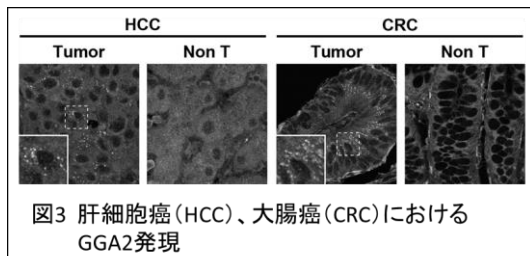


図3 肝細胞癌(HCC)、大腸癌(CRC)における GGA2発現

以上の事から、GGA2 及び AP-1 複合体は EGFR の細胞質領域を認識し、リソソームへのターゲティングをネガティブに調節することで EGFR 蛋白量を調節する事、この機能が癌細胞の増殖に寄与していることが示唆された。本解析結果は現在論文リバイス中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①植村武文、和栗聡

ゴルジ-エンドソーム局在型クラスリンアダプター GGA2 は上皮成長因子受容体 (EGFR) の安定化を介して腫瘍増殖を促進する

第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会
2017 年 03 月、長崎県長崎市。

②植村武文、和栗聡

上皮成長因子受容体の分解と細胞増殖における GGA 分子の機能

第 74 回日本癌学会学術総会
2015 年 10 月、愛知県名古屋市。

③植村武文、和栗聡

上皮成長因子受容体の恒常的分解と細胞増殖に関与する GGA 分子の解析

日本解剖学会 第 60 回東北・北海道連合支部学術集会
2014 年 09 月、福島県福島市。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/>

http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1050_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 武文 (UEMURA TAKEFUMI)

福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80548925

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30244908

(4)研究協力者
()