

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26440058
研究課題名(和文)糖鎖によるErbB受容体の制御機構とその応用

研究課題名(英文)Regulation of ErbB receptors by N-glycans

研究代表者
高橋 素子 (TAKAHASHI, MOTOKO)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00303941
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では糖鎖によるErbB受容体の機能制御機構を検討した。まず可溶性ErbBの精製効率を従来の100倍以上に改良した。可溶性EGFR N420Q変異体ではEGFシグナル抑制作用が著明に増強した。可溶性ErbB3 N418Q変異体では結晶構造は野生型と差はないが熱安定性の低下が見られた。ErbB3 N418上の糖鎖は構造安定性に関与しており、糖鎖欠損変異体では構造変化しやすいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The fundamental role of the glycan chain is to modify the physicochemical properties of target molecules. The aim of this study is to determine the mechanisms by which N-glycans regulate the function and structure of ErbB. First, we improved the purification efficiency of recombinant soluble ErbB (sErbB) over 100-fold. It was observed that the sEGFR N418Q N-glycan deletion mutant suppressed EGF signaling more effectively than the wild type. The crystal structure of the sErbB3 N418Q N-glycan deletion mutant revealed that the static structure of sErbB3 is not altered by the deletion of the N-glycan. In contrast, the thermostability of sErbB3 N418Q was reduced compared to the wild type. These results indicate that the N-glycan on N418 of ErbB3 is involved in the conformational stability of sErbB3, and the deletion of the N-glycan would increase the flexibility of the molecule.

研究分野：生化学、糖鎖生物学

キーワード：N型糖鎖 糖鎖生物学 糖タンパク質 増殖因子受容体 EGFR ErbB受容体

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾は様々な受容体の機能に影響し、シグナルの制御に関与している。研究代表者は、以前より ErbB 受容体の糖鎖に着目し、その機能を研究している。ErbB 受容体ファミリーには EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 が属し、それぞれの細胞外ドメインには 10 カ所前後の N 型糖鎖結合ポテンシャル部位が存在するが、そのポテンシャル部位は ErbB 間で高い相同性を示す。EGFR の N420 に結合する糖鎖を欠損する変異体 (EGFR N420Q) および ErbB3 の N418 に結合する糖鎖を欠損する変異体 (ErbB3 N418Q) はリガンド非存在下で二量体形成しやすいことがわかっている (Tsuda T. et al., *J. Biol. Chem.* 2000; Yokoe S., et al. *Cancer Res.* 2007)。

一方で、ErbB3 の細胞外ドメイン (可溶型 ErbB3) はシグナル抑制作用を示すことが報告されているが、研究代表者らはシグナル抑制のメカニズムとして可溶型 ErbB3 が細胞膜上の ErbB 受容体に作用すること、また可溶型 ErbB3 の糖鎖欠損変異体 N418Q ではその作用が著しく増強することを示した (Takahashi M. et al. *J. Biol. Chem.* 2013)。この際、可溶型 ErbB3 N418Q は MCF7 細胞、T47D 細胞、BT474 細胞など ErbB2 を発現する乳がん細胞において著明な効果を示すこと、またチロシンキナーゼ阻害剤と相乗効果を示すことも明らかとなった。

以上の結果は、N 型糖鎖が ErbB 受容体の二量体形成と活性化に関与していることを示唆している。二量体形成に関与する糖鎖を同定することができれば、可能型 ErbB3 N418Q 糖鎖欠損変異体より強力なシグナル抑制作用をもつ糖鎖改変・可溶型 ErbB が開発できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ErbB 受容体の糖鎖による制御機構を明らかにし、がん治療を目指した新しい糖鎖改変・可溶型 ErbB の開発を行うことを目的とする。具体的には、ErbB の糖鎖がどのように二量体形成を制御するかを同定し、二量体形成に関与する糖鎖を改変した可溶型 ErbB を作成することによって、強力なシグナル抑制作用をもつ可溶型 ErbB の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) 可溶型 ErbB の精製と EGF シグナル抑制作用の検討

EGF シグナル抑制作用を検討するため、可溶型 EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 を精製し、MCF7 細胞の EGF シグナルの抑制作用を比較検討した。

(2) 可溶型 EGFR N420Q 糖鎖欠損変異体の精製と糖鎖構造およびシグナル抑制作用の検討

EGFR の N420 に結合する N 型糖鎖の構造と機能を解析するため、可溶型 EGFR とその糖鎖欠損変異体 N420Q を精製した。マスマスペクトロメトリーによって N420 に結合する N 型糖鎖の構造を同定した。

MCF7 細胞の EGF シグナルの抑制作用を野生型と糖鎖欠損変異体とで比較検討した。

(3) 可溶型 ErbB3 N418Q 糖鎖欠損変異体の物理化学的性質の検討

可溶型 ErbB3 とその N418Q 糖鎖欠損変異体を用いて、X 線結晶構造解析と示差走査熱量測定を行なった。

4. 研究成果

(1) 可溶型 ErbB の精製と EGF シグナル抑制作用の検討

可溶型 EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 を精製し、MCF7 細胞の EGF シグナルの抑制作用を比較検討したところ、可溶型 EGFR が Akt および Erk のリン酸化を著明に抑制することが観察された。他の可溶型 ErbB ではそのような抑制作用は認められなかった。

(2) 可溶型 EGFR N420Q 糖鎖欠損変異体の精製と糖鎖構造およびシグナル抑制作用の検討

可溶型 EGFR とその N420Q 糖鎖欠損変異体の大量精製法を検討した結果、発現ベクターおよび精製方法を変更することによって従来の 160 倍のタンパク質量を得ることが可能となった。

N420 に結合する糖鎖構造をマスマスペクトロメトリーにて解析したところ、CHO-K1 細胞ではフコースのないパイアンテナ構造、Lec3.2.8.1 細胞では Man5 と呼ばれる構造であることが明らかとなった (図 1)。

可溶型 EGFR N420Q 糖鎖欠損変異体では、野生型と比較して EGF シグナル抑制作用が著明に増強することがわかった。

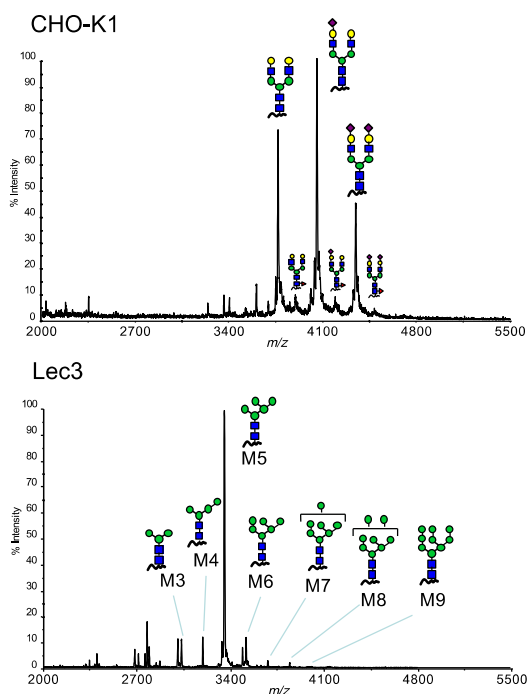


図 1 : sEGFR の N420 上の糖鎖構造
 (上図:CHO 細胞由来 sEGFR、下図:Lec3.2.8.1 細胞由来 sEGFR)

(3) 可溶性 ErbB3 N418Q 糖鎖欠損変異体の物理化学的性質の検討

X 線結晶構造解析では、野生型と N418Q 糖鎖欠損変異体とで構造の差は認められなかった(図 2)。

示差走査熱量測定では、野生型と比較して N418Q 糖鎖欠損変異体では熱安定性が低下しており、構造変化を起こしやすくなっていることが明らかになった(図 3)。

よって、糖鎖改変・可溶性 ErbB は立体構造変化を起こしやすくなっており、容易に二量体形成することが示唆された。

以上の結果は北海道大学先端生命科学研究院、姚関先生、加藤公児先生との共同研究による。

なお、(1)で開発した膜タンパク質の細胞外ドメインの調製法は、全ての I 型膜タンパク質の調製に应用可能であり、今回の研究で用いた糖鎖構造解析、X 線結晶構造解析、示差走査熱量測定のような大量の試料が必要な物性解析に有用と考えられる。



図 2 : 可溶性 ErbB3 N418Q 糖鎖欠損変異体の結晶構造解析

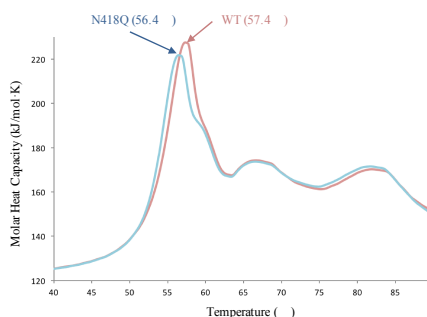


図 3 : 示差走査熱量測定による可溶性 ErbB3 の熱安定性の測定

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 15 件)

- 1 Hashimoto J, Takahashi M, Saito A, Murata M, Kurimura Y, Nishitani C, Takamiya R, Uehara Y, Hasegawa Y, Hiyama Y, Sawada N, Takahashi S, Masumori N, Kuroki Y, Ariki S. Surfactant protein A inhibits growth and adherence of uropathogenic Escherichia Coli to protect the bladder from infection. *J Immunol* 198, 2898-2905 (2017), doi: 10.4049/jimmunol.1502626. 査読有
- 2 Uehara Y, Takahashi M, Murata M, Saito A, Takamiya R, Hasegawa Y, Kuronuma K, Chiba H, Hashimoto J, Sawada N, Takahashi H, Kuroki Y, Ariki S. Surfactant protein A (SP-A) and SP-A-derived peptide attenuate chemotaxis of mast cells induced by human β -defensin

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 485, 107-112 (2017),
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.028. 査読有
- 3 Takahashi M, Hasegawa Y, Gao C, Kuroki Y, Taniguchi N. N-glycans of growth factor receptors: their role in receptor function and disease implications.
Clin. Sci., 130, 1781-1792 (2016), doi: 10.1042/CS20160273. 査読有
- 4 Takahashi M, Kizuka Y, Ohtsubo K, Gu J, Taniguchi N. Disease-associated glycans on cell surface proteins.
Mol. Aspects Med., 51, 56-70 (2016), doi: 10.1016/j.mam.2016.04.008. 査読有
- 5 Taniguchi N, Takahashi M, Kizuka Y, Kitazume S, Shuvaev VV, Ookawara T, Furuta A. Glycation vs. glycosylation: a tale of two different chemistries and biology in Alzheimer's disease.
Glycoconj. J., 33, 487-497 (2016), doi: 10.1007/x10719-016-9690-2. 査読有
- 6 Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Asakawa D, Tajiri M, Wada Y, Yamaguchi Y, Nishitani C, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Hashimoto J, Kurimura Y, Takahashi H, Kuroki Y. Surfactant protein D suppresses lung cancer progression by downregulation of epidermal growth factor signaling.
Oncogene, 34, 838-845 (2015) , doi: 10.1038/onc.2014.20. 査読有
- 7 Ito E, Oka R, Ishii T, Korekane H, Kurimoto A, Kizuka Y, Kitazume S, Ariki S, Takahashi M, Kuroki Y, Kida K, Taniguchi N. Fucosylated surfactant protein-D is a biomarker candidate for the development of chronic obstructive pulmonary disease.
Journal of Proteomics, 127 (Pt B), 386-394 (2015) , doi: 10.1016/j.dib.2015.09.017. 査読有
- 8 Ito J, Otsuki N, Zhang X, Konno T, Kurahashi T, Takahashi M, Yamato M, Matsuoka Y, Yamada K, Miyata S, Fujii J. Ascorbic acid reverses the prolonged anesthetic action of pentobarbital in Akr1a-knockout mice.
Life Sciences, 95, 1-8 (2014) , doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.004.. 査読有
- 9 Kurahashi T, Kwon M, Homma T, Saito Y, Lee J, Takahashi M, Yamada K, Miyata S, Fujii J. Reductive detoxification of acrolein as a potential role for aldehyde reductase (AKR1A) in mammals.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 452, 136-141 (2014),
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.072. 査読有
- 10 Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Takahashi M, Izawa T, Imaizumi K, Taniguchi N, Ohno H, Kizaki T. A circadian clock gene, Rev-erbalpha, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression.
J. Immunol., 192, 407-417 (2014),
doi: 10.4049/jimmunol.1301982. 査読有
- 11 Takamiya R, Takahashi M, Uehara Y, Ariki S, Hashimoto J, Hasegawa Y, Kuroki Y. The single N-glycan deletion mutant of soluble ErbB3 protein attenuates heregulin beta1-induced tumor progression by blocking of the HIF-1 and Nrf2 pathway.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 454, 364-368 (2014),
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.086. 査読有
- 12 長谷川喜弘, 梅田泰淳, 大塚満雄, 有木茂, 高宮里奈, 齋藤充史, 黒沼幸治, 千葉弘文, 高橋弘毅, 黒木由夫, 高橋素子. SP-D による変異型 EGFR 肺がんの制御機構.
分子呼吸器病 2017; 21: 80-83.
査読無
- 13 長谷川喜弘, 高橋素子, 有木茂, 高宮里奈, 上原康昭, 橋本次朗, 和田芳直, 高橋弘毅, 黒木由夫. 肺サーファクタント蛋白質の EGF シグナル制御を介した抗腫瘍作用.
分子呼吸器病 2015; 19: 107-111.
査読無
- 14 高橋素子, 長谷川喜弘, 黒木由夫. 肺サーファクタントタンパク質 SP-D による肺癌の進展の抑制.
Lung Perspectives 2015; 23: 65-69.
査読無
- 15 高橋素子, 有木茂, 黒木由夫. 肺サーファクタントの感染・炎症防御における役割.
呼吸器内科 2014; 16: 121-124.
査読無
- 〔学会発表〕(計7件)
1. 高橋素子, 長谷川喜弘, 加藤公児, 姚閔, 和田芳直, 有木茂, 高宮里奈, 齋藤充史, 黒木由夫
糖鎖改変・可溶性 EGFR による EGF シグ

- ナル抑制作用のメカニズム
第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25-27 日、仙台国際センター（宮城県・仙台市）
2. 高橋素子、長谷川喜弘、和田芳直、加藤公児、姚閔、有木茂、高宮里奈、齋藤充史、黒木由夫
EGFR の N 型糖鎖の機能
第 35 回日本糖質学会 2016 年 9 月 1 日-3 日、高知市文化プラザかるぽーと（高知県・高知市）
3. 高橋素子、加藤公児、姚閔、和田芳直、田尻道子、長谷川喜弘、高宮里奈、有木茂、黒木由夫
糖鎖改変・可溶性 ErbB3 による抗腫瘍作用の分子メカニズム
第 88 回日本生化学会大会 2015 年 12 月 1-4 日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）
4. 高橋素子、長谷川喜弘、高宮里奈、和田芳直、田尻道子、浅川大樹、有木茂、黒木由夫
EGFR のドメイン III の糖鎖による機能制御
第 34 回日本糖質学会 2015 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京大学工学部（東京都・文京区）
5. 高橋素子、長谷川喜弘、高宮里奈、有木茂、高橋弘毅、黒木由夫
肺サーファクタントタンパク質 SP-D の機能（特別講演）
第 3 4 回気道分泌研究会 2015 年 7 月 11 日、札幌プリンスホテル（北海道・札幌市）
6. Takahashi M., Hasegawa Y., Ikeda Y., Wada Y., Tajiri M., Ariki S., Takamiya R., Yamaguchi Y., Taniguchi N., Kuroki Y.
Signaling-inhibitory effects of sErbB3 is enhanced by single N-glycan deletion.
Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR), November 15-19, 2014, Hilton Hawaiian Village (Honolulu, USA).
7. 高橋素子、黒木由夫
N 型糖鎖による ErbB 受容体の機能制御メカニズム
（シンポジウム：「タンパク質の物性を制御する糖鎖」）
第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15-18 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

〔図書〕(計 2 件)

1. Takahashi M.: Functional Regulation of ErbB Receptors by N-Glycans.
Glycoscience: Biology and Medicine pp 983-989 (2015) Springer-Verlag Tokyo, Taniguchi N., Endo T., Hart G.W., Seeberger P.H., Wong C. -H. Eds.
2. Takahashi M.: Glycation of proteins.
Glycoscience: Biology and Medicine pp 1339-1345 (2015) Springer-Verlag Tokyo, Taniguchi N., Endo T., Hart G.W., Seeberger P.H., Wong C. -H. Eds.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 素子 (TAKAHASHI, Motoko)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00303941

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

有木 茂 (ARIKI, Shigeru)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80464478

和田 芳直 (WADA, Yoshinao)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター・研究所長
研究者番号：00250340