

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15597

研究課題名(和文)ネクチン様分子による細胞膜受容体二量体化の阻害機構

研究課題名(英文)The inhibitory mechanism by Necl-4 of the ligand-induced dimerization of cell surface receptors.

研究代表者

慶田城 迅(Kedashiro, Shin)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：00754558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜受容体ErbB3は、乳がんを含む多くのがんにおいて、その転移や生存を促進するタンパク質として知られている。ErbB3の働きを抑える機能を持つ分子として、細胞接着分子Necl-4を明らかにし、Necl-4によるErbB3の制御機構を解明した。また、Necl-4は、ErbB3以外のがんに関連したタンパク質の作用を抑制していることを示唆する結果が得られ、様々ながん細胞に対する抑制機能を持った分子である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本では二人に一人はがんになると言われており、その発症や、がん細胞の転移や生存の仕組みの解明は喫緊の課題である。事実、様々な抗がん剤がその仕組みを標的とし、積極的に開発されている。細胞膜受容体ErbB3は、乳がんを含む多くのがんにおいて、その転移や生存を促進するタンパク質として知られている。ErbB3の働きを抑える機能を持つ分子として、細胞接着分子Necl-4を明らかにし、Necl-4によるErbB3の制御機構を解明した。この成果は、ErbB3に対する新規抗がん剤の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：The ligand-induced dimerization of cell surface single-transmembrane receptors is essential for their activation. ErbB3, a single-transmembrane receptor, binds to its ligand heregulin, leading to the hetero-dimerization with ErbB2. This dimerization induces the activation of the signaling pathways for cell movement and survival. Despite the essential roles of ErbB3 signaling for cell survival, its hyperactivation and overexpression cause tumorigenesis. In this study, it was elucidated that Necl-4, nectin-like molecule-4/cell adhesion molecule 4, known to serve as a tumor suppressor, interacts with ErbB3 and inhibits the ErbB3/ErbB2 hetero-dimerization in an allosteric manner. Necl-4 also interacted with the hepatocyte growth factor receptor c-Met and reduced its phosphorylation, suggesting that Necl-4 targets the various oncogenic cell surface receptors to suppress the tumorigenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Necl-4 ErbB3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜一回貫通型受容体である上皮成長因子(EGF)受容体は、リガンドであるEGFを受容すると構造変化し、ホモあるいはヘテロ二量体を形成することで、細胞内に位置するキナーゼドメインがお互いをリン酸化して活性化する。活性化したEGF受容体は、様々なシグナル伝達分子をリクルート、あるいはリン酸化して下流へとシグナルを伝える。EGFリガンドによるEGF受容体の活性化機構は、Schlessingerらによって最初に解明されており、現在では、結晶構造解析によってより詳細に解明されている。EGF受容体で見出された活性化機構は、ファミリー分子であるErbB2、-3、-4においても基本的に同様の機構で活性化することが明らかとなっている。例えばErbB2の場合は、リガンドは結合しないが、二量体化することで活性化する(図1A)。また、ErbB3の場合、リガンドであるヘレグリン(HRG)を受容すると、ErbB3のドメインIIが外へ開いた構造へと変化し、パートナーであるErbB2のドメインIIと結合してヘテロ二量体を形成する(図1B)。このような機構において活性化したErbBファミリー分子は、下流へとシグナルを伝えるが、これらのシグナルは、個体の発生や生存を含めた、恒常性の維持に必須の役割を果たしている。一方で、受容体の過剰発現や遺伝子変異に由来する異常な活性化、それに伴う下流シグナルの増幅は、細胞のがん化を引き起こし、がん細胞の増殖や浸潤・転移を促進することも知られている。そのため、ErbBファミリー分子の活性制御は厳密に行われる必要があるが、ErbBファミリー分子のリガンドによる受容体の二量体化を阻害する生体内分子は知られていなかった。

研究代表者の所属研究室では、細胞間接着分子ネクチンを発見し、その機能と作用機構を解析してきた。ネクチンはスーパーファミリーを形成しており、4種のネクチンファミリー(ネクチン-1、-2、-3、-4)、5種のネクチン様分子ファミリー(Necl-1、-2、-3、-4、-5)から成る。ネクチンスーパーファミリー分子は共通した構造を持っており、細胞外に3つの免疫グロブリン様ループ(Igループ)を有している。ネクチンスーパーファミリー分子は、細胞間接着において機能していることが解析から明らかとなっているが、近年、細胞間接着以外の機能として、同じ細胞膜上の受容体やイン

テグリンとシスに結合して、細胞の極性形成、生存、増殖、運動、分化を制御していることが明らかになってきた。研究代表者の所属研究室では、がん抑制因子として知られていたNecl-4とNecl-2による新しい細胞膜受容体の制御機構を解明した(図2)。Necl-4とNecl-2はErbB3と細胞外領域同士で結合し、細胞内領域においてがん抑制因子である脱リン酸化酵素PTPN13と結合する。これにより、PTPN13はErbB3のごく近傍にリクルートされ、ErbB3を脱リン酸化し、その結果ErbB3の活性を阻害する。この機構に加え、研究代表者は、生体内の分子としてはじめて、Necl-4がHRGによるErbB3/ErbB2二量体化を阻害することを見出した(図1C)(*Sci. Rep.*, 7, 11375, 2017)。この新しい膜一回貫通型受容体の制御機構では、Necl-4は、ErbB3のHRG結合は阻害せず、また、ErbB2との結合部位とは異なる場所であるドメインIIIに結合して、アロステリック様式でErbB3/ErbB2ヘテロ二量体化を阻害した。この二量体化阻害により、HRG刺激依存的なMCF-7乳がん細胞の移動と足場非依存的な生存を抑制することを発見した(*Sci. Rep.*, 7, 11375, 2017)。このような学術的背景から、本研究では、Necl-4による

ErbB3/ErbB2二量体化を阻害する機構を詳細に解明し、その成果に基づいて、Necl-4が結合して二量体化を阻害するErbB3以外の受容体を同定し、その阻害機構の普遍性の解明を目指す。Necl-4によるErbB3/ErbB2二量体化の阻害機構を解明するためには、Necl-4あるいはNecl-2とErbB3との複合体の結晶を用いた三次元構造の解析が必要になるが、この解析は東京大学理学部の濡木理教授、石谷隆一郎准教授、森田純子博士の全面的な協力を受けて実施する。

2. 研究の目的

EGF受容体やそのファミリー分子に代表される膜一回貫通型受容体の活性化には、リガンドによる二量体化が必須であり、この活性化によるシグナル伝達は、がん化を引き起こす原因ともなることから、二量体化を含め、それらは厳密に制御される必要がある。一方で、これまで二量体化を阻害する生体内分子は知られていなかった。研究代表者は、Necl-4が成長因子受容体

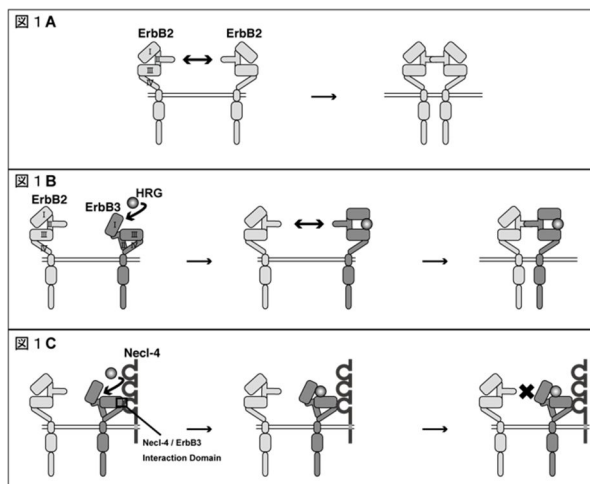
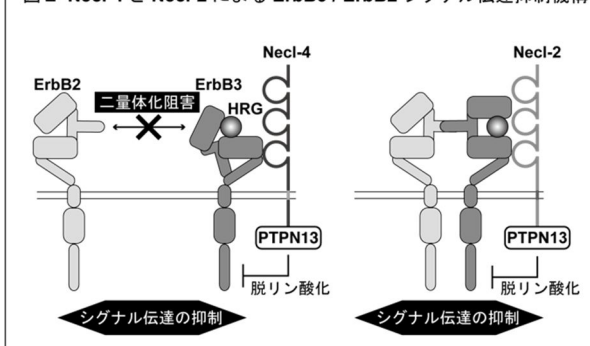


図2 Necl-4とNecl-2によるErbB3/ErbB2シグナル伝達抑制機構



ErbB3 と結合し、HRG による ErbB3/ErbB2 二量体化を阻害することを見出した。本研究では、Necl-4 と ErbB3 の複合体の結晶構造解析を行い、二量体化阻害機構の解明を目指す。この解析を行うことで、これまで全くの未知であった、アロステリック様式による膜一回貫通型受容体の二量体化制御機構の解明が期待でき、生物学としてのインパクトは非常に大きい。また、ErbB3 ががん細胞の生存や移動を制御していることから、ErbB3 の阻害機構を解明することは、新規抗がん剤開発に繋がるシーズとなる可能性もあり、医学の観点からも意義は非常に大きい。

3. 研究の方法

(1) Necl-4 あるいは Necl-2 と ErbB3 との複合体の結晶構造解析：Necl-4 と Necl-2 の Ig3 ドメインおよび ErbB3 の細胞外ドメインを、糖鎖修飾酵素欠損 CHO 細胞の分泌系を利用して発現させる。その際に、発現を上昇させるため、IR-MAR 法を利用した遺伝子増幅を利用する。得られる組換えタンパク質には、特異性が非常に高い Target タグを付加し、抗体によるアフィニティー精製を行い、結晶化に十分な量を確保する。結晶化スクリーニングにより結晶が得られた場合は、X 線構造解析に供し、三次元構造を決定する。

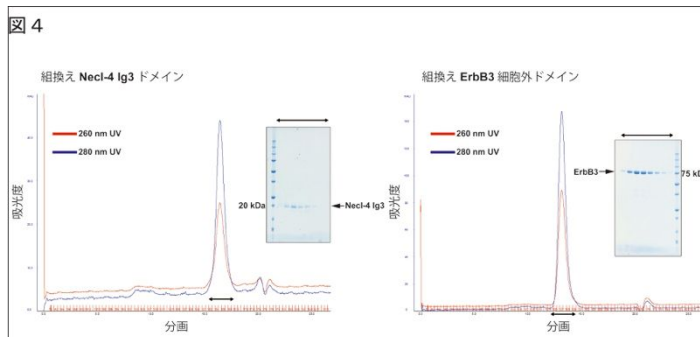
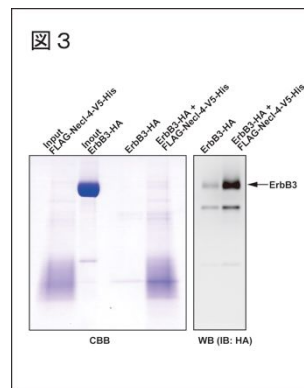
(2) Necl-4 による ErbB3/ErbB2 二量体化の阻害機構の解析：Necl-4 と Necl-2 の種々の変異体を作製して ErbB3/ErbB2 二量体化への作用を解析する。あるいは、Necl-4 もしくは Necl-2 側の結合部位をいくつかの断片に分割して化学的に合成し、作製したペプチドの ErbB3/ErbB2 二量体化阻害活性を測定することで、阻害活性に重要なアミノ酸を同定する。この結果と結晶構造解析の結果を合わせ、ErbB3 の結合に関与するアミノ酸を同定し、Necl-4 による ErbB3/ErbB2 二量体化の阻害機構を解明する。

(3) Necl-4 が結合する ErbB3 以外の受容体の同定とその結合の機能およびその受容体の二量体の阻害機構の解析：Necl-4 による膜一回貫通型受容体の二量体化阻害、それに伴う活性化阻害の制御機構が普遍的であるか検討する。Necl-4 と結合する、ErbB3 以外の膜一回貫通型受容体を同定するため、Necl-4 の組換えタンパク質を作製し、培養細胞の抽出液と混合する。組換え Necl-4 を免疫沈降により回収後、SDS-PAGE により展開し、CBB 染色を行って特異的に現れるバンドを質量分析に供する。ErbB3 以外の膜一回貫通型受容体が同定できた場合、受容体に対して Necl-4 による二量体化阻害機構、それに伴う活性化阻害機構が普遍的であるかどうかを、(1) と(2)と同様な方法で解析する。

4. 研究成果

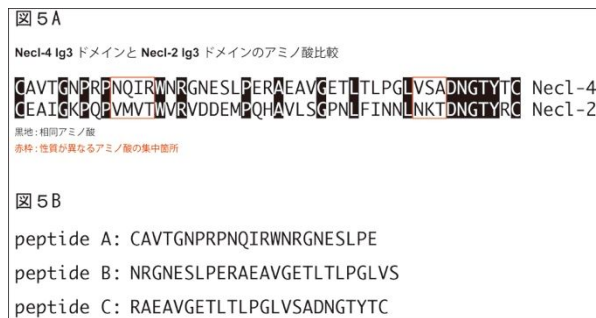
(1) Necl-4 あるいは Necl-2 と ErbB3 との複合体の結晶構造解析

Necl-4 による ErbB3/ErbB2 二量体化の阻害機構を解明するためには、Necl-4 と ErbB3 の複合体の結晶構造解析が有効である。結晶構造解析には Necl-4 側の結合部位である Necl-4 Ig3 ドメイン、ErbB3 側の結合部位である ErbB3 細胞外ドメインの組換えタンパク質が必要になるが、まず前提として、これらの組換えタンパク質が直接結合するかを確認した。HEK293E 細胞を用いた簡易的な方法で組換えタンパク質を精製し、直接結合するかプルダウンアッセイを行った結果、直接結合することが明らかとなった(図3)。次に、これらの組換えタンパク質を高発現する細胞株の樹立を行った。その際、結晶構造解析において、ネガティブな作用を及ぼすことが懸念される糖鎖をより少なくするため、糖鎖修飾酵素の一部を欠損した CHO 細胞を用いた。また、糖鎖修飾酵素欠損させた培養細胞は、一般的に組換えタンパク質の発現量が下がるため、その対策として IR-MAR 法による遺伝子増幅を行い、組換えタンパク質の発現量を増加させた。その結果、結晶構造解析を行うに十分な量を得ることができ、クロマトグラフィーに供して確認したところシングルピークが見られたため、精製度も十分であった(図4)。精製した組換えタンパク質を用いて、東京大学の濡木理教授、石谷隆一郎准教授、森田純子博士の協力のもとに、Necl-4/ErbB3 複合体の結晶化スクリーニングを実施した結果、Necl-4/ErbB3 複合体の結晶は得られなかったため、条件検討を行った。組換えタンパク質を濃縮し、高濃度な状態で冷所に静置した後、再度結晶化スクリーニングを行い、Necl-4/ErbB3 複合体と考えられる結晶が得られた。得られた結晶を X 線構造解析に供したが、Necl-4/ErbB3 複合体ではなく、ErbB3 単量体であることが明らかとなった。Necl-4/ErbB3 複合体が不安定であるため結晶が得られなかった可能性、あるいは結晶化に適した条件ではなかった可能性が考えられた。



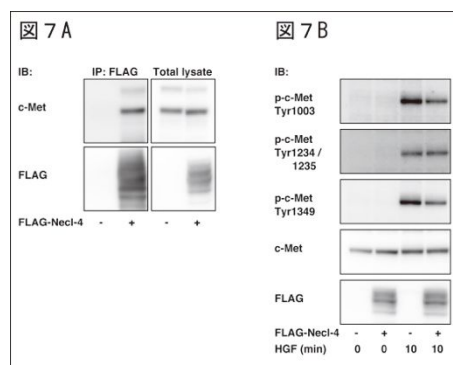
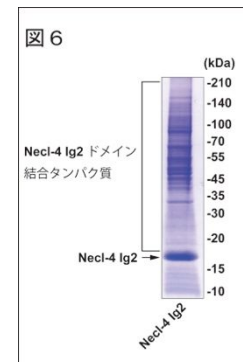
(2) Necl-4 による ErbB3/ErbB2 二量体化の阻害機構の解析

Necl-4 による ErbB3/ErbB2 二量体化の阻害機構を解明するため、この阻害効果に重要な Necl-4 側の結合部位の Ig3 ドメインにあるアミノ酸の同定を試みた。重要と予想されるアミノ酸を探索するには、比較検討が有用と考えられた。Necl-4 は ErbB3/ErbB2 二量体化を阻害したが、Necl-4 のファミリー分子である Necl-2 は、Necl-4 と同様に、Ig3 ドメインで ErbB3 と結合するにもかかわらず、ErbB3/ErbB2 二量体化を阻害しなかった。この結果から、Necl-4 Ig3 ドメインを Necl-2 Ig3 ドメインと比較検討することで、ErbB3 に結合して ErbB2 との二量体化を阻害する、Necl-4 Ig3 ドメインのアミノ酸を同定することができると考えられる (図 5A)。比較した結果をもとに、Necl-4/Necl-2 間で異なった性質のアミノ酸が集中しているペプチド配列を 3 種類に分割し、Necl-4 側のペプチドを化学的に合成した (図 5B)。合成したペプチドが ErbB3 に対して機能的に結合するなら、ErbB3/ErbB2 二量体化を阻害することが予想されるため、これらのペプチドで二量体化を ErbB3 のリン酸化を指標に検討したところ、二量体化の阻害は見られなかった。Necl-4 と ErbB3 の結合は、Necl-4 Ig3 ドメインを分割したペプチドではなく、Ig3 ドメインの全体の構造が重要である可能性が考えられた。実際に Necl-4 Ig3 ドメイン全体を化学合成し、ジスルフィド結合を付加した原型に近い状態で作製されたペプチドでは、ErbB3/ErbB2 二量体化阻害が見られた。これらの結果から、Necl-4/Necl-2 間の比較検討ではなく、(1)に記載しているように Necl-4/ErbB3 の結晶構造解析の結果をもとに、阻害効果に重要な Necl-4 側のアミノ酸の同定を行う方針とした。



(3) Necl-4 が結合する ErbB3 以外の受容体の同定とその結合の機能およびその受容体の二量体の阻害機構の解析

Necl-4 による膜一回貫通型受容体の制御機構の普遍性を解明することを目的として、Necl-4 が結合する ErbB3 以外の受容体を探索し、その受容体への効果を検討した。Necl-4 結合タンパク質の探索をする実験の過程において、Necl-4 Ig2 ドメインの組換えタンパク質を精製したところ、予想外に、多数のタンパク質が結合していることを見出した (図 6)。そこで、これらのタンパク質を質量分析に供し、Necl-4 結合タンパク質の同定を試みた。その結果、膜一回貫通型受容体として、肝細胞成長因子 (HGF) 受容体 (c-Met) が同定された。まず、Necl-4 と c-Met が結合するか、免疫沈降を行い検討した結果、両者が結合することが明らかとなった (図 7A)。次に、Necl-4 が c-Met に及ぼす影響を検討した。c-Met は、リガンドである HGF を受容すると二量体化し、リン酸化することで活性化する。そこで、Necl-4 を発現させた培養細胞における、リガンド依存的な c-Met のリン酸化を検討した。その結果、Necl-4 を発現させた培養細胞では c-Met のリン酸化が減少することを見出した (図 7B)。これらのことから、Necl-4 は ErbB3 だけではなく、多種の受容体の活性を制御することが示唆された。一方で、ErbB3 は Necl-4 Ig3 ドメインと結合するが、c-Met は、Necl-4 Ig2 ドメインと結合することがスクリーニングの結果から示唆されている。Necl-4 による ErbB3 と c-Met の制御機構は異なっている可能性も考えられた。外部環境や発現細胞、局在によって、効率的な作用や使い分けが存在するのかもしれない。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizutani Kiyohito, Kedashiro Shin, Maruoka Masahiro, Ueda Yuki, Takai Yoshimi	4. 巻 7
2. 論文標題 Nectin-like molecule-4/cell adhesion molecule 4 inhibits the ligand-induced dimerization of ErbB3 with ErbB2	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-10107-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yuki, Kedashiro Shin, Maruoka Masahiro, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi	4. 巻 23
2. 論文標題 Roles of the third Ig-like domain of Necl-5/PVR and the fifth Ig-like domain of the PDGF receptor in its signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 214 ~ 224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----