

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006 年度～2008 年度

課題番号：18681035

研究課題名 (和文) 糖鎖修飾によるがん転移制御機構の化学生物学的解析

研究課題名 (英文) Analyses of glycosylation-regulated tumor metastasis by chemical biology approach

研究代表者

清水 史郎 (SIMIZU SIRO)

独立行政法人理化学研究所・基幹研究所・長田抗生物質研究室・専任研究員

研究者番号：30312268

研究成果の概要：がん細胞が転移能を獲得するためには様々な要因が知られており、なかでも細胞外マトリックス分解酵素とその調節分子の異状が、がん細胞の悪性度と相関していることが多数報告されている。本研究では、細胞外マトリックス構成成分の 1 つであるヘパラン硫酸を加水分解するヘパラーゼと、マトリックスメタロプロテアーゼの調節因子である糖タンパク質 RECK に着目して検討を行った。その結果、ヘパラーゼはジスルフィド結合や C 末端側に存在する疎水性領域が活性化に必要であることが示された。また、RECK が MMP-9 の mRNA 量を減少させること、そしてその減少には c-Jun や Fra-1 の MMP-9 プロモーター領域への結合能低下が伴っていることなどを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2007 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	20,900,000	6,270,000	27,170,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体高分子、化学生物学

1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達機構の解析は、主に細胞内のリン酸化カスケードを中心に行われてきた。すなわち、チロシンキナーゼ型受容体から MAP キナーゼの活性化、そして転写因子を介したがん細胞の悪性化経路の研究である。このカスケードに関与する分子は薬剤開発が可能なのがある一方で、正常細胞の増殖においても必須のものが多いことから、阻害剤を開発できたとしても、重篤な副作用が

考えられた。そこで、がん細胞にだけ特異的に発現している、または発現しなくなっているような分子に着目して、解析を行うことが望まれてきていた。

2. 研究の目的

本研究では、まずがん細胞の転移の際に起こるヘパラン硫酸という糖鎖の分解に着目した。この分解はヘパラーゼという加水分解酵素が担っており、実際に多くのヒトがん

において過剰発現が報告されている。さらに、我々の研究グループを含む複数の研究室よりヘパラーゼ阻害剤やアンチセンスオリゴを処理した結果から、ヘパラーゼががん細胞の転移・浸潤に関与していることが明らかになってきた。そこで、本研究ではヘパラーゼの分解により促進されるがん細胞の転移・浸潤をヘパラーゼの研究を通して理解することを目的に検討を行った。

さらに、がん細胞の転移・浸潤の負の制御因子である RECK という糖タンパク質についても解析を行うことで、糖鎖修飾によるがん細胞の転移・浸潤機構の解析を幅広い視点で理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヘパラーゼの活性化における翻訳後修飾の役割

ヒト線維肉腫 HT1080 細胞にヘパラーゼを安定的に過剰発現している株を樹立し、コントロール細胞や変異型ヘパラーゼ過剰発現細胞と、発現量、活性化、細胞外分泌量などを比較した。また、ヘパラーゼに5つ存在するシステイン残基の翻訳後修飾については、ヘパラーゼを精製後、MALDI-TOF 質量分析により解析した。

(2) ヘパラーゼの活性化における C 末端側疎水性領域の役割

ヘパラーゼの C 末端側に存在する疎水性領域の役割については、ヘパラーゼの様々な欠損変異体および置換変異体発現ベクターを作製し、過剰発現細胞を樹立することで活性化に与える影響を検討した。

(3) RECK による MMP-9 mRNA 量調節機構の解析

ヒト線維肉腫 HT1080 細胞に RECK を安定的に過剰発現している細胞を樹立した。mRNA 量は定量的 RT-PCR 法、MMP-9 遺伝子の転写活性はルシフェラーゼアッセイ法、そしてプロモーター領域と転写因子の結合は ChIP 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) ヘパラーゼの活性化における翻訳後修飾の役割

Western blotting 法でヘパラーゼを検出すると、還元剤存在下と非存在下で移動度が異なることを見出した。このことから、ヘパラーゼは分子内でジスルフィド結合している可能性が示唆された。そこで、培地からヘパラーゼを精製し、MALDI-TOF 質量分析法にてジスルフィド結合の有無を確認した。その結果、Cys127 と Cys179、および Cys437 と Cys542 (図1) がジスルフィド結合しており、Cys211 がシステイン化されていることが

明らかになった。様々な変異体ヘパラーゼを発現させた結果、Cys437 と Cys542 のジスルフィド結合がヘパラーゼの小胞体からゴルジ体への輸送、引き続き起こる細胞外分泌、さらに活性化において重要であることが確かめられた。

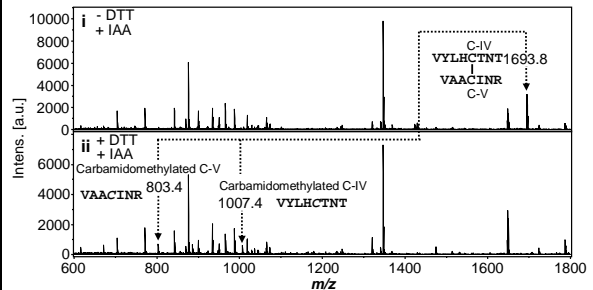


図1：精製ヘパラーゼを用いたジスルフィド結合部位の同定

(2) ヘパラーゼの活性化における C 末端側疎水性領域の役割

Kyte-Doolittle hydrophathy 法により、様々な生物種におけるヘパラーゼの疎水性アミノ酸の分布を見ると、N 末端側にシグナルペプチド由来の疎水性領域があり、C 末端側にも疎水性領域があることが分かった (図2)。ヘパラーゼの活性化におけるこの領域の役割を明らかにする目的で、様々なヘパラーゼの領域欠損変異体や置換変異体を発現している細胞を樹立し、解析を行った。その結果、ヘパラーゼの C 末端側に存在する疎水性領域は、ヘパラーゼの小胞体からゴルジ体への輸送、そして引き続き起こる細胞外分泌、活性化、さらにはヘパラーゼ誘導性のがん細胞遊走能亢進に必要であることが分かった。

上記ジスルフィド結合の解析からも、ヘパラーゼの C 末端側が小胞体からゴルジ体へと輸送されるために重要な役割を担っていることが示唆された。

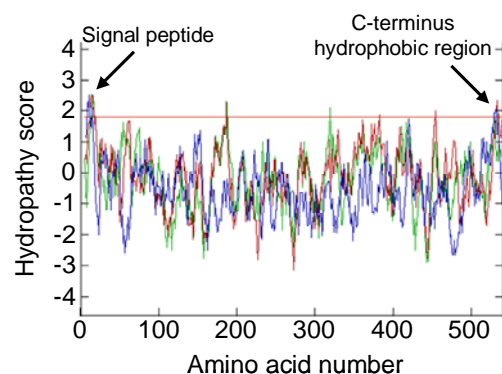


図2：様々な生物種におけるヘパラーゼの疎水性プロット (ヒト：緑、ゼブラフィッシュ：赤、イネ：青)

(3) RECKによるMMP-9 mRNA量調節機構の解析

これまでに、RECKはMMP-9の細胞外への分泌を抑制することで、がん細胞の転移・浸潤を負に制御していることが示唆されてきた。しかし、我々はDNAマイクロアレイを用いた解析や、定量的RT-PCR法などにより、RECK発現細胞ではMMP-9のmRNA量が低下していることを見出した。このことは種々の変異体やsiRNAを使用した実験からも支持された。

プロモーター解析やChIPアッセイの結果、RECK発現細胞では、Fra-1とc-JunのMMP-9プロモーター領域に対する結合力が低下していることが分かった(図3)。

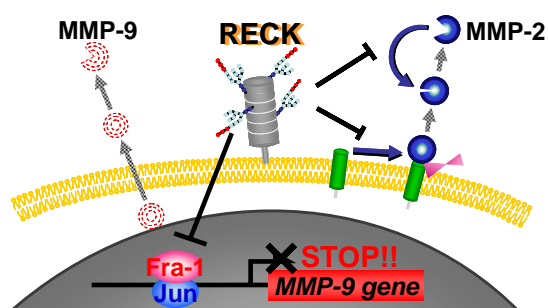


図3：RECKによるMMP-9の転写制御

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

1. Kanoh, N., Asami, A., Kawatani, M., Honda, K., Kumashiro, S., Takayama, H., Simizu, S., Amemiya, T., Kondoh, Y., Hatakeyama, S., Tsuganezawa, K., Utata, R., Tanaka, A., Yokoyama, S., Tashiro, H. & Osada, H. Photo-cross-linked small-molecule microarrays as chemical genomic tools for dissecting protein-ligand interactions. **Chem. Asian J.** 1, 789-797 (2006) 査読有
2. Simizu, S., Suzuki, T., Muroi, M., Lai, N. S., Takagi, S., Dohmae, N. & Osada, H. Involvement of disulfide bond formation in the activation of heparanase. **Cancer Res.** 67, 7841-7849 (2007) 査読有
3. Miyazaki, T., Yokoshima, S., Simizu, S., Osada, H., Tokuyama, H. & Fukuyama, T. Synthesis of (+)-vinblastine and its analogues. **Org. Lett.** 9, 4737-4740 (2007) 査読有
4. Lai, N. S., Simizu, S., Morisaki, D., Muroi, M. & Osada, H. Requirement of the conserved, hydrophobic C-terminus region for the activation of heparanase. **Exp. Cell Res.** 314, 2834-2845 (2008) 査読有
5. Miyazaki, I., Simizu, S., Ichimiya, H., Kawatani, M. & Osada, H. Robust and

systematic drug screening method using chemical arrays and the protein library: identification of novel inhibitors of carbonic anhydrase II. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72, 2739-2749 (2008) 査読有

6. Tamura, Y., Simizu, S., Muroi, M., Takagi, S., Kawatani, M., Watanabe, N. & Osada, H. Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-xL during pironetin-induced apoptosis. **Oncogene** 28, 107-116 (2009) 査読有
7. Asami, Y., Mori, M., Koshino, H., Sekiyama, Y., Teruya, T., Simizu, S., Usui, T. & Osada, H. A cell-based screening to detect inhibitors of BRAF signaling pathway. **J. Antibiot.** 62, 105-107 (2009) 査読有
8. Takagi, S., Simizu, S. & Osada, H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. **Cancer Res.** 69, 1502-1508 (2009) 査読有
9. Miyazaki, I., Simizu, S., Ishida, K. & Osada, H. On-chip fragment-based approach for discovery of high-affinity bivalent inhibitors. **ChemBiochem** 10, 838-843 (2009) 査読有
10. Miyazaki, I., Okumura, H., Simizu, S., Takahashi, Y., Kanoh, N., Muraoka, Y., Nonomura, Y. & Osada, H. Structure-affinity relationship study of bleomycins and Shble protein by use of a chemical array. **ChemBiochem** 10, 845-852 (2009) 査読有
11. 清水史郎、長田裕之「バイオプローブ開発からケミカルバイオロジー研究へ」**化学工業**, 58, 335-339 (2007) 査読無
12. 清水史郎、辻田和彦、長田裕之「分子細胞学的解析」**日本臨床**, 67 増刊号 1, 143-147 (2009) 査読無

[学会発表] (計17件)

1. 照屋貴之、清水史郎、小林雄一、長田裕之「PP2A特異的阻害剤ホスラクトマイシン類が有するHL60細胞の分化誘導活性」日本農芸化学会2007年度大会(2007年3月25日、東京)
2. 宮崎功、清水史郎、奥村英夫、叶直樹、高橋良和、野々村禎昭、長田裕之「官能基非依存型低分子マイクロアレイとヒト培養細胞抽出物を用いた、タンパク質-低分子リガンド・スクリーニング系の構築」第2回日本ケミカルバイオロジー研究会年会(2007年5月10日、京都)
3. 清水史郎、室井誠、Lai Ngit Shin、高木聡、堂前直、長田裕之「ヘパラーゼに存在するシステイン残基の修飾とその役割解析」第11回がん分子標的治療研究会総会(2007年7月5日、大阪)
4. 高木聡、清水史郎、長田裕之「RECKによるMMP-9 mRNA減少機構の解明」第11回

- がん分子標的治療研究会総会 (2007年7月5日、大阪)
5. 清水史郎、宮崎功、奥村英夫、叶直樹、長田裕之「A novel chemical microarray platform for searching anticancer drugs」第66回日本癌学会総会 (2007年10月3日、横浜)
 6. 高木聡、清水史郎、長田裕之「RECK suppresses the expression of MMP-9 mRNA in human tumor cells」第66回日本癌学会総会 (2007年10月3日、横浜)
 7. Simizu, S., Tamura, Y., Kawatani, M., Watanabe, N. & Osada, H. “Phosphorylation of Bcl-xL by polo-like kinase 1 results in the inactivation of the anti-apoptotic activity during tubulin binder-induced apoptosis” AACR-NCI-EORTC International Conference “Molecular Targets and Cancer Therapeutics” (2007年10月23日、アメリカ・サンフランシスコ)
 8. Simizu, S. “Human heparanase: Activation and inhibition” 15th Proteoglycan Forum (2007年10月28日、東京)
 9. 斎藤臣雄、米田新、宮崎功、清水史郎、近藤恭光、松井南、長田裕之「理研天然化合物バンク (NPDepo) におけるリガンドスクリーニング」日本農芸化学会 2008年度大会 (2008年3月27日、名古屋)
 10. 宮崎功、清水史郎、一宮治美、長田裕之「化合物アレイスクリーニング系の構築と新規CAIIリガンドの検出」第3回日本ケミカルバイオロジー研究会年会 (2008年5月19日、東京)
 11. 一宮治美、清水史郎、宮崎功、長田裕之「Gene ライブラリーGLORIAの構築」第3回日本ケミカルバイオロジー研究会年会 (2008年5月20日、東京)
 12. 清水史郎、Lai Ngit Shin、室井誠、長田裕之「ヘパラーゼ結合タンパク質の探索と活性化機構の解析」第12回がん分子標的治療研究会 (2008年6月26日、東京)
 13. 清水史郎、Lai Ngit Shin、室井誠、長田裕之「Identification of heparanase- interacting proteins of human fibrosarcoma cells」第67回日本癌学会学術総会 (2008年10月29日、名古屋)
 14. 高木聡、清水史郎、長田裕之「RECK suppressed MMP-9 mRNA due to the decrease of Fra-1 binding to MMP-9 promoter region.」第67回日本癌学会学術総会 (2008年10月29日、名古屋)
 15. Simizu, S., Lai, N. S. & Osada, H. “Activation and function of heparanase: roles of post-translational modifications” International Symposium on Systems Glycobiology (2008年12月5日、東京)
 16. Simizu, S., Miyazaki, I. & Osada, H. “Establishment of novel antitumor drugs

screening method by using chemical array” AACR-ACS Joint Conference on Chemistry in Cancer Research (2009年2月9日・アメリカ、ニューオーリンズ)

17. Miyazaki, I., Simizu, S. & Osada, H. “On-chip fragment-based approach for new tool of antitumor drug design” AACR-ACS Joint Conference on Chemistry in Cancer Research (2009年2月10日、アメリカ・ニューオーリンズ)

〔図書〕 (計1件)

1. 清水史郎、宮崎功、近藤恭光、叶直樹、長田裕之「低分子アレイ」マイクロアレイ・バイオチップの最新技術：シーエムシー出版、229-239 (2007) (総305ページ)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.antibiotics.riken.go.jp/japanese/personal/simizu_p.html

受賞等

平成21年度日本農芸化学会 B.B.B.論文賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 史郎 (SIMIZU SIRO)

独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質研究室・専任研究員

研究者番号：30312268

