

## 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28日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590342

研究課題名（和文） 増殖因子受容体 ErbB の構造と機能を制御する N 型糖鎖

研究課題名（英文） Regulation of ErbB signaling by N-glycan

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

研究成果の概要（和文）：

本研究ではN型糖鎖によるErbBの機能制御機構を解析した。ErbBの細胞外ドメイン（sErbB）によるヘレグリンシグナル抑制効果を比較したところ、sErbB3 は他のsErbBと比較して抑制効果が強いこと、またこの抑制効果がN418Q変異体で著名に増強することがわかった。この変異体では細胞増殖抑制効果の増強も見られた。ErbB3のAsn418に結合するN型糖鎖がシグナルを制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to understand the mechanisms by which N-glycan regulate function and structure of ErbB. We prepared the extracellular domain of ErbB (sErbB) and N418Q mutant of ErbB3. sErbB3 suppressed heregulin signaling more effectively than ErbB2 or ErbB4, and N418Q mutant suppressed more than wild type. Cell proliferation-inhibitory activity of sErbB3 was also upregulated by N418Q mutation. The results indicate that N-glycan on Asn418 of ErbB3 regulates the ErbB3 signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：増殖因子受容体、ErbB、N型糖鎖、糖鎖生物学

## 1. 研究開始当初の背景

増殖因子受容体 ErbB は発がんおよびがんの進展に深く関与しており、がん治療のターゲットとなっている。研究代表者らは、以前より、糖鎖による ErbB の活性調節機構を研究しており、その中で EGFR や ErbB3 のドメ

イン 3 中の糖鎖が二量体形成およびリン酸化を制御していることを報告してきた。当該 N 型糖鎖は ErbB の分子間相互作用および立体構造変化に関与している可能性があると考えた。ErbB の細胞外ドメインおよびその糖鎖欠損変異体を調製し、その物理化学的性質を

解析することによってその仮説を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究は、N型糖鎖による ErbB の制御メカニズムを解明することを目的とする。具体的には、ErbB の細胞外ドメイン (=soluble ErbB, sErbB) とその糖鎖欠損変異体のヘレグリンシグナル抑制作用を比較検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) ErbB の糖鎖構造解析

ErbB3 の Asn418 に結合する N 型糖鎖の構造を解析するため、sErbB を調製してペプチドマッピングを行った。Asn418 に結合する N 型糖鎖の構造をマスペクトロメトリーにて解析した。

### (2) sErbB のヘレグリンシグナル抑制作用の比較

sErbB3 および sErbB4 はヘレグリン抑制作用を有することが報告されている。sErbB2, sErbB3, sErbB3 N418Q 変異体、sErbB4 を調製し、そのヘレグリンシグナル抑制作用を比較検討した。

### (3) sErbB3 の細胞増殖抑制作用の解析

sErbB3 およびその糖鎖欠損変異体 sErbB3 N418Q の細胞増殖抑制作用を比較検討した。

### (4) sErbB3 のヘレグリンシグナル抑制に対する ErbB ノックダウンの影響

siRNA を用いて MCF7 細胞の内在性 ErbB2, ErbB3 をノックダウンし、sErbB3 のヘレグリンシグナル抑制作用にどのように影響するか検討した。

## 4. 研究成果

(1) ErbB3 の Asn418 上の N 型糖鎖の構造マスペクトロメトリー解析にて sErbB3 の Asn418 に結合する糖鎖構造を決定したところ、CHO 細胞由来 sErbB3 の Asn418 には主に複合型糖鎖が、Lec3 細胞由来 sErbB3 では主に 7 糖の高マンノース型糖鎖が結合していることがわかった (図 1)。

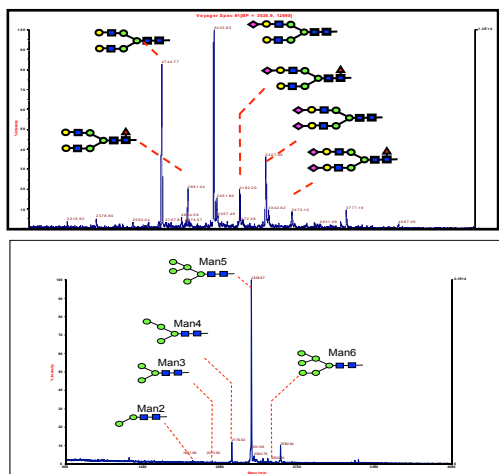


図 1 : sErbB3 の Asn418 上の糖鎖構造 (上 :

CHO 細胞由来 sErbB3, 下 : Lec3 細胞由来 sErbB3)

### (2) sErbB のヘレグリンシグナル抑制作用と sErbB3 の N418Q 糖鎖欠損の影響

乳がん細胞 MCF7 のヘレグリンシグナルに対する効果を観察したところ、sErbB3 は sErbB2, sErbB4 と比較して、ErbB3 リン酸化、Akt リン酸化、Erk リン酸化抑制作用が著しく強いことがわかった。sErbB4 は Erk のリン酸化を抑制したが、sErbB2 ではシグナル抑制効果が観察されなかった。この抑制効果は sErbB3 N418Q 糖鎖欠損変異体で著名に亢進した (図 2)。CHO-K1 細胞に ErbB3 を発現させた系や ErbB4 を発現させた系でも同様のシグナル抑制効果が見られた

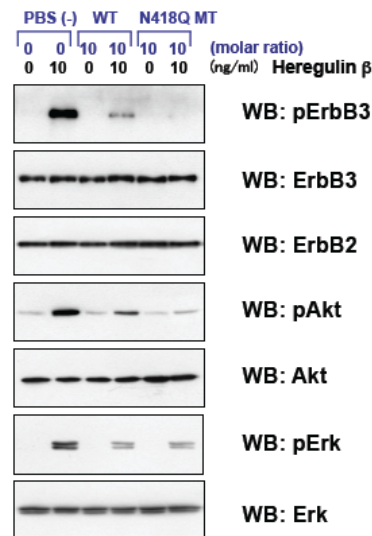


図 2 : sErbB3 N418Q 変異体による MCF7 細胞のヘレグリンシグナル抑制

(3) sErbB3 N418Q 変異体の細胞増殖抑制 MCF7 細胞をヘレグリンで刺激し、細胞増殖を観察したところ、sErbB3N418Q 糖鎖欠損変異体では野生型と比較して増殖抑制作用が有意に増強することがわかった。

### (4) 内在性 ErbB のノックダウンと sErbB3 によるヘレグリンシグナル抑制効果

MCF7 細胞の内在性 ErbB2 および ErbB3 を siRNA を用いてノックダウンさせた細胞に sErbB3 を添加したところ、ヘレグリンシグナル抑制作用が有意に増強することがわかった (図 3)。

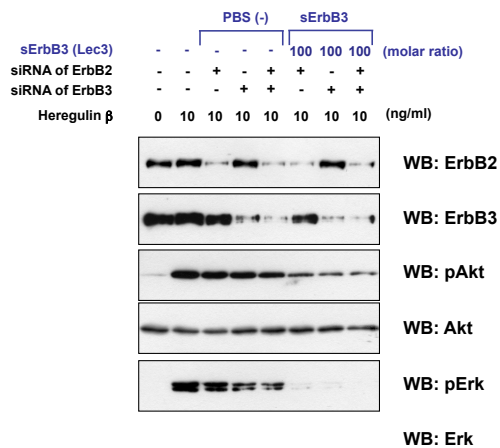


図3 : ErbB のノックダウンと sErbB3 による MCF7 細胞のヘレグリンシグナル抑制

今後、各 sErbB のリガンド親和性を測定し、シグナル抑制作用の作用機序を解明する予定である。sErbB3 N418Q 糖鎖欠損変異体では、リガンドをキャプチャーするか、あるいは細胞膜上の ErbB2 (もしくはそれに加えて ErbB3) に結合することによってヘレグリンシグナルを抑制すると考えている。現在、sErbB3 の Asn418 上の糖鎖欠損によるヘレグリンシグナル抑制効果の増強が何に起因しているかを明らかにするため、立体構造の解析を試みている。

増殖因子受容体 ErbB の活性を調節することはがん治療において重要な課題である。sErbB の利用によって ErbB シグナルを制御することができれば臨床的にも意義は大きい。

## 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 9 件)

1. Saito A., Arika S., Sohma H., Nishitani C., Inoue K., Ebata N., Takahashi M., Hasegawa Y., Kuronuma K., Takahashi H., Kuroki Y.: Pulmonary surfactant protein A protects lung epithelium from cytotoxicity of human  $\beta$ -defensin 3.

*J. Biol. Chem.*, 287, 15034-15043 (2012) 査読有

2. Ito R., Takahashi M., Ihara H., Tsukamoto H., Fujii J., Ikeda Y.: Measurement of peroxiredoxin-4 in rat tissues and implication of its serum level as a potential marker for hepatic disease.

*Int. J. Mol. Med.*, in press (2012) 査読有

3. Arika S., Kojima T., Gasa S., Saito A., Nishitani C., Takahashi M., Shimizu T., Kurimura Y., Sawada N., Fujii N., Kuroki Y.: Pulmonary collectins play distinct roles in host

defense against Mycobacterium Avium.

*J. Immunol.*, 187, 2586-2594 (2011) 査読有

4. Iuchi Y., Roy D., Okada F., Kibe N., Tsunoda S., Suzuki S., Takahashi M., Yokoyama H., Yoshitake J., Kondo S., Fujii J.: Spontaneous skin damage and delayed wound healing in SOD1-deficient mice.

*Mol. Cell. Biochemistry*, 341, 181-194 (2010) 査読有

5. Sawada K., Arika S., Kojima T., Saito A., Yamazoe M., Nishitani C., Shimizu T., Takahashi M., Mitsuzawa H., Yokota S., Sawada N., Fujii N., Takahashi H., Kuroki Y.: Pulmonary collectins protect macrophages against pore-forming activity of Legionella pneumophila and suppress its intracellular growth.

*J. Biol. Chem.*, 285, 8434-8443 (2010) 査読有

6. Osumi D.\*, Takahashi M.\*, Miyoshi E., Yokoe S., Lee SH., Noda K., Nakamori S., Gu J., Ikeda Y., Kuroki Y., Sengoku K., Ishikawa M., Taniguchi N.: Core fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells.

*Cancer Sci.*, 100, 888-895 (2009) 査読有

7. Nishitani C.\*, Takahashi M.\*, Mitsuzawa H., Shimizu T., Arika S., Matsushima N., Kuroki Y.: Mutational analysis of Cys88 of Toll-like receptor 4 highlights the critical role of MD-2 in cell surface receptor expression.

*Int Immunol.*, 21, 925-934 (2009) 査読有

8. Shimizu T., Nishitani C., Mitsuzawa H., Arika S., Takahashi M., Ohtani K., Wakamiya N., Kuroki Y.: Mannose binding lectin and lung collectins interact with Toll-like receptor 4 and MD-2 by different mechanisms.

*Biochim. Biophys Acta - General Subjects*, 1790, 1705-1710 (2009) 査読有

9. Takahashi M., Kuroki Y., Ohtsubo K., and Taniguchi N.: Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of N-glycan core; Their functions and target proteins.

*Carbohydrate Res.* (review) 344, 1387-1390 (2009) 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. Takahashi M., Wada Y., Tajiri M., Yamaguchi Y., Nishitani C., Arika S., Taniguchi N., Kuroki K.

Inhibition of heregulin signaling by N-glycan deleted soluble ErbB3

第 84 回日本生化学会大会

2011 年 9 月 21-24 日、京都市

2. 高橋素子、宮田哲、藤井順逸、井内陽子、上山茂充、曾我朋義、藤縄玲子、荒木素子、谷口直之、黒木由夫

酸化還元酵素アルデヒドレダクターゼノックアウトマウスで発症するアスコルビン酸欠乏症とその影響

第 64 回 日本酸化ストレス学会  
2011 年 7 月 2-3 日、留寿都町

3. Takahashi M., Wada Y., Tajiri M., Araki M., Yamaguchi Y., Taniguchi N., Kuroki Y. Inhibition of heregulin signaling by N-glycan deleted soluble ErbB3.

2011 Winter Annual Meeting of the Korean Society for Glycoscience

January 28-29, 2011, Daejeon, Korea

4. Takahashi M., Miyata S., Fujii J., Ueyama S., Araki M., Soga T., Fujinawa R., Taniguchi N., Kuroki Y.

The role of aldehyde reductase in biosynthesis of ascorbic acid in mice  
International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine

2011 年 1 月 20-22 日、京都市

5. Takahashi M., Fujii J., Araki M., Inai Y., Soga T., Miyata S., Taniguchi N., Kuroki Y.

The involvement of aldehyde reductase in biosynthesis of ascorbic acid in mice  
第 83 回日本生化学会大会

2010 年 12 月 7-10 日、神戸市

6. Takahashi M., Wada Y., Tajiri M., Araki M., Yamaguchi Y., Taniguchi N., Kuroki Y. Inhibition of heregulin signaling by N-glycan deleted mutant of sErbB3  
GlycoT 2010

The 7th International Symposium on Glycosyltransferases

2010 年 7 月 30 日-8 月 1 日、墨田区

7. Takahashi M., Inai Y., Miyata S., Nishikimi M., Riki S., Taniguchi N., Kuroki Y.

The role of aldehyde reductase in biosynthesis of ascorbic acid in mice

第 82 回日本生化学会大会

2009 年 10 月 21-24 日、神戸市

#### 8. 高橋素子

ErbB ファミリーの N 型糖鎖: 構造と機能  
第 7 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム

2009 年 12 月 7-8 日、吹田市

#### 9. 高橋素子

ErbB3 の N 型糖鎖の構造と機能  
大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質修飾: 新たな癌の診断・治療標的」

2009 年 9 月 17-18 日、吹田市

〔図書〕(計 1 件)

#### 高橋素子

「運動と免疫-からだをまもる運動のふしぎ」

(NAP) (2009) p219-220

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 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

西谷千明 (NISHITANI CHIAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30381255