

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06083

研究課題名(和文) ErbB4の部位特異的糖鎖解析による糖鎖機能の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of functional regulation of ErbB4 by N-glycans.

研究代表者

高橋 素子 (Motoko, Takahashi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：00303941

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)：増殖因子受容体ErbB4のN型糖鎖による制御機構を検討した。部位特異的糖鎖解析により、ErbB4の11か所のN型糖鎖付加ポテンシャル部位の糖鎖付加率は部位によって異なることがわかった。すなわちN149とN448の糖鎖付加率は50%以下であるが、他の部位は概ね高い付加率を示し、特にN113、N333はほぼ100%であった。また、N113、N228、N523の3か所はオリゴマンノース型糖鎖、それ以外の8か所では複合型糖鎖が主であった。N333に付加する糖鎖を欠損した変異体ではErbB4のリン酸化の亢進(リン酸化レベルの上昇と持続時間の延長)が認められ、糖鎖付加の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖因子受容体はがん治療の標的であり、その制御機構を明らかにすることは社会的にも重要である。研究代表者等は糖鎖によるErbB4の制御機構を検討した。ErbB4の部位特異的な糖鎖解析を行った結果、部位によって糖鎖付加率が異なること、また糖鎖のプロセシングの程度が異なることがわかった。これらは、ErbBファミリーの全てに共通するが、METやFGFRファミリーではみられない特徴であった。一方で、機能的に重要な糖鎖は100%の付加率を示す点は、これまで調べた全ての分子に共通していた。以上の結果は受容体の糖鎖付加、そして糖鎖のプロセシングを部位特異的に決定する機構の解明につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have been examining the mechanisms of functional regulation of growth factor receptor by N-glycans. In this study, N-glycans of ErbB4 were examined. We analyzed the site-specific glycosylation status and glycan structures of ErbB4, and found that the glycan occupancies of N146 and N448 were low as less than 50%, whereas occupancies of other sites were rather high, and those of N113 and N333 were especially high as 100%. We also found that most N-glycans on N113, N228 and N523 were oligomannose-type and those on other eight sites were complex type. We examined CHOK1 cells transfected with glycan deficient mutants of ErbB4, and found that N-glycan on N333 was involved in receptor activation: the levels and duration of heregulin-induced receptor phosphorylation were upregulated in ErbB4 N333Q mutant. The results suggested that the occupancies, structures and functions of N-glycans of ErbB4 were regulated site-specifically, and the N-glycan on N333 was involved in activation of ErbB4.

研究分野：生化学

キーワード：糖鎖 ErbB4 ErbB 増殖因子受容体 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

増殖因子受容体は、がん治療のターゲットとなっており、その制御機構を明らかにすることはがん治療の開発のためにも重要である。研究代表者らは、増殖因子受容体分子のN型糖鎖による制御機構を検討している。いくつかの受容体のN型糖鎖を検討するうち、複数の受容体に共通する糖鎖の性質があることがわかってきた。増殖因子受容体の糖鎖の詳細を比較することで、N型糖鎖の付加率やプロセッシングを決定する機構や、糖鎖の機能に関する新しい情報が得られると考えた。

ErbBファミリーには上皮増殖因子受容体EGFR (ErbB1、HER1)、ErbB2 (HER2)、ErbB3 (HER3)、ErbB4 (HER4)の4つの分子が属し、いずれも10か所前後のN型糖鎖付加部位をもっている(図1)。そのうちEGFRのN420とErbB3のN418に結合する糖鎖は、レセプターの二量体形成と活性化に関与することを報告してきた。特定のN型糖鎖がErbBレセプターの分子間相互作用に関与している可能性が考えられる。

ErbB4は比較的未知の部分が多く、またがん以外にも精神疾患との関係が報告されるなど、ユニークな性質をもつことがわかっている。ErbB4をターゲットとした治療は開発されておらず、ErbB4の制御機構の解明は重要である。

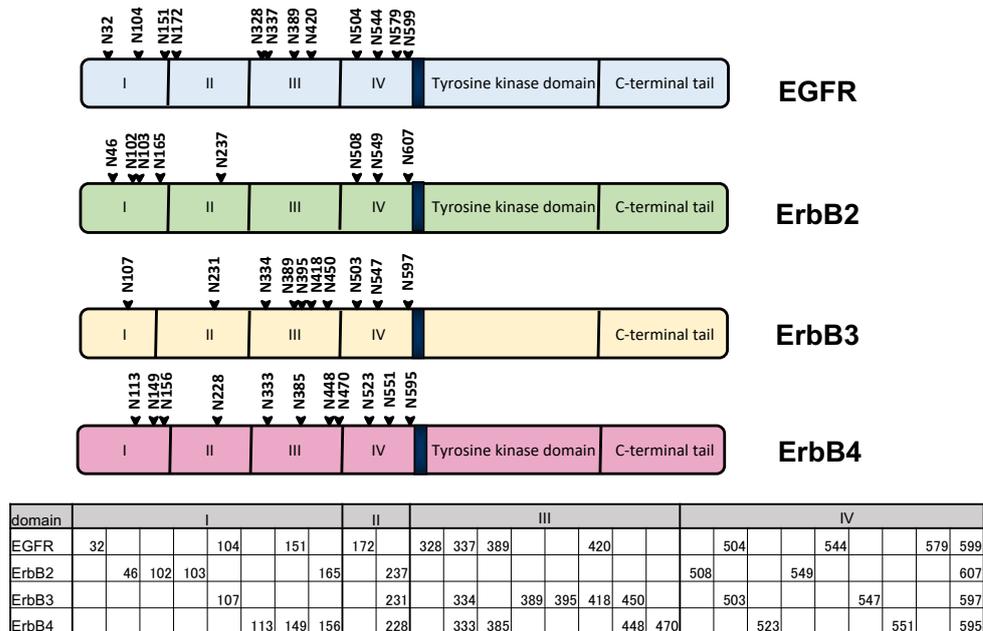


図1: ErbBファミリーの糖鎖付加部位の比較

2. 研究の目的

本研究は、ErbB4の部位特異的糖鎖解析を行い、糖鎖によるErbB4の制御メカニズムを解明することを目的とする。ErbB4の部位特異的糖鎖の付加率および糖鎖構造の解析を行うことで、N型糖鎖全体のプロファイルを明らかにする。また、ErbB4の糖鎖欠損変異体を調製し、その性質を解析することによって、糖鎖によるErbB4の制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ErbB4の糖鎖構造解析

CHOK1細胞を宿主として調製したErbB4の細胞外ドメイン(sErbB4)について、マスマスペクトロメトリーを用いて各糖鎖付加部位の糖鎖の付加率と糖鎖構造を決定した。

sErbB4の安定発現系の確立にはFlp-In systemを利用した。培養上清からニッケルカラム(HisTrapHP5)、陰イオン交換カラム(Mono Q)、ゲルろ過カラム(HiLoad Superdex 200pg)を用いてsErbB4を精製した。マスマスペクトロメトリーはOrbitrap Q Exactive Plusを用い、解析にはMaxQuant softwareを用いた。

(2) ErbB4の糖鎖欠損変異体におけるシグナル変化とそのメカニズムの解析

ErbBの細胞外ドメインの糖鎖付加部位にアミノ酸変異を導入することによって作製した糖鎖欠損変異体のシグナルを観察した。

各ErbB4変異体の安定発現系の確立にはFlp-In systemを利用した。50 ng/mlのヘレグリン刺激に対する時間依存性のシグナルをWestern Blotにて解析した。

(3) sErbB のシグナル抑制作用の解析

sErbB4 のヘレグリンシグナル抑制作用を検討した。A549 細胞を sErbB4 と 2 時間インキュベートしたのち、50 ng/ml ヘレグリンで 37°C、10 分間刺激した。A549 細胞のヘレグリン刺激による反応は Akt のリン酸化を指標とし、Western Blot にて解析した。

4. 研究成果

(1) ErbB4 の糖鎖構造について

Orbitrap LC-MS/MS を用いた解析にて、sErbB4 の部位特異的な糖鎖付加率と糖鎖構造を明らかにした (図 2)。糖鎖付加率に関して、11 か所の N 型糖鎖付加ポテンシャル部位のうち、N149 と N448 の糖鎖付加部位は 50%以下と低いことがわかった。他の部位は概ね高い付加率を示し、特に N113、N333 はほぼ 100%の糖鎖付加率であった。また、N113、N228、N523 の 3 か所はオリゴマンノース型糖鎖、それ以外の 8 か所は複合型糖鎖が主に結合していた。

これまでに、ErbB ファミリー (EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4)、MET、FGFR1、FGFR3 の部位特異的糖鎖構造を解析したが、このようなオリゴマンノース型糖鎖優位の部位が存在するのは ErbB ファミリーに共通する特徴であった。

今回は全長型の ErbB4 の糖鎖構造については検討できなかったが、EGFR の糖鎖構造に関する過去の報告より、精製細胞外ドメインの糖鎖構造は全長型受容体の糖鎖構造をよく反映していると考えている。

Domain	Site	Representative Structure	Occupancy	Complex-type	Core fucose	Sialylation
I	N113		100	10	0	9
	N149		23	100	100	78
	N156		93	100	100	90
II	N228		85	0	0	0
III	N333		100	100	22	24
	N385		90	100	97	100
	N448		49	100	96	89
	N470		86	100	100	98
IV	N523		98	23	1	7
	N551		95	100	18	75
	N595		94	100	100	88

図2: ErbB4の部位特異的糖鎖付加率と糖鎖構造

(2) ErbB4 の糖鎖欠損変異体におけるシグナル変化

ErbB4 N333Q 変異体ではリガンド刺激なしでレセプターのリン酸化が認められ、ヘレグリン刺激によるリン酸化のレベルおよびリン酸化の持続時間も長いことがわかった (図 3)。この時、ErbB4 の二量体形成の程度は確認できなかった。一方、N523Q 変異体ではレセプターのリン酸化が著しく減少した。

EGFR N420 および ErbB3 N418 に付加する糖鎖は、欠損させると受容体の二量体形成が増加するという性質をもつが、両者ともに付加率が 100%でフコース付加が著しく低い複合型糖鎖であることを報告している。今回調べた ErbB4 N333 に付加する糖鎖も同じ特徴をもつことがわかった (図 4)。

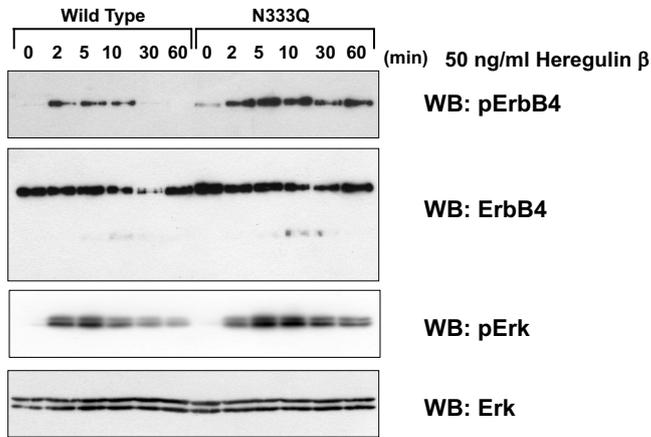


図3: ErbB4 N333Qのヘレグリン刺激に対する反応

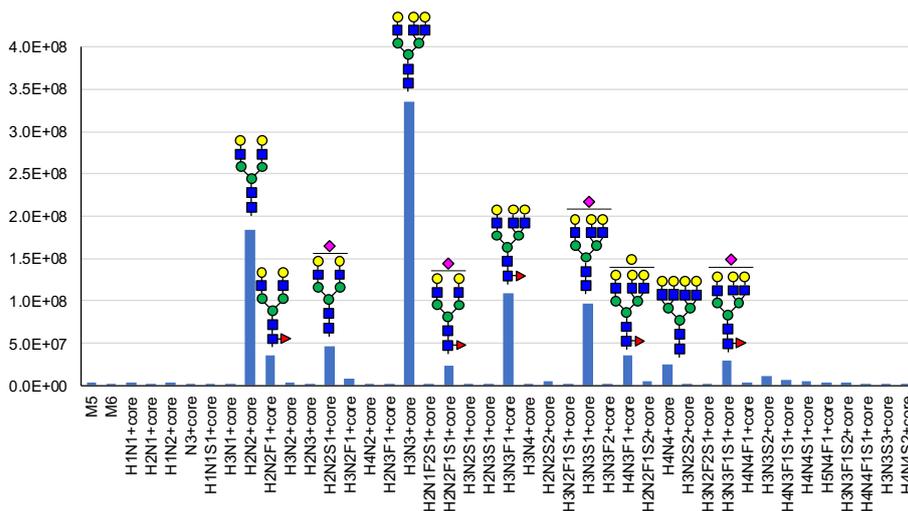


図4: ErbB4 N333に結合するN型糖鎖

(3) sErbB4 のシグナル抑制作用の解析

ヒト肺がん細胞 A549 のヘレグリンシグナルに対する sErbB4 のシグナル抑制作用を検討した。sEGFR、sErb2、sErbB3 と比較して、sErbB4 のシグナル抑制作用は低いことがわかった。sErbB4 の糖鎖欠損変異体のシグナル抑制作用に関して、現在検討中である。

<結論>

ErbB4 の部位特異的な N 型糖鎖解析を行った。N333 に付加する糖鎖を欠損した変異体では ErbB4 のリン酸化の亢進（リン酸化レベルの上昇と持続時間の延長）が認められた。この糖鎖は、EGFR N420、ErbB3 N418 に結合する糖鎖と同様の特徴、すなわち付加率が 100% でフコース付加が著しく低い複合型糖鎖であることがわかった。また、11 か所中 3 か所にオリゴマンノース型糖鎖優位の部位が存在することがわかった。これまで検討した増殖因子受容体の中で、このようにオリゴマンノース型糖鎖が存在するのは ErbB ファミリーのみ共通する特徴である。今後は、N333 の糖鎖を欠損した ErbB4 の動態を調べるとともに、sErbB4 の糖鎖欠損変異体のシグナル抑制作用と立体構造を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Ukichiro, Fujitani Naoki, Uehara Yasuaki, Okamoto Hiromi, Saitou Atsushi, Ito Fumie, Arika Shigeru, Shiratsuchi Akiko, Hasegawa Yoshihiro, Takahashi Motoko	4. 巻 1868
2. 論文標題 N-glycan on N262 of FGFR3 regulates the intracellular localization and phosphorylation of the receptor	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130565 ~ 130565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2024.130565	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Yamaguchi Miki, Hirai Sachie, Idogawa Masashi, Sumi Toshiyuki, Uchida Hiroaki, Fujitani Naoki, Takahashi Motoko, Sakuma Yuji	4. 巻 426
2. 論文標題 Junctional adhesion molecule 3 is a potential therapeutic target for small cell lung carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113570 ~ 113570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2023.113570	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Ichinohe Norihisa, Tanimizu Naoki, Ishigami Keisuke, Yoshioka Yusuke, Fujitani Naoki, Ochiya Takahiro, Takahashi Motoko, Mitaka Toshihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 CINC-2 and miR-199a-5p in EVs secreted by transplanted Thy1+ cells activate hepatocytic progenitor cell growth in rat liver regeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-023-03346-z	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Takahashi M., Fujitani N., Uehara Y., Hasegawa Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Site-specific analysis of N-glycans of receptor tyrosine kinases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends Glycosci. Glycotechnol.	6. 最初と最後の頁 E56-E60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Fujitani Naoki, Uehara Yasuaki, Arika Shigeru, Hashimoto Ukichiro, Mukai Jo, Hasegawa Yoshihiro, Takahashi Motoko	4. 巻 34
2. 論文標題 Site-specific glycosylation analysis of epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2): exploring structure and function toward therapeutic targeting	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 130565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwad100	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Takahashi Motoko, Hasegawa Yoshihiro, Maeda Kento, Kitano Masato, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Role of glycosyltransferases in carcinogenesis; growth factor signaling and EMT/MET programs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 167 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10041-3	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Saitou Atsushi, Hasegawa Yoshihiro, Fujitani Naoki, Arika Shigeru, Uehara Yasuaki, Hashimoto Ukichiro, Saito Atsushi, Kuronuma Koji, Matsumoto Kunio, Chiba Hirofumi, Takahashi Motoko	4. 巻 113
2. 論文標題 <i>glycosylation regulates MET processing and signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1292 ~ 1304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15278	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Takahashi Yuki, Saito Atsushi, Sakuma Yuji, Tada Makoto, Maki Ryunosuke, Takahashi Motoko, Watanabe Atsushi	4. 巻 51
2. 論文標題 Treatment of air leakage using the VIO soft coagulation system: a mouse pulmonary air leak model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-021-02251-3	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Fujitani Naoki, Ariki Shigeru, Hasegawa Yoshihiro, Uehara Yasuaki, Saito Atsushi, Takahashi Motoko	4. 巻 60
2. 論文標題 Integrated Structural Analysis of <i>N</i> -Glycans and Free Oligosaccharides Allows for a Quantitative Evaluation of ER Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1708 ~ 1721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00969	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Takahashi Motoko, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Maillard reaction in vivo and its relevance to diseases: editorial and dedication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 277 ~ 281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-021-09996-6	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Fujii Junichi, Homma Takujiro, Miyata Satoshi, Takahashi Motoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Pleiotropic Actions of Aldehyde Reductase (AKR1A)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 343 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11060343	査読の有無 無
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11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤淳、長谷川喜弘、藤谷直樹、有木茂、上原康昭、松本邦夫、高橋素子
2. 発表標題 METの糖鎖による機能制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋素子、齋藤淳、長谷川喜弘、藤谷直樹、有木茂、上原康昭、松本邦夫
2. 発表標題 肝細胞増殖因子受容体METの糖鎖の構造と機能
3. 学会等名 第41回 日本糖質学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本弘美、藤谷直樹、上原康昭、長谷川喜弘、橋本宇吉郎、有木茂、白土明子、高橋素子
2. 発表標題 FGFR1の糖鎖の部位特異的構造解析と機能解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤谷直樹、上原康昭、長谷川喜弘、橋本宇吉郎、有木茂、高橋素子
2. 発表標題 ヒトErbB2(HER2)の部位特異的糖鎖構造解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上原康昭、藤谷直樹、長谷川喜弘、有木茂、橋本宇吉郎、岡本弘美、高橋素子
2. 発表標題 ヒトRANKの糖鎖による機能制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋素子、岡本弘美、藤谷直樹、上原康昭、橋本宇吉郎、長谷川喜弘
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子受容体FGFR1の糖鎖の構造と機能
3. 学会等名 第42回 日本糖質学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋素子
2. 発表標題 糖鎖修飾による増殖因子受容体の機能制御
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部 特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡本弘美、藤谷直樹、上原康昭、長谷川喜弘、橋本宇吉郎、有木茂、白土明子、高橋素子
2. 発表標題 FGFR1のN型糖鎖はレセプターの細胞内輸送と自己リン酸化を制御する
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤谷直樹、上原康昭、長谷川喜弘、橋本宇吉郎、有木茂、高橋素子
2. 発表標題 ErbB2 (HER2) の分子安定性に関するN-glycansの機能の評価
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上原康昭、藤谷直樹、長谷川喜弘、有木茂、橋本宇吉郎、高橋素子
2. 発表標題 RANK C175R変異はERストレスを誘導し大理石骨病を引き起こす
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本宇吉郎、藤谷直樹、上原康昭、長谷川喜弘、有木茂、高橋素子
2. 発表標題 FGFR3のN型糖鎖は細胞膜への発現と活性を制御する
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	藤谷 直樹 (Naoki Fujitani) (10374191)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	上原 康昭 (Yasuaki Uehara) (40882907)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	長谷川 喜弘 (Yoshihiro Hasegawa) (90643180)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------