



Title	Cytoplasmic Domain Phosphorylation of Heparin-Binding EGF-like Growth Factor
Author(s)	王, 小彪
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46352
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 王 小 彪

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20099 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 Cytoplasmic Domain Phosphorylation of Heparin-Binding EGF-like Growth Factor
(HB-EGF 細胞質領域のセリンリン酸化とその役割の解析)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 目加田英輔

(副査)

教 授 松田 道行 教 授 岡田 雅人

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) は、膜結合型の proHB-EGF として合成され、細胞表面でプロテアーゼにより切断 (エクストメインシェディング、以下、シェディングと略) されて分泌型 HB-EGF を生じる。この分泌型 HB-EGF は、EGF 受容体 (EGFR) および ErbB4 を介して増殖シグナルを細胞外から細胞内へ伝達する。研究が進んでいる分泌型 HB-EGF に比べ、proHB-EGF および proHB-EGF のシェディングによって生じた細胞膜貫通及び細胞質領域からなる C 末端断片 (以下、「切り株」と表記) の役割については未だ多くの点が不明である。本論文では、proHB-EGF 細胞質領域にセリンリン酸化が起こることを明らかにし、その意義について検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

C 末端に HA タグを付加した HB-EGF を作製し、これを高発現する Vero 細胞を樹立した。この細胞を TPA で刺激すると、タグを付加していない HB-EGF と同様に細胞外ドメインがシェディングされ、SDS-PAGE において移動度の異なる二種類の切り株が生じることが、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより明らかになった。抗 HA 抗体を用いて精製した二種類の切り株について N 末端アミノ酸配列を決定したところ、いずれも Val¹⁵⁰ から始まっていることから、これら二種類の切り株の移動度の違いは、異なる部位でプロテアーゼに切断されたためではなく、翻訳後修飾の違いによることが示唆された。

切り株精製時に脱リン酸化酵素阻害剤を添加しないと移動度の遅いバンドが消失することが見出されたため、移動度の違いはリン酸化修飾の違いによると推論された。まず、チロシンリン酸化の可能性を調べるために、抗リン酸化チロシン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったが、どちらの切り株からもチロシンリン酸化は検出できなかった。HB-EGF の細胞質領域には、Thr²⁰⁵、Ser²⁰⁷、さらに HA タグを付加する際に生じた Ser²⁰⁹ の、リン酸化を受け得る 3 アミノ酸残基があることから、次これらのリン酸化の可能性について検討した。この 3 箇所を別々にアラニン置換した変異体を発現する Vero 細胞を TPA 刺激によってシェディングを誘導したところ、S207A 変異体でのみ電気泳動で移動度の遅い切り株が完全に消失し、³²P によるメタボリック標識実験でもリン酸化が検出されなくなっ

た。また、このリン酸化は HA タグを付加していない proHB-EGF でも起こることが確認された。以上の結果より、Ser²⁰⁷ がリン酸化されていることが示された。

S207A 変異体のシェディングは野生型と同程度に起こるので、Ser²⁰⁷ のリン酸化はシェディングには必須でないことがわかった。また、メタロプロテアーゼ阻害剤を加えてシェディングを抑制しても、TPA 刺激によりリン酸化が起こることから、リン酸化にシェディングは必須ではないこともわかった。シェディングを誘導することが知られているリゾホスファチジン酸やカルシウムイオノフォアなどの刺激によっても Ser²⁰⁷ のリン酸化が認められたことから、両者が同様な刺激で誘導される可能性が示された。

Ser²⁰⁷ のリン酸化の役割を調べる目的で、HB-EGF が持つ腫瘍形成促進能に着目して検討を行った。非造腫瘍性の BRL (Buffalo Rat Liver) 細胞に野生型、あるいは S207A 変異体 HB-EGF を発現させ、ヌードマウス皮下に移植し、4 週間後の腫瘍重量を測定した。その結果、HB-EGF の発現量と分泌量は同程度であるにもかかわらず、野生型を発現した細胞に比べて S207A 変異体を発現した細胞の腫瘍形成能が低下していた。この傾向は HA タグの有無にかかわらず認められた。また、HB-EGF ノックアウトマウスから樹立した MEF 細胞を用いた実験においても、同様の結果が得られた。以上のことから、Ser²⁰⁷ のリン酸化は、腫瘍形成能に何らかの役割を果たしていることが明らかとなった。

[総 括]

本研究により、proHB-EGF の細胞質領域にあるセリン残基がリン酸化されることを初めて見出し、そのリン酸化が HB-EGF の腫瘍形成能に何らかの役割を果たしていることを明らかにした。HB-EGF の腫瘍形成能にはシェディングが必須であることが報告されている。そのため、HB-EGF により誘導される腫瘍形成は、分泌型 HB-EGF による EGFR の活性化に依存していると考えられる。しかしながら、proHB-EGF のリン酸化はシェディングを誘導する刺激によって起きることから、リン酸化型 HB-EGF が EGFR と協調的に細胞増殖を亢進している可能性が考えられる。proHB-EGF の細胞質領域に結合する分子が幾つか同定されていることから、リン酸化型 HB-EGF が細胞内の分子を介して、増殖を亢進するシグナルを直接伝達している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 HB-EGF は、膜結合型の proHB-EGF として合成され、細胞表面でプロテアーゼにより切断されて分泌型 HB-EGF を生じる。分泌型 HB-EGF は EGF リセプターおよび ErbB4 を介して増殖シグナルを細胞外から細胞内へ伝達する。本論文は、proHB-EGF 細胞質領域にある Ser²⁰⁷ にリン酸化が起こることを初めて明らかにし、その意義について検討したものである。S207A 変異体を用いた解析から、このリン酸化は膜型から分泌型への切断に必須でなく、分泌型 HB-EGF の分泌量や細胞増殖能にも影響を与えないが、S207A 変異体を発現した細胞のヌードマウス皮下での腫瘍形成能は野生型を発現したものと比べると低下することから、proHB-EGF のリン酸化が腫瘍形成能に何らかの役割を果たしており、その細胞質領域に何らかの細胞増殖調節機能が存在することが示唆された。本研究は EGFR リガンド細胞質領域のリン酸化とその意義について初めて解析したもので、学位に値するものと認める。