

Title	The Asn418-linked N-glycan of ErbB3 plays a crucial role in preventing spontaneous heterodimerization and tumor promotion.
Author(s)	横江, 俊一
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47458
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	横江俊一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第20907号
学位授与年月日	平成19年3月23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	The Asn ⁴¹⁸ -linked <i>N</i> -glycan of ErbB3 plays a crucial role in preventing spontaneous heterodimerization and tumor promotion. (増殖因子受容体の一つである ErbB3 の Asn ⁴¹⁸ の <i>N</i> 型糖鎖は、リガンド非存在下での二量体形成、およびそれに伴う腫瘍進展の抑制に重要な役割を果たしている。)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 木下タロウ 教授 辻本 賀英

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

細胞膜に存在する増殖因子受容体は、多くが糖鎖修飾を受けている。糖鎖は、分子の立体構造を変化させたり、レクチン様分子との親和性を変化させたりすることによってタンパク質の安定性やタンパク間相互作用など、多くの要素に影響すると考えられている。増殖因子受容体の一つである ErbB ファミリーは、EGFR (epidermal growth factor receptor, ErbB1)、ErbB2、ErbB3、ErbB4 の四つのメンバーがあり、細胞増殖や分化、創傷治癒などに関与している。いずれも細胞外ドメイン (ドメイン I ~ IV)、膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼドメイン、自己リン酸化ドメインから構成されている。各メンバーの一次構造は高い相同性を示すが、ErbB3 はチロシンキナーゼの相同性が低く、キナーゼ活性を持たないことが知られている。以前我々は、EGFR のリガンド結合部位と考えられているドメイン III に存在する四つの糖鎖のうち、四番目の糖鎖付加部位を欠損した変異体 (N420Q) がリガンド結合能を失うとともに、リガンド非存在下でも二量体形成と自己リン酸化が起こっていることを見出した (Tsuda T, et al : J Biol Chem, 2000)。今回我々は、ErbB2 などとヘテロダイマー形成し、機能していると考えられている ErbB3 における糖鎖の役割を検討するため、ErbB3 に存在する 10 ケ所のアスパラギン結合型糖鎖付加部位をそれぞれ欠損させた変異体を作製し、糖鎖が二量体形成やシグナル伝達などに及ぼす影響と *in vivo* での腫瘍増殖性について検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

ErbB3 の 10 ケ所の *N* 型糖鎖付加部位変異体の安定発現細胞株をそれぞれ樹立した。それらの細胞表面をビオチン化して、抗 ErbB3 抗体にて免疫沈降することにより、ビオチン化された ErbB3 をウエスタンブロットで検出した。その結果、それぞれの糖鎖付加部位の変異によって細胞表面上の ErbB3 の発現は変化しないことを確認した。次に、架橋剤を用いて、二量体化した ErbB3 の検出を試みたところ、EGFR の N420Q に相当する ErbB3 の変異体 (N418Q) で、リガンド非存在下で二量体形成が観察された。次に、細胞に野生型および変異型 (N418Q) ErbB3 と野生型 ErbB2 をそれぞれ共発現させ、ヘテロ二量体形成に及ぼす糖鎖の役割について検討したところ、変異型 ErbB3 (N418Q)

と野生型 ErbB2 を共発現した細胞で、リガンド非存在下でヘテロ二量体形成が観察された。二量体形成に伴ってチロシンリン酸化が促進し、ERK や PI3K/Akt 経路の活性化が認められた。細胞増殖の亢進が考えられたため、WST-1 を用いて足場依存性の細胞増殖アッセイを行ったところ、変異型 ErbB3 (N418Q) と野生型 ErbB2 を共発現した細胞で、細胞を培養してから 72 時間後より、野生型 ErbB3 と野生型 ErbB2 を共発現した細胞と比較して細胞増殖能が有意に上昇した。また、腫瘍形成の指標となる足場非依存性の細胞増殖について検討するため、軟寒天上での細胞増殖アッセイを行ったところ、変異型 ErbB3 (N418Q) と野生型 ErbB2 を共発現した細胞で、野生型 ErbB3 と野生型 ErbB2 を共発現した細胞と比較して足場非依存性の細胞増殖能の亢進が認められた。こうした細胞増殖能の亢進は、MAP キナーゼ阻害剤である PD98059 や、PI3K/Akt 阻害剤である Wortmannin によって抑制されたことから、ERK 経路や PI3K/Akt 経路の活性化により、細胞増殖が亢進していることが分かった。さらに、*in vivo* での影響について検討するため、共発現細胞株をヌードマウスの皮下に注射し、腫瘍増殖能を観察したところ、変異型 ErbB3 (N418Q) と野生型 ErbB2 を共発現した細胞で、野生型 ErbB3 と野生型 ErbB2 を共発現した細胞と比較して、*in vivo* においても腫瘍増殖能が有意に亢進していた。

[総 括]

ErbB3 の 418 番目の糖鎖が欠損すると、リガンドが存在しなくとも、二量体の形成が起こり、自己リン酸化を引き起こし、また細胞増殖能の増加、軟寒天培地で足場非依存性の増殖の上昇、また、ヌードマウスで、腫瘍形成が亢進することが観察されたことから、ErbB3 の 418 番目の糖鎖が二量体形成の制御および細胞増殖能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

細胞膜に存在する増殖因子受容体は、多くが糖鎖修飾を受けている。糖鎖は、分子の立体構造や可塑性を変化させたり、レクチン様分子との親和性を変化させたりすることによってタンパク質の安定性やタンパク間相互作用など、多くの要素に影響すると考えられている。今回、増殖因子受容体の一つである ErbB ファミリーの内、ErbB3 の糖鎖について、ErbB2 とのヘテロ二量体形成やシグナル伝達、細胞増殖に及ぼす影響について検討した結果、ErbB3 の 10 ケ所の糖鎖付加部位の内、418 番目の糖鎖付加部位が欠損すると、リガンドが存在しなくとも二量体の形成・リン酸化が起こり、*in vitro* での細胞増殖・軟寒天培地での足場非依存性の増殖・ヌードマウスでの腫瘍増殖がそれぞれ亢進することが明らかにされた。このように、糖鎖の役割を明らかにしていくことで、今後、病態との関係を解明していくことが大いに期待される成果を示したことから、本論文は学位に値すると考える。