

Title	Suppression of the Biological Activities of the Epidermal Growth Factor(EGF)-like Domain by the Heparin-binding Domain of Heparin-binding EGF-like Growth Factor
Author(s)	高崎, 理紗
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47492
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 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名 高 崎 理 紗

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20923 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 Suppression of the Biological Activities of the Epidermal Growth Factor (EGF)-like Domain by the Heparin-binding Domain of Heparin-binding EGF-like Growth Factor
(分泌型 HB-EGF の増殖因子活性発現におけるヘパリンの作用機序)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 目加田英輔

(副査)

教 授 堀口 安彦 教 授 岡田 雅人

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

HB-EGF は細胞膜結合型のタンパクとして合成され、細胞膜上でプロテアーゼによる切断を受けて分泌型を生じる。分泌型は増殖因子として、細胞膜結合型はジフテリア毒素受容体として機能する。HB-EGF はヘパリン結合性を有し、細胞外マトリックス分子の一つであるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) と結合する。これまでの研究より、膜型 HB-EGF が HSPG との相互作用によりジフテリア毒素との結合活性を上げることが明らかになっていた。しかし、HB-EGF の生理活性発現にヘパリン結合領域がどのように関与しているのか明らかではなかった。そこで、岩本亮博士の指導のもと私は、HB-EGF のヘパリン結合領域を欠損した変異体 (Δ HB) を作成し、野生型と活性を比較した。

[方法ならびに成績]

Δ HB の作成

野生型 HB-EGF、あるいは、 Δ HB 変異 HB-EGF をコードする cDNA を PCR で合成し、制限酵素で切断後、発現ベクター pcDNA6/myc-His に組み込んだ。リコンビナントタンパクは、HS の多量体化に必要な酵素、N-acetylglucosaminyltransferase および glucuronosyltransferase を欠損した細胞 (CHO-677 細胞) に cDNA を導入し、作製した。合成タンパクの発現はウェスタンブロッティング法で、 Δ HB のヘパリン非結合性の確認はヘパリンセファロースクロマトグラフィーにて、それぞれおこなった。その結果合成された Δ HB は野生型と比較して、欠損させたアミノ酸配列に相当する分子量の分小さく、ヘパリン結合性を失っていた。培養上清より回収した HB-EGF および Δ HB の濃度はジフテリア毒素結合によるスカッチャードプロットで計った。

ジフテリア毒素との結合活性

ジフテリア毒素との結合活性を調べるため、ジフテリア毒素を 125 I ラベルし、HB-EGF および Δ HB への結合量を γ カウンターで測定した。分泌型、膜型ともに、ヘパリン非存在下で、 Δ HB のほうが野生型と比較して、ジフテリア毒素との結合活性が高かった。また、ヘパリンの添加により、野生型 HB-EGF のジフテリア毒素結合活性が上昇した。一方、変異型 Δ HB のジフテリア毒素結合活性はヘパリンの影響をうけなかった。

増殖因子活性

増殖因子活性を調べるため、ヘパリン非存在下およびヘパリン存在下で EGFR 高発現細胞 (DER 細胞) を培養した。ヘパリン非存在下で HB-EGF あるいは Δ HB を加えたところ、DER 細胞は野生型 HB-EGF に比べ Δ HB でより増殖が促進された。また、野生型 HB-EGF の増殖因子活性はヘパリン存在下で促進された。一方、変異型 Δ HB の増殖因子活性は、ヘパリンの影響をうけなかった。

[総 括]

以上の結果より、我々は、HB-EGF の生理活性をヘパリン結合領域が負に制御しており、ヘパリンとの結合によるコンフォメーションの変化が活性発現に重要であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

高崎は、増殖因子活性やジフテリア毒素との結合活性といった HB-EGF の生理活性に対するヘパリンの影響を調べるために、HS 合成能のない細胞で合成した 'HS-free HB-EGF' の生理活性をヘパリン存在下・非存在下で測定し、ヘパリンの濃度依存的に生理活性が促進されることを見出した。また、HB-EGF の活性発現におけるヘパリン結合領域の関与を調べるために、ヘパリン結合領域を欠損した変異体の生理活性を測定し、野生型と比較して顕著に生理活性が高くなることを見出した。これらのことから、HB-EGF の生理活性をヘパリン結合領域が負に制御しており、ヘパリンとの結合によるコンフォメーションの変化が活性発現に重要であることを明らかにした。これらの研究成果は、細胞外基質との相互作用による増殖因子の構造変化が増殖因子の活性調節に重要であるという視点をもたらした。高崎の発表した論文は学位論文に値する。