The Role of Heparan Sulfate Proteoglycan in Ligand-induced Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor

リガンドによって誘起される上皮細胞増殖因子レセプターの活性化における
ヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割

Johnson, Gibbs R.

Division of Cytokine Biology, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration,
Bethesda, MD 20892, USA, FAX: 1-301- 402-1659

Key Words: *amphiregulin, epidermal growth factor receptor, fibroblast growth factor, heparan sulfate proteoglycan, heparin-binding EGF-like growth factor*

Abstract

The class of mammalian biologically active polypeptides called growth factors influence the proliferation, differentiation, motility, maintenance and apoptosis of target cells. Growth factors such as epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF) elicit responses in cells by interacting with the extracellular domain of their receptors. This binding results in the activation of the intrinsic tyrosine kinase activity of the receptor and signaling. It has become apparent that accessory receptors, namely heparan sulfate (HS) proteoglycan, are required for the action of some growth factors. The mechanism of action of the FGFs serves as the prototype for this phenomenon. Amphiregulin and heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), two ligands which function via the activation of the EGF receptor have been shown to require extracellular HS proteoglycan for bioactivity. The heparin-binding regions of amphiregulin and HB-EGF have been localized to a basic ~20 amino acid segment which lies just adjacent to the EGF-like domain of these mitogens. Based upon experimental data, a mechanism is proposed for amphiregulin action in which the HS proteoglycan is an integral membrane protein which either presents amphiregulin to the receptor or stabilizes the bivalent binding of one molecule of amphiregulin to the activated receptor dimer.

要 約

生物活性を持った哺乳類の成長因子と呼ばれるポリペプチドは、標的細胞の増殖、分化、移動、維持、アポトーシスに影響を与えている。上皮細胞増殖因子(EGF)や繊維芽細胞増殖因子(FGF)のような成長因子は、レセプターの細胞外ドメインと相互作用することによって、細胞に反応を引き起こす。この結合の結果、レセプター自身のチロシンキナーゼ活性とシグナル伝達が活性化される。本来のレセプターに付随して存在する補助的レセプターであるヘパラン硫酸プロテオグリカンが、幾つかの成長因子の作用に必要なものであることが明らかとなっている。FGFsの機能発現の機構は、この現象のよいモデルである。EGFレセプターの活性化に必要な2つのリガンドであるアンフィレグリンとヘパリン結合性EGF様成長因子(HB-EGF)は、生物活性を発揮するために、細胞外HSプロテオグリカンを必要とすることが示された。アンフィレグリンとHB-EGFのヘパリン結合領域は、約20残基のアミノ酸配列からなる塩基性のペプチド断片にあることが示されており、それは分裂促進因子上のEGF様ドメインに非常に近接した位置に存在する。HSプロテオグリカンはアンフィレグリンの機能発現において必須の膜タンパク質であり、アンフィレグリンをレセプターに提示したり、あるいは、活性化されて二量体を形成したレセプターと一分子のアンフィレグリンの二価の結合を安定化するというメカニズムが、データに基づいて提唱されている。

A. Glycosaminoglycans and Proteoglycans

Glycosaminoglycans (GAGs) are long unbranched polysaccharide chains consisting of repeating disaccharide units which can range in size from approximately 4,000 to 80,000,000 daltons. GAGs can be classified into four groups based upon their sugar residues, the type of linkage between the sugar residues and the position and number of sulfate moieties. The four main classes of GAGs are: (a) hyaluronic acid, (b) chondroitin sulfate and dermatan sulfate, (c) heparan sulfate and heparin, and (d) keratan sulfate. With the exception of hy-

A. グリコサミノグリカンとプロテオグリカン

グリコサミノグリカン(GAG)は、長く、枝分かれのない多糖鎖であり、約4,000~80,000,000ダルトンの二糖繰り返し領域からなっている。GAGsは、その糖残基、糖残基間の結合様式、硫酸基の位置と数の違いにより、4つのグループに分類されている。GAGsの主要な4つのグループは、(a)ヒアルロン酸、(b)コンドロイチン硫酸とデルマトン硫酸、(c)ヘパラン硫酸とヘパリン、(d)ケラタン硫酸である。ヒアルロン酸を除いて、すべてのGAGsは様々な硫酸化されており、硫酸基はGAGsに強い負

aluronic acid, all GAGs are sulfated to varying degrees which provides these GAGs with a strong negative charge. Heparan sulfate (HS) and heparin, which are the focus of this review, are composed of characteristic repeating glucuronic acid-*N*-acetylglucosamine disaccharide units. A number of additional modifications occur in HS and heparin including epimerization of glucuronic acid to iduronic acid and sulfation of the iduronic and glucosamine residues. Heparin differs from HS in that it contains a much higher degree of sulfation and quantity of iduronic acid. A more complete review on the structure, biosynthesis and metabolism of HS and heparin can be found in the review by Yanagishita and Hascall (1).

Proteoglycans are proteins which contain covalently linked GAGs and exist on the surface of cells and within the extracellular matrix. In contrast to the other GAGs, hyaluronic acid is not bound to a core protein and exists in a free form. Proteoglycans are believed to play an important role in a wide range of biological functions which include cell division, morphogenesis, developmental processes and cancer (1–5). One very important subset of proteoglycans is the HS proteoglycan which can exist on the surface of cells or within basement membranes (1, 6–8). HS proteoglycan can exist on the surface of cells as integral membrane proteins, can be linked covalently to the cell surface via a glycosyl phosphatidylinositol (PI) anchor or can be bound to the surface through non-covalent specific or non-specific interactions with other plasma membrane proteins. The syndecan family of HS proteoglycans represent examples of integral membrane HS proteoglycans, whereas the glypican-related HS proteoglycans represent examples of PI-anchored HS proteoglycans (1, 7, 8). HS proteoglycan can be expressed on the surface of cells at relatively high concentrations and typically can exist in the range of 10^5 – 10^6 molecules/cell (1). Their ability to bind growth factors, enzymes, basement membrane proteins, proteinase inhibitors, and cytokines implies that HS proteoglycans perform very diverse biological functions. HS has been shown to play an essential role in the action of fibroblast growth factor (FGF) (9), vascular endothelial growth factor (VEGF) (10), amphiregulin (11), and heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (12). While this review focuses on the binding of growth factors to the HS chains of proteoglycans, it is important to note that proteoglycans can also bind growth factors through their core proteins (2). For example, the proteoglycan, betaglycan, binds transforming growth factor- β (TGF- β) through its protein core, and functions to present TGF- β to the signal-transducing TGF- β type II receptor (13).

B. Signaling by Growth Factor Receptors Which Have Intrinsic Tyrosine Kinase Activity

The class of polypeptide molecules called growth factors induce a number of biological responses in target cells.

の電荷を与えている。この総説の焦点であるヘパラン硫酸(HS)とヘパリンは、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの特徴的な二糖の繰り返しにより構成されている。HSとヘパリンにおいては、グルクロン酸からイズロン酸へのエピメリ化と、イズロン酸残基とグルコサミン残基の硫酸化などの様々な修飾がみられる。ヘパリンは、より硫酸化の程度が高く、イズロン酸の含量が高いという点でHSとは異なる。HSおよび、ヘパリンの構造、機能、生合成、代謝についての詳細はYanagishitaとHascallによる総説に記載されている(1)。

プロテオグリカンはGAGsが共有結合している蛋白質であり、細胞表面や細胞外マトリクス中に存在している。他のGAGsとは対照的に、ヒアルロン酸はコア蛋白質に結合しておらず、遊離した状態で存在する。プロテオグリカンは細胞分裂、形態形成、個体の発生の過程、癌化を含む生物学的な機能に、広範囲にわたって重要な役割を果たしていると信じられている(1–5)。プロテオグリカンの重要な亜群の1つとして、細胞の表面や基底膜中に存在しているHSプロテオグリカンがある。HSプロテオグリカンは、必須の膜蛋白質として細胞表面上に存在していたり、グリコシルホスファチジルイノシトール(PI)アンカーを介して細胞表面に共有結合していたり、あるいは、非共有結合的に他の形質膜蛋白質と特異的に、または、非特異的に相互作用して、細胞表面に結合している。シンデカンファミリーのHSプロテオグリカンは必須の膜結合型プロテオグリカンであり、グリピカン関連のHSプロテオグリカンはPIアンカーHSプロテオグリカンである(1, 7, 8)。HSプロテオグリカンは、細胞表面に比較的高濃度に発現しており、典型的には 10^5 – 10^6 分子/細胞の範囲で存在している(1)。HSプロテオグリカンが、種々の成長因子、酵素、基底膜中の蛋白質、プロテアーゼインヒビター、サイトカインと結合することは、それらが非常に多彩な生物学的機能を発揮することを暗示している。HSが繊維芽細胞増殖因子(FGF)(9)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)(10)、アンフィレグリン(11)、ヘパリン結合EGF様成長因子(HB-EGF)(12)の作用において、必須の役割を担っていることが示されている。この総説の焦点は、プロテオグリカン中のHS鎖と種々の成長因子との結合であるが、プロテオグリカンは、そのコア蛋白質においても成長因子と結合することを記しておくことも重要である(2)。例えば、ベータグリカンというプロテオグリカンは、そのコア蛋白質部分で、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)と結合し、シグナルを変換するTGF- β IIレセプターにTGF- β を提示するというように機能している(13)。

B. チロシンキナーゼ活性をもった成長因子レセプターによるシグナル伝達

成長因子と呼ばれるポリペプチドのクラスは、標的細胞に数多くの生物学的な反応を引き起こす。これらの中には、細胞

These responses include influencing the proliferation, differentiation, migration, maintenance and apoptosis of cells. Growth factors such as epidermal growth factor (EGF), insulin, FGF, nerve growth factor (NGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) initiate their action through binding to the extracellular domain of their respective cell surface receptors. It is generally believed that ligand binding to these receptor leads to receptor dimerization, activation of the intrinsic tyrosine kinase activity of the receptor, autophosphorylation of the receptor and the generation of signals which eventually reach the nucleus (14-16). The activation of signaling by the insulin receptor appears to be slightly different in the sense that the receptor pre-exists as a disulfide-linked dimer. While all of the specific steps and mechanisms involved in growth factor receptor signaling have not been elucidated, a general scheme appears to have emerged which can link these receptors to the nucleus of cells. Ligand-dependent signaling by these receptor tyrosine kinases results in the activation of the GTP-binding protein, Ras, which resides at the cytosolic side of the plasma membrane (17). The binding of a pre-existing complex of the adaptor protein, GRB2, and the guanine nucleotide exchange factor, son-of-sevenless (Sos), to tyrosine phosphorylated sites in the receptors themselves, as well as in other signaling proteins, drives the activation of Ras. The GRB2 protein is able to link itself to tyrosine phosphorylated sites and proline-rich sites in signaling proteins through its src homology 2 (SH2) and src homology 3 (SH3) domains, respectively. The activation of Ras initiates a phosphorylation cascade involving Raf kinase, mitogen-activated protein kinase (map kinase kinase, MAPKK or MEK) and mitogen-activated protein kinase (map kinase, MAPK or extracellular signal-regulated kinase). The increase in the serine/threonine kinase activity of mitogen-activated protein kinase is believed to be essential for most, if not all, of the cellular response to growth factors (18-20). Recently, another pathway which links growth factor receptor signaling to the initiation of transcription within the nucleus has been discovered and appears to occur independent of Ras activation (21). Upon binding of ligand to receptor, a rapid tyrosine phosphorylation of signaling proteins called STATs (signal transducers and stimulators of transcription) occur resulting in the translocation of the STAT proteins into the nucleus. It appears that this phenomenon is involved in the initiation of the transcription of early response genes. However, in terms of growth factor action, the biological consequence of the activation of this pathway is unknown.

C. The Mechanism of FGF-Triggered Activation of the FGF Receptor as a Model for Heparan Sulfate-dependent Growth Factor Action

Fibroblast growth factors comprise a large family of growth factors which play important roles in cell division, differentiation and embryogenesis (22, 23). While there are at

増殖、分化、移動、維持、アポトーシスへの影響が含まれる。上皮細胞増殖因子(EGF)、インスリン、神経成長因子(NGF)、血小板由来成長因子(PDGF)のような成長因子が、細胞表面に存在する各々のレセプターの細胞外ドメインと結合することで、このような作用が始まる。一般的に、リガンドがレセプターと結合すると、レセプターの二量体化、レセプター自身のチロシンキナーゼの活性化、レセプターの自己リン酸化が起こり、そのようにして生み出されたシグナルは、最終的に核へ到達する(14-16)。インスリンレセプターによりシグナル伝達が活性化される場合は、レセプターがジスルフィド結合によりあらかじめ二量体として存在しているので、その点が、多少異なるようだ。成長因子のシグナル伝達に關する特異な過程や機構のすべてが解明されたわけではないが、細胞のこれらのレセプターと核をつなぐ概要は明らかになったように思える。これらのレセプターチロシンキナーゼによる、リガンドに依存したシグナル伝達の結果、形質膜の細胞質側に存在する GTP 結合蛋白質である Ras タンパクの活性化が起こる(17)。アダプター蛋白質である GRB2 とグアニジンスクレオチド変換因子である son-of-sevenless(Sos)の既存の複合体がレセプター自身のリン酸化チロシン残基へ結合することも、他のシグナル蛋白質の場合と同様に Ras の活性化を引き起こす。GRB2 蛋白質はそれ自身が、その src homology 2(SH2)や src homology 3(SH3)ドメインを介して、シグナル蛋白質中のリン酸化を受けたチロシン残基やプロリンリッチな部位とそれぞれ結合することができる。Ras の活性化により、Raf キナーゼ、MAPキナーゼキナーゼ(map kinase kinase、MAPKK、MEK)、MAPキナーゼ(map kinase、MAPK、extracellular signal-regulated kinase)の關与するリン酸化のカスケード反応が起こる。セリン/スレオニン/チロシンキナーゼのセリン/スレオニンキナーゼ活性の上昇が、成長因子の細胞応答反応のすべてとはいわないまでも、大部分において重要であると考えられている(18-20)。最近、成長因子とそのレセプターを介したシグナリングと核内での転写の開始をつなぐ他の経路が発見され、それは Ras の活性化には依存しないようである(21)。リガンドとレセプターとの結合によって、STATs(signal transducers and stimulators of transcription)と呼ばれるシグナル伝達蛋白質のチロシン残基の迅速なリン酸化が起こり、その結果、STAT 蛋白質は核へ移行する。この現象は、初期応答する遺伝子の転写の開始に關係すると考えられる。しかしながら、成長因子の作用という観点においては、この経路の活性化の結果、どのような生物学的反応が生じるのかはわかっていない。

C. ヘパラン硫酸に依存した成長因子の作用のモデルとしての、FGF により引き起こされる FGF レセプターの活性化のメカニズム

繊維芽細胞増殖因子は、細胞の分裂、分化、胚発生において重要な役割を果している成長因子の巨大ファミリーを形成している(22, 23)。このファミリーのなかには、少なくとも9種の

least nine different FGFs within this family, the following discussion will focus on the most studied members of this family, namely acidic FGF (aFGF, FGF-1) and basic FGF (bFGF, FGF-2). The FGFs are potent stimulators of endothelial cell mitogenesis and angiogenesis. Over the last several years significant progress has been made in understanding the role that HS and HS proteoglycan play in FGF action and thus, provide us with a prototypical mechanism for HS-dependent growth factor action. It has been well recognized that heparin can potentiate the bioactivity of the FGFs and cells which lack HS proteoglycan, do not respond to bFGF (9, 24, 25). However, the action of bFGF can be reconstituted in these cells by adding soluble heparin or heparan sulfate in the presence of bFGF. It has been proposed that cell-surface, heparin-like molecules (HS) are necessary for binding of bFGF to its high affinity, signal-transducing tyrosine kinase receptor (25). In contrast to these findings, Roghani *et al.* (26) have provided data which indicates that heparin is not essential to bFGF binding to its receptor, but instead increases the affinity of the interaction in the bFGF/receptor complex. It also has been demonstrated that heparin binds to the FGF receptor and proposed that this interaction is essential to the aFGF and bFGF activity (27). Numerous studies have identified structures in heparin and heparan sulfate which are critical to the bioactivity of bFGF and aFGF (28–33). Oligosaccharides rich in 2-*O*-sulfo- α -L-iduronic acid and containing at least 10 sugar units were found to bind strongly to the FGFs and to confer biological activity to the FGFs. Interestingly, these highly negative charged structures are common to heparin, but rare in HS. The work of Aviezer *et al.* has demonstrated that the cell surface HS proteoglycans, syndecan, glypican and fibroglycan are not able to drive high affinity binding of bFGF to its receptor (32). However, a very recent report from this group indicates that the basal lamina HS proteoglycan, perlecan, promotes bFGF-mediated mitogenesis and angiogenesis (34). A specific mechanism which may explain the role of heparin and HS in aFGF action has recently been put forth (35). It has been proposed that heparin functions to induce oligomerization of aFGF molecules and that this oligomerization of growth factor molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation and mitogenesis.

D. Multiple Ligands Activate the Epidermal Growth Factor Receptor

The activated EGF receptor mediates a number of important biological responses in mammals including the stimulation of cell division, migration, and differentiation (36). Five different polypeptide ligands which derive from distinct genes are capable of binding to the extracellular domain of the EGF receptor and thus, inducing the generation of an activated, signaling receptor. These ligands include EGF (36, 37), transforming growth factor- α (TGF- α) (38, 39), amphiregulin (40–45),

異なった FGF が存在するが、以下の議論では、このファミリーのうち、最もよく研究された成長因子である acidic FGF (aFGF, FGF-1) と basic FGF (bFGF, FGF-2) に焦点を絞る。FGFs は内皮細胞の細胞分裂や血管新生の強力な刺激因子である。過去数年間にわたって、FGF の作用において HS と HS プロテオグリカンの果たす役割の理解における相当な研究の進歩があり、そのようにして我々は、HS に依存した成長因子の作用の機構の原型を知るようになった。ヘパリンが FGFs の生物活性を高めることや、HS プロテオグリカンを欠如した細胞は bFGF に応答しないことはよく知られている(9, 24, 25)。しかし、可溶性のヘパリンやヘパラン硫酸を bFGF 存在下に添加すると、これらの細胞において bFGF の作用を構築することができる。細胞表面上のヘパリン様分子(HS)が、bFGF の高親和性レセプターであるシグナル伝達チロシンキナーゼレセプターとの結合に必要であることが提唱されている(25)。これらの知見とは対照的に、Roghani らは(26)、ヘパリンは bFGF とそのレセプターの結合には必須ではないが、その代わりに、bFGF/レセプター複合体における相互作用の親和力を増すというデータを提出した。ヘパリンは FGF レセプターと結合することも示され、この相互作用が aFGF と bFGF の活性にとって必須であることが提言された(27)。多くの研究により、bFGF と aFGF の生物活性にとって決定的なヘパリンとヘパラン硫酸中の構造が同定された(28–33)。2位が硫酸化された α -L-イズロン酸に富んだ、少なくとも10糖単位を含んでいるオリゴ糖が、FGFs と強く結合することや、FGFs に生物活性を与えることが観察された。興味深いことに、これらの非常に負に荷電した構造はヘパリンにおいて一般的であるが、HS にとっては稀である。Aviezer らの研究は、細胞表面の HS プロテオグリカンであるシンデカン、グリピカン、フィブログリカンは、bFGF をそのレセプターに非常に強く結合させることはできないことを示している(32)。しかしながら、このグループの最近の報告は、基底層の HS プロテオグリカンであるパルカンは、bFGF が媒介する細胞分裂や血管新生を促進することを示している(34)。aFGF の作用におけるヘパリンと HS の役割を説明する特異的な機構が、最近、提出された(35)。ヘパリンは aFGF 分子のオリゴマー化を引き起こすという機能を果たし、また、このような成長因子分子のオリゴマー化が FGF レセプターの二量体化、活性化、細胞の分裂促進の原因となっていることが提唱されている。

D. 多数のリガンドが上皮細胞増殖因子レセプターを活性化する

活性化した EGF レセプターは、ほ乳類において、細胞の分裂、移動、分化の刺激を含む多くの重要な生物学的反応を媒介している(36)。異なった遺伝子の産物である五種のポリペプチドリガンドは、EGF レセプターの細胞外ドメインに結合でき、それゆえ、活性化されたシグナルレセプターを誘導できる。これらのリガンドとして、EGF (36, 37)、トランスフォーミング増殖因子 α (TGF- α)(38, 39)、アンフィレグリン(40–45)、

HB-EGF (12, 46, 47) and betacellulin (48, 49). Amphiregulin, HB-EGF and betacellulin have all been shown to bind to immobilized heparin, in contrast to EGF and TGF- α which do not. Relative to amphiregulin and HB-EGF, betacellulin binds weakly to heparin (49). All of these growth factors contain a characteristic EGF-like domain which is defined by 6 evenly spaced cysteines residues which generate 3 loops through the formation of disulfide bonds. In the case of amphiregulin and HB-EGF, these growth factors contain a very basic NH₂-terminal extension of varying length relative to the EGF-like domain. All of these EGF-like polypeptides are believed to be released from cells via proteolytic processing of their transmembrane precursors. However, some evidence exists that these growth factors are biologically active in their cell-anchored transmembrane forms (39, 50). In addition to the aforementioned polypeptide mitogens, another heparin-binding growth factor which acts through the EGF receptor has been discovered, called schwannoma-derived growth factor (51), and is believed to be the rat homolog of human amphiregulin.

E. Heparan Sulfate is Necessary for Amphiregulin- and HB-EGF-Induced Signaling by the Epidermal Growth Factor Receptor

Relatively high concentrations of soluble heparin have been demonstrated to inhibit the mitogenic activity of amphiregulin (11, 42) and to inhibit the binding of HB-EGF to the EGF receptor (47). This phenomenon appears to be somewhat specific since chondroitin sulfate was only slightly inhibitory (11, 47). Conversely, the bioactivity of betacellulin is not affected by soluble heparin (49). Since growth factors are unlikely to ever encounter the highly negatively charged GAG, heparin, *in vivo* (2), it was not initially clear whether the inhibition of amphiregulin and HB-EGF action by heparin was of any physiological significance. In this regard it is worth noting that soluble HS was as equally effective as heparin at inhibiting amphiregulin-induced cell growth (11). To test the hypothesis that amphiregulin and HB-EGF utilized the heparin-related GAG, HS, to activate the EGF receptor, a number of approaches were used. Treatment of cells with chlorate, an inhibitor of ATP-sulfurylase, blocks sulfation of GAGs (24). The ability of amphiregulin to trigger autophosphorylation of the EGF receptor and to induce mitogenesis is blocked by chlorate treatment of MCF-10A human mammary epithelial cells (11). Most importantly, these responses to amphiregulin are rescued by adding 5 mM sodium sulfate to the culture medium confirming that chlorate functions specifically to inhibit sulfation. Chlorate treatment of bovine aortic smooth muscle cells (BASMCs) and chinese hamster ovary (CHO) cells inhibits HB-EGF-evoked BASMC migration and binding of radiolabeled HB-EGF to EGFR-devoid CHO cells (12). Exposure of cells to the GAG-degrading enzymes heparinase (EC 4.2.2.7)

HB-EGF(12, 46, 47)、ベータセルリン(48, 49)がある。アンフィレグリン、HB-EGF、ベータセルリンは、固相化されたヘパリンに結合するが、EGFとTGF- α は結合しないことが示されている。アンフィレグリン、HB-EGFと比較すると、ベータセルリンのヘパリンへの結合は弱い(49)。これらの成長因子のすべてが、特徴的なEGF様ドメインを含んでおり、それは、等間隔に存在している6つのシステイン残基によりジスルフィド結合が形成され、それによって3つのループが生じている。アンフィレグリンとHB-EGFの場合は、これらのすべての成長因子は、EGF様ドメインと比べると、長さの異なる非常に塩基性のN末端伸長配列を持っている。これらのすべてのEGF様ポリペプチドは、膜を貫通した前駆体がタンパク分解酵素によるプロセッシングをうけて、細胞より遊離すると考えられている。しかし、成長因子は、膜を貫通して細胞に結合した型で生物学的に活性であるという証拠もある(39, 50)。さらに、前述のポリペプチドの分裂促進因子の他にもう1つ、EGFレセプターを通して作用する、シュワン細胞腫由来成長因子(51)と呼ばれているヘパリン結合成長因子が見つけれられ、ラットのそれはヒトのアンフィレグリンのホモログであると考えられている。

E. ヘパラン硫酸は、アンフィレグリンと HB-EGF が誘導する、上皮細胞増殖因子(EGF)レセプターによるシグナル伝達に必要である

比較的高濃度の可溶性のヘパリンはアンフィレグリンの分裂促進活性(42)、および、HB-EGFとEGFレセプターの結合を阻害することが示されている(47)。コンドロイチン硫酸ではわずかに阻害がかかるにすぎないので(11, 47)、この現象は幾分特異的であるようだ。逆に、ベータセルリンの生物活性は可溶性のヘパリンによって影響を受けない(49)。成長因子は、*in vivo*では、高度に負に荷電したGAGであるヘパリンと接触しないので(2)、ヘパリンによるアンフィレグリンやHB-EGFの作用の阻害が、生理的に意義があるかどうかははじめは不明であった。この点に関して、アンフィレグリンにより誘導される細胞成長を阻害するのに、可溶性のHSが可溶性のヘパリンに匹敵するほど有効であるということは特に指摘する価値がある(11)。アンフィレグリンとHB-EGFがEGFレセプターを活性化するために、ヘパリン関連GAGであるHSが必要であるという仮説を検証するため、数多くのアプローチがなされた。ATP-スルフリラーゼのインヒビターである塩素酸塩で細胞を処理すると、GAGsの硫酸化が阻害される(24)。EGFレセプターの自己リン酸化を引き起こし細胞分裂を誘導するアンフィレグリンの活性は、ヒト乳腺上皮細胞であるMCF-10Aの塩素酸処理により阻止される(11)。非常に重要なのは、これらのアンフィレグリンに対する反応性が5 mM 硫酸ナトリウムを培養培地に添加することによって回復することであり、塩素酸が硫酸化を特異的に阻害していることが確認できる。ウシ大動脈平滑筋細胞(BASMCs)とチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を塩素酸で処理すると、HB-EGFにより引き起こされるBASMCの移動や、アイソトープ標識HB-EGFのEGFレセプター欠損CHO細胞への結合が阻害される(12)。細胞をGAG分解酵素であるヘパリナーゼ(EC 4.2.2.7)やヘパリチナーゼ(EC 4.2.2.8)に曝すと、細胞

or heparitinase (EC 4.2.2.8) cleave distinct sites within cell surface HS chains (52). Digestion of HS chains with either of these enzymes inhibits AR-induced activation of the EGF receptor and mitogenesis, but has no effect on EGF-dependent responses (11). Binding of ^{125}I -HB-EGF to the EGF receptor and HB-EGF stimulation of BASMC motility are also inhibited by treatment of cells with heparinase (12, 47). Additionally, binding of radiolabeled HB-EGF to mutant CHO cells deficient in HS production is significantly reduced relative to wild type CHO cells (12). HS proteoglycan is necessary for amphiregulin- and HB-EGF-triggered autophosphorylation of tyrosine residues in the COOH-terminal tail of the EGF receptor (11, 53). Taken together, these data demonstrate that amphiregulin and HB-EGF require extracellular HS proteoglycan for EGF receptor binding and signal transduction. The data does not rule out the possibility that the requisite HS proteoglycan(s) may also exist and function within extracellular matrix which is synthesized by the cells. It is not clear whether amphiregulin and HB-EGF utilize a common HS proteoglycan to activate the EGF receptor. Further, AR and HB-EGF may exploit distinct structures within certain HS chains for their bioactivity. Preliminary experiments studying the mitogenic response of MCF-10A cells to amphiregulin and HB-EGF indicated that amphiregulin was significantly more potent suggesting that these two activators of the EGF receptor may necessitate discrete HS proteoglycans or HS structures for function (G. R. Johnson, unpublished observations). Consistent with this view is the finding that HS-containing CD44 isoforms are able to bind HB-EGF, but do not bind amphiregulin (54).

F. Regions in Amphiregulin and HB-EGF that Are Involved in the Interaction with Heparin

In contrast to EGF and TGF- α , amphiregulin, HB-EGF and betacellulin contain an NH_2 -terminal extension relative to their EGF-like domain. In the case of betacellulin, which binds weakly to heparin and whose bioactivity is not inhibited by heparin, this region is not essential for bioactivity nor for heparin binding (49). However, this NH_2 -terminal extension appears to be critical to the ability of amphiregulin and HB-EGF to activate the EGF receptor and induce responses in target cells. As seen in Fig. 1, this region of amphiregulin and HB-EGF is rich in lysine and arginine residues. Previous work from my laboratory has demonstrated that residues 26–44 of amphiregulin (underlined in Fig. 1) bind to heparin and can block the ability of amphiregulin to interact with immobilized heparin (11). Since HS is just as effective as heparin at inhibiting amphiregulin-evoked mitogenesis (11), it is very likely that residues 26–44 of AR bind to HS in an analogous manner. Similar studies using synthetic peptides and recombinant mutant forms of HB-EGF indicated that a region of 21 amino acids running from residues 21–41 of HB-EGF (underlined, Fig. 1) is responsible for the

表面の HS 鎖内の異なる部位が切断される(52)。どちらかの酵素で HS 鎖を消化すると、アンフィレグリンに誘導された EGF レセプターの活性化と細胞分裂が阻害されるが、EGF に依存した反応には影響を与えない(11)。EGF レセプターへの ^{125}I -HB-EGF の結合と、HB-EGF により刺激されて起こる BASMC の移動もまた、細胞のヘパリナーゼ処理により阻害される(12, 47)。加えて、アイソトープで標識された HB-EGF の HS 産生能の欠損した変異株 CHO 細胞への結合は、野生型 CHO 細胞に比べて有意に低下している(12)。HS プロテオグリカンは、EGF レセプターの C 末端に存在するチロシン残基の、アンフィレグリンと HB-EGF に引き起こされる自己リン酸化反応に必要である(11, 53)。総合して、これらの結果は、アンフィレグリンと HB-EGF が、EGF レセプターと結合してシグナルを伝達するために、細胞外 HS プロテオグリカンが必要であるということを示している。これらの結果は、細胞により合成される細胞外マトリクス内に活性に必須の HS プロテオグリカンが存在し機能しているという可能性を否定することはできない。アンフィレグリンと HB-EGF が EGF レセプターを活性化するために共通の HS プロテオグリカンを要求するかどうかは不明である。さらに、アンフィレグリンと HB-EGF はそれらの生物活性を発揮するために、ある一定の HS 鎖中の異なった構造を利用しているのかもしれない。MCF-10A 細胞のアンフィレグリンと HB-EGF に対するマイトジェニックな反応を調べる予備的な実験は、アンフィレグリンの方がより強力であることを示しており、そのことは EGF レセプターのこれら2つのアクチベーターが機能するためには、別々の HS プロテオグリカン、あるいは別々の HS の構造を必要としているのかもしれないことを示唆している(G. R. Johnson, 未発表)。この見解は、HS を含む CD44 のアイソフォームが、HB-EGF とは結合できるがアンフィレグリンとは結合しないという知見とも一致している(54)。

F. ヘパリンと相互作用に関与するアンフィレグリンと HB-EGF 中の領域

EGF、TGF- α と比較して、アンフィレグリン、HB-EGF、ベータセルリンは、EGF 様ドメインの N 末端側に伸長配列を含んでいる。ヘパリンと弱く結合し、その生理活性がヘパリンで阻害されないベータセルリンの場合は、この領域は生物活性や、ヘパリンとの結合に必須ではない(49)。しかしながら、N 末端に存在する伸長配列は、アンフィレグリンや、HB-EGF が EGF レセプターを活性化し、標的細胞に応答を引き起こすのに非常に重要である。図1のように、アンフィレグリンと HB-EGF 中のこの領域には、リジンとアルギニン残基が多く含まれている。

著者の研究室の以前の研究は、アンフィレグリン由来(Fig. 1の下線部)の 26–44 番目の残基(図1の下線部)がヘパリンと結合し、アンフィレグリンと固相化したヘパリンとの相互作用を阻害できることを示した(11)。HS はヘパリン同様、アンフィレグリンにより引き起こされた細胞分裂を阻害するのに有効であるので(11)、アンフィレグリンの 26–44 番目残基と HS はよく似た様式で結合する可能性が大である。合成ペプチドとリコンビナントの変異体 HB-EGF を用いた同様の研究で、HB-EGF の 21–41 番目の 21 アミノ酸残基からなる領域(図1の下線部)が、

B.

297

apart facing opposite directions of an α -helix with basic residues dispersed between these two residues. An amphipathic structure is generated with basic residues on one side of the helix and nonpolar residues on the other. A similar spatial arrangement is compatible with a β -sheet structure that binds heparin. Alignment of these linear sequences demonstrated that the α -helix structures contain two basic residues separated by 12 amino acid residues, whereas the two basic residues are separated by 6 amino acid residues in the β -sheet structures (62). This model appears to be consistent with the experimentally determined heparin-binding domains of amphiregulin and HB-EGF.

G. A Proposed Mechanism for the Role of HS Proteoglycan in Amphiregulin-Induced Activation of the EGF Receptor

Much of our understanding of how HS proteoglycan can function as an accessory protein to facilitate the biological action of growth factors is derived from studies on the FGF family of growth factors. However, based upon the currently available data, there appears to be several differences between the mechanisms that FGF and amphiregulin utilize to activate their respective receptors. These differences are as follows: i) heparin/HS at the appropriate concentrations can act to potentiate the activity of FGF, whereas heparin/HS always functions as an inhibitor of amphiregulin bioactivity, presumably due to masking of the heparin-binding site in amphiregulin; ii) soluble heparin/HS can substitute for the presence of the HS proteoglycan and can reconstitute the biological action of FGF, but not that of amphiregulin, in cells which lack the requisite HS proteoglycan (11, 24); and iii) FGF is monovalent in the sense that each FGF molecule binds one receptor monomer in the activated signaling receptor dimer, whereas ligands for the EGF receptor are bivalent and a single molecule can bind simultaneously to two receptor molecules (63). Treatment of cells with PI-specific phospholipase C had no effect on amphiregulin-induced mitogenesis suggesting that the HS chains essential for amphiregulin function are not PI-anchored to the cell surface (11). Additionally, the HS chains do not appear to be conjugated to the EGF receptor itself (11). Thus, the HS proteoglycan is probably a cell surface integral membrane protein similar to the syndecan family of HS proteoglycans. Due to the fact that soluble heparin/HS cannot rescue the amphiregulin response in cells which are deficient in HS proteoglycan indicates that the HS chains need to be tethered to the surface of the cells. This situation is analogous to the role that betaglycan plays in presenting TGF- β to the TGF- β type II receptor in which betaglycan needs to be tethered to the cell surface for TGF- β action (13). Amphiregulin can compete, albeit weakly, for the specific binding of radiolabeled EGF to immobilized plasma membrane preparations suggesting the possibility that some binding of AR may occur directly to the EGF receptor

の残基間に塩基性のアミノ酸が分散している。ヘリックスの一方側に存在する塩基性アミノ酸と他方側に存在する非極性のアミノ酸残基によって、両親媒性の構造がつくりだされる。ヘパリンに結合するベータシート構造においても、同様の空間的な配置が見られる。これらの一次配列の並びは、 α -ヘリックス構造は12のアミノ酸残基により隔てられた2つの塩基性アミノ酸を含み、ベータシート構造では2つの塩基性アミノ酸残基が6つのアミノ酸残基により隔てられていることを示している(62)。このモデルが、アンフィレグリンと HB-EGF の実験的に決められたヘパリン結合ドメインと一致していることが明らかとなっている。

G. アンフィレグリンにより誘導される EGF レセプターの活性化における HS プロテオグリカンの役割のために提唱された機構

成長因子の生物学的な作用を促進するために、HS プロテオグリカンが補助タンパク質としてどのようにして機能するのかについての多くの知見は、成長因子の FGF ファミリーの研究より得られた。しかしながら、現在あるデータに基づく、FGF とアンフィレグリンが、それぞれのレセプターを活性化するために使う機構の間には、いくらかの違いがあることが明らかである。これらの違いは以下のようなものである。i) 適度な濃度のヘパリン/HS は、FGF については、活性を高めるように作用するが、アンフィレグリンについては、おそらく、アンフィレグリンのヘパリン結合領域をマスクすることにより、その生物活性の阻害物質として機能する。ii) 可溶性のヘパリン/HS は HS プロテオグリカンの代用となり、必須である HS プロテオグリカンを欠いた細胞において、FGF の生物活性を構築できるが、アンフィレグリンの活性は構築できない(11, 24)。iii) 1つの FGF 分子は、活性化された二量体において1つのレセプター単量体と結合するので、FGF は一価といえるが、EGF レセプターのリガンドは二価であり、一分子は同時に2つのレセプター分子に結合する(63)。細胞を PI 特異的ホスホリパーゼ C で処理しても、アンフィレグリンにより誘導される細胞分裂には影響を与えないことより、アンフィレグリンの機能に必須の HS 鎖は、細胞表面に PI アンカーによって結合していないことを示唆している(11)。さらに、EGF レセプター自身には結合していないことが明らかになった(11)。それゆえ、HS プロテオグリカンは、おそらく、シンデカンファミリーの HS プロテオグリカンのような細胞表面の必須の膜タンパク質である。可溶性のヘパリン/HS により、HS プロテオグリカンを欠いた細胞におけるアンフィレグリンの反応を回復できないということは、HS 鎖が細胞表面に結合している必要があることを示している。これは、TGF- β を TGF- β タイプ II レセプターに提示するベータグリカンの役割と類似しており、TGF- β の作用を発揮させるためには、ベータグリカンは細胞表面に結合している必要がある(13)。アンフィレグリンが、アイソトープで標識した EGF と固相化された形質膜との特異的な結合と、弱いながらも競合できることは、アンフィレグリンのうちの分子は、細胞表面に正しい方向に埋

Fig. 2. A proposed mechanism for the role of HS proteoglycan in amphiregulin-triggered activation of the EGF receptor. The model represents a proposed mechanism for the cell surface activation of the EGF receptor by amphiregulin (AR) based upon the currently available data. HSPG represents an integral membrane heparan sulfate proteoglycan and TK represents the cytoplasmic tyrosine kinase domain of the EGF receptor. Depicted at the bottom of the figure is a complex of HSPG, AR and activated dimerized EGF receptor containing multiple autophosphorylated tyrosine residues (P) within the COOH-terminal tail of the receptor. The pathway depicted on the left is called the presentation mechanism, whereas the pathway depicted on the right is called the stabilization mechanism of amphiregulin action.

without the properly oriented cell surface HS chains (40). Based upon all of this information, a mechanism for the action of amphiregulin can be proposed (Fig. 2). Note that amphiregulin is depicted as a structure with a round compact EGF-like domain and an NH₂-terminal extension containing the HS-binding region. Amphiregulin can initially bind to either the HS proteoglycan (HSPG) or to the ligand binding site of the EGF receptor. When amphiregulin binds first to HS proteoglycan, the HS chains can then present amphiregulin in the proper spatial orientation to the EGF receptor. Once amphiregulin has been presented to the receptor monomer, dimerization, autophosphorylation and activation of and signaling by the EGF receptor follows. This can be considered or called the presentation mechanism of amphiregulin action. When the amphiregulin molecule binds first to the ligand-binding site of the EGF receptor, the HS chains of the proteoglycan can bind to amphiregulin and stabilize the interaction between ligand and receptor at the cell surface. This also rapidly leads to activation and signaling by the EGF receptor. This pathway is called the stabilization mechanism of amphiregulin action. One potential difference between amphiregulin and HB-EGF is that in cells which are deficient in HS proteoglycan binding of HB-EGF to the receptor can be reconstituted by soluble heparin

め込まれた HS 鎖なしでも、EGF レセプターと直接的に結合するのかもしれない(40)。これらの情報のすべてより、アンフィレグリンの作用の機構を提唱することができる(図 2)。アンフィレグリンが球状の EGF 様ドメインとヘパリン結合領域を含む N 末端の伸長配列を持つ構造として、描かれていることに、注目せよ。アンフィレグリンは、最初にヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)にでも EGF レセプターのリガンド結合領域にでも結合することができる。まず始めに、アンフィレグリンが HS プロテオグリカンと結合する場合には、次に、HS 鎖はアンフィレグリンを EGF レセプターに結合しやすいような空間配置で提示する。一旦、アンフィレグリンがレセプターの単量体に提示されると、二量体化、自己リン酸化、EGF レセプターの活性化とシグナル伝達が順に起こる。これは、アンフィレグリンによる作用発現のための機構だと考えられ、また、そう呼ばれている。アンフィレグリン分子が、まず EGF レセプターのリガンド結合領域に結合したときには、プロテオグリカンの HS 鎖がアンフィレグリンと結合することができるようになり、細胞表面のリガンドとレセプター間の相互作用を安定化する。これが、また、迅速に EGF レセプターの活性化とシグナル伝達を引き起こす。この経路は、アンフィレグリンの作用の安定化機構であると呼ばれている。アンフィレグリンと HB-EGF の考えられる違いは、HS プロテオグリカン欠損細胞で、HB-EGF のレセプターへの結合が可溶性のヘパリンにより回復するという点である(53)。HB-EGF の生物活性が回復するかどうかは示されていない

(53). Whether HB-EGF bioactivity can be recovered has not been demonstrated. While the aforementioned discussion and mechanism focused on amphiregulin, this mechanism may be, at least partially, applicable to HB-EGF also.

H. Conclusions

The importance of proteoglycans in growth factor action is now being widely recognized. In addition to their importance in facilitating the ability of the growth factor to activate their signal-transducing receptor, proteoglycans provide an important regulatory function in the control of growth factor action. For example, for an FGF molecule to act at a specific site *in vivo*, both the appropriate FGF receptor and proteoglycan need to be expressed and the FGF, receptor and proteoglycan need to come together in the correct spatial orientation. Thus, this level of regulation is very likely to be critical in biological processes such as development whereby growth factor function can be controlled by the temporal and spatial expression of these three components. A variation on this basic theme was recently demonstrated in which the developmental regulation of neural response to the FGFs is controlled by HS proteoglycan structure (64). HS proteoglycan within the neuroepithelium of mouse embryos switches between day 9 and 11 of development from a form which binds FGF-2 preferentially to a form which prefers to bind FGF-1.

The utilization of HS proteoglycan as a regulatory protein for the control of EGF receptor function *in vivo* appears to be very likely. Ligands for this receptor such as EGF and TGF- α do not require HS proteoglycan to activate the receptor, in contrast to amphiregulin and HB-EGF which do. The necessity of HS proteoglycan for amphiregulin and HB-EGF action may provide another level of specificity and control for ligand-dependent signaling by this receptor. A number of important questions still remain in this regard. What is the essential HS proteoglycan? Is it limited to one proteoglycan or several? Can it function to facilitate growth factor activation of the EGF receptor as part of the basement membrane or extracellular matrix? What are the essential structures within the HS chains? From a more general standpoint, can specific inhibitors be designed and developed which can be used therapeutically to interfere with HS proteoglycan-dependent growth factor bioactivity? Further studies are clearly warranted in this relatively new and exciting area of biological research.

い。前述の議論と作用機構は、アンフィレグリンに焦点を当てたが、この機構が、少なくとも部分的には、HB-EGFにも適応できるだろう。

H. 結論

プロテオグリカンの成長因子の作用における重要性が、現在、広く認識されつつある。シグナル伝達レセプターを活性化する成長因子を賦活化するという重要性に加えて、プロテオグリカンは、成長因子の作用を調節する、重要な制御機能を与える。例えば、FGF 分子が、*in vivo* において、特定の部位で作用するには、適切な FGF レセプターとプロテオグリカンが共に発現している必要があり、FGF とレセプターとプロテオグリカンの三者が、正確な空間的配向をとることが必要である。それゆえ、このようなレベルでの制御は、発生のような生物学的過程において決定的に重要であり、そこでは成長因子の機能は、これら三成分の時間的、空間的発現により調節されている。この基本的な課題は、最近、FGF に対する神経反応の分化段階の制御が、HS プロテオグリカンの構造によって調節されていることがわかり、違った局面を迎えている(64)。マウス胚の神経上皮細胞中の HS プロテオグリカンは、9 から 11 日齢の間の分化段階で、FGF-2 と優位に結合する型から、FGF-1 に結合する型に変化する。

生体内で、EGF レセプターの機能を調節する調節蛋白質として、*in vivo* で HS プロテオグリカンが利用されていることは、非常にありそうなことである。EGF と TGF- α のようなリガンドは、アンフィレグリンと HB-EGF とは対照的に、レセプターを活性化するのに、HS プロテオグリカンを必要としない。アンフィレグリンと HB-EGF の作用に HS プロテオグリカンが必要であることによって、リガンドに依存したシグナル伝達にもう 1 つのレベルの特異性を賦与し、調節を可能とする。この事に関して、多くの重要な問題が、現在も残っている。必須の HS プロテオグリカンとは何であるか？それは、1 つのプロテオグリカンに限られるのか、それとも幾つかの種類が存在するのか？基底膜や細胞外マトリクスの一部として、EGF レセプターの成長因子による活性化を可能にするように機能するのか？HS 鎖中の必須の構造はなんであるか？一般的な立場より、HS プロテオグリカンに依存した成長因子の生理活性を阻害する特異的インヒビターが、デザインされ開発されて、治療に利用されるのだろうか？このような比較的新しく、刺激的な生物学の分野において、さらなる研究が求められている。

神戸薬科大学・生化学教室
灘中 里美、菅原 一幸 共訳

References

1. Yanagishita, M., and Hascall, V.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9451–9454
2. Ruoslahti, E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13369–13372
3. Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1991) *Cell* **64**, 867–869
4. Jackson, R.L., Busch, S.J., and Cardin, A.D. (1991) *Physiol. Rev.* **71**, 481–539
5. Esko, J., Rostand, K.S., and Weinke, J.L. (1988) *Science* **241**, 1092–1096

6. Noonan, D., Fulle, A., Vallenta, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y., and Hassel, J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22939–22947
7. Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M.T., Spring, J., Gallo, R.L., and Lose, E.J. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 365–393
8. David, G. (1993) *FASEB J.* **7**, 1023–1030
9. Klagsbrun, M., and Baird, A. (1991) *Cell* **67**, 229–231
10. Gitay-Goren, H., Soker, S., Vlodavsky, I., and Neufeld, G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6093–6098
11. Johnson, G.R., and Wong, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27149–27154
12. Higashiyama, S., Abraham, J.A., and Klagsbrun, M. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 933–940
13. Lopez-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L., and Massague, J. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 557–568
14. Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990) *Cell* **61**, 203–212
15. Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1992) *Neuron* **9**, 383–391
16. Heldin, C.-H. (1995) *Cell* **80**, 213–223
17. Schlessinger, J. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 273–275
18. Davis, R.J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14553–14556
19. Davis, R.J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 470–473
20. Marshall, C.J. (1995) *Cell* **80**, 179–185
21. Darnell, J.E., Kerr, I.M., and Stark, G. R. (1994) *Science* **264**, 1415–1421
22. Burgess, W.H., and Maciag, T. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 575–606
23. Basilico, C., and Moscatelli, D. (1992) *Adv. Cancer Res.* **59**, 115–165
24. Rapraeger, A.C., Krufka, A., and Olwin, B.B. (1991) *Science* **252**, 1705–1708
25. Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., and Ornitz, D.M. (1991) *Cell* **64**, 841–848
26. Roghani, M., Mansukhani, A., Dell'Era, P., Bellosta, P., Basilico, C., Rifkin, D.B., and Moscatelli, D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3976–3984
27. Kan, M., Wang, F., Xu, J., Crabb, J.W., Hou, J., and McKeegan, W.L. (1993) *Science* **259**, 1918–1921
28. Turnbull, J., Fernig, D., Ke, Y., Wilkinson, M., and Gallagher, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10337–10341
29. Habuchi, H., Suzuki, S., Saito, T., Tamura, T., Harada, T., Yoshida, K., and Kimata, K. (1992) *Biochem. J.* **285**, 805–813
30. Maccarana, M., Casu, B., and Lindahl, U. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23898–23905
31. Guimond, S., Maccarana, M., Olwin, B.B., Lindahl, U., and Rapraeger, A. C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23906–23914
32. Aviezer, D., Levy, E., Safran, M., Svahn, C., Buddeke, E., Schmidt, E., David, G., Vlodavsky, I., and Yayon, A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 114–121
33. Walker, A., Turnbull, J.E., and Gallagher, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 931–935
34. Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., and Yayon, A. (1994) *Cell* **79**, 1005–1013
35. Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J., and Lax, I. (1994) *Cell* **79**, 1015–1024
36. Carpenter, G., and Cohen, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7709–7712
37. Hunter, T. and Cooper, J. A. (1981) *Cell* **24**, 741–752
38. Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M.E., Chen, E.Y., and Goeddel, D.V. (1984) *Cell* **38**, 287–297
39. Massague, J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21393–21396
40. Shoyab, M., Plowman, G.D., McDonald, V.L., Bradley, J.G., and Todaro, G.J. (1989) *Science* **243**, 1074–1076
41. Plowman, G.D., Green, J.M., McDonald, V.L., Neubauer, M.G., Disteche, C.M., Todaro, G.J., and Shoyab, M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1969–1981
42. Cook, P.W., Mattox, P.A., Keeble, W.W., Pittelkow, M. R., Plowman, G.D., Shoyab, M., Adelman, J.P., and Shipley, G.D. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2547–2557
43. Johnson, G.R., Saeki, T., Gordon, A.W., Shoyab, M., Salomon, D. S., and Stromberg, K. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 741–751
44. Johnson, G.R., Kannan, B., Shoyab, M., and Stromberg, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2924–2931
45. Johnson, G.R., Prigent, S.A., Gullick, W.J., and Stromberg, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18835–18843
46. Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddles, J.C., and Klagsbrun, M. (1991) *Science* **251**, 936–939
47. Besner, G.E., Whelton, D., Crissman-Combs, M.A., Steffen, C.L., Kim, G.Y., and Brigstock, D.R. (1992) *Growth Factors* **7**, 289–296
48. Shing, Y., Christofori, G., Hanahan, D., Ono, Y., Sasada, R., Igarashi, K., and Folkman, J. (1993) *Science* **259**, 1604–1607
49. Watanabe, T., Shintani, A., Nakata, M., Shing, Y., Folkman, J., Igarashi, K., and Sasada, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9966–9973
50. Ono, M., Raab, G., Lau, K., Abraham, J.A., and Klagsbrun, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31315–31321
51. Kimura, H., Fischer, W.H., and Schubert, D. (1990) *Nature* **348**, 257–260
52. Ototani, N., Kikuchi, M., and Yoshizawa, Z. (1981) *Carbohydr. Res.* **88**, 291–303
53. Aviezer, D., and Yayon, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12173–12177
54. Bennett, K.L., Jackson, D.G., Simon, J.C., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G., and Aruffo, A. (1995) *J. Cell Biol.* **128**, 687–698
55. Thompson, S.A., Higashiyama, S., Wood, K., Pollitt, N. S., Damm, D., McEnroe, G., Garrick, B., Ashton, N., Lau, K., Hancock, N., Klagsbrun, M., and Abraham, J. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2541–2549
56. Johnson, G. R., Saeki, T., Auersperg, N., Gordon, A.W., Shoyab, M., Salomon, D.S., and Stromberg, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 481–488
57. Saeki, T., Stromberg, K., Qi, C., Gullick, W. J., Tahara, E., Normanno, N., Ciardiello, F., Kenney, N., Johnson, G.R., and Salomon, D.S. (1992) *Cancer Res.* **52**, 3467–3473
58. Kitadai, Y., Yasui, W., Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Ayhan, A., Haruma, K., Kajiyama, G., Johnson, G.R., and Tahara, E. (1993) *Jpn. J. Cancer Res.* **84**, 879–884
59. Saeki, T., Salomon, D., Normanno, N., Johnson, G.R., Gullick, W.J., Mandai, K., Moriwaki, S., Takashima, S., Kuniyasu, M., Tahara, E., Kawami, H., Nishiyama, M., and Toge, T. (1994) *Int. J. Oncol.* **5**, 215–223

60. Qi, C.-F., Liscia, D.S., Normanno, N., Merlo, G., Johnson, G.R., Gullick, W.J., Ciardiello, F., Saeki, T., Brandt, R., Kim, N., Kenney, N., and Salomon, D.S. (1994) *Br. J. Cancer* **69**, 903–910
61. Ebert, M., Yokoyama, M., Kobrin, M.S., Friess, H., Lopez, M.E., Buchler, M.W., Johnson, G. R., and Korc, M. (1994) *Cancer Res.* **54**, 3959–3962
62. Margalit, H., Fischer, N., and Ben-Sasson, S.A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19228–19231
63. Lemmon, M.A. and Schlessinger, J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 459–463
64. Nurcombe, V., Ford, M.D., Wildschut, J.A., and Bartlett, P.F. (1993) *Science* **260**, 103–106

Received on April 10, 1995, accepted on April 21, 1995