

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390082

研究課題名（和文） 膜型増殖因子アンフィレグリンとエピレグリンのカルボキシ末端断片シグナルの解明

研究課題名（英文） Functional analysis of carboxy-terminal peptide signaling of pro-amphiregulin and pro-epiregulin

研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・教授

研究者番号：60202272

研究成果の概要（和文）：

アンフィレグリン(AREG)とエピレグリン(EREG)は、I型膜蛋白質 proAREG と proEREG として細胞膜表面に発現する。様々な細胞外刺激は、ectodomain shedding 反応を誘導し、AREG と EREG を細胞外に放出するとともに、細胞膜に C-末端断片ペプチド AREG-CTF と EREG-CTF を残す。産生された AREG-CTF と EREG-CTF は膜貫通ドメインを保持したまま、未切断の proAREG と proEREG とともに細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれ、核膜に局在変化した。さらに、AREG-CTF と未切断 proAREG につき核膜内膜への局在を明らかにした。これらは LaminA/C と結合し、ヘテロクロマチン構造を誘導した。

研究成果の概要（英文）：

Amphiregulin (AREG) and epiregulin (EREG), members of the EGF family, are synthesized as type I transmembrane protein precursors (proAREG and proEREG) and expressed on the cell surface. Shedding of proAREG and proEREG yield transmembrane-cytoplasmic fragments (AREG-CTF and EREG-CTF), as well as soluble forms AREG and EREG. Here we demonstrated that the ectodomain shedding stimuli triggered endocytosis of both their CTFs and un-shed forms. They translocated from the plasma membrane to the nuclear membrane via retrograde membrane trafficking. Nuclear envelope localization of proAREG involves truncation of the C-terminus, which subsequently activates the ER-retrieval signal. The truncated form of proAREG interacts with A-type lamin and is retained at the inner nuclear membrane. Heterochromatin formation is then induced and global transcription is transiently suppressed. This study gives new insight into epigenetic chromatin organization in mammalian cells: a plasma-membrane-anchored growth factor is targeted to the inner nuclear membrane where it participates in dynamic chromatin organization and control of transcription.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬類

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード: amphiregulin, epiregulin, ectodomain shedding, EGF ファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が外界から様々なリガンド刺激を受

け、細胞内に情報を伝達する仕組みは、各リガンド特異的受容体の活性化と、その下流

子のリン酸化リレーとして明らかにされてきている。その中で、シグナルの多様化を作り出す一つの分子機構に、EGF 受容体のトランス活性化がある。この EGF 受容体のトランス活性化には、そのリガンドである膜型増殖因子 EGF ファミリー，特に膜型 Heparin-binding EGF-like Growth Factor (proHB-EGF) が、細胞膜表面上で膜結合型メタロプロテアーゼ ADAMs により切断される shedding 反応がキーステップであることを、私どもを含むいくつかの研究グループが提唱し、広く受け入れられている。さらに、私どもは、この HB-EGF の shedding を介する EGFR のトランス活性化は、皮膚創傷治癒、心筋肥大、拡張型心筋症等の生理・病理的反応において極めて重要な反応であることを、*in vitro* および HB-EGF 遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 解析で明らかにしてきた。

一方、shedding によって生じる遊離型細胞外ドメインは、受容体を活性化し、さらに細胞内の MAP キナーゼカスケードを活性化して増殖シグナルを惹起するが、shedding 後に細胞膜に残る C 末端断片ペプチド (CTF) の役割について、その機能は全く不明であった。最近、私どもは、HB-EGF-C 末端断片ペプチド (HB-EGF-CTF) が速やかに核内に移行し、転写抑制因子 PLZF や Bcl6 と結合し、これらの機能を抑制することを見出した。すなわち、HB-EGF-CTF が、遺伝子転写抑制解除という驚くべき生物活性を持つことを明らかにし、新たなシグナル分子として機能すると共に、新たな細胞増殖シグナル経路が存在することを示してきた。

## 2. 研究の目的

以上の様な学術的背景ならびに研究成果を踏まえ、本研究では、膜型増殖因子 EGF ファミリーの CTF シグナル全貌を理解するために、細胞外刺激にリスポンスよく shedding され、CTF 産生が確認できている Amphiregulin (AREG) と Epregeulin (EREG) の CTF シグナルを明らかにする。さらに、HB-EGF-CTF シグナルと詳細に比較検討することにより、EGF ファミリーの CTF シグナル解明を目指す。

## 3. 研究の方法

これまでの予備実験で、Amphiregulin (AREG) と Epregeulin (EREG) の CTF 共に、膜貫通領域を保持したままのサイズで検出されることを確認している。このことは AREG-CTF, EREG-CTF 共に、HB-EGF-CTF 同様に細胞内オルガネラの膜面分に局在することを示唆している。また、AREG-GFP, EREG-GFP (共に C-末端側に GFP を融合させたもので、shedding 誘導後に AREG-CTF-GFP, EREG-CTF-GFP が産生される) 両者共に

shedding 後に細胞内のある特定の部位に局在変化することを見出している。以上のことは AREG-CTF, EREG-CTF 共に独自のシグナル分子として機能することを強く示唆している。そこで、本研究では AREG-CTF および EREG-CTF シグナルの分子機構を明らかにするため以下 3 項目につき解析する。

1) AREG-CTF ならびに EREG-CTF の細胞内局在の解析: shedding 後の AREG-CTF ならびに EREG-CTF の細胞内局在部位 (特に膜構造に注目) を蛍光顕微鏡ならびに電子顕微鏡レベルで明らかにする。

2) AREG-CTF ならびに EREG-CTF の結合蛋白質の同定: AREG-CTF ならびに EREG-CTF の結合蛋白質を免疫沈降法ならびに質量分析法により同定し、機能推定を行う。

3) AREG-CTF ならびに EREG-CTF による細胞増殖制御の解析: AREG-CTF ならびに EREG-CTF ミュータントならびに独立操作システムを開発し、細胞増殖をいかに制御するか解析する

## 4. 研究成果

### (1) AREG-CTF の細胞内局在の解析:

AREG-CTF の細胞内局在を解析するために、pro-form の N-末端領域 (NTF) と CTF 領域に対する特異的抗体 ( $\alpha$ AREG-N および  $\alpha$ AREG-C) を用いて免疫染色を行った。図 1 は proAREG/AREG-CTF の細胞内局在挙動を示す。図 1 B, C に示す様に、shedding 刺激無し (TPA-) では、 $\alpha$ AREG-N および  $\alpha$ AREG-C により主にゴルジ/ER に加え、細胞膜が染色された。また、新規蛋白質合成阻害剤サイクロヘキシミド (CHX) 存在下では、主に細胞膜が染色された。一方、shedding 刺激下 (TPA+) では、両抗体により、ER を含む核膜周辺が染色された。このことから、AREG-CTF のみならず、shedding を受けていない proAREG (unshed-proAREG, 図 1 A 参照) も細胞内に局在を変えていることが示唆された。

そこで、核膜周辺での局在部位を明らかにするため、細胞をあらかじめ digitonin のみ、および digitonin/Triton X100 の両方の detergent で処理をした後に、免疫染色を行った結果、 $\alpha$ AREG-C で核膜を鮮明に染色することができた (図 1 D)。さらに、免疫電子顕微鏡解析を行うために、V5 タグを C-末端側に挿入した proAREG-V5 を細胞に強制発現した。shedding 刺激下 (TPA+) で、V5 抗体を用いて免疫電子顕微鏡解析を行った結果、図 1 E に示す様に、核膜内膜にシグナルを検出した。これらの結果は、AREG-CTF または unshed-proAREG が shedding 刺激により、その細胞内局在を細胞膜から、核膜内膜へと変えることを示唆する。

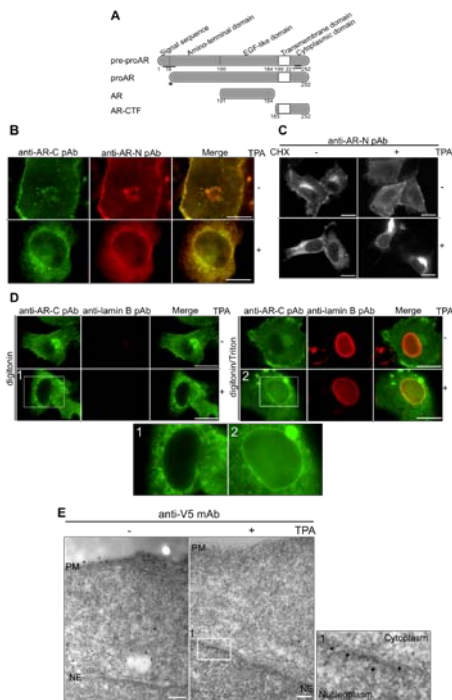


図 1 : HeLa 細胞での強制発現 proAREG の免疫染色。(A) proAREG およびそのフラグメントスキーム。(B、C) shedding 刺激前後での  $\alpha$ AREG-N および  $\alpha$ AREG-C による免疫染色像。(D) Digitonin および digitonin/TritonX100 処理下での shedding 刺激前後での  $\alpha$ AREG-N および  $\alpha$ AREG-C による免疫染色像。(E) shedding 刺激前後での  $\alpha$ V-5 による免疫電子顕微鏡像。

## (2) AREG-CTF の結合蛋白質の同定

$\alpha$ AREG-C による免疫染色の実験過程において、核膜染色の陽性コントロールとして用いた LaminA/C の免疫染色が、 $\alpha$ AREG-C 染色陽性細胞において、明らかに減弱していた (図 2 A)。このことは、AREG-C 末端領域 と LaminA/C とが物理的相互作用をする可能性を示唆してくれる。そこで、免疫沈降法および GST プルダウン法により、まず AREG と LaminA/C との結合を検討した。その結果を、図 2 B-E に示す。まず、AREG の発現レベルの変動によって LaminA/C の蛋白質レベルは、変化することはなかった (図 2 B)。LaminA/C 特異抗体による免疫沈降物中に  $\alpha$ AREG-C によって検出される蛋白質を同定した (図 2 C)。また、この検出された蛋白質バンドは野生型 AREG の蛋白質バンドよりわずかに小さい分子量を示した。また、このバンドは shedding 刺激下 (TPA+) で増強した。一方、AREG-CTF に相当する分子量を示すバンドは検出できなかった。更なる解析から、LaminA/C と結合する AREG は C-末端領域 11 残基を消失したもの (unshed-proAREG  $\Delta$ C11) であり、この C-末端

領域 11 残基のトリミングが、LaminA/C との結合に必須であることを明らかにした。さらに、LaminA/C の AREG 結合領域を LaminA/C deletion mutant を用いた GST プルダウン法により解析した。その結果、LaminA/C 247-355 アミノ酸領域であることを明らかにした (図 2 D、E)。

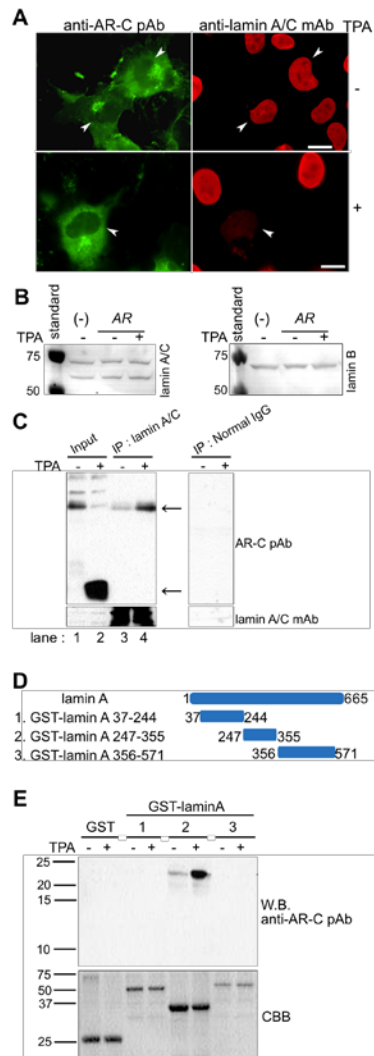


図 2 : AREG と LaminA/C の相互作用解析。(A)  $\alpha$ AREG-C および  $\alpha$ LaminA/C による免疫染色像。(B) Western blot 法による AREG 強制発現下での LaminA/C および LaminB の蛋白質発現量解析。(C) shedding 刺激前後での  $\alpha$ LaminA/C 抗体による免疫沈降物の  $\alpha$ AREG-C による Western blot 解析。(D) LaminA/C の全長および GST プルダウンに用いた deletion mutant。(E) GST プルダウンによる AREG の検出。

さらに、AREG-CTF 結合蛋白質を幅広く解析する目的で、shedding 抵抗性を示す uncleavable-proAREG mutant を作成し、shedding 刺激前後での proAREG を  $\alpha$ AREG-N に

よって免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物を、質量分析法により解析した結果、35kDaの分子量を持つ蛋白質を同定し、AREG-regulating protein 35 (ARP35)と命名した。ARP35はその蛋白質構造の相同性から、12個のメンバーを有するファミリー蛋白質の1つであることが判明した。さらに、12個のメンバーにつき AREG との結合を解析した結果、新たに3つのメンバーが AREG と結合することを明らかにした。これらの蛋白質の機能については現在解析を進めているところである。

### (3) AREG-CTF による細胞増殖制御の解析

核膜内膜に局在する unshed-proAREG-ΔC11 または AREG-CTF-ΔC11 の機能を解析するために、proAREG を強制発現した HeLa 細胞を用いて、DNAase 処理後の LaminA/C の免疫染色像の変化を検討した。その結果、unshed-proAREG-ΔC11 または AREG-CTF-ΔC11 の核膜内膜局在により抑制される LaminA/C の免疫染色強度が DNAase 処理により、明らかに回復した (図 3A)。このことは、DNA の存在様式に変化が生じていることを強く示唆している。そこでさらに、クロマチンの変化をヘテロクロマチン蛋白質 HP1b の免疫染色により、およびヒストン修飾を H3K9 のメチル化の免疫染色により検討した。

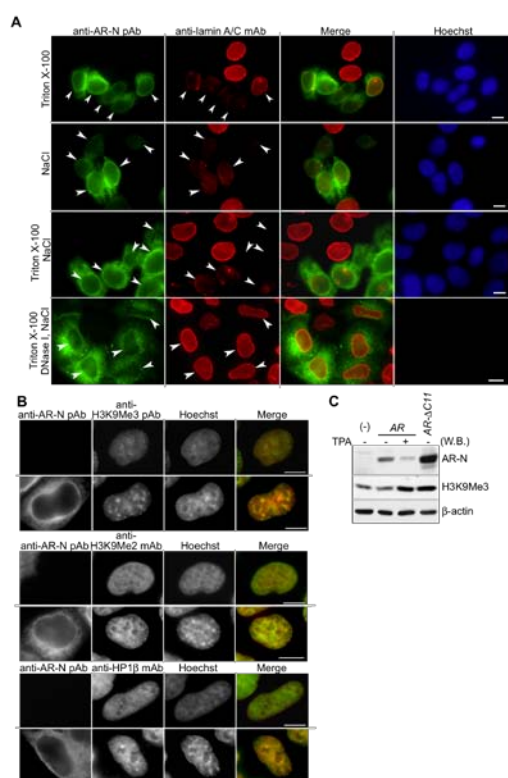


図 3 : proAREG を強制発現した HeLa 細胞での LaminA/C および HP1β の免疫染色。(A) DNAase 処理前後での proAREG および LaminA/C の免

疫染色像。(B) shedding 刺激前後での HP1β およびヒストン H3K9 のメチル化の免疫染色像。(C) shedding 刺激前後でのヒストン H3K9 のメチル化の Western blot 解析。

その結果、unshed-proAREG-ΔC11 または AREG-CTF-ΔC11 の核膜内膜への局在により、HP1β 染色強度が増強した (図 3B)。このことは、ヘテロクロマチンの形成が増大していることを示唆している。また、H3K9 のメチル化を Western blot 法により解析した結果、明らかなメチル化の上昇を観察した (図 3C)。以上の結果から、unshed-proAREG-ΔC11 または AREG-CTF-ΔC11 の核膜内膜への局在は、ヘテロクロマチン産生を増大させ、その結果、遺伝子発現をグローバルに制御する可能性を示唆している。

### (4) AREG-CTF の細胞内局在、結合蛋白質の探索・同定、および機能解析

AREG-CTF の細胞内局在および結合蛋白質の探索・同定は、AREG で行った方法に準じて同様に解析を進めた。その結果、AREG-CTF の細胞内局在は AREG-CTF と同様に、shedding 刺激により細胞膜から核膜へとその局在を変化させることを明らかにした。また、AREG-CTF は AREG-CTF と同様に shedding 刺激後に γ-secretase による切断を受けず、膜貫通領域を保持したまま、核膜へと移行することが示唆された。現在、免疫電子顕微鏡解析等を進めているところである。また、AREG 結合蛋白質として新たに同定した ARP35 ファミリー蛋白質のいくつかのメンバーが、AREG に結合することを明らかにした。現在、それらの蛋白質の機能解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Myers TJ, Higashiyama S. (7,④) Mitochondrial reactive oxygen species mediate GPCR-induced TACE/ADAM17-dependent transforming growth factor-alpha shedding. *Mol Biol Cell.* 2009, 20:5236-5249
2. Xu D, Higashiyama S. (10,⑤) Promyelocytic leukemia zinc finger protein regulates interferon-mediated innate immunity. *Immunity.* 2009, 30:802-816.
3. Isokane M, Hieda M., Higashiyama S. (8,⑧) Plasma-membrane-anchored growth factor pro-amphiregulin binds A-type lamin and regulates global transcription. *J Cell Sci.* 2008, 121:3608-3618.

[学会発表] (計 15 件)

1. 福田信治、中山寛尚、東山繁樹  
「Identification of novel molecules that regulate ectodomain shedding of EGF ligands」第 33 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 3S5:Ectodomain shedding biology-functional conversion of plasma membrane proteins-2010 年 12 月 9 日、神戸、
2. 東山繁樹、井上博文, 「C-terminal fragment signaling of proHB-EGF for protection of cardiac cell death」第 18 回 日本血管生物医学会学術集会 シンポジウム 2 : 心不全・冠動脈 2010 年 12 月 1 日、大阪、
3. 東山繁樹「増殖因子による増殖の正と負のシグナル制御機構と癌微小環境制御」第 48 回日本癌治療学会 学術集会 JSCO-JCA joint symposium 1 「がんの微小環境 (血管浸潤、がんの転移・浸潤) からのがん治療」2010 年 9 月 29 日、京都、
4. Hironao Nakayama, Shinji Fukuda, Hirofumi Inoue and Shigeki Higashiyama. “A novel amphiregulin-binding protein, ARP35, regulates the amphiregulin-ADAM17 interaction and the ectodomain shedding.” 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21-24 日、神戸 (優秀プレゼンテーション賞受賞)
5. Mayumi Isokane, Miki Hieda and Shigeki Higashiyama “Plasma membrane-anchored growth factors HB-EGF and amphiregulin targeted to the inner nuclear membrane and regulated gene expression.” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Dynamic Organization of Nuclear Function” September 17-20, 2009 Cold Spring Harbor, NY, USA
6. 福田信治 「ADAM による膜型増殖因子 shedding と cell cycle 制御」第 14 回 日本病態プロテアーゼ学会 2009 年 8 月 22 日、大阪
7. Shigeki Higashiyama “Inner nuclear membrane translocation and nuclear signaling of membrane-anchored growth factors” 第 61 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム 2009 年 6 月 2 日~4 日、名古屋
8. Shigeki Higashiyama, “Inner nuclear membrane targeting of membrane-anchored growth factors and transcriptional regulation” (Invited). Gordon Research Conference “Signal Transduction within the Nucleus”, April 1, 2009, Ventura, CA, USA
9. Shigeki Higashiyama “Nuclear signaling of

membrane-anchored growth factors and cell growth regulation” International Symposium “New Frontiers in Cancer Research” March 18, 2009, Sapporo, Hokkaido

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 新規ユビキチンリガーゼ及びその利用法

発明者: 東山繁樹、井上博文、大貫秀隆

権利者: 国立大学法人愛媛大学

種類: 特許

番号: 2009-277073

出願年月日: 2009 年 12 月 4 日

国内外の別: 国内

名称: 血管新生制御剤, 及びそのスクリーニング方法、並びにスクリーニング用キット

発明者: 東山繁樹、井上博文、大貫秀隆

権利者: 国立大学法人愛媛大学

種類: 特許

番号: 2008-208828

出願年月日: 2008 年 8 月 14 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem2/>

<http://www.proteo.ehime-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・教授

研究者番号: 60202272

(2) 連携研究者

福田 信治 (FUKUDA SHINJI)

愛媛大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号: 70398238