

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21570196

研究課題名（和文） 核膜へ輸送される細胞膜タンパク質の生理機能の解析：  
EGF ファミリーを例として研究課題名（英文） Functional analysis of nuclear envelope targeting plasma membrane  
Proteins: using EGF family proteins

研究代表者

檜枝 美紀 (HIEDA MIKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：00380254

研究成果の概要（和文）：

乳癌細胞において、EGF ファミリー分子 amphiregulin の発現は亢進し、乳がんの悪性度とも関連する。しかし EGF 受容体を介したシグナル伝達だけでは説明できない点が多い。そこで本研究では核膜局在化した amphiregulin が乳癌細胞において果たす機能を解析した。その結果、核膜局在化した amphiregulin により、クロマチン構築が制御され、さらにそのシグナルが核膜タンパク質である LINC complex を介して、細胞遊走能を活性化することが明らかになってきた。

研究成果の概要（英文）：

An EGF family member, amphiregulin, which has been suggested to play role(s) in breast cancer, is expressed on the cell surface in pro-form. Shedding stimuli result in release of soluble EGFR ligand and migration of the pro-form to the nuclear envelope. This study demonstrates that nuclear envelope-localized proAREG activates breast cancer cell migration and the activation of cell migration does not require EGFR function, but does occur concomitantly with an alteration of histone modification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能、細胞核、転写調節

## 1. 研究開始当初の背景

細胞増殖・分化に重要な役割を果たす EGF ファミリー増殖因子は膜貫通型タンパク質として細胞膜に発現し、刺激に応答して増殖因子領域を細胞外に遊離する。そして EGF 受容体を活性化することにより、増殖シグナルを細胞内へ伝える。研究開始当初、このよく知られた機能に対して、私達は EGF ファミリーの heparin binding EGF growth factor (HB-EGF) および amphiregulin が、shedding 刺激に応答して小胞輸送により核膜へ輸送されること、さらに amphiregulin の核膜局在化は、エピジェネティックな制御を介して、一過性にゲノムワイドな転写抑制を引き起こすことを見出していた。細胞外から情報を受け取る細胞膜から、遺伝情報の発現の場である核(核膜)まで、膜タンパク質そのものが小胞輸送により輸送され遺伝子発現を制御するという報告はこれまでなく、まったく新しい概念の物質輸送経路であった。そこで核膜局在化した EGF ファミリー増殖因子の機能を明らかにすることが重要であると考えられる状態であった。

## 2. 研究の目的

高等真核生物では細胞膜を介して細胞間の情報交換を行い個体の恒常性を維持している。細胞外より受け取った情報は多くの場合、遺伝情報発現の場である核へと伝えられる。『小胞輸送によって、細胞膜タンパク質が核膜に輸送され、そこで何らかの機能を担う』という概念はまったく新しいものであるが、細胞にとって外界との接点である細胞膜に存在する分子と、核との間にコミュニケーションが存在するという考えは生理的あるいは病理的な種々の現象に大きな意義を持っている。そこで核膜へ輸送される細胞膜タンパク質が、核膜において担っている機能を明らかにすることを目的として本研究を行った。

## 3. 研究の方法

核膜へ輸送される細胞膜タンパク質が、核膜において担っている機能を明らかにするために、下記の2点より研究を進めた。

- (1) EGF増殖因子 amphiregulinの発現が亢進していることが知られている乳癌に着目

し、核膜局在化したamphiregulinの機能を探ることにした。そのために、様々な amphiregulin変異体を構築し、用いた。

- (2) 細胞膜タンパク質の核膜局在化機構を明らかにし、さらに核膜の分子基盤を解析するために、核膜内膜タンパク質LAP2 $\beta$ をモデル分子として、ERから核膜内膜への移行メカニズムを解析するためのアッセイ系を構築し、その移行活性を解析した。

## 4. 研究成果

- (1) Amphiregulin の核膜局在化により乳癌細胞の遊走能が活性化することを示した。さらにこの遊走能の活性化は、amphiregulin の増殖因子領域を必要としないこと、さらに EGF 受容体を介さないことなどから、細胞質領域の機能であることを明らかにした。核膜局在化した amphiregulin において増殖因子領域は核膜の間腔に面するのに対し、細胞質量域は核質に面することとなり、その領域が何らかの機能を発揮するということが矛盾しない。
- (2) Amphiregulin の核膜局在化により細胞の遊走能が活性化するが、この時、同時にヒストンH3K9のメチル化が亢進する。そこで H3K9 のメチル化亢進ことから、真核細胞において細胞極性の形成は、細胞運動、細胞の分化など様々な細胞機能の鍵を握るため 細胞の運動活性とクロマチン構造(ヒストン修飾状態)には密接な相関関係が見られる。クロマチン構造変化による細胞極性調節機構の存在を示唆する結果を報告した。その結果、核膜タンパク質 SUN/nesprins を含む LINC complex が、クロマチン構造変化(nuclear status)を細胞質へ伝え、ゴルジ体構築を調節する候補分子であること、またこのゴルジ体構築調節には SUN1、SUN2 が共に関与することが明らかになってきた。さらに SUN2 に結合する因子として kinesin 様タンパク質および Rab6 結合タンパク質を同定した。
- (3) 核膜の分子基盤を明らかにするために、LAP2 $\cdot$ をモデルタンパク質として、核膜内膜へのタンパク質輸送アッセイ系を

構築しその輸送機構を解析した。その結果、LAP2 $\cdot$ のERから核膜内膜への輸送は、大きさ依存性を示すにも関わらず、ATPおよび可溶性因子を必要とすることが明らかになり、これまでの核輸送の概念とは大きく異なる輸送機構であることを示した。

#### 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 29 件)

1. Tanaka, H., Nishioka, Y., Yokoyama Y., Higashiyama S., Matsuura, N., Matsuura, S., Hieda, M., Nuclear envelope-localized EGF family protein amphiregulin activates breast cancer cell migration in an EGF-like domain independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012, 420, 721-726, (査読有)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.045
2. Ohzeki J-i, Bergmann JH, Kouprina N, Noskov VN, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V, and Masumoto H. (2012). Breaking the HAC Barrier: Histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J* (in press) (査読有)  
doi: 10.1038/emboj.2012.82
3. Kim J-M, To TK, Ishida J, Matsui A, Kimura H, Seki M. (2012). Transition of Chromatin Status During The Recovery Process from Drought Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53, 847-856. (査読有)  
doi: 10.1093/pcp/pcs053
4. Ushijima Y, Inoue YH, Konishi T, Kitazawa D, Yoshida H, Shimaji K, Kimura H, and Yamaguchi M. (2012). Roles of histone H3K9 methyltransferases during *Drosophila* spermatogenesis. *Chromosome Res* 20, 319-331. (査読有)  
doi:10.1007/s10577-012-9276-1
5. Yamagata K, Iwamoto D, Terashita Y, Li C, Wakayama S, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Saeki K, and Wakayama T. (2012). Fluorescence Cell Imaging and Manipulation Using Conventional Halogen Lamp Microscopy. *PLoS ONE* 7, e31638. (査読有)  
doi:10.1371/journal.pone.0031638
6. Bergmann JH, Jakubsche JN, Martins NM, Kagansky A, Nakano M, Kimura H, Kelly DA, Turner BM, Masumoto H, Larionov V, and Earnshaw WC. (2012). Epigenetic Engineering: Histone H3K9 acetylation is compatible with kinetochore structure and function. *J Cell Sci* 125, 411-421. (査読有)  
doi: 10.1242/jcs.090639
7. Brookes E, de Santiago I, Hebenstreit D, Morris KJ, Carroll T, Xie SQ, Stock JK, Heidemann M, Eick D, Nozaki N, Kimura H, Ragoussis J, Teichmann SA, and Pombo A. (2012). Polycomb Associates Genome-wide with a Specific RNA Polymerase II Variant, and Regulates Metabolic Genes in ESCs. *Cell Stem Cell* 10, 157-170. (査読有)  
doi:10.1016/j.stem.2011.12.017
8. Yokoyama, Y., Mori, S., Hamada, Y., Hieda, M., Kawaguchi, N., Shaker, M., Tao, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., Matsuura, N., Platelet-Derived Growth Factor Regulates Breast Cancer Progression via  $\beta$ -Catenin Expression. *Pathobiology* 2011, 78, 253-260 (査読有)  
doi:10.1159/000328061
9. Hagiwara A, Tanaka Y, Hikawa R, Morone N, Kusumi A, Kimura H, and Kinoshita M. (2011). Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68, 512-525. (査読有)  
doi: 10.1002/cm.20528
10. Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, Tachibana M, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, and Kimura H. (2011). Tracking epigenetic histone

- modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic Acids Res* 39, 6475-6488. (査読有)  
doi: 10.1093/nar/gkr343
11. Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, Hayashi-Takanaka Y, Oda T, Sato M, Park SY, Kimura H, and Kurumizaka H. (2011). Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* 476, 232-235. (査読有)  
doi: 10.1038/nature10258
  12. Tachiwana H, Osakabe A, Shiga T, Miya Y, Kimura H, Kagawa W, and Kurumizaka H. (2011). Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 578-583. (査読有)  
doi:10.1107/S0907444911014818
  13. Kondo T, Hamao K, Kamijo K, Kimura H, Morita M, Takahashi M, and Hosoya H. (2011). Enhancement of myosin II/actin turnover at the contractile ring induces slower furrowing in dividing HeLa cells. *Biochem J* 435, 569-576. (査読有)  
doi:10.1042/BJ20100837
  14. Yamazaki Y, Tokumasu R, Kimura H, and Tsukita S. (2011). Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. *Mol Biol Cell* 22, 1495-1504. (査読有)  
doi:10.1091/mbc.E10-12-1003
  15. To TK, Kim JM, Matsui A, Kurihara Y, Morosawa T, Ishida J, Tanaka M, Endo T, Kakutani T, Toyoda T, Kimura H, Yokoyama S, Shinozaki K, and Seki M. (2011). Arabidopsis HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. *PLoS Genet* 7, e1002055. (査読有)  
doi:10.1371/journal.pgen.1002055
  16. Liu T, Rechtsteiner A, Egelhofer TA, Vielle A, Latorre I, Cheung MS, Ercan S, Ikegami K, Jensen M, Kolasinska-Zwierz P, Rosenbaum H, Shin H, Taing S, Takasaki T, Iniguez AL, Desai A, Dernburg AF, Kimura H, Lieb JD, Ahringer J, Strome S, and Liu XS. (2011). Broad chromosomal domains of histone modification patterns in *C. elegans*. *Genome Res* 21, 227-236. (査読有)  
doi: 10.1101/gr.115519.110
  17. Bergmann JH, Rodriguez MG, Martins NM, Kimura H, Kelly DA, Masumoto H, Larionov V, Jansen LE, and Earnshaw WC. (2011). Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J* 30, 328-340. (査読有)  
doi: 10.1038/emboj.2010.329
  18. Inagaki S, Miura-Kamio A, Nakamura Y, Lu F, Cui X, Cao X, Kimura H, Saze H, and Kakutani T. (2010). Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome. *EMBO J* 29, 3496-3506. (査読有)  
doi:10.1038/emboj.2010.227
  19. Kelly AE, Ghenoiu C, Xue JZ, Zierhut C, Kimura H, and Funabiki H. (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 330, 235-239. (査読有)  
doi:10.1126/science.1189505
  20. Rechtsteiner A, Ercan S, Takasaki T, Phippen TM, Egelhofer TA, Wang W, Kimura H, Lieb JD, and Strome S. (2010). The histone H3K36 methyltransferase MES-4 acts epigenetically to transmit the memory of germline gene expression to progeny. *PLoS Genet* 6, e1001091. (査読有)  
doi:10.1371/journal.pgen.1001091
  21. Reynoird N, Schwartz BE, Delvecchio M, Sadoul K, Meyers D, Mukherjee C, Caron C, Kimura H, Rousseaux S, Cole PA, Panne D, French CA, and Khochbin S. (2010). Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally

- inactive hyperacetylated chromatin domains. *EMBO J.* 29, 2943–2952. (査読有)  
doi:10.1038/emboj.2010.176
22. Furuhashi H, Takasaki T, Rechtsteiner A, Li T, Kimura H, Checchi PM, Strome S, and Kelly WG. (2010). Trans-generational epigenetic regulation of *C. elegans* primordial germ cells. *Epigenetics Chromatin.* 3, 15. (査読有)  
doi:10.1186/1756-8935-3-15
23. Nozawa RS, Nagao K, Masuda HT, Iwasaki O, Hirota T, Nozaki N, Kimura H, Obuse C. (2010). Human POGZ modulates dissociation of HP1alpha from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nat Cell Biol* 12, 719–727. (査読有)  
doi:10.1038/ncb2075
24. Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, Kawaguchi K, Shiga T, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, and Kurumizaka H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 10454–10459. (査読有)  
doi:10.1073/pnas.1003064107
25. Hashimoto H, Takami Y, Sonoda E, Iwasaki T, Iwano H, Tachibana M, Takeda S, Nakayama T, Kimura H, and Shinkai Y. (2010). Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome architecture. *Nucleic Acids Res* 38, 3533–3545. (査読有)  
doi: 10.1093/nar/gkq076
26. Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, and Shinkai Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464, 927–931. (査読有)  
doi:10.1038/nature08858
27. Numa H, Kim JM, Matsui A, Kurihara Y, Morosawa T, Ishida J, Mochizuki Y, Kimura H, Shinozaki K, Toyoda T, Seki M, Yoshikawa M, and Habu Y. (2010). Transduction of RNA-directed DNA methylation signals to repressive histone marks in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 29, 352–362. (査読有)  
doi:10.1038/emboj.2009.374
28. Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Nozaki N, and Kimura H. (2009). Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *J Cell Biol* 187, 781–790. (査読有)  
doi: 10.1083/jcb.200904137
29. Goto Y and Kimura H. (2009). Inactive X chromosome-specific histone H3 modifications and CpG hypomethylation flank a chromatin boundary between an X-inactivated and an escape gene. *Nucleic Acids Res* 37, 7416–7428. (査読有)  
doi: 10.1093/nar/gkp860
- [学会発表] (計 12 件)
1. 野村菜美子、西岡優、松浦成昭、松浦脩治、檜枝美紀、in vitro 核膜内膜タンパク質局在化 assay 系の構築、(Development of an in vitro nuclear membrane protein targeting system)、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
  2. 野村菜美子、西岡優、松浦成昭、松浦脩治、檜枝美紀、in vitro 膜タンパク質核膜局在化アッセイ系の構築、第 10 回核ダイナミクス研究会、2011 年 10 月 27 日、クラッセホテル北広島、北海道北広島市
  3. Miki Hieda, Yuhki Yokoyama, Yu Nishioka, Hisae Tanaka, Shigeki Higashiyama, Nariaki Matsuura, Shuji Matsuura, Nuclear envelope localized EGF receptor ligand, amphiregulin activates the cell migration via chromatin reorganization、EMBO Conference Series Nuclear Structure & Dynamics, 2011 年 9 月 30 日、L' sle sur la Sorgue,

- France,
4. Miki Hieda, Nuclear envelope localized EGF receptor ligand, amphiregulin activates the cell migration via chromatin reorganization, EMBL Blue Seminar (招待講演)、2011年9月26日、The European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany
  5. 檜枝美紀、核細胞質間コミュニケーション・核からの情報発信、第1回異分野融合ワークショップ、2011年9月8日、情報通信研究機構未来 ICT 研究所 (KARC)、兵庫県神戸市
  6. 檜枝美紀、横山雄起、西岡優、田中ひさえ、東山繁樹、松浦成昭、松浦脩治、EGF ファミリー増殖因子 amphiregulin の核膜局在化による細胞遊走能の調節機構、(Nuclear envelope localized an EGFR ligand, amphiregulin regulates cell migration)、第63回日本細胞生物学会大会、2011年6月27日、北海道大学、北海道札幌市
  7. Miki Hieda, An EGFR ligand, amphiregulin is translocated from the plasma membrane to the nuclear envelope and regulates cell migration (招待講演) 6th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress (第6回アジア太平洋国際細胞生物学会) 2011年2月26日 Manila, Philippines
  8. Yuhki Yokoyama, Miki Hieda, Hisae Tanaka, Yu Nishioka, Shigeki Higashiyama, and Nariaki Matsuura, A nuclear envelope localized EGFR ligand, amphiregulin, up-regulates the cancer cell migration, International Symposium Physicochemical Field for Genetic Activities, 2011年1月26日 淡路夢舞台国際会議場、兵庫県淡路市
  9. Hisae Tanaka, Miki Hieda, Yu Nishioka, Shigeki Higashiyama, Nariaki Matsuura, Cytoplasmic tail of EGFR ligand, amphiregulin regulates histone modification and induces the cell migration, 75th Nuclear Organization & Function, Cold Spring Harbor Symposium, 2010年6月4日 Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
  10. Hisae Tanaka, Miki Hieda, Yu Nishioka, Shigeki Higashiyama, Nariaki Matsuura, Intracellular domain of an EGFR ligand, amphiregulin regulates cell migration, 第62回日本細胞生物学会大会、2010年5月19日、大阪国際会議場、大阪府吹田市
  11. Hisae Tanaka, Miki Hieda, Yu Nishioka, Shigeki Higashiyama, Nariaki Matsuura, Reverse signaling of an EGFR ligand, amphiregulin, suppresses breast cancer cell proliferation and induces the cell migration, AACR/JCA Joint Conference: Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics 2010年2月8日, Waikoloa, Hawaii, USA,
  12. Miki Hieda, Michiko Koizumi, Tomohiko Taguchi, Taro Tachibana, Nariaki Matsuura, Shigeki Higashiyama, HB-EGF の細胞膜-ER/核膜間メンブレントフィック経路の解析、第61回日本細胞生物学会大会、2009年6月3日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
檜枝 美紀 (HIEDA MIKI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教 (常勤)  
研究者番号：00380254
  - (2) 研究分担者  
なし
  - (3) 連携研究者  
木村 宏 (KIMURA HIROSHI)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授  
研究者番号：30241392