

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659154  
 研究課題名（和文） リーダーレスタンパク質の非古典的分泌機序の解明  
 研究課題名（英文） Molecular Mechanism of Unconventional Secretory Pathway for  
 “Leaderless” Proteins  
 研究代表者  
 西 英一郎 (NISHI EIICHIRO)  
 京都大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：30362528

研究成果の概要（和文）：分泌タンパク質の多くは、シグナルペプチドと呼ばれる疎水性の高いペプチド鎖を有し、粗面小胞体からゴルジ装置を通る、いわゆる古典的分泌経路を通じて細胞の外に分泌される。一方いくつかのシグナルペプチドを持たないタンパク質（リーダーレスタンパク質）が、未知の経路で細胞外に分泌されることが報告されているが、その分子機構は明らかではない。我々は、細胞質プロテアーゼ、nardilysin (NRDc) がリーダーレス分泌タンパク質のひとつであり、細胞内外で異なる機能を持つことを明らかにした。本研究では、NRDc の非古典的分泌機序の解明を試み、同分泌がリン酸化に依存することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Several “leaderless” proteins, which lack a consensus signal sequence, are secreted through unconventional secretory pathways. The mechanism by which leaderless proteins cross cell membranes is poorly understood. We have shown that nardilysin (N-arginine dibasic convertase: NRDc), a leaderless zinc peptidase, has localization-dependent multiple functions. Here, we demonstrate that the phosphorylation of NRDc is involved in the secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：分泌タンパク質、シグナルペプチド、非古典的分泌経路、ナルディライジン

## 1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質のほとんどは、そのアミノ末端（例外的にその内部）のシグナルペプチドを介して小胞体に取り込まれ、小胞体からゴルジ体を通る古典的分泌経路を介して細胞外に分泌される。一方、シグナルペプチドを持たないタンパク質（以下、リーダーレスタンパク質）、例えば FGF2 や IL-1b、HMGB1 などが、古典的分泌経路とは異なる経路を介して細胞外に分泌されることも明らかになっているが、その分子機構は明らかではない。リーダーレスタンパク質は、そのユニークな

多機能性、すなわちひとつのタンパク質が細胞の内外で全く異なる、しかしながら関連し合う機能を有することで、より複雑な作用を可能にしているという面でも注目されている (Nat Rev Mol Cell Biol, 2009)。

我々が増殖因子 HB-EGF の細胞表面受容体として同定した、メタロプロテアーゼ M16 ファミリーの nardilysin (NRDc) もリーダーレスタンパク質のひとつである (Nishi 他 EMBO.J, 2001)。NRDc は主に細胞質に存在する可溶性酵素だが、非古典的分泌経路を通り分泌される。哺乳類のタンパク質で唯一 NRDc と有意な相同性を持つ、同じ M16 フ

ファミリーの IDE (insulin degrading enzyme) も同様の挙動を示す。我々は、NRDc が細胞表面で膜タンパク質の細胞外ドメインシェディングを増強することを報告してきた (Nishi 他 JBC,2006 など)。さらに NRDc 欠損マウスの解析より、NRDc がニューレギュリンのシェディングを介して、中枢および末梢神経の軸索・髄鞘形成を司ることを明らかにし、NRDc が個体レベルにおいても、シェディング調節因子として重要であることを明らかにした (Ohno et.al. Nat. Neurosci. 2009)。細胞外におけるシェディング増強機能に加え、最近我々は NRDc が細胞質から核に移行し転写調節に関わっていることも明らかにし (未発表データ)、NRDc が細胞内外の異なる機能によって、例えば、「細胞外における TNF-alpha のシェディング増強」と、「核内における NFkB 活性増強」を介して、二方向から炎症反応を進めている可能性 (2 ページ図参照) を示唆し、欠損マウスの表現型も NRDc の多機能性を裏付ける表現型を呈している。以上の背景と研究成果をもとに、我々は「リーダーレスタンパク質、特に M16 ファミリー分子の非古典的分泌機序の解明および、同分子の局在に応じた多機能性と、その生物学的意義の解明」を最終目的として研究を進める。

## 2. 研究の目的

本研究では、NRDc をモデルとしてリーダーレスタンパク質の非古典的分泌機序の解明および、分子局在に応じた多機能性と、その生体における意義を明らかにすることを最終目的とした。具体的には、(1) NRDc の分泌検出アッセイの確立および、分泌誘導シグナルを明らかにすること、(2) 非古典的分泌経路との関連が示唆されている既知分子 (caspase-1, GRASP, オートファジー関連分子、ABC タンパク質、HB-EGF など) の関与を明らかにすること、(3) NRDc 分泌との関連が推測される翻訳後修飾 (リン酸化、アセチル化、イソプレニル化など) の意義の検討、(4) NRDc, IDE の非分泌型・非核移行型変異体の探索、などを目的にした。

## 3. 研究の方法

(1) NRDc の分泌検出アッセイの確立および、分泌誘導シグナルを明らかにすること:

NRDc は分泌されて細胞表面に留まる分画と培地中に放出される分画に分かれる。細胞表面分画については、ビオチン化した細胞表面タンパク質をアビジンビーズで回収後、抗 NRDc 抗体ウェスタンブロットにて検出した。

培地中のヒト NRDc については我々が開発した高感度測定系 (抗 NRDc モノクローナル抗体サンドイッチ ELISA、測定感度 50pg/ml) を用いた。

(2) 非古典的分泌経路との関連が示唆されている既知分子関与の検討:

Caspase-1 のセリンプロテアーゼ活性が非古典的分泌に必要なと報告されている。Caspase-1 特異的阻害剤 YVAD の NRDc 分泌に対する効果を検討。その他の分子、例えば GRASP や ABC ファミリー分子については、過剰発現系あるいは遺伝子ノックダウンを用いて検討する。

(3) NRDc 分泌との関連が推測される翻訳後修飾の検討:

リン酸化、アセチル化、イソプレニル化などの特異的な阻害あるいは活性化方法と NRDc 分泌アッセイを組み合わせで検討した。

(4) NRDc, IDE の非分泌型・非核移行型変異体の探索:

NRDc, IDE の酵素活性欠損型など各種変異体の分泌を過剰発現系を用いて検討した。予備実験から、リン酸化が分泌を制御している可能性が示唆されたため、質量分析を用いて、NRDc 自身がリン酸化されているかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) NRDc の分泌検出アッセイの確立および、分泌誘導シグナルを明らかにすること:

COS7 やマウス胎児由来線維芽細胞のみならず、ラット初代心筋細胞、マウス初代褐色脂肪前駆細胞など様々な細胞腫を用いて NRDc 分泌を誘導する刺激を検討したところ、ホルボールエステル、IL-6 などが NRDc 分泌を誘導することが明らかになった。

一方、フォルスコリンなどで PKA を活性化させると、NRDc 分泌が強く誘導されることが明らかになった。この結果から、NRDc 自身がリン酸化されるかどうか、リン酸化が分泌を制御していないかどうか、について検討した (下記(3)に記載)。

(2) 非古典的分泌経路との関連が示唆されている既知分子関与の検討:

Caspase-1 特異的阻害剤 YVAD は NRDc の分泌を阻害しなかった。また、ABC ファミリー分子、ABCA1, B1, G1 を過剰発現させた細胞で、NRDc 分泌に有意な変化は認めなかった。以上から、これら非古典的分泌経路との関連が示唆されている既知分子

群は、NRDc 分泌制御には関わっていない可能性が示唆された。

(3) NRDc 分泌との関連が推測される翻訳後修飾の検討：

(4) NRDc, IDE の非分泌型・非核移行型変異体の探索：

NRDc 自身のリン酸化が、分泌制御に関与している可能性を検討するため、まず *in vitro* kinase assay を用いて、PKA が NRDc をリン酸化するかどうかを検討したところ、明らかなリン酸化を認めた。次に、質量分析を用いて NRDc が 10 カ所以上でリン酸化されていることを明らかにした。さらに、これらのリン酸化部位をアラニンに置換して、非リン酸化変異体を作製したところ、全てのリン酸化部位をアラニンに置換した変異体の分泌は有意に低下することが明らかになった。以上から、NRDc の分泌が、自身のリン酸化に依存することが明らかになった。

#### 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 2 件)

- ① Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohno M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H\*, Nishi E\*, and Chiba T (\*Co-corresponding author) Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF- $\alpha$  *EMBO Mol Med*, 4:396-411, 2012. doi: 10.1002/emmm.201200216 査読有
- ② Li J, Chu M, Wang S, Chan D, Qi S, Wu M, Zhou Z, Li Z, Nishi E, Qin J and Wong J. Identification and Characterization of Nardilysin as a Novel Dimethyl H3K4 Binding Protein Involved in Transcriptional Regulation *J Biol Chem*, 287:10089-98, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.313965 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kita T, Nishi E, Kimura T. Nardilysin, an activator of ectodomain shedding, is a novel and potent biomarker for acute

coronary syndrome ESC Congress 2012, 25-29 Aug 2012, Munich(Germany)

- ② Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kita T, Kimura T, Nishi E. NRDc regulates circulatory dynamics through modulating sinus node automaticity and cardiac sympathetic innervation ESC Congress 2012, 25 Aug 2012- 29 Aug 2012, Munich(Germany)
- ③ Nishi E, Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nishi K, Saijo S, Kita T, Kimura T. Nardilysin regulates adaptive thermogenesis via modulation of transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  (Selected for oral presentation) Cold Spring Harbor Meeting (Nuclear Receptors & Diseases), Oct 30-Nov3, 2012, Cold Spring Harbor, NY(USA)
- ④ Hiraoka Y, Yoshitane H, Nunokawa R, Fukada Y, Kimura T and Nishi E. Nardilysin regulates the mammalian circadian clock via modulating PER2 stability ASCB (American Society for Cell Biology) 2012, December 15-19, San Francisco(USA)
- ⑤ 西清人、平岡義範、大野美紀子、松岡龍彦、西城さやか、坂本二郎、陳博敏、北徹、木村剛、西英一郎 ナルディライジンはインスリン分泌調節を介して糖代謝を制御する(学会奨励賞受賞) 第 17 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2012 年 8 月 10-11 日、浜松)
- ⑥ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin regulates sinus node automaticity and sympathetic nerve innervation (ワークショップ「発生物学の最前線：個と全体をつなぐ新規メカニズム」) 第 34 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11-14 日福岡)
- ⑦ Nishi K, Hiraoka Y, Ohno M, Matsuoka T, Saijo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin controls glucose metabolism through the regulation of insulin secretion 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11-14 日、福岡)
- ⑧ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuura H, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Kimura T, Nishi E. NRDc regulates circulatory dynamics through modulating sinus node automaticity and cardiac sympathetic innervation Neuro-Vascular Wiring Symposium

- 2012, Nov 12-13, 2012, Nara.
- ⑨ 西 英一郎：『適応熱産生におけるナルディライジンの役割』、温熱生理研究会 2012 (2012年9月4-5日、岡崎)
- ⑩ Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin, an Activator of Ectodomain Shedding, is a Novel and Potent Biomarker for Acute Coronary Syndrome 第77回日本循環器学会総会 (2013年3月15-17日 横浜)
- ⑪ Nishi K, Hiraoka Y, Ohno M, Matsuoka T, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin Controls Glucose Metabolism through the Regulation of Insulin Secretion 第77回日本循環器学会総会 (2013年3月15-17日 横浜)
- ⑫ Nishi E. Nardilysin promotes cancer development through activation of ectodomain shedding 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Feb1-2. 2013. Tokyo
- ⑬ Nishi E. Multiple pathophysiological roles of nardilysin, an enhancer of ectodomain shedding. Gordon Research Conference (Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins) (July 10 - 15, 2011, Davidson, NC, USA) 招待講演
- ⑭ Nishi E. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. 10th Biennial ISN Satellite Meeting on Myelin Biology (Aug 24 - 27, 2011, Kolymvari, Crete, Grace) 招待講演
- ⑮ Ohno TM, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kimura T, and Nishi E. Nardilysin regulates circulatory dynamics through modulating sympathetic nerve innervation The 84th Scientific Sessions of American Heart Association, Nov 16, 2011, Orland, Florida(USA)
- ⑯ Ohno TM, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kimura T, and Nishi E. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing  $\alpha$ -secretase activity in vivo. AAICAD (Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease) 2011, July 16-21, Paris(France)
- ⑰ Ohno M, Nishi E.: Demyelination and remyelination are distinctly regulated

by nardilysin in the murine cuprizone model. Poster presentation 10th Biennial ISN Satellite Meeting on Myelin Biology (Aug 24 - 27, 2011, Kolymvari, Crete, Grace)

- ⑱ Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nishi K, Saijo S, Kimura T, Kita T, Nishi E. Critical roles of a metalloendopeptidase nardilysin in cold-induced adaptive thermogenesis. 第34回日本分子生物学会年会 (2011年12月13-16日、横浜)
- ⑲ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kimura T, Nishi E. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing  $\alpha$ -secretase activity in vivo. 第34回日本分子生物学会年会 (2011年12月13-16日、横浜)
- ⑳ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin regulates circulatory dynamics through modulating sympathetic nerve innervation 第76回日本循環器学会総会 (2012年3月16-18日 福岡)

〔図書〕 (計1件)

- ① Nishi E, Edited by Neil D. Rawlings and Guy Salvesen, Academic Press, The Handbook of Proteolytic Enzymes (The 3rd Edition)、2012、4104

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 英一郎 (NISHI EIICHIRO)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：30362528