

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390074

研究課題名(和文) ADAM17を介するShedding制御機構とレムナントペプチドシグナルの解析

研究課題名(英文) Regulation of ectodomain shedding by ADAM17 and remnant signaling

研究代表者

東山 繁樹 (Higashiyama, Shigeki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ADAM17による細胞膜上での膜蛋白質限定分解(shedding)は、様々な情報伝達因子を量的・質的に制御するシステムとして重要である。膜型増殖因子proHB-EGF、proAREGと膜型サイトカインTNF- α はそれぞれI型とII型の膜蛋白質であるが、両者共にADAM17によりsheddingを受ける。我々がADAM17制御因子として見出したannexin (ANX)が、ADAM17によるI型およびII型一回膜貫通蛋白質のsheddingを全く逆に制御することを明らかにした。ANXによるADAM17触媒ドメインヘッドスウィングモデルを提案する。

研究成果の概要(英文)：ADAM17, a transmembrane-type metalloprotease, sheds various transmembrane proteins on cell surface, which regulates cell signaling. Both type I transmembrane protein proHB-EGF and proAREG, and type II transmembrane protein proTNF- α are equally shed. However, ADAM17 binding proteins annexin reversibly affected on their ADAM17-induced shedding. We propose that the catalytic domain of ADAM17 can swing by binding different member of annexin and access to the different types of membrane proteins.

研究分野：生化学、分子細胞生物学、

キーワード：ectodomain shedding ADAM17 proHB-EGF proamphiregulin proTNF- α annexin レムナントペプチドシグナル

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、その下流分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 ectodomain shedding (以後 shedding と記す) 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 proHB-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。しかし私どもは、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。

さらに、EGF ファミリーメンバーの1つである amphiregulin (AREG) とその shedding 酵素である ADAM17 の両分子に結合し、shedding 効率を制御する分子として annexin (ANX)を新規に同定してきた。ANX ファミリーは12種類のメンバーから構成され、このうち、ANX2, 6, 8, 9 の4種が ADAM17 と結合し、ANX2 は shedding を負に、ANX8, 9 は Shedding を正に制御することを突き止めている。ちなみに shedding ANX6 は、shedding に影響を及ぼさない。このような酵素と基質の双方に結合し、shedding を正または負に制御するファミリー分子の同定は初めてである。

2. 研究の目的

ADAM17 は上記の EGF ファミリーだけでなく、Tumor Necrosis Factor (TNF)ファミリーの shedding をも制御することが知られている。EGF ファミリーは I 型膜タンパク質であり、逆に TNF ファミリーは II 型膜タンパク質であることから、この2つのタンパク質ファミリー分子の細胞膜上でのトポロジーは全く

逆となる。しかし、両タンパク質ファミリー分子の主要な shedding 酵素は ADAM17 と共通しており、同一細胞上で shedding されると考えられていることから、ADAM17 と基質との結合を制御する第3の因子が存在することが示唆される。我々がこれまでに、EGF ファミリーの新たな shedding 制御因子として同定してきた ANX がその役割を担うのではないかと考え、その可能性を検証するとともに、分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1) shedding 検証モデル細胞株の作成

ANX による EGF ファミリー(HB-EGF と AREG)と TNF ファミリー (TNF- α) の shedding 制御を解析するために、まず、内性に ANX 2、9、ADAM17、proTNF- α 、HB-EGF、AREG を発現する細胞株を探索した。当教室が保有する細胞株を用いてこれらの遺伝子発現解析を PCR 法により行った。さらにタンパク質発現は、それぞれの抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した。また、TNF- α 、HB-EGF、AREG の shedding 効率の簡易測定のためのプローブとして、proTNF- α 、proHB-EGF、proAREG タンパク質のそれぞれの細胞外ドメインにアルカリフォスファターゼ(AP)を融合した、proTNF- α -AP、proHB-EGF-AP、proAREG-AP を安定発現する細胞株を作成した。

2) ANX ノックダウンによる proHB-EGF、proAREG、proTNF- α の shedding 効率測定

上記1)により各遺伝子発現が確認された細胞を用いて、ANX2、ANX9をそれぞれ特異的 siRNA、または microRNA レンチウイルスベクターを用いて遺伝子ノックダウンを行った。遺伝子ノックダウンの判定は定量 PCR 法により行った。proHB-EGF、proAREG、proTNF- α の shedding 誘導は、96穴プレートで培養した細胞に、サイトカイン IL-1 β (20 ng/ml)、またはフォルボールエステル TPA (100 nM) 添加で行い、15、30、60、120 分後の培養上清中の AP 活性を測定することで、shedding 活性を評価した。

3) ADAM17 と I 型および II 型膜タンパク質基質を用いたシス/トランス位のインビトロ酵素反応系の構築

小麦胚芽無細胞タンパク質合成系にリボソームを導入したプロテオリボソーム合成系を用いて、まず活性型 ADAM17 プロテオリボソームを合成した。ADAM17 の活性は、5-FAM/QXL™ 520 FRET ペプチドを基質とし、ADAM17 による切断で生じる遊離型 5-FAM が放つ蛍光を検出することにより測定した。基質タンパク質の N-末端または C-末端にピオチンリガーゼ認識配列 (GLNDIFEAQKIEWHE) を付加した I 型膜タンパク質 proHB-EGF、proAREG、II 型膜タンパ

ク質 proTNF- α の各細胞外ドメインを、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成した。合成後、大腸菌由来 BirA 酵素によりビオチン化を図った。また ANX2 または ANX9 全長リコンビナントタンパク質は HisX6-Tag を導入し、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系で作成した。作成したリコンビナントタンパク質はキレートセファロースカラムにより精製した。

4 shedding の 1 細胞イメージングプローブの開発

1 細胞での膜タンパク質 shedding の解析を可能にするために、proHB-EGF を用いて、その細胞外、および細胞内領域にそれぞれ mCherry (mCh) と monomeric Azami Green1 (mAG1) 蛍光タンパク質タグを導入し、shedding イメージング用プローブを作成した。shedding 活性は mAG1/mCh 蛍光比で算出した。

4. 研究成果

1) ANX2、9 による proHB-EGF、proAREG および proTNF- α の shedding 制御

内在性に ANX 2、ANX 9、ADAM17、TNF- α 、HB-EGF、AREG を発現する細胞株として、リンパ腫細胞株 U-937 細胞株 および、2 種の大腸がん細胞株 HCT116 と HT29 細胞株を得た。これらの細胞に proTNF- α -AP、proHB-EGF-AP、proAREG-AP 遺伝子を導入し、これを安定的に発現する細胞株を作成した。これらを用いて、IL-1 β または TPA 誘導による shedding 活性を培養上清中の AP 活性を測定することで検出した。その結果、用いた 3 種の細胞株ともに、ANXA2 のノックダウンにより、proAREG ならびに proHB-EGF の shedding はコントロールに比べ約 2 倍に増幅したのに対し、proTNF- α の shedding は、逆にコントロールに比べ 50% 以上抑制された (図 1)。一方、同様に行った ANXA9 のノックダウンでは、ANXA2 のノックダウンとは全く逆に、proAREG ならびに proHB-EGF の shedding はコントロールに比べ約半分以下に抑制されたのに対し、proTNF- α の shedding は逆に、コントロールに比べ 2 倍以上の増幅が認められた。このことから、ANX2 および ANX9 による proAREG ならびに proHB-EGF の shedding と proTNF- α の shedding は正反対に制御を受けることが明らかとなり、ADAM17 による I 型膜タンパク質、および II 型膜タンパク質の shedding が ANX2 および ANX9 により制御されることが示唆された。

2) ADAM17 と I 型および II 型膜タンパク質基質を用いたシス/トランス位でのインビトロ酵素反応系の構築

培養細胞で確認した上記結果 1) の ANX2 および ANX9 による proAREG/proHB-EGF の shedding と proTNF- α の shedding 制御の

相違をインビトロ酵素反応系の構築で検証することを試みた。まず、ANX2 および ANX9、を無細胞タンパク質合成系、ならびに ADAM17、ビオチン化 proAREG、ビオチン化 proHB-EGF、ビオチン化 proTNF- α を、プロテオリポソームを用いた無細胞タンパク質合成系にて作成した。どのタンパク質も 1 マイクログラム以上のタンパク質収量を得ることができた。さらに、シス/トランス位のインビトロ酵素反応系の構築に先駆け、まず、ADAM17 の蛋白分解酵素活性の確認実験を行った。

まず、proTNF- α -AP、proHB-EGF-AP、proAREG-AP を安定的に発現する HCT116 細胞株の培養液にリコンビナント ADAM17 を添加し、1 時間の反応後、培養上清における AP 活性を測定した。その結果、どの培養上清においても、有意な AP 活性を確認することができなかつた。そこで、さらに高感度の 5-FAM/QXL™ 520 FRET ペプチドを基質とし、ADAM17 による切断で生じる遊離型 5-FAM が放つ蛍光を検出することにより測定した。しかし、この酵素活性測定系においても、有意な酵素活性を検出できなかった。この結果より、ADAM17 の活性発現には、翻訳後修飾が必須である事が示唆された。本実験の継続には活性化 ADAM17 作成が必須であることから、インビトロでの酵素反応系の構築から、細胞レベルでの解析に切り替えることとした。

shedding における酵素-基質のシス/トランス位の問題点を細胞レベルで解析・検討するためには細胞間接着の無い環境下での shedding 解析が必須である。そこで、shedding 反応を 1 細胞で捉えるためイメージングプローブの開発を試みた。

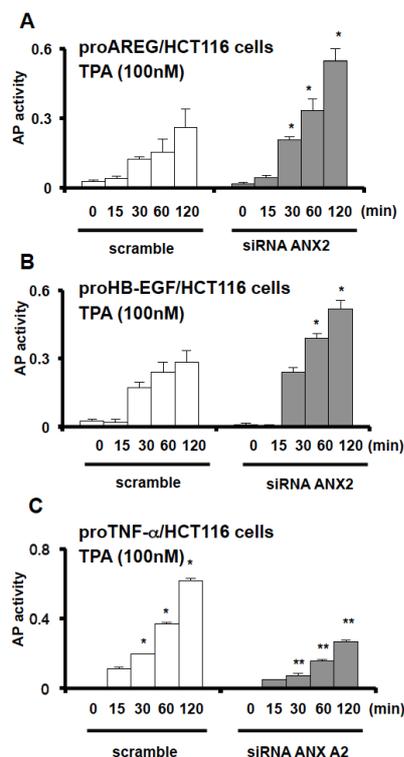


図1 : proAREG、proHB-EGF、proTNF- α の shedding に及ぼす ANX2 の機能評価。ヒト大腸がん細胞株 HCT116 細胞に proAREG-AP (A)、 proHB-EGF-AP (B)、 proTNF- α -AP (C)をそれぞれ安定発現する細胞を TPA100 nM で刺激し、shedding を惹起した。TPA 刺激後 15 分、30 分、60 分、120 分での培養上清を調製し、AP 活性を測定した。白色バーはコントロール siRNA で細胞をあらかじめ処理、灰色バーは ANX2 siRNA で処理した。ANX2 siRNA 処理による ANX2 の遺伝子発現抑制は定量 PCR により、ANX2 タンパク質産生抑制は特異抗体を用いたウエスタンブロットにより、それぞれ 80 %以上の抑制を確認した。

3) shedding の 1 細胞イメージング解析システムの開発

proHB-EGF の shedding 反応を 1 細胞で捉えるために、proHB-EGF の細胞外領域と細胞内領域に異なる波長域を持つ蛍光タンパク質を挿入し、shedding 反応前後で細胞膜表面における 2 つの蛍光タンパク質の蛍光強度比で shedding 活性を評価するイメージングプローブの作成を試みた。

proHB-EGF 遺伝子導入において、その増殖因子活性による細胞への影響を最小限に抑えるために、活性発現に必須の EGF 用ドメイン 103-150 アミノ酸領域を蛍光タンパク質 mCh (Ex.587 nm, Em 610 nm)に置換した。さらに、proHB-EGF の細胞膜表面への輸送ならびに shedding 活性発現には細胞内ドメインが重要な役割を果たすことから、この両者の活性に最も影響の少ない細胞内領域 193 アミノ酸部位に mAG1 (Ex.492 nm, Em 505 nm)を挿入する形で遺伝子構築を行った(図 2 A)。本構築遺伝子 proHB-EGF-mAG1-mCh を繊維芽肉腫細胞株 HT1080 細胞に導入し、タンパク質産生を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、mAG1 と mCh の両蛍光共に細胞膜に発現・局在することを確認した(図 2 B、C)。さらに、これらの細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE 後、mAG1 と mCh 両抗体を用いた Western Blot によりタンパク質の産生を確認したところ、両抗体ともに約 70kDa の同一のバンドを検出した。これらのことから、proHB-EGF-mAG1-mCh タンパク質は、proHB-EGF と同等な細胞局在を示すことが明らかとなり、proHB-EGF shedding のイメージングプローブとして有用であることが示唆された。

次に、proHB-EGF-mAG1-mCh 安定発現 HT1080 細胞株 (proHB-EGF-mAG1-mCh/HT1080 細胞)を樹立し、培養系における proHB-EGF-mAG1-mCh の shedding を、mAG1 ならびに mCh の蛍光検出と、NIS-Elements を用いた mAG1/mCh の蛍光強度比算出により定量化した。また、shedding はフォルボールエステル TPA 添加により誘導した。その結果、TPA 添加後、60 分

間において蛍光強度比の変化を観察でき、蛍光強度比は 2 倍の幅で変化することを確認した。この結果より、1 細胞における proHB-EGF の shedding を定量することが可能であると結論づけた。

そこで本 proHB-EGF-mAG1-mCh を用いて、HT1080 細胞運動時における proHB-EGF-mAG1-mCh shedding を観察・解析した。その結果 proHB-EGF-mAG1-mCh の shedding は細胞運動の先端領域、特にラフリング領域において活発に起こっていることが観察された。このことは、アクチンダイナミクスが膜タンパク質 shedding を制御する可能性や、細胞運動には局所におけるオートクリン増殖因子産生・刺激が必要である可能性を示唆しているものと考えられる。

さらに、proHB-EGF-mAG1-mCh/HT1080 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、*in vivo* での shedding 観察が可能かどうかを検討した。移植 10 日後に共焦点レーザー顕微鏡下で mAG1 ならびに mCh の蛍光検出を行い、得られたイメージング像より mAG1/mCh の蛍光強度比を算出した。その結果、血管周囲に集まった移植細胞において、強い shedding 活性を観察した。このことは、がん細胞の血行性転移時において、がん細胞自身が作り出す proHB-EGF の shedding が活発に起こっていることや、細胞運動・転移に重要な役割を果たしている可能性を強く示唆している。

本研究において proHB-EGF の shedding を可視化するプローブの開発に成功し、これまで不可能であった 1 細胞での proHB-EGF shedding 反応を *in vitro* ならびに *in vivo* で捉える事に成功した。この技術は、他の膜タンパク質 shedding 反応の可視化に有用であり、1 細胞での shedding 解析、さらには、2 細胞でのシス/トランス位の shedding 解析に応用可能であることを示している。

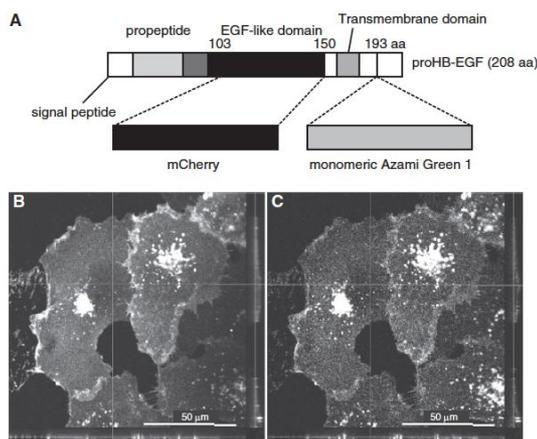


図2 : proHB-EGF shedding のイメージングプローブ proHB-EGF-mAG1-mCh の分子構築とその応用。(A) proHB-EGF のドメイン構築と mAG1 ならびに mCh の挿入部位を示す。(B、C) proHB-EGF-mAG1-mCh を繊維芽肉腫細胞株 HT1080 細胞に導入し、タンパク質

産生を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。mAG1 (B) と mCh (C) の両蛍光共に細胞膜に発現・局在することを確認した。

以上のことから、ANX は ADAM17 と相互作用し、ADAM17 による I 型膜タンパク質 proHB-EGF、proAREG および II 型膜タンパク質 proTNF- α の shedding を全く逆に制御することを明らかにした。本研究においては、ANX による ADAM17 介在性の shedding がシス位において制御する可能性を示唆するに留まったが (図3)、これまで不可能であった 1 細胞での膜タンパク質の shedding 反応を *in vitro* ならびに *in vivo* で捉える事に成功した。今後、この方法を用いて、上記の問題にアプローチが可能であると考えている。

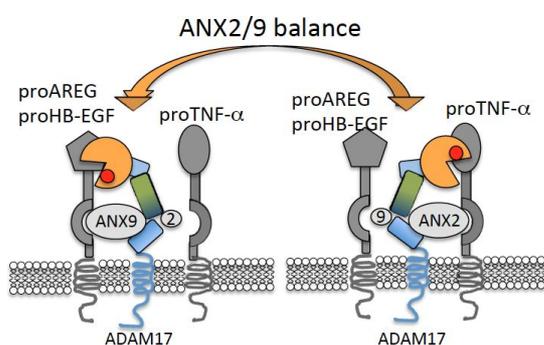


図3: ADAM17 ヘッドスウィングモデル図。同一細胞上での ADAM17 の I 型および II 型膜タンパク質基質 shedding のモデルを示す。ANX 2、9 は、ADAM17 とその基質分子である proHB-EGF、proAREG および proTNF- α に対して、触媒ドメインヘッドを回転させることでそれぞれの基質への結合を適切に行うことを示す。

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 16 件)

1. Nanba D, Matsushita N, Higashiyama S, (10,) Cell motion predicts human epidermal stemness. *J Cell Biol.* 2015, 209:305-315. (査読有)
2. Beck Gooz M, Higashiyama S, (8,) ADAM17 promotes proliferation of collecting duct kidney epithelial cells through ERK activation and increased glycolysis in polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014, 307:F551-559. (査読有)
3. Taira N, Fukuda S, Higashiyama S, (8,) Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, 111:717-722. (査読有)

4. Ota I, Higashiyama S, Matsuura N. (6,) Heparin-binding EGF-like growth factor enhances the activity of invasion and metastasis in thyroid cancer cells. *Oncol Rep.* 2013, 30:1593-1600. (査読有)
5. Takemura T, Higashiyama S, (15,) Conditional loss of heparin-binding EGF-like growth factor results in enhanced liver fibrosis after bile duct ligation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013, 437:185-191. (査読有)
6. Tsukamoto H, Fukuda S, Higashiyama S, Joh T, (12,) Annexin A2 regulates a disintegrin and metalloproteinase 17-mediated ectodomain shedding of pro-tumor necrosis factor- α in monocytes and colon epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis.* 2013, 19:1365-1373. (査読有)
7. Inoue H, Higashiyama S, (4,) Spatiotemporal visualization of proHB-EGF ectodomain shedding in living cells. *J Biochem.* 2013, 154:67-76. (査読有)
8. Diaz B, Higashiyama S, (5,) Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. *J Cell Biol.* 2013, 201:279-292. (査読有)
9. Ozeki K, Fukuda S, Higashiyama S, Joh T, (13,) Telmisartan inhibits cell proliferation by blocking nuclear translocation of proHB-EGF C-terminal fragment in colon cancer cells. *PLoS One.* 2013, 8:e56770. (査読有)
10. Nakayama H, Fukuda S, Matsushita N, Inoue H, Higashiyama S, (8,) Human antigen R-mediated mRNA stabilization is required for ultraviolet B-induced autoinduction of amphiregulin in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2013, 288:10338-10348. (査読有)
11. Inoue A, Higashiyama S, (11,) TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods.* 2012, 9:1021-1029. (査読有)
12. Shimura T, Fukuda S, Higashiyama S, Joh T, (11,) Nuclear translocation of the cytoplasmic domain of HB-EGF induces gastric cancer invasion. *BMC Cancer.* 2012, 12:205. (査読有)
13. Nakayama H, Fukuda S, Inoue H, Higashiyama S, (7,) Cell surface annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin. *Mol Biol Cell.* 2012, 23:1964-1975. (査読有)
14. Fukuda S, Inoue H, Higashiyama S, (5,) Monoubiquitination of pro-amphiregulin regulates its endocytosis and ectodomain shedding. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 420:315-320. (査読有)
15. Gooz P, Higashiyama S, (6,) A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is

regulated by $\alpha 5\beta 1$ integrin in kidney mesangial cells. *PLoS One* 2012, 7:e33350. (査読有)

16. Yoshida M, Fukuda S, Higashiyama S, Joh T. (10,) Nuclear translocation of pro-amphiregulin induces chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2012, 103:708-715. (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

1. 河村勇志、田中涼果、難波大輔、東山繁樹 「乳がん細胞における形質転換と proHB-EGF のエクストドメインシェディングの相関性」 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25-27日、横浜
2. 福田 信治、福田(西田)尚代、東山繁樹 「EGF ファミリーの増殖因子による乳腺細胞の細胞間接着制御機構」 第37回日本分子生物学会 2014年11月25-27日 横浜
3. 福田(西田)尚代、福田 信治、東山繁樹 「EGF 受容体シグナルによる乳腺細胞の可逆的な表現型変換の制御機構解析」 第37回日本分子生物学会 2014年11月25-27日 横浜
4. Shigeki Higashiyama “Ectodomain shedding in EGFR/ligand signaling; regulation, functional implication and imaging” **Matrix Metalloproteinases Gordon Research Conference** May 19-24, 2013, Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy
5. 東山繁樹、福田信治 「Ectodomain shedding 制御と EGFR/Ligand シグナリング」 第18回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2013年8月16日、大阪
6. Shigeki Higashiyama. “Regulation of ectodomain shedding in EGFR/ligand signaling.” **The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “TGF- β Family: Signal Network and Tumor Microenvironment.** October 29-30, 2012, Tokyo, Japan
7. Shigeki Higashiyama. “Regulation of ectodomain shedding in EGFR/ligand signaling.” **International Scientific Coordination Network (ISCN) France-Japan.** November 28-December 1, 2012, Naruto, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：エクストドメインシェディング検知のための蛍光バイオセンサー
発明者：井上博文、東山繁樹
権利者：国立大学法人愛媛大学
種類：特許願

番号：125257H

出願年月日：2013年1月18日

国内外の別：国内

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・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

(2) 連携研究者

福田 信治 (FUKUDA SHINJI)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号：70398238

井上 博文 (INOUE HIROFUMI)

愛媛大学大学院・医学系研究科・講師

研究者番号：70321635

松下 夏樹 (MATSUSHITA NATSUKI)

愛媛大学医学部附属病院・研究員

研究者番号：40271556

城 卓志 (JHO TAKASHI)

名古屋市立大学大学院・医学系研究科・教授

研究者番号：30231369