

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：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790319

研究課題名（和文） 膜型増殖因子のshedding制御を標的とした心筋細胞の生存機構の解明とその応用

研究課題名（英文） Analysis of the machinery of ectodomain shedding and its possible role for the action of HB-EGF

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：我々は EGF ファミリーの膜型増殖因子に結合する蛋白質としてアネキシン群を同定した。本研究では EGF ファミリーの膜上切断(ectodomain shedding)に果たすアネキシン群の作用を検討した。心筋細胞で重要な役割を果たす HB-EGF に関しては、アネキシン A8 は shedding を促進的に、A2 は抑制的に作用することを明らかにした。またこれらアネキシンは shedding の責任酵素である ADAM17 の細胞外領域に結合することも分かった。本成果は、アネキシンを標的とした新規創薬へと発展させるための重要な分子基盤となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We identified cell surface-annexins as components of their shedding complex. Annexin family members, annexin A2 (ANXA2), A8, and A9 interacted with ADAM17 on the cell surface. Shedding of proHB-EGF was increased when ANXA2 was knocked down, but decreased with ANXA8 knockdown. Taken together with studies of its related ligand, Amphiregulin, we propose that annexins on the cell surface function as “shedding platform” proteins to determine the substrate selectivity of ADAM17, with possible therapeutic potential in ADAM-related diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：膜型増殖因子, ectodomain shedding, HB-EGF, Amphiregulin, アネキシン

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室は、膜型増殖因子 heparin-binding EGF (HB-EGF)が細胞膜上で切断(ectodomain shedding)を受けることで生じる C 末断片(C-terminal fragment: CTF)に活性酸素を除去する作用があり、CTFが低酸素下での心筋細胞の生存に必要であることを明らかにしてきた。さらに申請者らは、生化学的な解析から ectodomain shedding を制御する分子群としてアネキシンファミリーを同定していた。ただしアネキシンと EGF ファミリーリガンドが相互作用することの意義は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では HB-EGF の shedding におけるアネキシンファミリーの役割を明らかにすることを目的とした。本成果を応用することで、低酸素環境下における心筋細胞の生存維持の分子基盤の解明に貢献できることが期待される。

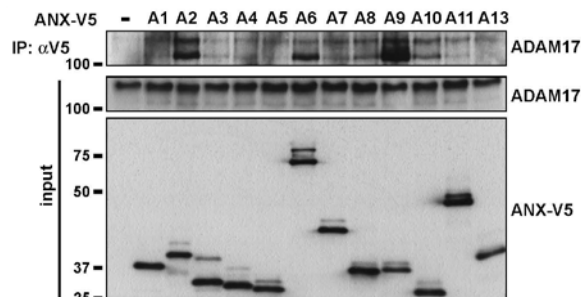
3. 研究の方法

EGF ファミリーに属する HB-EGF と Amphiregulin は類似した構造を持ち、いずれも EGF 受容体を介したシグナル伝達経路の活性化に必須の役割を果たす。そこで Amphiregulin に結合する因子群を Amphiregulin 複合体として免疫沈降によって単離し、質量分析によってその構成成分を同定した。この中にアネキシン A8 が含まれていたため、全アネキシン(12種)の cDNA をクローニング、またノックダウン実験を行った。アネキシンファミリーは Amphiregulin のみならず、HB-EGF にも結合が認められたため、これら分子の ectodomain shedding に及ぼす影響を検討した。

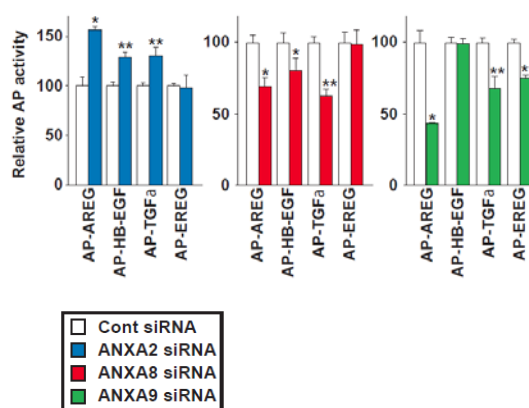
4. 研究成果

(1) Amphiregulin 結合因子として同定したアネキシン群は、Amphiregulin のみならず、

Ectodomain shedding の責任酵素である ADAM17 にも結合することが分かった。下記の免疫沈降のデータは、12種類のアネキシン群の中で、アネキシン A2, A6, A8, A9 が ADAM17 と結合することを示す。

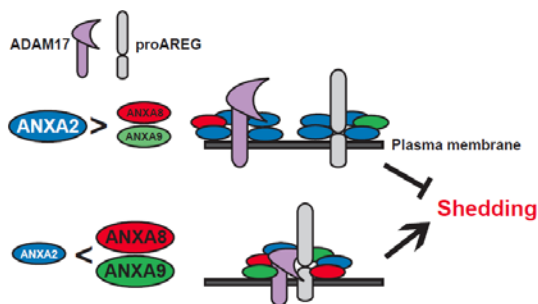


(2) 上記アネキシンが HB-EGF 及び他の EGF ファミリーの ectodomain shedding に及ぼす影響を明らかにするため、ノックダウン実験を行った。基質としては alkaline phosphatase と融合した EGF ファミリーを用い、ホルボールエステルによって shedding を誘導した。下記の結果から、アネキシン群は HB-EGF, Amphiregulin, TGF α , epiregulin という複数の EGF リガンド産生に関与するものであることが分かった。ただしその作用の程度はリガンドの種類によって異なるものであり、アネキシンファミリー間に機能的な重複があることが示唆される。



(3) 以上の結果、及び公表した論文(下記参照)より、我々は次のモデルを提唱した。即ち、ectodomain shedding では、酵素と複合体の他に、アネキシンのような複合体形成を制御する分子によって酵素と基質が相互作用

用する頻度が決定されると考えられる。アネキシンは ectodomain shedding のプラットフォームのような役割をしており、このプラットフォームの構造・組成を人為的に制御することで、増殖因子の産生を調節することが可能になると考えられる。



上記のような shedding 複合体の人為的制御のためには複合体の構造解析が極めて有用な情報をもたらす。一方で、ADAM、EGF ファミリーとも膜貫通蛋白質であり、我々は現時点では今回明らかにした shedding 複合体の蛋白質精製に成功していない。この点については今後の課題として考えている。

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. Nakayama H*, Fukuda S*, Inoue H, Nishida-Fukuda H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. (*: equal contribution) Cell surface-annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin. *Molecular Biology of the Cell*. 2012, In press. 査読有

2. Fukuda S#, Nishida-Fukuda H, Nakayama H, Inoue H, Higashiyama S#. (#: corresponding authors) Monoubiquitination of pro-amphiregulin regulates its endocytosis and ectodomain shedding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012, 420 (2): 315-320. 査読有

3. Yoshida M, Shimura T, Fukuda S, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, Nakazawa T, Higashiyama S, Joh T. Nuclear translocation of pro-amphiregulin induces chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Science*. 2012, 103(4):708-715. 査読有

4. Ohnuki H, Inoue H, Takemori N, Nakayama H, Sakaue T, Fukuda S, Miwa D, Nishiwaki E, Hatano M, Tokuhisa T, Endo Y, Nose M, Higashiyama S. BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signaling in angiogenesis. *Blood*. 2012, 119(11):2688-2698. 査読有

5. Shigematsu S, Fukuda S, Nakayama H, Inoue H, Hiasa Y, Onji M, Higashiyama S. ZNF689 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the down-regulation of Bcl-2 family members. *Experimental Cell Research*. 2012, 317 (13): 1851- 1859. 査読有

6. Higashiyama S, Nanba D, Nakayama H, Inoue H, Fukuda S. Ectodomain shedding and remnant peptide signalling of EGFRs and their ligands. *Journal of Biochemistry*. 2011, 150(1):15-22. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. Fukuda S, Nishida-Fukuda H, Nakayama H, Inoue H, Higashiyama S. The Role of monoubiquitination in the regulation of endocytosis and ectodomain shedding of a ligand for epidermal growth factor (EGF) receptor, Amphiregulin 第 34 回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16, 横浜

2. Shigematsu S, Hiasa Y, **Fukuda S**, Nakayama H, Onji M, Higashiyama S. ZNF689 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma through the down-regulation of Bcl-2 family members. 第 62 回アメリカ肝臓病学会 The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8 San Francisco, CA・Moscone West

3. Yoshida M, Shimura T, **Fukuda S**, Higashiyama S, Mizoshita T, Kataoka H, Joh T. Amphiregulin nuclear translocation might cause poor prognosis due to chemotherapeutic resistance in gastric cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011.10.3-5, 名古屋

4. Shimura T, Yoshida M, **Fukuda S**, Mizoshita T, Kataoka H, Higashiyama S, Joh T. HB-EGF-CTF nuclear translocation induces gastric cancer invasion. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011.10.3-5, 名古屋

5. Shigematsu S, **Fukuda S**, Onji M, Higashiyama S. ZNF689 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the down-regulation of Bcl-2 family members. 第 70 回日本癌学会総会 2011.10.3-5, 名古屋

6. 重松秀一郎, **福田信治**, 中山寛尚, 日浅陽一, 恩地森一, 東山繁樹. ZNF689 の肝細胞癌におけるアポトーシス抑制機構. 第 47 回日本肝臓病学会総会 2011.6.2-3, 東京

7. **Fukuda S**, Nakayama H, Higashiyama S. Identification of novel molecules that regulate ectodomain shedding of EGF ligands. シンポジウム” Ectodomain shedding biology-functional conversion of plasma membrane proteins “ (招待講演) 第

33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会, 2010.12.7-10, 神戸

8. Shigematsu S, **Fukuda S**, Nakayama H, Hiasa Y, Onji M, Higashiyama S. Characterization of ZNF689 in Human Hepatocellular Carcinoma. 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会 2010.5.14-15 山口

9. 大貫秀隆, 井上博文, 中山寛尚, **福田信治**, 三輪大輔, 東山繁樹. 新規血管新生制御因子 ZF50 による Notch シグナル解除機構. 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会 2010.5.14-15 山口

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenqweb.office.ehime-u.ac.jp/Profiles/0008/0001988/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし