

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014068

研究課題名（和文）膜結合型増殖因子の機能制御機構

研究課題名（英文）Functional analysis of the C-terminal fragment of membrane-anchored growth factors

研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60202272

研究成果の概要（和文）：細胞膜結合型増殖因子の代表例として proHB-EGF を用いて、細胞膜表面での切断 (shedding) 後に産生される C-末端フラグメント (CTF) の機能を解析した。その結果、(1) CTF はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、小胞輸送の逆経路を経て核膜内膜に局在する、(2) 複数の転写抑制因子と相互作用し、細胞増殖に必須の遺伝子発現を制御する、(3) いくつかの癌腫で CTF シグナルが恒常的に入っていることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the function of C-terminal fragment (CTF) signals which are evoked by the shedding of a representative membrane-anchored growth factor proHB-EGF. We found that (1) the CTF of proHB-EGF was internalized into cytosol by endocytosis and localized at the innernuclear membrane by retrograde vesicle transport, (2) the CTF regulated several gene expression essential for cell growth promotion by interacting with and regulating gene repressors, and (3) the CTF signal was constitutively active in some tumor cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	11,300,000	0	11,300,000
2006年度	11,000,000	0	11,000,000
2007年度	11,000,000	0	11,000,000
2008年度	11,000,000	0	11,000,000
2009年度	11,000,000	0	11,000,000
総計	55,300,000	0	55,300,000

研究分野：生化学、分子細胞生物学、腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：シグナル伝達と遺伝子発現、膜型増殖因子、shedding、CTF シグナル、転写リプレッサー、レトログレード小胞輸送、

1. 研究開始当初の背景

様々な細胞外刺激に応答して、細胞は膜結合型増殖因子 Pro-heparin-binding EGF-like Growth Factor (proHB-EGF) を

shedding する。我々は shedding によって産生される細胞外ドメイン (増殖因子領域) とは別に、細胞膜に切れ残るカルボキシ末端ペプチド (HB-EGF-CTF) がこれまでに全く報

告のない独自の新規シグナル伝達経路を稼働させることを見出し (J. Cell Biol. 163, 489, 2003)、この新規シグナル伝達経路は増殖ブレーキを解除する役割を持つことを明らかにした。これまでの細胞増殖研究は増殖因子-受容体シグナルによる増殖アクセラの機能解析が中心に行われてきた。しかし、細胞の増殖は増殖アクセラと並行して、増殖ブレーキ解除の機構が作動することにより、スムーズな細胞周期の進行がもたらされると考えられる。しかし、このブレーキ解除の分子機構は全くと言っていい程不明であった。

2. 研究の目的

本研究では膜型増殖因子 proHB-EGF が shedding を受け、産生される HB-EGF-CTF の持つ増殖ブレーキ解除機能の巧妙な分子機構を明らかにする。この研究から細胞増殖分子機構の新たな概念を創出し、まず、proHB-EGF の shedding 破綻によってもたらされるがん細胞増殖の分子基盤の解明と新たな治療戦略の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) HB-EGF-CTF 核膜移行の分子機構解析と HB-EGF-CTF シグナルの独立操作系の開発

これまでの研究により HB-EGF-CTF はトランスメンブレン領域を含んでおり、核への移行は小胞体輸送の逆経路をとることが示唆されている。HB-EGF-CTF はプロセッシング後にエンドサイトーシスにより小胞体として細胞内に取り込まれることから、CTF 領域内に輸送を制御するアミノ酸配列があると予測される。そこで、CTF 領域内に変異を導入することで、HB-EGF-CTF の細胞内輸送に関わるアミノ酸配列を同定する。さらにこれを利用して、shedding 誘導を必要としない HB-EGF-CTF シグナルの独立操作系を確立する。

(2) 標的リプレッサーのプロファイリング

HB-EGF-CTF シグナルによって誘導される特異的な遺伝子発現プロファイルを明らかにするために、HB-EGF-CTF が標的とする転写リプレッサーの一つ PLZF の結合領域を詳細に決める。この結合領域の構造を基に HB-EGF-CTF が標的とする転写リプレッサー

の候補をバイオインフォマテイクス解析によりリストアップする。リストアップされた遺伝子を CFP 融合様プラスミドにクローニングし、HT1080 細胞に発現させ、HB-EGF-CTF による核外汲み出しが誘導されるかどうか判定する。これをリストアップされた全ての遺伝子について行い、HB-EGF-CTF が標的とする転写リプレッサーのプロファイリングを行う。

(3) HB-EGF-CTF によって制御される遺伝子の機能解析

上記項目 2 で同定した HB-EGF-CTF 標的転写リプレッサーが発現抑制する遺伝子群を標的転写リプレッサーの過剰発現細胞と RNAi による標的転写リプレッサーノックダウン細胞との比較による DNA チップマイクロアレイ解析により同定する。同定した遺伝子群の中から細胞増殖、運動制御に関与する因子をリストアップし、それらの因子が HB-EGF-CTF によりどのように機能制御を受けるか、蛋白質の発現レベル等の側面から機能解析を行う。

(4) HB-EGF-CTF シグナルおよび EGF ファミリーの CTF シグナルとがん疾患との関連解明

まず、各種がん細胞株、がん組織での HB-EGF-CTF、AREG-CTF の局在を免疫組織染色により検討する。さらに、抗がん剤抵抗性との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) HB-EGF-CTF 核膜移行の分子機構解析と HB-EGF-CTF シグナルの独立操作系の開発

① HB-EGF-CTF 核膜移行の分子機構解析

HB-EGF-CTF による遺伝子発現制御の分子機構を明らかにするため、その細胞内局在変化の分子機構の解析を行ってきた。proHB-EGF の細胞質内ドメインに対するモノクローナル抗体を作成し、TPA による shedding 刺激前後の局在変化を解析した。その結果、proHB-EGF は定常状態では細胞膜およびリサイクリングエンドソームに局在し、shedding 刺激により、細胞膜への局在が消失し、核膜への局在が新たに観察された (図 1、2)。膜貫通領域の 2 アミノ酸直下に V5 タグを挿入した proHB-EGF-V5 を V5 タグに対する抗体で観察したところ、同様の

局在が観察された。一方、proHB-EGFの細胞外ドメインを認識する抗体では、この局在変化は観察されなかったことから、細胞膜に発現したproHB-EGFはsheddingされ、細胞外ドメインであるsoluble HB-EGFを放出した後、HB-EGF-CTFが細胞膜から核膜へ移行すると予想される。高等真核細胞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と考えられている。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。しかし現在までに、膜タンパク質そのものが、細胞膜から核膜まで輸送され情報伝達するという報告は全くなく、この発見は細胞生物学的に極めて重要であると考えられる。そこでさらにHB-EGF-CTFの局在変化の分子機構の詳細な解析を試みた。

増殖因子領域を遊離した後に細胞膜に残るHB-EGF-CTFは、膜貫通領域(HB-EGF-TM)と24個のアミノ酸から成る細胞質領域(HB-EGF-CTF)を持つペプチドである。HB-EGF-CTFを核膜タンパク質の一つであるLap2bの膜貫通領域に融合したところ、融合膜タンパク質を核膜へ局在化させる活性を示した。さらに24アミノ酸のうち核膜への局在化にはN-末端側14アミノ酸領域が必要であり、残りのC-末端側10アミノ酸領域はリサイクリングエンドソームへの局在化活性を示した(図3)。最近、酵母の核膜内膜局在タンパク質に関して、核タンパク質輸送因子の関与が報告されたがHB-EGF-CTFは核タンパク質輸送因子importin a/bには結合せず、また核移行シグナル(NLS)活性も示さなかった。これまでに知られている核膜内膜局在タンパク質は、ER膜・核膜外膜から核膜孔を介して核膜内膜へ至ると考えられている。HB-EGF-CTFの場合、細胞質/核質に面する領域(HB-EGF-CTF)が24アミノ酸と小さく、核膜孔の通過は可能であり、ER局在により、核膜に至ることが可能であると考え、ER局在化メカニズムを探った。

HB-EGF-CTFのアミノ酸配列を種間で比較すると、C-末端近傍にK(X)KXX型のER retrieval signal様の配列が存在した。そこで、C-末端5アミノ酸を欠失させ、K(X)KXXシグナルをC-末端に露出させた。するとその変異体は細胞膜には発現せず、合成後ERに残留した。また、K(X)KXXシグナル内のリジンをアラニンに置換した変異体はshedding刺激後も核膜局在せず、HB-EGF-CTFのC-末端近傍K(X)KXX配列がHB-EGF-CTFのER局在に関与すること

が示唆される。HB-EGFはshedding刺激が無い状態ではERに留まることなく細胞膜に局在するため、何らかのメカニズムでこのER局在配列の活性化が制御されていると考えられる。HB-EGF-CTFのC-末端より2つめのセリン残基がshedding刺激後リン酸化を受けることが報告されているため、そのこのセリン残基の変異体を作成したところ、shedding刺激後も核膜への局在変化が観察されなかった。このことから、このセリンを含むHB-EGF細胞質内領域の修飾、脱修飾によりHB-EGF-CTFの局在が制御されていると考えられる。

以上の結果より、次のようなモデルを想定している。(a)刺激により細胞外の増殖因子領域が切断され、細胞質内領域が何らかの修飾・脱修飾をうけ、HB-EGF-CTFはエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれる。(b)そしてゴルジ体、リサイクリングエンドソーム等の細胞小器官を經由し、選別をうけ(c)ERを經由して(d)核膜内膜に集積する。

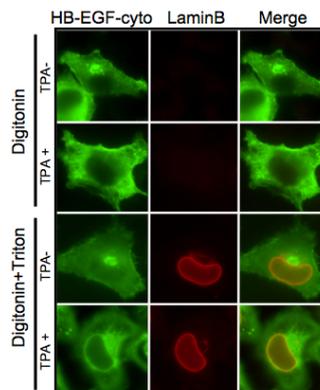


図1. HB-EGF-CTFの免疫染色。Digitonin処理により細胞膜を抗体が通過できるように処理を施した細胞と(上2段)DigitoninとTriton処理により細胞膜と核膜を抗体が通過できるように処理を施した細胞(上2段)を、shedding誘導前(TPA-)後(TPA+)でproHB-EGF細胞内ドメイン(HB-EGF-cyto)を認識する抗体で免疫染色した。核膜内膜蛋白質としてLaminBを陽性コントロールとして染色した。

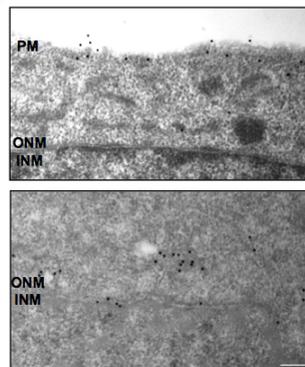


図 2. HB-EGF-CTF の免疫電子顕微鏡像。(上) shedding 誘導前 (TPA-), (下) shedding 誘導後 (TPA+)。PM: 細胞膜、ONM: 核膜外膜、INM: 核膜内膜。shedding 誘導前では HB-EGF-CTF は主に細胞膜に局在し、shedding 誘導後では ER 膜や核膜内外膜に局在する。

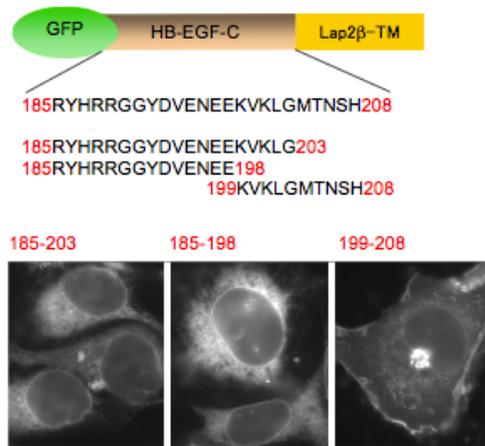


図 3. GFP/HB-EGF-CTF/Lap2 β -融合蛋白質変異体の構造と HT1080 細胞での細胞内局在。

② HB-EGF-CTF 独立操作系の開発

上述の解析結果から、核膜に局在することを見出した C-末端 5 アミノ酸を欠失させた HB-EGF-CTF 変異体 (HB-EGF-CTF Δ 5C) を発現させたが、Bcl6 による転写抑制の解除は観察されなかった。HB-EGF-CTF Δ 5C を更に機能的に局在させる技術開発により HB-EGF-CTF 独立操作系の開発が可能になると考えている。

(2) 標的リプレッサーのプロファイリング

HB-EGF-CTF シグナルの標的リプレッサーとして PLZF を同定してきたが、その他のリプレッサーが HB-EGF-CTF シグナルの標的になりうるのかどうかを検討するために、PLZF の属する BTB/POZ-ZnF ファミリーで一次構造上最も類似している Bcl-6 について検討を加えた。その結果、まず免疫沈降法ならびに GST-pull down により Bcl-6 が HB-EGF-CTF と結合することが確認できた。さらに、PLZF ならびに Bcl6 の HB-EGF-CTF 結合領域の解析からコンセンサス配列を予測し、これを基に各種遺伝子データベースから隠れマルコフモデルを用いて検索を実施し、ヒトとマウス転写抑制因子をコードする遺伝子を絞り込んだ。さらに候補遺伝子を CFP 融合様プラスミドにクローニングし、HT1080 細胞に発現させ、HB-EGF-CTF による核外移行を指標として判定した。その結果、5 つの標的リプレッサー を同定した。このうち 4 種は、N-末端側に KRAB ドメインを持

ち、C-末端側に C2H2Zn フィンガードドメインを持つ KRAB-ZN フィンガーファミリーに属する転写リプレッサーであり (これまでに報告の無い因子であることから、KRAB-1, KRAB-2, KRAB-3, KRAB-4 とそれぞれ命名)、もう一つは PLZF や Bcl-6 のファミリーに属する因子 ZF50 であることが明らかとなった。同定した 5 種それぞれのリコンビナント蛋白質を作成し、HB-EGF-CTF との結合を in vitro 実験において確認した。さらに、細胞内局在を検討した結果、5 種共に核内局在を示した。

(3) HB-EGF-CTF によって制御される遺伝子の機能解析

癌遺伝子である c-myc 遺伝子の転写抑制が PLZF によって担われていること、HB-EGF-CTF が PLZF の機能を抑制できることを踏まえ、HB-EGF-CTF による c-myc 遺伝子転写制御を解析した。その結果、HB-EGF-CTF シグナルが増殖因子 bFGF や EGF による c-myc 遺伝子発現に必須のステップとなっている事を明らかにした (図 4)。従来、増殖因子刺激による c-myc 遺伝子発現は受容体からのシグナル伝達で必要十分と考えられていたが、c-myc 制御に基づくがん細胞増殖制御とがん治療の新たな道を探る上で、本研究により PLZF が担う転写抑制が HB-EGF-CTF によって解除されることを明らかにした意義は大きい。

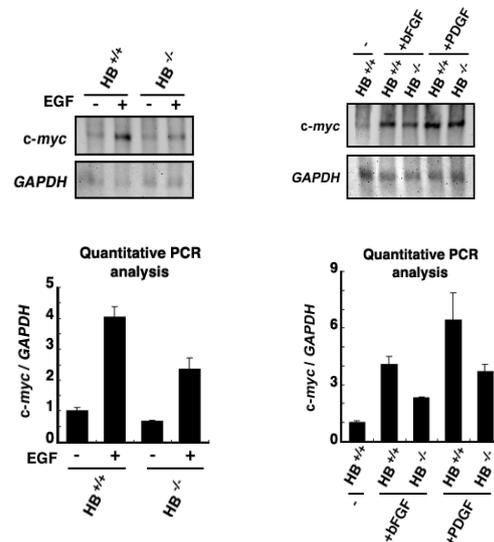


図 4. c-myc 遺伝子発現解析。

上: RNA プロテクションアッセイによる HB^{+/+} と HB^{-/-} マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) での c-myc mRNA 発現解析。細胞は無血清で 10 時間培養後に 10 ng/ml EGF、1 ng/ml bFGF または 10 ng/ml PDGF で 1 時間刺激した。GAPDH mRNA の発現を陽性コントロールとした。下: 定量 PCR 法により HB^{+/+} と HB^{-/-} MEF での c-myc mRNA 発現量の解析。細胞は無血清で 10 時間培養後に 10 ng/ml

EGF、1 ng/ml bFGF または 10 ng/ml PDGF で 1 時間刺激した。GAPDH mRNA の発現を陽性コントロールとした。

さらに、Bcl-6 が細胞周期制御因子の一つ cyclin D2 の遺伝子発現抑制をしていることが報告されていることから、cyclin D2 promoter-Luciferase をレポーター遺伝子として用いて Bcl-6 による cyclin D2 遺伝子の発現抑制を HB-EGF-CTF が解除するかどうかを検討した。Bcl-6 結合部位に変異を入れたミュータント cyclin D2 promoter-Luciferase をコントロールとしてヒト繊維芽肉腫細胞株 HT1080 細胞で Luciferase アッセイを行った。まず内在性 Bcl-6 の転写抑制活性が Bcl-6 特異的 siRNA による遺伝子ノックダウンにより有意に阻害されることを確認した。このアッセイシステムに野生型 proHB-EGF、shedding 抵抗性ミュータント proHB-EGF、細胞内ドメイン欠損ミュータント proHB-EGF Δ C の各遺伝子を導入し、TPA 処理により shedding を誘導した。その結果、野生型を導入した細胞のみ Bcl-6 による転写抑制が解除された(図 5)。以上の結果から HB-EGF-CTF が Bcl-6 による転写抑制を解除することができる結論づけた。

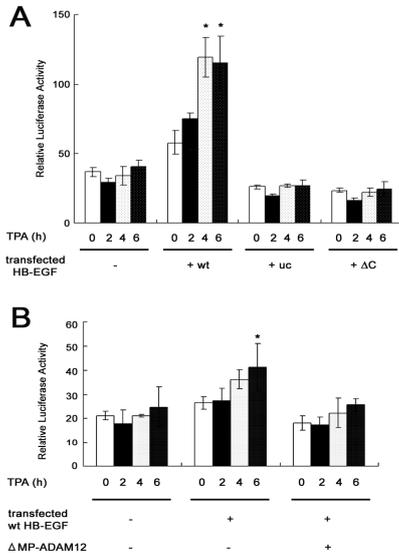


図 5. HB-EGF-CTF による Bcl6 依存性転写抑制の解除。

(A), HT1080 細胞に HB-EGF 遺伝子を導入していないもの (-), 野生型 HB-EGF (wt), shedding 抵抗性変異体 HB-EGF (uc), または細胞内ドメイン欠損変異体 HB-EGF (DC)一過性に発現し cyclin D2 プロモーター luciferase レポーター遺伝子の発現を TPA 処理後 0, 2, 4, 6 時間で測定した。*, $P < 0.01$ and **, $P < 0.05$ (B), HT1080,

HT1080/AP-HB-EGF, or HT1080/AP-HB-EGF/ Δ MP-ADAM12 細胞に cyclin D2 プロモーター luciferase レポーター遺伝子を発現し、TPA 処理後 0, 2, 4, 6 時間で luciferase 活性を測定した。 $P < 0.05$

(4) EGF ファミリーの CTF シグナルとがん疾患との関連解明

まず、各種がん細胞株での内在性 HB-EGF-CTF、AREG-CTF の局在を免疫組織染色により検討した。その結果、多くのがん細胞では定常状態では、細胞膜での局在を観察したが、口腔扁平上皮がん細胞株や、胃がん細胞株の中には定常状態において、核膜に局在するものが認められた。また、定常状態で細胞膜に局在する細胞株では、TPA 処理による shedding 誘導後では、その局在を細胞膜から核膜に変化させたのに対し、定常状態で核膜に局在する細胞株では shedding 誘導前後での変化は認められなかった。

ヒト胃がん組織を用いて、HB-EGF-CTF、AREG-CTF の局在を免疫組織染色により検討した。その結果、AREG-CTF の細胞内局在が各に限局する症例が多く確認されたことから、化学療法治療前後での AREG-CTF の細胞内局在を免疫組織染色で解析した。その結果、AREG-CTF の細胞内局在と抗がん剤抵抗性との間に有意な相関性が確認された。さらに解析症例数を増やし、AREG-CTF の細胞内局在と抗がん剤抵抗性を明確にするとともに、抗がん剤耐性予測の診断マーカーとしての有用性を今後検討し、診断応用開発を進める。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 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 Dec;20(24):5236-49
2. Oyagi A, Higashiyama S, (13,⑫)
Generation and characterization of conditional heparin-binding EGF-like growth factor knockout mice. PLoS One. 2009 Oct 14;4(10):e7461.
3. Xu D, Higashiyama S, (10,⑤)
Promyelocytic leukemia zinc finger protein regulates interferon-mediated innate immunity. Immunity. 2009 Jun 19;30(6):802-16.
4. Uetani T, Inoue H, Higashiyama S. (7,⑦)
Insufficiency of pro-heparin-binding

- epidermal growth factor-like growth factor shedding enhances hypoxic cell death in H9c2 cardiomyoblasts via the activation of caspase-3 and c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem. 2009 May 1;284(18):12399-409.
5. 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 Nov 1;121(Pt 21):3608-18.
 6. Hieda M, Higashiyama S. (9,⑨) Membrane-anchored growth factor, HB-EGF, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane. J Cell Biol. 2008 Feb 25;180(4):763-9.
 7. Higashiyama S. (6,①) Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. Cancer Sci. 2008 Feb;99(2):214-20. Review.
 8. Nanba D, Inoue H, Higashiyama S. (6,⑥) An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-Myc gene expression. J Cell Physiol. 2008 Feb;214(2):465-73.
 9. Kinugasa Y, Hieda M, Hori M, Higashiyama S. The carboxyl-terminal fragment of pro-HB-EGF reverses Bcl6-mediated gene repression. J Biol Chem. 2007 May 18;282(20):14797-806
 10. Shiraishi K, Inoue H, Higashiyama S. (8,⑧) Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. Oncogene. 2007 Jan 18;26(3):339-48.

[学会発表] (計3件)

1. Shigeki Higashiyama, Inner nuclear membrane targeting of membrane-anchored growth factors and transcriptional regulation (Invited). Gordon Research Conference "Signal Transduction within the Nucleus", Ventura, CA, USA, March 29-April 3, 2009
2. Hidetaka Ohnuki, Hirofumi Inoue, Hironao Nakayama, Shinji Fukuda, Shigeki Higashiyama. A zinc finger transcription factor regulates vascular sprouting through the downregulation of Notch signaling in vascular endothelial cells. Keystone Symposia -Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Cancer-, January 6-11, 2009, Big Sky Resort, Big Sky, Montana, USA (Hidetaka Ohnuki received Keystone Symposia Scholarship Award, NIH, National Cancer Institute Grant #1R13CA135834-01.)
3. Shigeki Higashiyama. Ectodomain shedding

of membrane-anchored growth factor HB-EGF by ADAM and HB-EGF-C terminal fragment signaling. The Kennedy institute of Rheumatology Symposium, Metalloproteinases. Biology and Pathology, London, UK, Nov. 21-22, 2005.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 新規コ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 `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

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60202272

(2) 研究分担者

森本 千恵 (MORIMOTO CHIE)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号: 10332826

(H17~H18: 研究分担者)

檜枝 美紀 (HIEDA MIKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 00380254

(H17~H19: 研究分担者)

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

(H19: 研究分担者)