

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570182

研究課題名（和文） HB-EGF-CTF の膜輸送による細胞膜から核膜への輸送機構解析

研究課題名（英文） Membrane trafficking mechanism of HB-EGF from the plasma membrane to the nuclear membrane

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

研究者番号：00380254

研究成果の概要：

上皮増殖因子（EGF）ファミリー分子は膜貫通型タンパク質として細胞膜に発現し、細胞外領域の切断により増殖因子を細胞外へ遊離する。この時、細胞膜には膜貫通型ペプチド断片が残る。私達はEGFファミリーメンバー、HB-EGFの膜貫通型ペプチド断片が細胞膜から核膜内膜へ局在変化し、転写因子に結合し、転写調節を行う事を明らかにした。さらにHB-EGFだけでなく、他のEGF分子、amphiregulinも細胞膜から核膜へ局在変化する事を示した。この時、カルボキシル末端が切断され、核膜裏打ちタンパク質ラミンと結合する事、核膜局在化によりヒストンH3の修飾が変化し、グローバルな転写が一時的に抑制される事も明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物学・細胞生物学

キーワード：メンブレントラフィック・HB-EGF・EGF 増殖因子

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に膜貫通型前駆体として発現する上皮増殖因子 (EGF) ファミリーは、刺激に応答し、EGF 様増殖因子を細胞外へ遊離する (ectodomain shedding)。遊離された EGF 増殖因子は EGF 受容体を活性化し細胞内へシグナルを伝達する。このシグナル伝達の分子メカニズムは詳細に調べられていた。一方、shedding 刺激後、細胞膜には膜貫通領域と細胞内領域をもつカルボキシル末端ペプチド断片が残るが、細胞内領域の機能に関してはほとんど何も知られていなかった。私達はその領域に転写抑制因子が結合することを yeast two hybrid 法により見出したため、本研究を開始した。

2. 研究の目的

EGF ファミリー分子の細胞内領域が転写抑制因子に結合することの生物学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

分子細胞生物学的、生化学的手法を利用した。HB-EGF の細胞内領域が結合する転写抑制因子が抑制している、遺伝子の転写調節機構を解析した。

転写抑制因子に結合する細胞内での場所を明らかにするために、HB-EGF の野生型あるいはその変異体を培養細胞株へ強制発現させ、その細胞内局在を詳細に解析した。

その結果核膜に局在化することが明らかになったので、その局在化の膜輸送経路を詳細に探った。さらに、最終の到達地に関しては免疫電顕により解析した。

4. 研究成果

- (1) HB-EGF の細胞内領域が PLZF, Bcl6 等ある種の構造をもった転写抑制因子に直接結合することを示し、その結合により転写抑制活性が調節されることを明らかにした
- (2) HB-EGF および amphiregulin の細胞内領域は膜貫通型タンパク質として、細胞膜から核膜内膜へと局在変化することを明らかにした。このようなメンブレントラフィック経路はこれまでまったく報告されておらず、まったく新規の輸送経路である。
- (3) Amphiregulin の核膜局在化にはカルボキシル末端およそ 10 アミノ酸の切断が必要であること、その切断により核膜裏打ちタンパク質ラミンに結合することを明らかにする等、細胞膜タンパク質の核膜局在化分子メカニズムを明らかにしつつある。
- (4) 上述のように、HB-EGF が転写を調節するだけでなく、Amphiregulin の核膜局在

化によりグローバルな転写が一時的に抑制されることを明らかにした。

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 32 件)

1. Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka JI, Higashiyama S., Saito N, Kirino T, Kawahara N. Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury. *Neuroscience*. 2009, 158, 683-692. 査読有
2. Uetani, T., Nakayama, H., Okayama, H., Okura T., Higaki, J., Inoue, H., & Higashiyama S. Insufficient shedding of proHB-EGF enhances hypoxic cell death in H9c2 cardiomyoblasts via activation of Caspase-3 and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 2009, in press 査読有
3. Maeda J, Inoue M, Nakabayashi K, Otomo Y, Shintani Y, Ohta M, Okumura M, Matsuura N. Rapid diagnosis of lymph node metastasis in lung cancer with loop-mediated isothermal amplification assay using carcinoembryonic antigen-mRNA. *Lung Cancer*. 2009, in press. 査読有
4. Yamamoto, K., Kimura, T., Sugitachi, A., Matsuura N. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of β -1,3-glucan purified from Hanabiratake, *Sparassis crispa*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2009, 32, 259-263. 査読有
5. Miyagawa, S., Matsumiya, G., Funatsu, T., Yoshitatsu, M., Sekiya, N., Fukui, S., Hoashi, T., Hori, M., Yoshikawa, H., Kanakura, Y., Ishikawa, J., Aozasa, K., Kawaguchi, N., Matsuura N., Myoui, A., Matsuyama, A., Ezo, S., Iida, H., Matsuda, H., Sawa, Y. Combined autologous cellular cardiomyoplasty using skeletal myoblasts and bone marrow cells for human ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist system implantation. Report of a case. *Surg. Today* 2009, 39, 133-136. 査読有
6. Isokane, M., Hieda M., Hirakawa, S., Shudou, M., Nakashiro, K., Hashimoto,

- K., Hamakawa, H., and Higashiyama, S. The plasma membrane-anchored growth factor, pro-amphiregulin, binds A-type lamin and regulates global transcription. *J. Cell. Sci.* 2008, 121, 3608-3618. 査読有
7. Hieda, M., Isokane, M., Koizumi, M., Higashi, C., Tachibana, T., Shudou, M., Taguchi, T., Hieda, Y., and Higashiyama, S. Membrane-anchored growth factor, HB-EGF, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* 2008, 180, 763-769. 査読有
 8. Higashiyama, S., Iwabuki, H., Morimoto, C., Hieda, M., Inoue, H., and Matsushita, N. Membrane-anchored Growth Factors, The EGF Family: Beyond receptor ligands. *Cancer Sci.* 2008, 99, 214-220. 査読有
 9. Yudin, D., Hanz S., Yoo, S., Iavnilovitch, E., Willis, D., Gradus, T., Vuppalachchi, D., Segal-Ruder, Y., Ben-Yaakov, K., Hieda, M., Yoneda, Y., Twiss, J.L., and Fainzilber, M. Localized regulation of axonal RanGTPase controls retrograde injury signaling in peripheral nerve. *Neuron* 2008, 59, 241-252. 査読有
 10. Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka JI, Higashiyama, S., Saito N, Kirino T, Kawahara N. Region-specific proliferative response of neural progenitors to exogenous stimulation by growth factors following ischemia. *Neuroreport.* 2008, 19, 805-809. 査読有
 11. Ngan, C.Y., Yamamoto, H., Takagi, A., Fujie, Y., Takemasa, I., Ikeda, M., Takahashi-Yanaga, F., Sasaguri, T., Sekimoto, M., Matsuura, N., Monden, M. Oxaliplatin induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells. *Cancer Sci.* 2008, 99, 129-139. 査読有
 12. Komori, T., Takemasa, I., Yamasaki, M., Motoori, M., Kato, T., Kikkawa, N., Kawaguchi, N., Ikeda, M., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Matsubara, K., Matsuura, N., Monden, M. Gene expression of colorectal cancer: Preoperative genetic diagnosis using endoscopic biopsies. *Int. J. Oncol.* 2008, 32, 367-375. 査読有
 13. Ueda, K., Nakanishi, T., Shimizu, A., Takubo, T., Matsuura, N. Identification of L-plastin autoantibody in plasma of patients with non-Hodgkin's lymphoma using a proteomics-based analysis. *Ann Clin Biochem.* 2008, 45, 65-69. 査読有
 14. Ezumi, K., Yamamoto, H., Murata, K., Higashiyama, M., Damdinsuren, B., Nakamura, Y., Kyo, N., Okami, J., Ngan, C.Y., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N., Nojima, H., Monden, M. Aberrant Expression of Connexin 26 Is Associated with Lung Metastasis of Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 677-684. 査読有
 15. Fukui, S., Kitagawa-Sakakida, S., Kawamata, S., Matsumiya, G., Kawaguchi, N., Matsuura, N., Sawa, Y. Therapeutic effect of midkine on cardiac remodeling in infarcted rat hearts. *Ann. Thorac. Surg.* 2008, 85, 562-570. 査読有
 16. Miyoshi, Y., Kurosumi, M., Kurebayashi, J., Matsuura, N., Takahashi, M., Tokunaga, E., Egawa, C., Masuda, N., Kim, S.J., Okishiro, M., Yanagisawa, T., Ueda, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. Topoisomerase IIalpha-positive and BRCA1-negative phenotype: Association with favorable response to epirubicin-based regimens for human breast cancers. *Cancer Lett.* 2008, 264, 44-53. 査読有
 17. Kittaka, N., Takemasa, I., Takeda, Y., Marubashi, S., Nagano, H., Umeshita, K., Dono, K., Matsubara, K., Matsuura, N., Monden, M. Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data. *Eur. J. Cancer* 2008, 44, 885-897. 査読有
 18. Miyoshi, Y., Kurosumi, M., Kurebayashi, J., Matsuura, N., Takahashi, M., Tokunaga, E., Egawa, C., Masuda, N., Kim, S.J., Okishiro, M., Yanagisawa, T., Ueda, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. :The Collaborative Study Group of Scientific Research of the Japanese Breast Cancer Society. Low nuclear grade but not cell proliferation predictive of pathological complete response to docetaxel in human

- breast cancers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008, 134, 561-567. 査読有
19. Shiozaki, M., Yoshimura, K., Shibata, M., Koike, M., Matsuura, N., Uchiyama, Y., Gotow, T. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. *Neuroscience* 2008, 152, 924-941. 査読有
20. Watanabe, M., Takemasa, I., Kawaguchi, N., Miyake, M., Nishimura, N., Matsubara, T., Matsuo, E., Sekimoto, M., Nagai, K., Matsuura, N., Monden, M., Nishimura, O. An application of the 2-nitrobenzenesulfonyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma: A novel approach for biomarker discovery. *Proteomics Clin. Appl.* 2008, 2, 925-935. 査読有
21. Torikai, K., Ichikawa, H., Hirakawa, K., Matsumiya, G., Kuratani, T., Iwai, S., Saito, A., Kawaguchi, N., Matsuura, N., Sawa, Y. A self-renewing, tissue-engineered vascular graft for arterial reconstruction. *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 2008, 136, 37-45. 査読有
22. Tian, H., Miyoshi, E., Kawaguchi, N., Shaker, M., Ito, Y., Taniguchi, N., Tsujimoto, M., Matsuura, N. The implication of N-acetylglucosaminyltransferase V expression in gastric cancer. *Pathobiology* 2008, 75, 288-294. 査読有
23. Inoue, M., Maeda, J., Ohta, M., Sawabata, N., Matsuura, N., Okumura, M. Detection of occult lymph node metastasis in lung cancer patients using molecular technique. *Curr. Res. in Cancer* 2008, 2, 141-149. 査読有
24. Yokota, T., Ichikawa, H., Matsumiya, G., Kuratani, T., Sakaguchi, T., Iwai, S., Shirakawa, Y., Torikai, K., Saito, A., Uchimura, E., Kawaguchi, N., Matsuura, N., Sawa, Y. In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding. *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 2008, 136, 900-907. 査読有
25. Yamamoto, H., Noura, S., Okami, J., Uemura, M., Takemasa, I., Ikeda, M., Ishii, H., Sekimoto, M., Matsuura, N., Monden, M., Mori, M. Overexpression of MT1-MMP is insufficient to increase experimental liver metastasis of human colon cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 2008, 22, 757-761. 査読有
26. Kinugasa, Y., Hieda, M., Hori, M., and Higashiyama, S. The carboxyl-terminal fragment of proHB-EGF reverses Bcl6-mediated gene repression. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 14797-14806. 査読有
27. Shiraishi, K., Yamasaki, K., Nanba, D., Inoue, H., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Higashiyama, S. Pbx1 is a major target of PLZF-mediated melanoma cell growth suppression. *Oncogene* 2007, 26, 339-348. 査読有
28. Joko, T., Nanba, D., Shiba, F., Miyata, K., Shiraishi, A., Ohashi, Y. and Higashiyama, S. Effects of promyelocytic leukemia zinc finger protein on the proliferation of cultured human corneal endothelial cells. *Mol. Vision.* 2007, 13, 649-658. 査読有
29. Nanba, D., Inoue, Y., Shigemi, Y., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Higashiyama, S. An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-myc expression. *J. Cell. Physiol.* 2007, 214, 465-473. 査読有
30. Furochi, H., Tamura, S., Mameoka, M., Yamada, C., Ogawa, T., Hirasaka, K., Okumura, Y., Imagawa, T., Oguri, S., Ishidoh, K., Kishi, K., Higashiyama, S. Nikawa, T. Osteoactivin fragments produced by ectodomain shedding induce MMP-3 expression via ERK pathway in mouse NIH-3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.* 2007, 581, 5743-5750. 査読有
31. Morita, S., Shirakata, Y., Shiraishi, A., Kadota, Y., Hashimoto, K., Higashiyama, S., Ohashi, Y. Human corneal epithelial cell proliferation by epiregulin and its cross-induction by other EGF family members. *Mol. Vision.* 2007, 13, 2119-2128. 査読有
32. Ikin, A.F., Causevic, M., Pedrini, S., Lyndsey S. Benson, L.S., Buxbaum, J.D., Suzuki, T., Simon Lovestone, S., Higashiyama, S., Mustelin, T., Burgoyne,

R.D., and Gandy, S. Evidence against roles for phorbol binding protein Munc13-1, ADAM adaptor Eve-1, or vesicle trafficking phosphoproteins Munc18 or NSF as phospho-state-sensitive modulators of phorbol/PKC-activated Alzheimer APP ectodomain shedding. *Molecular Neurodegeneration* 2007, 2:23 査読有

[学会発表] (計 22 件 招待講演含む)

1. 第 67 回日本癌学会学術総会 (ミニシンポジウム・口頭発表) 2008 年 10 月 28 日~30 日、愛知県・名古屋市、Mayumi Isokane, Miki Hieda, Eriko Koya, Koichi Nakashiro, Hiroyuki Hamakawa and Shigeki Higashiyama, Inner nuclear membrane targeting of pro-amphiregulin regulates oral squamous cell carcinoma cell viability
2. Kaori Iwaki, Yasuko Yamamoto, Yukiko Ueno, Yuhki Yokoyama, Mohammed N. Shaker, Seiji Mori, Nariaki Matsuura, Induction of Metastatic Potential by Cleavage of Carcinoembryonic Antigen in Colorectal Carcinoma Cells. 36th Congress of the International Society of Oncology & Biomarkers, Tokyo, 2008.10.5-9.
3. Mohammed N.Shaker, Seiji Mori, Yuhki Yokoyama, Kaori Iwaki, Yukiko Ueno, Nariaki Matsuura, Novel Molecular Method for Rapid Diagnosis of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer. 36th Congress of the International Society of Oncology & Biomarkers, Tokyo, 2008.10.5-9.
4. Yukiko Ueno, Hideki Ishikawa, Yuhki Yokoyama, Mohammed N. Shaker, Kaori Iwaki, Seiji Mori, Nariaki Matsuura, Intermediate Surrogate Molecular Marker for the Prevention of Colorectal Cancer. 36th Congress of the International Society of Oncology & Biomarkers, Tokyo, 2008.10.5-9.
5. Seiji Mori, Yoshikazu Takada, Nariaki Matsuura, Specific Binding of Fibroblast Growth Factor-1 (FGF1) to Integrins is Required for FGF1 Signaling. 36th

Congress of the International Society of Oncology & Biomarkers, Tokyo, 2008.10.5-9.

6. Yuhki Yokoyama, Seiji Mori, Nariaki Matsuura, Effect of Platelet Derived Growth Factor on Development and Progression of Breast Cancer. 36th Congress of the International Society of Oncology & Biomarkers, Tokyo, 2008.10.5-9.
7. Cold Spring Harbor meeting, Nuclear structure and function Dynamic Organization of Nuclear Function (ポスター発表)2008 年 9 月 17 日~ 21 日 Cold Spring Harbor, NY, U.S.A. (9 月 18 日) Mayumi Isokane, Miki Hieda, and Shigeki Higashiyama, Plasma membrane anchored growth factors HB-EGF and amphiregulin targeted to the inner nuclear membrane and regulate gene expression
8. 第 60 回日本細胞生物学会大会 2008 年 6 月 29 日~7 月 1 日 (7 月 1 日) 神奈川県・パシフィコ横浜、檜枝美紀、磯兼真由美、東山繁樹、Intracellular transport of membrane-anchored EGF family growth factor from the plasma membrane to the inner nuclear membrane 「膜型増殖因子 EGF ファミリー分子は細胞膜から核膜へ局在変化する」
9. 第 60 回日本細胞生物学会大会 2008 年 6 月 29 日~7 月 1 日 (6 月 29 日) パシフィコ横浜、磯兼真由美、檜枝美紀、東山繁樹、The plasma membrane-anchored growth factor, amphiregulin, binds A-type lamin and regulates global transcription 「膜型増殖因子 amphiregulin の細胞内輸送経路およびその機能解析」
10. 12th International Congress on Oral Cancer *conjunction with* 24th Congress of ICMFS (former IAMFS)、2008 年 5 月 22 日~25 日 Shanghai, China、Mayumi Isokane, Miki Hieda, Satoshi Hirakawa, Koichi Nakashiro, Koji Hashimoto, Hiroyuki Hamakawa and Shigeki Higashiyama, The plasma membrane-anchored growth factor, amphiregulin, binds A-type lamin and regulates global transcription

11. 国際シンポジウム「メンブレントラフィック」2007 11月27日～29日(11月27日)、淡路島、Miki Hieda and Shigeki Higashiyama、Membrane-anchored growth factor HB-EGF on cell surface targets to the nuclear membrane and regulates gene expression
12. 核ダイナミクス研究会 2007 9月27日～29日(9月29日)、札幌、檜枝美紀、衣笠由美、東山繁樹、「膜型増殖因子 HB-EGF は核膜内膜に移行し転写を調節する
13. EMBO Conference Series on Nuclear Structure and Dynamics Montpellier 2007 9月1日～5日(9月4日)、Miki Hieda and Shigeki Higashiyama Membrane-anchored growth factor HB-EGF on cell surface targets to the nuclear membrane and regulates gene expression
14. 第40回発生生物学会第49回日本細胞生物学会合同大会、2007年5月28日～30日(5月30日)、福岡県福岡市国際会議場、Miki Hieda, Yumi Kinugasa, Chizuru Higashi, Taro Tachibana, Tomohiko Taguchi, and Shigeki Higashiyama, Membrane-anchored growth factor, HB-EGF targets to the nuclear membrane and regulates gene expression

招待講演

- 1 Shigeki Higashiyama, Gordon Research Conference “Signal Transduction within the Nucleus” March 29-April 3, 2009, Ventura, California, USA, “Inner nuclear membrane targeting of membrane-anchored growth factors and transcriptional regulation”
- 2 Shigeki Higashiyama, International Symposium “New Frontiers in Cancer Research”, March 18, 2009, Sapporo, Hokkaido, “Nuclear signaling of membrane-anchored growth factors and cell growth regulation”
- 3 Nariaki Matsuura, Yasushi Shintani, Yukiko Ueno, Kaori Iwaki, Yuhki Yokoyama, Mohammed N. Shaker, Seiji Mori. 36th Congress of the International Society of Oncology & Biomarkers, Symposium “New Molecular Markers in Lung Cancer”, Tokyo, October 5-9 2008,

“The Role of ADAM9 in Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer.”

- 4 N. Matsuura, F. Akiyama, S. Noguchi, M. Tsujimoto, H. Inaji, S. Nakamura, M. Mano, Y. Otomo, International Oncoplastic Breast Surgery Symposium, September 19-20, 2008. Daegu, Korea, “Development of a new molecular method for rapid diagnosis of lymph node metastasis in breast cancer.”
- 5 東山繁樹、文部科学省、厚生労働省 がん研究合同シンポジウム、2008年2月28-29日、学術総合センター 一橋記念講堂(東京)、招待講演 「膜型増殖因子の核膜内膜移行とがん細胞特性の変化」
- 6 東山繁樹、特定領域研究「核ダイナミクス」、「遺伝情報デコード」合同シンポジウム「クロマチンシグナリングの分子機構」東京ステーションカンファレンス、2008年1月8日、招待講演 「膜型増殖因子の核膜内膜移行による転写調節」
- 7 東山繁樹、第44回日本口腔組織培養学会、2007年12月1日、松山、招待講演 「膜型増殖因子による遺伝子転写制御機構」
- 8 東山繁樹、第59回日本泌尿器科学会西日本総会、2007年11月10日、松山、招待講演「癌微小環境における細胞特性の変化-膜型増殖因子の役割

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
研究者番号：00380254

(2) 研究分担者

松浦 成昭 (MATSUURA NARIAKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190402

(3) 連携研究者

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