# 終末分化細胞—特に心筋および神経細胞の長期生存維持機構の解明
# Molecular mechanisms of long term maintenace of the terminal differentiated cells, cardiomyocytes and neurons

代表研究者　愛媛大学　東山繁樹　Ehime University　Shigeki Higashiyama
共同研究者　カルナバイオサイエンス　石黒啓司　Carna Bioscence Inc. Hiroshi Ishiguro
カルナバイオサイエンス　松原　守　Carna Bioscence Inc. Mamoru Matsubara

A disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) is implicated in the ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) in epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation. However, the activation mechanisms of ADAM12 remain elusive. To analyze the regulatory mechanisms of ADAM12 activation, we performed yeast two-hybrid screening using the cytoplasmic domain of ADAM12 as bait, and identified PACSIN3 and a novel protein that we designated Eve-1. The interaction analyses between ADAM12 and PACSIN3 or Eve-1 were performed by using Glutathione *S*-transferase (GST) fusion protein and revealed that the proline-rich region (amino acid residues 829-840) of ADAM12 was required for the binding to them. Knockdown of endogenous PACSIN3 and Eve-1 by small interfering RNA (siRNA) in HT1080 cells attenuated greatly the shedding of proHB-EGF induced by TPA and angiotensin II.

Based on these data, these identified proteins play a role in positively

regulating the activity of ADAM12 in the signaling of angiotensin II- and TPA-induced HB-EGF shedding.

## 研究目的

循環器疾患や神経疾患は我が国を問わず先進諸国では癌と並ぶ最大の医療問題である。本研究では、何十年もの間、増えることなく、死ぬことなく生き続ける終末分化細胞である心筋細胞と神経細胞の長期生存の分子機構を解き明かすことを目的とした基礎研究である。

私どもはこれまでに、心筋細胞の長期的正常機能維持には心筋細胞膜蛋白質の一つである膜型細胞増殖因子 HB-EGF の細胞膜からの切り離し（プロセシング）の機構が極めて重要であることを明らかにしてきた。（**Nature Med.**, 8,35-40, 2002）。この実験結果は HB-EGF プロセシングのコントロールが心筋細胞を長期に生存させる重要な分子機構であることを強く示唆している。また。HB-EGF は成体の神経細胞にも比較的多く発現しており、神経細胞においても心筋細胞と同様の生体反応が存在するものと推測される。すなわち、終末分化細胞の長期生存の分子機構は共通のものであり、HB-EGF を代表とする細胞膜結合型増殖因子のプロセシングが鍵を握るものと考えられる。本研究では HB-EGF プロセシングの分子機構の全容解明を目指し、終末分化細胞の長期生存の分子機構解明にアプローチした。

## 研究経過

### ADAM12 活性化の分子機構

G-蛋白質共役型受容体(GPCR)から HB-EGF へのシグナル伝達経路を解明する目的で、GPCR によって活性化され HB-EGF をプロセシングする ADAM12 の

細胞内ドメインに結合する蛋白質を同定するために、ADAM 12 の細胞内ドメインをベイトとして酵母 two-hybrid スクリーニングを行った。

ADAM12 細胞内ドメインをベイトにし、ヒト心臓の cDNA ライブラリーよりスクリーニングした結果、１６種類の遺伝子を同定した。ADAM12 細胞内ドメインは４つのプロリンリッチドメインを持つことから、その結合相手と考えられる SH3 ドメインをコードする 2 つの遺伝子に着目しその cDNA 全長を PCR によりクローニングした。得られた遺伝子の一つはすでに報告のある PACSIN3、もう一つは EST データーベースでは SH3d19 として登録されている新規の遺伝子であり、ADAM に結合することから Eve-1 と名付けた。

PACSIN3 は 424 個のアミノ酸からなる蛋白質で C-末端側に SH3 ドメインを１個持つ。一方、Eve-1 は 767 個のアミノ酸からなる蛋白質で C-末端領域に SH3 ドメインをタンデムに 4 個持つ Eve-1a と、さらにこの分子の中程に 23 アミノ酸の挿入を持つことにより新たな SH3 ドメインを形成し、合計 5 個の SH3 ドメインをもつスプライシングバリアントの Eve-1b からなる。この両蛋白質共に SH3 ドメインを介して ADAM12 のプロリンリッチドメインと相互作用する。また Eve-1 は N-末端領域にプロリンリッチドメインを 7 個持ち、この領域は ADAM12 との相互作用するための制御ドメインとして機能することが予測される。

PACSIN3 ならびに Eve-1 の機能を明らかにするために、ADAM12 による HB-EGF のプロセシングに及ぼす効果を、PACSIN3 ならびに Eve-1 の特異的 siRNA によるノックダウンにより検討した。両 siRNA 共に HT1080/HB-EGF-AP 細胞に効率良く導入され、導入後４８時間での PACSIN3 ならびに Eve-1 の遺伝子発現を PCR により検出した結果、顕著に抑制しているのを確認した。この細胞を用いて、フォルボールエステル、または angiotensin II によっ

て引き起こされる HB-EGF-AP のプロセシングを処理後３０分後の培養上清中の AP 活性の検出により検討した。その結果、PACSIN 及び Eve-1 のノックダウンによりフォルボールエステルによる HB-EGF-AP のプロセシングは各々約 40％および約 50％抑制抑制された。一方、PACSIN 及び Eve-1 のノックダウンにより angiotensin II による HB-EGF-AP のプロセシングは各々約 55％および約 40％抑制された。両者の同時ノックダウンによりフォルボールエステルと angiotensin II による HB-EGF-AP のプロセシングは各々ほぼ 50-60％が抑制されるに留まった。

以上の結果から、PACSIN, Eve-1 ともにフォルボールエステルならびに angiotensin II 刺激による HB-EGF プロセシングのシグナル経路に位置し、ADAM12 の活性化を正に制御する因子であると推測された。また、両者の siRNA によりフォルボールエステルと angiotensin II による HB-EGF-AP のプロセシングに相乗的または相加的効果が見られなかったことから、両者が同時に作用して機能することが示唆される。

## 考察

我々はこれまでに、HB-EGF プロセシングの生理的な重要性を明らかにする目的で遺伝子改変による２種のプロセシング破綻マウス、すなわち HB-EGF を恒常的に分泌する遺伝子改変マウスと HB-EGF の分泌が抑制されるプロセシング抵抗性遺伝子改変マウスを作成し、その表現系を解析した。その結果、HB-EGF を恒常的に分泌するは心筋細胞の肥大ならびに形態形成異常を現し、キメラで死亡した。一方、HB-EGF プロセシング抵抗性マウスは拡張型心筋症の症状を呈し６—８ヶ月で死亡した。我々は、厳密な HB-EGF のプロセシン制御は少なくとも心形成ならびに機能維持に必須であることを示唆したが、厳密な HB-EGF

のプロセシン制御の分子機構を理解する上で、プロセシング酵素 ADAM12 の制御機構の解析は極めて重要である。本研究において同定した ADAM12 の活性化を制御する２つの分子 PACSIN3 と Eve-1 は、心筋細胞の長期生存の分子機構を明らかにするための重要な鍵分子となるものと期待できる。今後、PACSIN3 と Eve-1 について、さらなる解析を進める。

## 研究発表

### 口頭発表

1. Motonari Tanaka, Seiji Mori, Daisuke Nanba, Hiroshi Ishiguro, Koichiro Yoshino, Nariaki Matsuura, and Shigeki Higashiyama
Identification of ADAM12-binding Protein Necessary for Ectodomain Shedding of Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor
第７６回　日本生化学大会　（横浜、2003）

2. Seiji Mori, Motonari Tanaka, Mayumi Uragami, Daisuke Nanba, Eiji Nishiwaki, Hiroshi Ishiguro, Shigeki Higashiyama, Nariaki Matsuura
SH3-domain containing protein PACSIN3 binds ADAM12 cytoplasmic domain and modulates ectodomain shedding of HB-EGF
第７６回　日本生化学大会　（横浜、2003）

### 誌上発表

1. Tanaka, M., Nanba, D., Mori, S., Ishiguro, H., Nishiwaki, E., Yoshino, K., N.Matsuura and Higashiyama, S. Ectodomain shedding of heparin-binding EGF-like growth factor is regulated positively by ADAM12-binding protein Eve-1. ***J. Biol. Chem.*** *revised.*