OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	PACSIN3 Binds ADAM12/Meltrin α and Upregulates Ectodomain Shedding of Heparin-binding EGF-like Growth Factor
Author(s)	森, 誠司
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45231
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏　　名	森（もり）　誠司（せいじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（保健学）
学位記番号	第　18110　号
学位授与年月日	平成15年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科保健学専攻
学位論文名	PACSIN3 Binds ADAM12/Meltrin α and Upregulates Ectodomain Shedding of Heparin-binding EGF-like Growth Factor （PACSIN3はADAM12/Meltrin αに結合し、ヘパリン結合型EGF様増殖因子を正に制御する）
論文審査委員	（主査） 教授　松浦　成昭 （副査） 教授　川野　淳　　教授　杉山　治夫

論文内容の要旨

〔目　的〕

ディスインテグリンメタロプロテアーゼ（ADAM）は複数の機能ドメインを持つ膜貫通型タンパク質である。その多彩な機能のひとつにメタロプロテアーゼドメインを介した膜タンパク質の切断がある。ADAM12は膜型ヘパリン結合型上皮増殖因子様増殖因子（HB-EGF）を細胞膜より切断し、可溶型の増殖因子を産生し、レセプターである上皮増殖因子受容体（EGFR）に結合、活性化することが知られている。本研究はADAM12のプロテアーゼ機能を活性化する機構の解明を目的として、細胞内ドメインとの結合タンパクを同定し、その調節メカニズムを検討した。

〔方法ならびに成績〕

ADAM12の細胞内領域にはSrc homology 3（SH3）結合領域と推測されるプロリンに富んだ配列が複数みられ、この領域を介した細胞内調節機構の可能性が考えられる。そこで酵母two-hybrid法を用いてADAM12の細胞内領域をベイトとし、それに結合するタンパク質をヒト心臓由来ライブラリーよりスクリーニングした。その結果C末端領域にSH3領域を有する49 kDのタンパク質PACSIN3を単離した。この結合を確認するためにグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）融合PACSIN3を大腸菌に発現させ精製した後、ADAM12を過剰発現させたヒト線維肉種細胞株HT1080抽出液と混和し*in vitro*の結合実験を行い、ADAM12とGST-PACSIN3の特異的な結合を確認した。またPACSIN3を恒常的に発現させたHT1080細胞（HT1080/PACSIN3）にADAM12を過剰発現させ共免疫沈降法を行なった。その結果、ADAM12とPACSIN3とが細胞内においても結合することを確認した。さらにHT1080/PACSIN3細胞へ緑色蛍光色素標識したADAM12を過剰発現させた後、蛍光抗体間接法でPACSIN3の局在を観察すると、ADAM12とPACSIN3の両者が細胞膜上で共局在していることが明らかとなった。

両者の結合部位を決定するためにADAM12のN末端からの長さの異なる欠失変異体7種類を順次作製しGST融合タンパク質とし、HT1080/PACSIN3の細胞抽出液とそれぞれ混和し*in vitro*の結合実験を行なった。これよりADAM12のプロリンに富む領域（829-840アミノ酸残基）がその結合に必要であることが分かった。

プロテインキナーゼC（PKC）の活性化剤である12-*O*-tetradecanoyl-phorbor-13-acetate（TPA）またはGタン

パク質共役型受容体（GPCR）アゴニストであるアンジオテンシンII（AngII）によりHB-EGFの膜からの切断が誘導されることが知られている。HB-EGFの細胞外領域にアルカリフォスファターゼ（AP）標識したものをHT1080細胞に恒常的に発現させ（HT1080/HB-EGF-AP）、さらにPACSIN3を一過性に発現させた。この細胞をTPA、AngIIで刺激したところ、その培養上清中ではいずれの刺激でもAP活性の上昇が見られ、HB-EGFの膜からの切断を確認した。しかし、PACSIN3のSH3領域欠失変異体を発現させてもAP活性の有意な上昇は認められなかった。HT1080/HB-EGF-AP細胞に対してPACSIN3に特異的なsmall interfering RNA（siRNA）を用いて内在性のPACSIN3の発現を抑制したところ、TPA、AngIIいずれの刺激でもAP活性は著明に減少した。

切断された可溶型のHB-EGFはリガンドとしてEGFRに結合する。そこでHT1080細胞にPACSIN3を過剰発現させTPA、AngIIで刺激したところEGFRのリン酸化上昇が早期にみられた。またsiRNAを用いたPACSIN3のノックダウンによりEGFRのリン酸化の遅延が認められた。

ADAMファミリーにはプロテアーゼの活性があるものがいくつか報告されている。そこで他のプロテアーゼ活性を有するADAMファミリー分子についてもPACSIN3との結合性を酵母two-hybrid法を用いて解析した。その結果、PACSIN3はADAM12のみならずADAM9、10、15、19とも相互作用することが分かった。

〔総　括〕

ADAM12の活性化のメカニズムについて解析を行った。ADAM12の細胞内領域にはプロリンに富んだSH3結合領域があり、PACSIN3は分子内のSH3領域を介して直接結合することが*in vitro*の結合実験より明らかとなった。TPA、AngII刺激で惹起されるHB-EGFの切断はPACSIN3により正に制御されていることがPACSIN3の過剰発現および発現抑制の実験より示された。またPACSIN3は他のADAMとも結合することから、ADAMが活性化される時の細胞内調節因子として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、筋肉や神経の発生・分化、癌の浸潤・転移、心不全などの病態の点から最近大きな注目を集めているディスインテグリンメタロプロテアーゼ12（ADAM12）の機能の制御機構を解明したものである。膜タンパク質であるADAM12が細胞内から調節されている可能性は以前より考えられていたが、本論文により、細胞内からPACSIN3というこれまであまり注目されていなかった分子がADAM12のプロテアーゼ活性を制御していることが明らかにされた。

実験手法として、まず酵母two-hybrid法という分子生物学的な方法でADAM12の細胞内ドメインに結合するタンパク質としてPACSIN3を同定し、生化学的、細胞生物学的方法により多角的に両者の相互作用を証明し、さらにその結合部位を決定した。次いで、PACSIN3のADAM12の機能制御の検証として、PACSIN3のup-regulationに伴い、ヘパリン結合型EGF様増殖因子（HB-EGF）が細胞膜から切断されることを種々の系で示した。さらに、PACSIN3分子を抑制することによりHB-EGFの切断が阻害されることも証明した。

PACSIN3はADAM12のプロテアーゼ活性を制御する因子として初めて見つかったものであるが、ADAMファミリーの多くの分子に結合することが示され、ADAMファミリー全体の機能制御の重要な調節因子であり、多くの病態の解明および診断・治療への応用が期待される。

本論文に記載された研究の立案、研究計画とその遂行、得られた研究成果ならびに考察から、著者は科学的な研究を行なうために必要な高度な研究能力を保有していることが示された。よって本論文の著者は、博士（保健学）の学位を授与されるに値するものと認める。