

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	もり 森 せい 誠 じ 司
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、可溶性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-phorbol-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 (Ang II) 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、Ang II 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、Ang II いずれの刺激でも AP 活性は著明に減少した。

切断された可溶性の 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、Ang II 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、Ang II 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、細胞生物学的な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。