

属する酵素が複数報告されている。酵素を扱う以上、酵素学に基づいた考察は必要であり重要であるが、実験系において、正確に追試した場合の再現される実験結果が基本であり、限られた知識に基づいた先入観にとらわれない、実験事実に基づいた考察が重要と考える。このことは恩師である早石修先生が折にふれ、おっしゃっていたことであるが、還元当量供与体としての Trx の関与は、そのことを体現したことであった。限られた範囲での常識から外れることであっても、その事実を故意に消し去るのではなく、実験事実をもとに生体内での役割を考え、検討することが大事であると考え。

生体内での PGF は AKR 型酵素に加え、Trx 型酵素によって合成されると思われる。著者等が見出した AKR 型 PGF 合成酵素は肺や肝臓に高い活性があるが、Trx 型 PGF 合成酵素は中枢神経系に多く存在していることから、各 PGF 合成酵素の臓器分布や細胞内分布の違い、あるいは還元当量供与体の分布の違いにより、PGF 合成に寄与する酵素は異なるのかもしれない。今後の研究の進展により明らかになることを期待する。

最後に、上述したように AKR 群に属する PGF を合成する酵素が複数報告されてきており、それぞれの酵素名の扱いが混乱しつつあるように見受けられる。酵素学的結果に基づき名付けられた酵素名が、その時々論文に受理されやすいという理由で故意に、別の酵素名に変えられる場合もあると聞き、さらに混乱に拍車がかかる恐れがある。PGF を生成する酵素に関して、酵素名の整理が必要であるとともに、正確な酵素名の提示が求められる。

謝辞

東亜大学に在籍するようになって以来約 10 年間、偏見なく研究を支え、勇気づけていただいた David F. Woodward 博士 (Allergan 社)、ラジオアイソトープの使用実験を快く御許可いただいた伊藤誠二博士 (関西医科大学教授) に深く感謝申し上げます。プロスタミド/PGF 合成酵素の研究にポストドクとして従事していただいた幸田 (田中) 紀子博士、森内寛博士 (現武蔵野大学) をはじめ、mPGE 合成酵素-2 の研究を含め、多くの共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。最後に東亜大学大学院生、卒業研究生に感謝致します。

- 1) Watanabe, K., Yoshida, R., Shimizu, T., & Hayaishi, O. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 7035-7041.
- 2) Watanabe, K., Fujii, Y., Nakayama, K., Ohkubo, H.,

- Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Nakanishi, S., & Hayaishi, O. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 11-15.
- 3) Suzuki-Yamamoto, T., Nishizawa, M., Fukui, M., Okuda-Ashitaka, E., Nakajima, T., Ito, S., & Watanabe, K. (1999) *FEBS Lett.*, 462, 335-340.
- 4) Chen, L.Y., Watanabe, K., & Hayaishi, O. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, 296, 17-26.
- 5) Suzuki, T., Fujii, Y., Miyano, M., Chen, L.Y., Takahashi, T., & Watanabe, K. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 241-248.
- 6) Wintergalen, N., Thole, H.H., Galla, H.J., & Schlegel, W. (1995) *Eur. J. Biochem.*, 234, 264-270.
- 7) Kubata, B.K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szalies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., & Hayaishi, O. (2000) *J. Exp. Med.*, 192, 1327-1338.
- 8) Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J.C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., Lefranc, A.M., Martinez, O., Martinez, A. & Urade, Y. (2009) *J. Biochem.*, 145, 161-168.
- 9) Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J. A., & Fortier, M.A. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 11205-11212.
- 10) Moriuchi, H., Koda, N., Okuda-Ashitaka, E., Daiyasu, H., Ogasawara, K., Toh, H., Ito, S., Woodward, D.F., & Watanabe, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 792-801.
- 11) Woodward, D.F., Liang, Y., & Krauss, A.H. (2008) *Br. J. Pharmacol.*, 153, 410-419.
- 12) Laurent, T.C., Moore, E.C., & Reichard, P. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 3436-3444.
- 13) Kondo, N., Nakamura, H., Masutani, H., & Yodoi, J. (2006) *Antioxid. Redox. Signal.*, 8, 1881-1890.
- 14) Saze, H., Ueno, Y., Hisabori, T., Hayashi, H., & Izui, K. (2001) *Plant Cell Physiol.*, 42, 1295-3102.
- 15) Daiyasu, H., Watanabe, K., & Toh, H. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 281-286.

渡部 紀久子

(東亜大学医療学部医療工学科・
東亜大学大学院生命科学専攻)

Prostaglandin synthases with thioredoxin domain
Kikuko Watanabe (Division of Life Sciences, Graduate School of Integrated Sciences and Arts, University of East Asia, 2-1 Ichinomiyagakuen, Shimonoseki, Yamaguchi 751-8503, Japan)

EGF ファミリー前駆体切断による心筋細胞の低酸素ストレス応答

1. はじめに

生物はその体内の恒常性を保つことによってその機能を安定させ、生命の営みを維持することができる。そのため

には、生体内環境変化、いわゆるストレス刺激に対して柔軟な応答を備えていることが重要である。その応答が減弱すると恒常性を維持することが困難になり、不可逆的な変化を経て機能消失へと至ると考えられる。

我々の体内でも特に心筋組織は、高い恒常性を要求される臓器のひとつであり、特に心筋組織に多大な影響を与える酸素に対してどのようなストレス応答を備えているかを理解することは、正常心機能そのものの理解を深めると同時に生命予後を左右する心筋梗塞や心筋症など急性および慢性心筋変性疾患の病態理解にも繋がる。

その心筋組織に高発現し機能性に影響を与える分子のひとつに heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) がある。HB-EGF は EGF ファミリーに属する増殖因子であり、EGF 領域をもつ一回膜貫通分子を前駆体とすることが共通点である。一方、HB-EGF の特徴としてヘパリン結合領域を兼ね備えている。この HB-EGF は、組織障害や低酸素あるいは酸化ストレスなどの環境ストレスによって発現誘導がみられ、また消化管、中枢神経系、腎臓、骨格筋、胎盤などで細胞生存に関わる因子としても報告されている。本稿では、HB-EGF の膜型タンパク質前駆体である proHB-EGF の切断と低酸素下での心筋細胞生存との関連性について概説したい。

2. proHB-EGF shedding と二方向性シグナル伝達経路

1) 細胞外シグナル伝達経路 (extracellular signaling pathway: ECS 経路)

HB-EGF は他の EGF ファミリー分子と同様に、I 型膜タンパク質前駆体 proHB-EGF として産生され、20 数 kDa の分子として細胞膜表面上に発現する。この前駆体は ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) や MMP (matrix metalloproteinase) などの細胞外基質を標的とするタンパク質分解酵素によって膜貫通領域に隣接する細胞外領域で切断され、14 kDa 程度の遊離型 HB-EGF として細胞周囲に放出される。この一連の切断現象は shedding と呼ばれており、紫外線、増殖因子、酸化ストレスなど様々な外的刺激によって生じる。shedding 後、遊離した HB-EGF は EGF 受容体に結合して活性化を促し、下流の MAPK シグナル等を刺激する。この経路は遊離した HB-EGF リガンドが細胞外から EGF 受容体を介してシグナル伝達することが知られており、細胞外シグナル経路 (ECS 経路) と呼ぶこととする。

2) 細胞内シグナル伝達経路 (intracellular signaling pathway: ICS 経路)

一方、細胞膜上に残存した 7 kDa 程の proHB-EGF カルボキシル基側領域 (HB-EGF-CTF) は細胞膜に貫通したままエンドサイトーシスを受けた後、細胞核膜内膜へ逆行輸送され、PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger protein) や BCL6 (B-cell CLL/lymphoma 6) などの転写抑制因子と結合することによってその転写抑制機能を解除することも明らかとなってきた¹⁻⁴⁾。この経路は、従来全く着目されていなかった新たな経路であり、shedding 後、直接細胞内を経由してゆくシグナルであることから、この経路を細胞外シグナル経路 (ECS 経路) に対して細胞内シグナル経路 (ICS 経路) と名付ける。細胞はこれら ECS および ICS 経路の両シグナル経路が連動することで、あたかも自動車がアクセルとブレーキ解除をうまく使い分けて加速するように、細胞増殖を効率よく促していると考えられる⁵⁾(図 1)。

3. HB-EGF が心筋組織に及ぼす影響

生体内での HB-EGF の役割を見てみると、HB-EGF ノックアウトマウスでは、心臓内膜弁の形成不全が認められ、生後まもなく心不全を起こして死亡する⁶⁾。また proHB-EGF shedding に着目すると、膜貫通領域と細胞内領域を欠いた proHB-EGF ノックインマウス、つまり常時遊離型である HB-EGF が発現しているマウスでは、心筋壁の著明な肥厚による心不全を生じる⁷⁾。一方、proHB-EGF shedding 不全変異体 (膜貫通領域に隣接する細胞外切断領域のアミノ酸が置換されているために shedding を受けにくく、細胞膜表面上に留まっていると考えられている) ノックインマウスにおいては、心臓弁形成不全のほかにもノックアウトマウスでは見られなかった心筋壁の非薄化と線維化が認められ、拡張型心筋症に類似した組織型を示す⁷⁾。このことは、HB-EGF が心臓弁形成に重要な役割を果たしている以外にも、proHB-EGF shedding そのものが心筋細胞の肥大化や生存に大きく関わっていることを示唆している。

4. 低酸素刺激での proHB-EGF shedding と細胞死制御

低酸素ストレスは心筋細胞において重要な微小環境因子のひとつであるため、我々は低酸素ストレスが proHB-EGF shedding を誘導することを検証した。ヒト HB-EGF 遺伝子を導入したラット心筋細胞株 H9c2 を低酸素環境下で培養したところ、proHB-EGF shedding の誘導が観察された⁸⁾。このことから、心筋細胞は低酸素ストレスによ

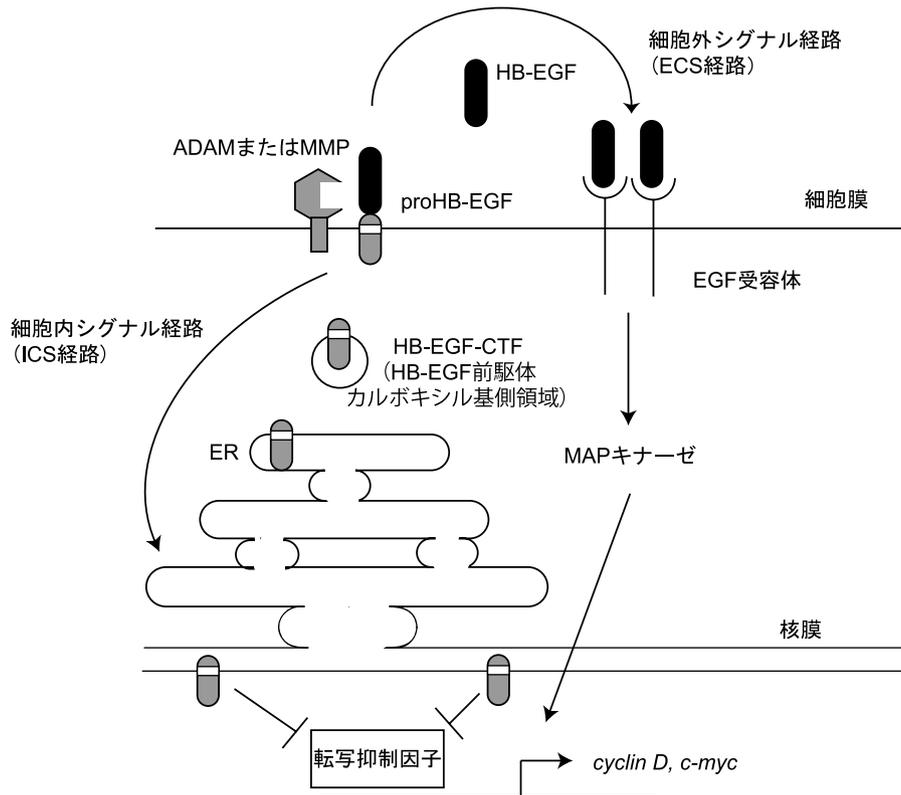


図1 proHB-EGF shedding シグナル伝達経路

HB-EGF 前駆体 (proHB-EGF) は, ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) や MMP (matrix metalloproteinase) などのタンパク質分解酵素によって細胞外領域が切断されると, 遊離型 HB-EGF は細胞外より EGF 受容体と結合することによって下流の MAP キナーゼを活性化する (ECS 経路). 一方, 細胞内領域 (HB-EGF-CTF) は膜に貫通した状態で細胞内を逆行輸送し, 核膜内膜に到達して転写抑制因子の抑制機能を解除する (ICS 経路).

て, proHB-EGF shedding というストレス応答を行っていることが考えられた.

さらに低酸素ストレスにおける proHB-EGF shedding の影響を明らかにするために, 野生型あるいは shedding 不全変異型 HB-EGF 遺伝子 (uc proHB-EGF) を導入した H9c2 細胞を用いて低酸素環境下培養を行った. その結果, 培養開始 24 時間後より, uc proHB-EGF 導入 H9c2 細胞群において有意な細胞死の誘導が認められた⁸⁾ (図 2). これより proHB-EGF shedding は, 低酸素ストレス下において心筋細胞死回避へと応答する重要な現象であることが示唆された.

5. proHB-EGF shedding によるカスパーゼ活性および活性酸素シグナル経路制御

低酸素刺激にて誘導された uc proHB-EGF 導入細胞群での死細胞には核の断片化が認められたため (図 2), アポ

トーシスの関与を強く疑い, その関与について検証した. まず蛍光プローブを用いてアポトーシス実行の鍵を握る分子であるカスパーゼ 3 の活性化を見てみたところ, 有意にその活性上昇が認められた. さらに汎カスパーゼ阻害剤にてアポトーシスの抑制が認められたが, 完全に抑えるまでには至らなかった⁸⁾.

MAP キナーゼ経路は細胞応答制御に関与するシグナル伝達経路であり, その中でも p38 や JNK は DNA 障害や酸化ストレス, 熱, 浸透圧ショックなどの細胞障害ストレスや, 炎症性サイトカインによって活性化されるストレス応答 MAP キナーゼである. そこで我々は, カスパーゼ以外の細胞死誘導経路として p38 や JNK の活性化を検討したところ, uc proHB-EGF 導入 H9c2 細胞群において低酸素下培養開始 12 時間後より JNK のリン酸化の有意な上昇が認められた. さらにその上流には活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の蓄積が関与することも明らかとなった⁸⁾.

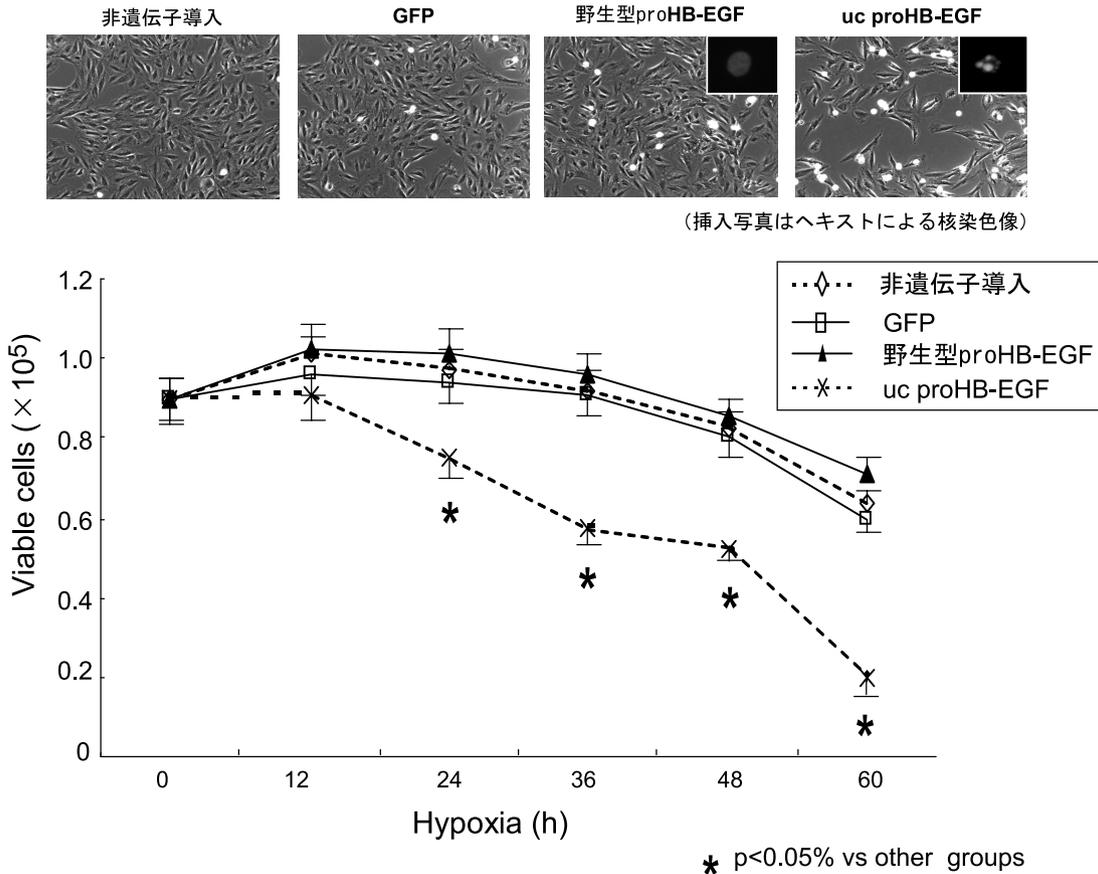


図2 低酸素培養下における *proHB-EGF* 遺伝子導入ラット心筋細胞の生存
proHB-EGF shedding 不全変異体 (un *proHB-EGF*) 遺伝子導入ラット心筋細胞は、低酸素培養下で他遺伝子導入群に比して生存率が有意に低下する。

6. HB-EGF-CTF による細胞死制御

前述の通り *proHB-EGF* shedding は、遊離型となった *HB-EGF* が細胞外より *EGF* 受容体を介して細胞にシグナルを伝える *ECS* 経路と細胞膜上に残ったカルボキシル末端側ペプチド *HB-EGF-CTF* が核内へ移行して転写制御する *ICS* 経路を活性化する⁵⁾。そこで我々は、この二つの経路のうちどちらが細胞死に関わっているかを調べるために、リコンビナント遊離型 *HB-EGF* 添加による細胞死阻止を試みた。しかしながら、遊離型 *HB-EGF* によって細胞外より *EGF* 受容体を介して十分に *ECS* 経路の活性化を促したにもかかわらず、uc *proHB-EGF* 導入細胞群のアポトーシスは抑制されなかった。これよりこのアポトーシス誘導には *ICS* 経路の関与が示唆された。*ICS* 経路では転写調節を司ることが明らかとなっていたため^{1,2,4)}、この現象においてアポトーシス関連遺伝子発現への影響について解

析した。その結果、uc *proHB-EGF* 導入 H9c2 細胞ではアポトーシス抵抗性遺伝子である *XIAP*, *Bcl-xl* 遺伝子の発現低下とアポトーシス促進遺伝子である *Bax* 遺伝子の発現上昇がメッセンジャー RNA およびタンパク質レベルで確認された⁸⁾。これは *HB-EGF-CTF* が、細胞増殖関連遺伝子だけではなく、細胞生存関連遺伝子制御にも重要な役割を果たしていることを示唆している。

また *proHB-EGF* 細胞内カルボキシル基末端側領域には *BAG-1* 分子が結合することが知られている⁹⁾。*BAG-1* 分子は *Bcl* ファミリーである *Bcl2* 分子との結合を介してアポトーシスを阻害することや *ROS* の蓄積を軽減することが報告されている^{10,11)}。*proHB-EGF* shedding と *BAG-1* 機能制御との関連性については未だ不明な点が多いが、*proHB-EGF* shedding による *ICS* 経路は遺伝子発現制御だけではなく、*BAG-1* などの結合タンパク質などを介した他シグナル伝達の調整を行っている可能性もある。

7. 今後の展望と課題

拡張型心筋症や心筋梗塞による心不全発症と proHB-EGF shedding の影響については詳細な検討はまだ行われていないが、トランスジェニックマウスや今回の結果から心不全によって増長される低酸素ストレス下での心筋細胞の生存には、proHB-EGF shedding が重要な役割を果たしていることが予想される (図 3)。また、proHB-EGF shedding 調整の検討は難治心疾患のもたらす心不全への新しい治療法開発にも繋がる可能性が大きい。

しかしながら、一般的に膜タンパク質分子の shedding

制御メカニズムにおいては、細胞骨格や細胞膜の状態変化等が関与していて単純な酵素-基質反応では理解できないことや *in vitro* では反応が容易に起き易く生体内での制御を再現しきれていないことなどから、いまだ十分な解析が進んでおらず多くのことがベールに包まれたままである。今後、分子レベルでの更なる詳細な検討や生体内での shedding 検出法の開発などが、EGF ファミリーを含む膜タンパク質 shedding の制御メカニズムを解き明かすことになり、難治性心疾患やさらにはアルツハイマーや関節リウマチなど shedding 現象が関与する疾患治療においても新局面を迎えることが期待できる。

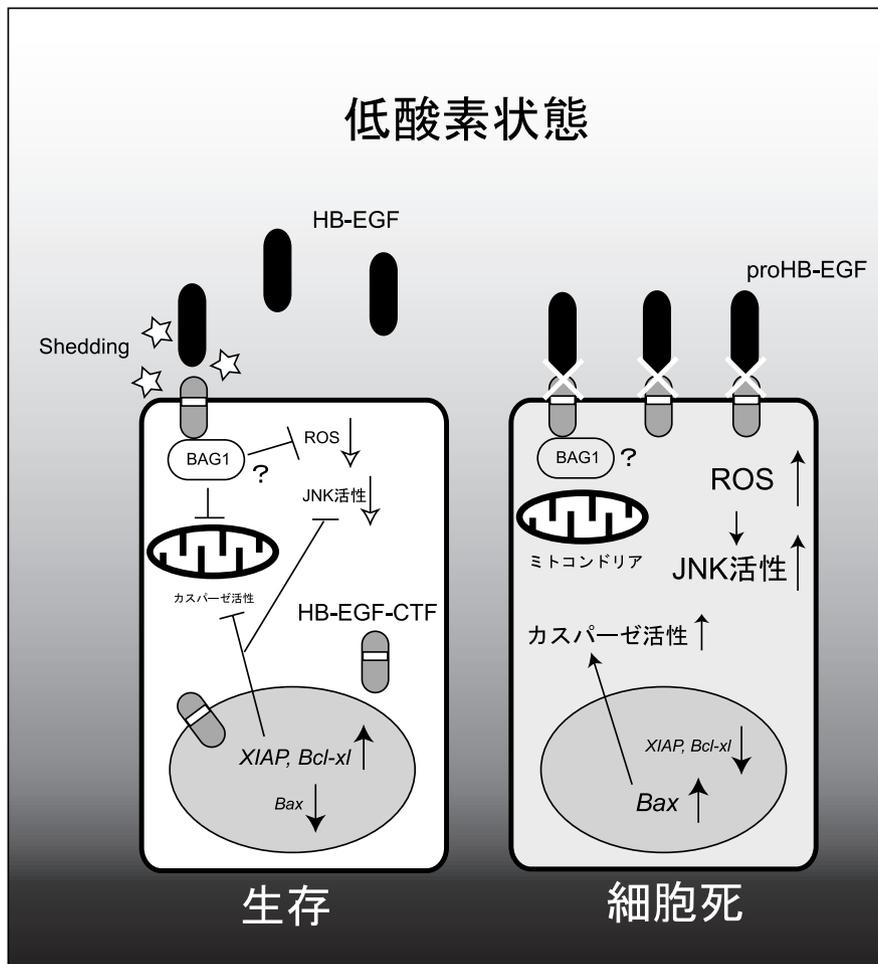


図 3 低酸素ストレス下において proHB-EGF shedding が心筋細胞に及ぼす影響 (文献 8 の図を一部改変)

低酸素環境下で proHB-EGF は shedding を受けて活性酸素種 (ROS) の蓄積阻害, XIAP, Bcl-xl, Bax といった細胞死関連遺伝子の発現制御を介して細胞死を回避しようとするが, shedding が適切に行われないと, ROS の蓄積による JNK 経路の活性化や細胞死抑制因子発現に対する制御ができず細胞死に至ると思われる。

謝辞

本研究の機会と proHB-EGF 遺伝子の提供を頂きました愛媛大学大学院医学系研究科生化学・分子遺伝学教室の東山繁樹教授をはじめ、ご協力頂いた教室メンバーの方々に深謝いたします。

- 1) Nanba, D., Mammoto, A., Hashimoto, K., & Higashiyama, S. (2003) *J. Cell Biol.*, 163, 489–502.
- 2) Kinugasa, Y., Hieda, M., Hori, M., & Higashiyama, S. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 14797–14806.
- 3) Hieda, M., Isokane, M., Koizumi, M., Higashi, C., Tachibana, T., Shudou, M., Taniguchi, T., Hieda, Y., & Higashiyama, S. (2008) *J. Cell Biol.*, 180, 763–769.
- 4) Nanba, D., Inoue, H., Shigemi, Y., Shirakata, Y., Hashimoto, K., & Higashiyama, S. (2008) *J. Cell Physiol.*, 214, 465–473.
- 5) Higashiyama, S., Iwabuki, H., Morimoto, C., Hieda, M., Inoue, H., & Matsushita, N. (2008) *Cancer Sci.*, 99, 214–220.
- 6) Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M., & Mekada, E. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100, 3221–3226.
- 7) Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G., & Mekada, E. (2003) *J. Cell Biol.*, 163, 469–475.
- 8) Uetani, T., Nakayama, H., Okayama, H., Okura, T., Higaki, J., Inoue, H., & Higashiyama, S. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 12399–12409.
- 9) Lin, J., Hutchinson, L., Gaston, S.M., Raab, G., & Freedman, M.R. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 30127–30132.
- 10) Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., & Reed, J.C. (1995) *Cell*, 80, 279–284.
- 11) Schulz, J.B., Bremen, D., Reed, J.C., Lommatzsch, J., Takayama, S., Wüllner, U., Löschmann, P.A., Klockgether, T., & Weller, M. (1997) *J. Neurochem.*, 69, 2075–2086.

井上 博文^{1),3)}, 上谷 晃由^{1),2)}

¹⁾愛媛大学大学院医学系研究科
生化学・分子遺伝学分野,

²⁾愛媛大学大学院医学系研究科病態情報内科学分野,

³⁾愛媛大学プロテオ医学研究センター
バイオイメージングコアラボラトリー)

Survival response of EGF family shedding to hypoxia in cardiomyocytes

Hirofumi Inoue^{1),3)} and Teruyoshi Uetani^{1),2)} ¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime, 791-0295, Japan, ²⁾Department of Integrated Medicine and Informatics, Ehime University Graduate School of Medicine, ³⁾Bioimaging Core Laboratory, Ehime Proteo Medicine Research Center, Ehime University)

感染に対する宿主側トレランス機構の発見

はじめに

マラリアや西ナイル熱、日本脳炎やフィラリアなど、蚊やダニなどの節足動物によって媒介される感染性疾患は依然として脅威である。これらの疾病を媒介する節足動物はベクター（運び屋昆虫）と呼ばれ、人間や動物に広く被害を及ぼしている。またこれらの中には人間と動物間に病原体が相互伝播する人獣共通感染症を媒介するものも多数存在し、対策が不可欠となっている。

それぞれの疾病を引き起こす病原体（ウイルス、細菌、寄生虫）が節足動物の体内で成長・増殖し、それらの病原体が宿主に伝播されることにより感染が成り立つ。感染症の本質は、宿主個体と病原微生物間に存在する「寄生する・寄生される」といった単純な生物学的関係といえる。病原体媒介節足動物も、自然免疫応答を中心に、病原体に対する様々な排除システムを持っていることが知られている¹⁾。病原体と節足動物間で成立する病原体-ベクター相互関係が理解され、病原体を制圧できるベクター側抵抗性因子を発見することは、従来の抗生物質などとは全く異なった概念の薬物ターゲットを与え、病原体を保持することが不可能な昆虫を作出する道を開くと考えられる。

そこで著者らは、蚊やダニなどの媒介節足動物において、病原体が体内にありながらもほとんど病原性を示さないという事実に着目した。これは、媒介節足動物が、病原体の排除を目的とした通常の免疫システムとは異なる「感染耐性機構」を有することを示唆する。この仕組みにより、あたかも病原体と節足動物が共存している状態が作り出され、その結果ベクターとしての媒介能を保持することが可能になっていると考えた。そこで本研究では、病原体を媒介する節足動物が持つと思われる感染耐性（トレランス）のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

1. レジスタンスとトレランス

蚊やダニが見せるような、病原性を持つ微生物と宿主が共存する状態は、特に節足動物に限ったことではない。人間においても、チフス菌（サルモネラ菌）の健常保菌者の存在が知られている。その歴史上最初の臨床報告例では、ある家政婦が病気を発症しないにも関わらずチフス菌を持