



## 細胞接着斑分子 Hic-5 の機能解析 —新規創薬標的分子としての可能性—

### はじめに

ヒト組織はその体積の相当部分が細胞ではなく、細胞外マトリクス (extracellular matrix: ECM) とよばれる生体高分子で満たされている。例えばタンパク質総量に占めるコラーゲンの割合は 25% にも上るといわれている。以前 ECM は単なる物理的な足場か、細胞間を繋ぎとめる結合材のようなものだと考えられていた。しかし現在では、ECM そのものが、接触している細胞の生存、発生、移動、増殖、形態、機能などを調節する生理活性物質であることが明らかとなっている。この ECM と細胞間の相互作用に重要な役割を果たしているのが、インテグリンを軸として形成される細胞接着斑 (focal adhesion: 接着斑) 装置である。接着斑は細胞-ECM 間の接着のみならず、機械的応力の伝達、細胞骨格調節、シグナル伝達などに関わる多機能構造体である。近年、この接着斑の分子構造が三次元超解像蛍光顕微鏡法により決定され、タンパク質の構成と配置が明らかになった。それによると、接着斑は組織だった超微細構造で、三層以上の層構造からなる約 40 nm のコア領域によってインテグリンとアクチン骨格を連結している。この層構造を形成するタンパク質として、FAK (focal adhesion kinase), Paxillin, Talin, Vinculin, Zyxin などの細胞接着斑構成分子群が知られている。現在これらの分子の中には、既存薬のターゲット分子とは別に、創薬のターゲットとなることが期待されるものも存在する。本稿では細胞接着斑構成分子の一つである Hic-5 (hydrogen peroxide-inducible clone-5) に着目し、この分子に関するこれまでの研究を紹介する。

### 1. 分子背景

*hic-5* は、1994 年に過酸化水素および TGF- $\beta$  に応答し発現誘導される遺伝子としてクローニングされた<sup>1)</sup>。その後この遺伝子は ECM と細胞の接着点にある細胞接着斑タンパク質をコードし、同じ LIM (lin-11, Isl-1, and Mec-3) ドメインファミリーに属する Paxillin と高い相同性を示すアダプター分子であることが明らかにされた。構造上の特徴として、N 末側にロイシンとアスパラギン酸に富む四つの LD ドメインを、C 末側に Zn フィンガーからなる四つの LIM ドメインを持ち、これらのドメインを介して、FAK, PYK2 (PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta), Vinculin, GIT1 (G protein-coupled receptor kinase interactor Arf GAP1), Csk (*c-src* tyrosine kinase), PTP-PEST (protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 12), CRP2 (cysteine-rich protein 2) 等と直接または間接的に結合することが報告されている<sup>2,3)</sup>。また Hic-5 は分子内に核外排出シグナル (NES: nuclear export signal) 配列を保持し、通常は細胞接着斑-核間をシャトルしていると考えられる。Hic-5 の NES 配列は酸化ストレス応答性のシステイン残基を持つことから、過酸化水素存在下では核に蓄積して遺伝子発現の制御に関与し、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) を介するシグナル伝達に寄与することが報告されている<sup>4)</sup>。さらに細胞接着斑や核のみならず、Hic-5 は伸展刺激存在下ではアクチン骨格上に局在することを筆者らは見出している。このように複数の細胞内局在を示す Hic-5 は、各局在箇所において様々な機能が報告されている。これまでに知られている培養細胞を用いた機能解析結果を下記に要約する。

### 2. Hic-5 の細胞内局在と機能

#### A) 細胞接着斑での機能 (図 1A)

Hic-5 は細胞接着斑では接着斑シグナル分子の FAK, PYK2/Cak $\beta$ , GIT1, Csk, PTP-PEST など様々な分子と会合するアダプター分子である Hic-5 は機能分子間の相互作用を可能にするための足場 (scaffold) を提供していると考えられる。具体的に細胞に生じる変化として、二次元培養細胞では、Hic-5 を過剰発現させると細胞が基質に接着する際の細胞伸展能を抑制する。また最近、三次元培養細胞内の Hic-5 をノックダウンすると正常な細胞接着斑構造が形成されることが明らかとなった<sup>5)</sup>。このような現象は二次元培養細胞では生じない。

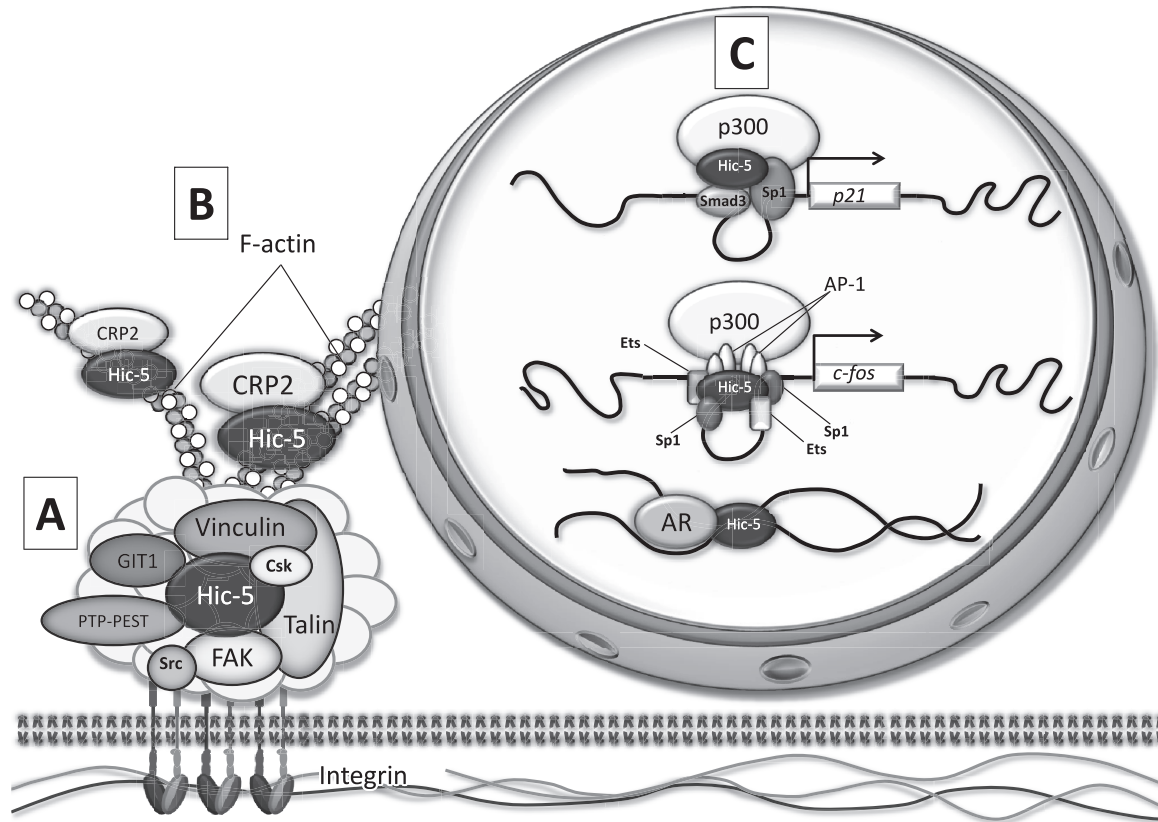


図1 Hic-5の細胞内局在と機能

A. 細胞接着斑, B. アクチン骨格, C. 細胞核

細胞接着斑(A)は細胞膜貫通分子であるインテグリンを中心に様々な裏打ちタンパクが会合し、巨大な複合体を形成している。Hic-5は細胞接着斑(A)において、Talin, Vinculin, FAK (focal adhesion kinase), PYK2 (PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta), GIT1 (G protein-coupled receptor kinase interactor Arf GAP1), Csk (*c-src* tyrosine kinase), PTP-PEST (protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 12)などと直接または間接的に結合し、接着斑の足場として機能すると考えられている。さらに核内(C)においても足場として機能する可能性があり、AP-1 (activator protein 1), Ets, Sp1, Smad3等と共働して遺伝子発現制御に関与する。また細胞に動脈壁と同等な伸展刺激を加えると、Hic-5はCRP2 (cysteine-rich protein 2)と共にアクチン骨格上に局在し、細胞収縮能制御に関与する(B)。詳細は本文中の2. A-Cを参照。

#### B) アクチン骨格での機能 (図1B)

通常の二次元培養条件下では、Hic-5は主に細胞接着斑に局在する。その一方で細胞伸展システムを用いて生理的な範囲内で細胞に伸展刺激を与えると、Hic-5はアクチン骨格上に局在を変化させ細胞収縮能制御に関与する。アクチン骨格上への局在はHic-5のLIM2, 3ドメインを介することや、平滑筋細胞高発現LIMタンパク質であるCRP2との結合が関与していると考えられる。Hic-5とCRP2の細胞内発現量を増加させると、細胞収縮能力が抑制されることから、Hic-5は細胞の収縮を抑制方向に制御すると考えられる<sup>3)</sup>。

#### C) 細胞核内での機能 (図1C)

Hic-5の核内での機能として、遺伝子発現誘導機構への関与が挙げられる。核移行シグナル(NLS: nuclear localization signal)を付加したHic-5の強制発現系を用い、Hic-5が*c-fos*や*p21<sup>Cip1</sup>*遺伝子発現を誘導することが見出されている<sup>6,7)</sup>。またHic-5応答配列として*c-fos*の転写制御領域中からはERE (Estrogen responsive element)とAP-1 (activator protein 1) 応答配列が重複したエレメントや、Ets, Sp1結合配列が明らかになっている。p21<sup>Cip1</sup>上流からはSp1結合配列が同定されている。さらにSp1結合配列にHic-5が働きかける詳細なメカニズムとして、Hic-5はSp1タンパク質に直接結合せず、Smad3やp300などの複合体

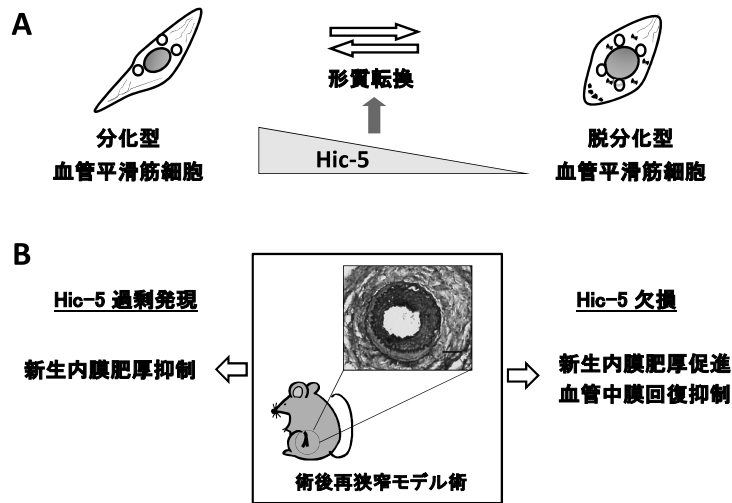


図2 血管平滑筋細胞形質転換に伴う Hic-5 発現変化(A)と血管内膜肥厚における Hic-5 の効果(B)

A. 平滑筋細胞の形質転換に伴い、脱分化状態の平滑筋細胞では Hic-5 発現が低下していることが明らかとなっている。

B. 術後再狭窄モデル術を行った血管病変に Hic-5 を過剰発現させると内膜肥厚が抑制された。また Hic-5 ノックアウトマウスの病変は内膜肥厚の促進と共に、中膜平滑筋層の回復抑制が見られた。詳細は本文中の 2. A-C を参照。

形成を介すると考えられる。その他に LEF (lymphoid enhancer binding factor)/TCF (T-cell-specific factor), PPAR $\gamma$ , ステロイドホルモンレセプターの転写共役因子としての機能も報告されている。

### 3. 種々の病態における Hic-5 の役割

#### A) 血管病変

Hic-5 の細胞レベルでの機能解析が増える一方で、個体レベルでの解析が遅れていた。マウスおよびヒトにおける Hic-5 発現細胞の同定を行ったところ、大腸、肺、気道、子宮、卵巣、大動脈などの内臓平滑筋細胞や血管平滑筋細胞に発現が確認された<sup>3)</sup>。SM22 $\alpha$  などの平滑筋細胞特異的分子マーカー遺伝子はプロモーター領域に、筋特異的な転写の活性化に関与する CArG エlement (CC(A/T)-rich GG element) を持ち、転写因子 SRF (serum response factor)/myocardin による発現制御を受けることが知られている。hic-5 遺伝子上流にも CArG ボックスが保存されており、実際に SRF/myocardin によって発現が制御されている<sup>8)</sup>。

Hic-5 が高発現している血管中膜平滑筋細胞は、周囲を豊富な ECM に取り囲まれその細胞外環境の変化により容易に形質変換 (phenotypic modulation) する特徴を持つ。この現象は特に血管病態の解析時に注目され、平滑筋細胞が分化型から脱分化型へ形質変換し増殖能、遊走能、タン

パク質合成能を獲得することが病変形成の一因であることが知られている。興味深いことに複数のマウス動脈硬化モデルの血管病変部組織を用いた解析から、Hic-5 は病変部急性期の脱分化型平滑筋細胞で発現が低下していることを見出した。そこで、Hic-5 の病変部脱分化型平滑筋細胞形質への積極的な関与の有無を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。ラット総頸動脈へバルーン血管障害モデルの手術を行う際にアデノウイルスベクターを用いて血管壁細胞に Hic-5 遺伝子発現を回復させたところ、新生内膜の肥厚が抑制された。そのメカニズムとしては Hic-5 の発現増化に伴う細胞遊走関連遺伝子の発現調節を介した平滑筋細胞遊走能の抑制が想定された<sup>9)</sup>。この結果から Hic-5 は生体内で血管病変部の新生内膜形成度を制御する新たな分子であると考えられる。

#### B) その他の病態

Hic-5 は血管病変形成のみならず、がんや組織の線維化においても重要な役割を担っている。マウスを用いたがん転移実験では、乳がん細胞株 (MDA-MB-231) 内の Hic-5 量を低下させると肺転移が顕著に抑制された<sup>5)</sup>。これはがん細胞の ECM 中への浸潤能が抑制されるためであると考えられている。その一方で、Hic-5 を安定的に発現させた前立腺がん細胞株を免疫不全マウスに移植すると、前立腺がんの成長が抑制されるとの報告もある<sup>10)</sup>。また現在イギ

リスで第I相臨床試験が行われている開発中の抗がん剤 GSAO [4-(N-(S-glutathionylacetyl) amino) phenylarsenoxide] の作用機序として Hic-5 のリン酸化の関与が報告されている<sup>11)</sup>。

さらに創傷治癒過程<sup>12)</sup>、癒痕形成<sup>13)</sup>や糸球体硬化症<sup>14)</sup>といった組織の線維化を伴う病態への関与が報告されている。これらの報告は Hic-5 が ECM のリモデリングに寄与することを示している。その他にも子宮内膜症やアルツハイマー病との関連が検討されている。

#### 4. Hic-5 ノックアウトマウス表現型解析

著者らが作製した Hic-5 遺伝子のノックアウトマウスはメンデル比に従って誕生し、発育、生殖能は共に正常であった<sup>15)</sup>。hic-5 と最も高い相同性を示す paxillin のノックアウトマウスは胎生致死であったことから、当初 hic-5 ノックアウトマウスも胎生致死になることが想定された。しかし純系の C57BL/6 に限らず、ICR 系や CBA 系のコンジュニック系統でも同様に Hic-5 ノックアウトマウスは正常な成長、発達をしたことから、系統間での遺伝的背景の違いが存在しても通常の飼育条件下では hic-5 欠損効果は認められないことが明らかとなった。Paxillin に直接結合し、Hic-5 とは結合しない Crk (CT10 regulator of kinase) のノックアウトマウスは胎生後期或いは出生後間もなく頭蓋に水腫や血腫ができ死亡する。さらに発生過程で心室壁の厚さが薄くなり口蓋裂も起こすため、個体発生に欠かせない遺伝子であると考えられる。これらのことから、Paxillin を軸として個体発生に重要なカスケードが存在し発生過程に重要な働きをしており、Paxillin ファミリーの中で Hic-5 は発生過程においては優位な役割を持たないと考えられる。さらに血液検査、microCT、全身の病理組織学検査などにおいても、通常の飼育条件下では顕著な変化は認められなかった。しかしその一方で、血管障害の修復過程に変化が現れた。具体的には大腿動脈にバルーン血管障害モデル術を行ったところ、傷害部位の中膜平滑筋層の回復が抑制され、血管内腔側に形成される新生内膜肥厚が促進するという変化が見られた<sup>15)</sup>。その原因として、ノックアウトマウス血管病変では、慢性期に入っても持続的にアポトーシスが起きていることが挙げられる。Hic-5 ノックアウトマウスから分離した血管平滑筋細胞は、伸展刺激により容易にアポトーシスを起こすことから、血管壁におけるアポトーシス頻度上昇の原因として、メカニカルストレスの関与が示唆された。また、術直後の血管壁に付着している血栓像が野生型マウスとは異なり、血小板の形態変化に

異常が見られる。巨核球から血小板への最終分化過程で Hic-5 の発現が急激に上昇し、成熟血小板内には Hic-5 が相当レベル発現することが報告されている。これらのことから、病変部中膜平滑筋細胞における Hic-5 機能のみならず、血小板血栓形成能という側面からもノックアウトマウスを用いて現在検討を行っている。

#### おわりに

血管病変部では、形質変化した平滑筋細胞由来のサイトカインや細胞外基質分解酵素などによる細胞外環境のダイナミックな変化、リモデリングが持続的に起きている。よって血管壁における細胞接着シグナルの役割を解析することで、動脈硬化性疾患に対するあらたな治療戦略の構築が期待できると考える。特にこの分子がこれまでに持つ背景から、術後再狭窄のみならず血管リモデリングが主体をなしている様々な血管病変の病態解明が期待される。さらに Hic-5 の発現を誘導する ROS は心血管疾患のみならず、様々な病態、特に癌、老化、生活習慣病にも関与している。したがって、ROS シグナル伝達分子による細胞外環境変化への詳細な応答メカニズムが解明されることで、多様な生理的シグナルを同時に担う ROS ではなく、ROS 下流で病変を引き起こす1機能分子を標的にできる。このことから ROS が関与する種々の疾患に対する標的分子を絞った副作用の少ない予防法・治療法の発案が可能になると考える。

- 1) Shibamura, M., Mashimo, J., Kuroki, T., & Nose, K. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 26767-26774.
- 2) Turner, C.E. (2000) *Na. Cell Biol.*, 2, E231-236.
- 3) Kim-Kaneyama, J.R., Suzuki, W., Ichikawa, K., Ohki, T., Kohno, Y., Sata, M., Nose, K., & Shibamura, M. (2005) *J. Cell Sci.*, 118, 937-949.
- 4) Shibamura, M., Kim-Kaneyama, J.R., Ishino, K., Sakamoto, N., Hishiki, T., Yamaguchi, K., Mori, K., Mashimo, J., & Nose, K. (2003) *Mol. Biol. Cell*, 14, 1158-1171.
- 5) Deakin, N.O. & Turner, C.E. (2011) *Mol. Biol. Cell*, 22, 327-341.
- 6) Kim-Kaneyama, J., Shibamura, M., & Nose, K. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299, 360-365.
- 7) Shibamura, M., Kim-Kaneyama, J.R., Sato, S., & Nose, K. (2004) *J. Cell Biochem.*, 91, 633-645.
- 8) Wang, X., Hu, G., Betts, C., Yund Harmon, E., Keller, R.S., Van De Water, L., & Zhou, J. (2011) *J. Biol. Chem.*, Oct 8. [Epub ahead of print]
- 9) Kim-Kaneyama, J.R., Wachi, N., Sata, M., Enomoto, S., Fukabori, K., Koh, K., Shibamura, M., & Nose, K. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 376, 682-687.
- 10) Li, X., Martinez-Ferrer, M., Botta, V., Uwamariya, C., Baner-

- jee, J., & Bhowmick, N.A. (2011) *Oncogene*, 30, 167-177.
- 11) Cadd, V.A., Hogg, P.J., Harris, A.L., & Feller, S.M. (2006) *BMC Cancer*, 6, 155.
  - 12) Dabiri, G., Tumbarello, D.A., Turner, C.E., & Van de Water, L. (2008) *J. Invest. Dermatol.*, 128, 2518-2525.
  - 13) Inui, S., Shono, F., Noguchi, F., Nakajima, T., Hosokawa, K., & Itami, S. (2010) *J. Dermatol. Sci.*, 58, 152-154.
  - 14) Hornigold, N., Craven, R.A., Keen, J.N., Johnson, T., Banks, R.E., & Mooney, A.F. (2010) *Kidney Int.*, 77, 329-338.
  - 15) Kim-Kaneyama, J.R., Takeda, N., Sasai, A., Miyazaki, A., Sata, M., Hirabayashi, T., Shibamura, M., Yamada, G., & Nose, K. (2011) *J. Mol. Cell Cardiol.*, 50, 77-86.

金山 朱里

(昭和大学医学部生化学教室)

Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target

Joo-ri Kim-Kaneyama (Department of Biochemistry, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan)

## 好熱菌新規リシン生合成経路の制御機構

### 1. はじめに

リシンはタンパク質に含まれる天然アミノ酸で、リシンを生合成できない哺乳類の必須アミノ酸として知られている。細菌では、リシンはジアミノピメリン酸 (DAP) という中間体を経て生合成される。DAP はほとんどの細菌の細胞壁合成成分であるペプチドグリカンの構成要素であるため、DAP を経るリシン合成経路は細菌にとって必須なものと考えられていた。筆者らは、高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* が、細菌として初めて、リシンを 2-オキソグルタル酸 (2-OG) を初発物質とし、 $\alpha$ アミノアジピン酸 (2-アミノアジピン酸; AAA) を経由して生合成することを見出し<sup>1)</sup>、各酵素の構造と機能、および酵素活性や遺伝子発現の制御機構を解析してきた<sup>2)</sup>。最近、同リシン生合成の後半にあたる AAA がリシンに変換される過程において、AAA のアミノ基がタンパク質により保護される初めての例を見出した<sup>3)</sup>。このタンパク質は各生合成酵素に効率よく認識されるためのキャリアタンパク質となっておりと推定される。本ミニレビューでは、このユニークなリシン生合成経路とともに、その制御機構について紹介する。

### 2. AAA を経るリシン生合成経路

リシンは、カビ、酵母などの下等真核生物では 2-OG から AAA を経て生合成されることが知られていた。その生合成経路のどの反応も DAP を経由するリシン生合成経路の反応との類似性がないことから、DAP 経路と AAA 経路は独自に進化したものと考えられていた。これら下等真核生物におけるリシン生合成では 2-OG を初発物質として 5 段階の反応で AAA が合成され、そのうち AAA はサッカロピンという化合物を経て、リシンへと変換される (図 1)。下等真核生物以外では、ユーグレナ藻や古細菌 *Thermoproteus neutrophilus* において、AAA を経由してリシンが生合成されるという報告があるものの<sup>4,5)</sup>、それらについて詳細な解析は行われていない。著者らは、*T. thermophilus* のリシン生合成は AAA までは酵母などと同様に進行するが、その後はサッカロピンを経ず、アルギニン生合成に類似した反応により合成されることを生合成酵素の機能解析から明らかにしている (図 1)。

### 3. LysX/LysW を介したアミノ酸修飾システム

アルギニン生合成において、グルタミン酸は 4 段階の反応でオルニチンに変換され、オルニチンはその後アルギニンへと変換される。同生合成では、グルタミン酸側鎖がリン酸化、還元されて生じるセミアルデヒド中間体が不安定で、容易に末端のカルボキシル基と環化してしまうため、効率の良い生合成のためには、分子内環化を防ぐ必要がある。そこでアルギニン生合成では、まず最初にグルタミン酸のアミノ基がアセチル CoA を用いてアセチル化され、そのうち側鎖の変換反応が進行し、オルニチン側鎖が完成した後にアセチル基が除去される。

*T. thermophilus* のリシン生合成後半部である AAA からリシンへの変換反応は、アルギニン生合成のグルタミン酸からオルニチンへの反応に類似している。リシン生合成においても、AAA からリシンへの変換は不安定なセミアルデヒド中間体を経由するため、同様な保護が必要だが、リシン生合成ではアルギニンの場合とは全く異なる保護機構が働いている。リシン生合成においては、AAA のアミノ基は、LysW と名付けた 54 アミノ酸からなるタンパク質の C 末端 Glu54 の側鎖カルボキシル基とのイソペプチド結合形成により保護される。この反応はアセチル CoA を用いるアセチル化反応とは全く異なり、ペプチドグリカン生合成に関わる D-Ala-D-Ala 合成酵素やグルタチオン合成酵素などのペプチド結合を形成する酵素のパラログである