

論文内容の要旨

論文題目

ERK MAP kinase phosphorylates the F-actin cross-linking protein EPLIN and regulates its interaction with F-actin

ERK MAP キナーゼによるアクチン結合タンパク質 EPLIN の リン酸化およびアクチンとの相互作用の制御

氏名 韓 美英

MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinases : MAPK) は様々な細胞外刺激により活性化され、これらの特異的な基質をリン酸化することによって多くの細胞のできごとを制御している。MAPK の代表的なものとして ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1, 2), JNK (c-Jun N-terminal kinase 1/2/3), p38 (p38 α / β / γ / δ), ERK5 の四つのサブファミリーがある。ERK1/2 はチロシンキナーゼ受容体からのシグナルによって Ras-Raf を介して活性化され、細胞の増殖および分化を制御する。ERK は Ser-Pro 或は Thr-Pro のコンセンサス配列を含む基質をリン酸化し、その標的因子として Elk-1, Sap-1 などの転写因子や RSK, MAPKAPK-2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase) などのキナーゼが報告されている。活性化された ERK1/2 は細胞質から核に移行し、核内基質をリン酸化することによってさまざまな生理的な過程を制御する。近年、核内における機能とは別に、ERK は MLCK (myosin light chain kinase), FAK (focal adhesion kinase), calpain, paxillin などの因子をリン酸化することで、細胞の運動や接着を制御することが明らかにされた。

成長因子や細胞-基質間接着などの複数の細胞外刺激は細胞運動へのシグナルを起動し、このシグナルは続いて MAPK family, protein kinase C, tyrosine kinases, Rho family small

GTPases などのさまざまな細胞内因子によって伝達される。細胞が運動する際には、アクチン細胞骨格系のダイナミックな再構成がおこる。アクチン線維の束化および架橋の可逆的な制御は、アクチン細胞骨格系の伸張性と柔軟性の産生に重要な働きをする。したがって、細胞運動制御において、多くのアクチン束化/架橋蛋白質が機能している。

EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm) は多くの腫瘍組織で mRNA の発現の低下が認められるタンパク質として同定された。EPLIN には α と β の2つのアイソフォームがあり、EPLIN β は N 末側にさらに 160 アミノ酸伸長した構造である。EPLIN は中央に LIM ドメインを有し、その N 末側と C 末側に2つのアクチン結合領域が存在する。LIM ドメインを介して形成した二量体が、計4つのアクチン結合部位を用いてアクチン線維を架橋し、束化することでアクチン線維を安定化させる。この機能により、EPLIN は Arp2/3 complex によって誘導されるアクチン線維脱重合を抑制し、また Rac が制御するメンブレンラッフル形成を抑制することが報告されている。したがって、EPLIN 発現の低下は細胞の運動を増加させ、転移性腫瘍の運動性を高める可能性が考えられている。我々の研究室において ERK MAP キナーゼ基質を網羅的に解析した結果、EPLIN は ERK の新規基質候補として同定された。本研究においては、ERK による EPLIN リン酸化の部位を決定し、さらに EPLIN リン酸化による機能制御について解析を行った。

はじめに ERK が試験管内および細胞内で EPLIN をリン酸化することを確認した。ERK リン酸化のコンセンサス配列内部のセリン残基をアラニン残基に変異させた変異体を用いたリン酸化実験と、リン酸化された EPLIN の LC-MS/MS 解析により、EPLIN 上の 360, 602, 692 のセリン残基が ERK による主なリン酸化部位であることを明らかにした。

EPLIN は N 末側と C 末側に2つのアクチン結合部位を含んでいるため、アクチン線維を架橋して束化するが、これら2つのアクチン結合部位は細胞で異なる働きをする可能性がある。そこで、F-actin との共沈実験と細胞抽出液からの免疫沈降実験を行ったところ、C 末側のアクチン結合領域の F-actin との親和性が ERK によるリン酸化により低下することが判明された。N 末側の結合領域および全長 EPLIN ではこのような変化は認められなかった。C 末側のアクチン結合部位のアクチン線維への親和性低下は、EPLIN のアクチン線維束化

活性を低下させ、アクチン線維のダイナミックな再構成を促進させる可能性が考えられる。

EPLIN を MCF-7 細胞に発現させると細胞ストレスファイバーの数、サイズおよび強度が増加することが報告されている。そこで抗 EPLIN 抗体で NIH3T3 細胞に対する免疫染色を行ったところ、無刺激の細胞では EPLIN は F-actin と共にストレスファイバーに局在したが、細胞を PDGF 刺激するとストレスファイバーが消失し、EPLIN は F-actin と共にラメリポディアやドーサルリングに移行した。また、U0126 により ERK 活性を抑制した細胞では、PDGF 刺激時のストレスファイバーの消失が部分的に抑制され、EPLIN は残存するストレスファイバーにも共局在することが分かった。

EPLIN のセリン 360 と 602 番目のリン酸化部位を含むペプチドで作製した抗リン酸化抗体を用いて、PDGF で刺激した NIH3T3 細胞を免疫染色した。その結果、PDGF 刺激後 5 分から EPLIN のリン酸化がラメリポディアやドーサルリングで誘導され、120 分まで強いリン酸化が認められた。また、PDGF によるリン酸化は U0126 により完全に抑制された。

さらに、細胞が運動する際には F-actin の再構成が起こるので、EPLIN のリン酸化による機能制御が関与する可能性を想定し、wound healing における EPLIN のリン酸化を検討した。コンフルエントな NIH3T3 細胞を wounding してから 6 時間後に 2 つの抗リン酸化抗体で免疫染色したところ、360 番目のセリンおよび 602 番目のセリンのリン酸化は、ともに細胞の leading edge において認められた。この時 U0126 で前処理すると healing が部分的に抑制されると共に抗リン酸化抗体による陽性シグナルが消失したことから、これらのリン酸化は ERK 活性に依存していることが分かった。

以上の結果から EPLIN のリン酸化と F-actin の再構成を伴う細胞の運動性の上昇に関連性が認められたので、EPLIN α -GFP とそのリン酸化部位をアラニンに置換した EPLIN α (S360/602/692A)-GFP を NIH3T3 細胞に過剰発現し、PDGF 刺激後のラッフリング形成を検討した。その結果、無刺激の細胞では EPLIN α -GFP および EPLIN α (S360/602/692A)-GFP を過剰発現することによってストレスファイバーの形成が促進されていた。これに対して PDGF 刺激後の細胞ではストレスファイバーの消失とともに、EPLIN α -GFP の過剰発現によってラッフリングの形成が周囲の細胞よりさらに促進されたが、EPLIN α (S360/602/692A)-GFP では逆にストレスファイバーの消失が低下し、ラッフリン

グの形成も抑制された。従って PDGF 刺激によるラップリングの形成に EPLIN のリン酸化が必要であることが示唆された。

細胞運動における EPLIN のリン酸化の必要性をさらに検討するために Boyden-chamber assay を行った。GFP や EPLIN α -GFP を発現した細胞では PDGF 添加によって運動性の強い上昇が認められたが、EPLIN α (S360/602/692A)-GFP を発現した細胞ではこの運動性の上昇が有意に抑制された。

以上の結果から、EPLIN は ERK の新規基質であり、*in vitro* 及び *in vivo* で ERK によっておにも 3 ヶ所のセリン残基がリン酸化されることが分かった。そして ERK によるリン酸化は EPLIN の C 末側での F-actin との親和性を低下させることが分かった。さらに EPLIN のリン酸化は PDGF 刺激によるストレスファイバーの消失とラップリングの形成に必要であり、細胞運動に重要であることが示唆された。EPLIN は LIM ドメインを介して二量体を形成しているため、リン酸化されていない時は N 末側と C 末側を合わせて計 4 つのアクチン結合部位が F-actin と同時に結合することによって F-actin が強く束化し、ストレスファイバーの形成を促すことが予想される。これに対してリン酸化された EPLIN は C 末側のアクチン結合活性が低下することによって N 末側だけによる F-actin の架橋因子となり、ラップリング領域でのダイナミックな F-actin のメッシュワークの形成に関与しているのではないかと推測している。このような非リン酸化 EPLIN の機能は細胞の運動に対して抑制的に機能すると考えられる。さまざまな腫瘍で EPLIN の発現レベルが低下していることから、これらの細胞では運動性が亢進し、転移性を高めていることが考えられる。RNAi による EPLIN レベルの抑制や、ノックアウトマウスの解析により、こうした点にアプローチすることは今後の重要な課題である。