

論文内容の要旨

論文題目：

蛋白質 SUMO 化による ERK MAPK 経路の活性抑制機構と発癌制御
(Negative regulation of the ERK MAPK cascade and inhibition of
carcinogenesis by protein sumoylation)

氏名 久保田 裕二

多細胞生物を構成する細胞は、多様なシグナル伝達分子を介して互いに情報を共有し、様々な環境変化に適応することで個体の生命を維持する。哺乳類生物で機能するシグナル伝達分子には、細胞外に分泌されることで遠く離れた細胞にも情報を伝える細胞外シグナル伝達分子と、それらを細胞膜表面の受容体で感知し、適切な細胞応答を惹起する細胞内シグナル伝達分子が存在する。哺乳類生物の細胞外シグナル伝達分子には、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質などの蛋白質分子または低分子化合物が存在する。このようなシグナル伝達分子を受け取った細胞は、GTP 結合蛋白質や蛋白質キナーゼなど様々な細胞内シグナル伝達分子を活性化させることによって、細胞の増殖や分化、細胞死など多様な細胞機能を行うように制御されている。

MAPK (Mitogen activated protein kinase) 経路は、最も詳細な解析が行われている細胞内シグナル伝達システムの一つであり、MAPKKK—MAPKK—MAPK の 3 種類のキナーゼによる連続的かつ段階的なリン酸化反応を介して活性化される。古典的 MAPK カスケードとして知られる ERK (Extracellular signal-regulated kinase) 経路は、Raf—MEK—ERK の 3 種類のキナーゼにより構成されており、様々な増殖刺激に応答して活性化され、細胞増殖制御や発癌に深く関与することが知られている。ERK 経路の MAPKK である MEK 蛋白質は、その分子内に存在するドッキング・サイトを介して Raf および ERK と相互作用することで、ERK 経路のシグナル伝達の特異性と効率の維持に重要な役割を果たしている。

これまでに、MAPK 経路の制御機構として、主に蛋白質リン酸化による活性調節が知られている。私は、MAPK 経路の翻訳後修飾による活性制御機構を検討する中で、ERK 経路の

MAPKK である MEK1 および MEK2 が細胞内で選択的に SUMO (Small ubiquitin-related modifier) 化を受けることを見出した。まず、質量分析により MEK 分子内で SUMO 化修飾される特定のリジン残基を決定した。この SUMO 化を受ける MEK のリジン残基は、様々な多細胞生物で進化的に保存されていた。

一般的に、SUMO 化は標的蛋白質の機能、細胞内局在、安定性などに影響を与えることが知られている。そこで、SUMO 化が MEK の機能に与える影響を確認すべく、様々な面から検討を行った。まず、SUMO 化が MEK の細胞内局在に与える影響を明らかにするために、BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) 法による蛍光顕微鏡観察や、細胞分画法を用いて検討を行った。その結果、SUMO 化された MEK は選択的に細胞質に局在することが分かった。

次に、MEK1 の SUMO 化が、Raf による MEK、あるいは MEK による ERK のリン酸化に影響を与える可能性について検討した。その結果、MEK1 の SUMO 化は、Raf による MEK のリン酸化には殆ど影響を与えないが、MEK による ERK のリン酸化を強く抑制することが分かった。さらに、その分子メカニズムを検討した結果、SUMO 化された MEK は ERK に対する結合能を失い、結果として ERK に対するキナーゼ活性が抑制されていることが明らかとなった。

ERK 経路は増殖因子によって活性化され、細胞周期の進行に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、増殖因子刺激や細胞周期の進行が MEK の SUMO 化に影響を与えるか、検討した。その結果、bFGF や EGF、PDGF など ERK 経路を活性化する様々な増殖因子刺激は、MEK の SUMO 化に影響を与えないことが分かった。また、細胞周期の各ステージにおいて、MEK の SUMO 化レベルに明らかな変化は観察されなかった。

次に、MEK-SUMO 化の生理的意義を検討した。まず、ERK 経路の持続的活性化が必要とされる PC12 細胞の神経細胞様分化を観察した。SUMO 化欠損 MEK 変異体を安定に発現する PC12 細胞株を作製し、NGF による分化誘導を行った。その結果、このような細胞では、野生型 MEK1 を発現する場合と比較して、NGF 刺激に依存した ERK のリン酸化が促進され、神経細胞様分化も有意に亢進した。同様に、SUMO 化欠損 MEK 変異体を発現する NIH3T3 細胞でも、EGF や bFGF 刺激による ERK リン酸化の遷延化や、細胞増殖率の亢進が観察された。また、MEK1 をノックアウトしたマウスから採取された MEF 細胞に SUMO 化欠損 MEK 変異体を再導入し、同様の実験を行った。その結果、このような細胞では、増殖因子による ERK リン酸化の遷延化や細胞増殖率の亢進が観察され、さらに、様々な癌遺伝子 (B-Raf、C-Raf、ErbB2) の発現による悪性形質転換効率 (軟寒天コロニー形成能) が増加する傾向が認められた。

Raf や ErbB2 による悪性形質転換効率は、SUMO 化欠損 MEK 発現細胞で有意に亢進したが、活性型 Ras による悪性形質転換効率の亢進は観察されなかった。そこで、活性型 Ras が MEK の SUMO 化に影響を与え得るか、検討を行った。レトロウイルスを用いて活性型 Ras を正

常 Ras を持つ NIH3T3 細胞内に過剰発現させたところ、MEK の SUMO 化が顕著に抑制されることが分かった。また、Ras 活性に重要な細胞膜局在能を欠損した Ras 変異体や、不活性型 Ras 変異体を強制発現した場合には、MEK の SUMO 化に明らかな影響は観察されなかった。したがって、活性型 Ras による MEK の SUMO 化の抑制には、Ras の発癌活性に必須である細胞膜局在能や活性が必要であることが分かった。

そこでさらに、実際に Ras 遺伝子に活性型点変異を持つことが知られている様々なヒト癌細胞を用いて検討を行ったところ、これらの癌細胞では MEK の SUMO 化がほぼ完全に消失していることが確認された。そこで、Ras に対する阻害剤や RNAi を用いて、癌細胞内の Ras 活性を抑制したところ、MEK の SUMO 化が回復した。

これら結果から、活性型 Ras は、MEK の SUMO 化を阻害することで ERK 経路の活性化を促進し、発癌に寄与すると推察されたので、MEK1 の SUMO 化を強制的に亢進させることで、活性型 Ras による細胞の悪性形質転換能を抑制し得るか検討した。この目的のため、UFDS (Ubc9-fusion directed sumoylation)法を利用した。UFDS 法は、SUMO 化に特異的な E2 である Ubc9 を標的蛋白質の C 末端に融合して細胞に発現させる方法であり、その結果、標的蛋白質の SUMO 化が強く亢進する。まず、UFDS 法によって誘導される MEK1 の SUMO 化は、Ras に抵抗性であり、活性型 Ras 存在下でも消失しないことを確認した。そこで、MEK1-Ubc9 融合蛋白質を活性型 Ras と共に MEF 細胞内で発現させ、軟寒天培地でのコロニー形成能を検討したところ、これらの細胞では活性型 Ras の発現による悪性形質転換効率が有意に抑制された。以上の結果から、活性型 Ras は、Raf の活性化を誘導するのみならず、MEK の SUMO 化を抑制することによっても、ERK 経路の活性化を亢進させ、強い発癌活性を有することが強く示唆された。

MEK 分子内の SUMO 化リジン残基は、Ubc9 との結合配列である SUMO 化コンセンサス配列 (ψ -K-X-D/E) と一致しないことから、MEK の SUMO 化は未知の SUMO-E3 リガーゼに依存した機構であることが示唆された。また、活性型 Ras による SUMO 化抑制は MEK に選択的であることから、その SUMO 化制御に関する未知

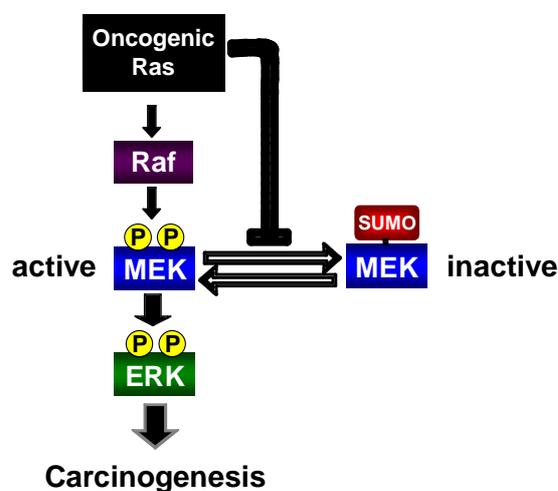


Fig.1 活性型 Ras に依存した SUMO 化抑制による ERK 経路活性化機構

分子の機能に影響を与えている可能性が考えられる。

したがって、今後は MEK の SUMO 化機構をより詳細に解析すべく、その SUMO 化を特異的に亢進する SUMO E3-リガーゼや、脱 SUMO 化を行う SUMO プロテアーゼを探索することが必要と考えられる。また、SUMO 化欠損 MEK を発現するノックインマウスを作製することで、MEK の SUMO 化が生体に与える生物学的意義を解明したい。