

博士論文

一細胞ダイナミクス計測による  
シグナル伝達タンパク質の時空間的機能の解明

吉澤 亮

# 目次

第1章 序論.....	3
1.1 RTK-RAS-MAPK シグナル伝達.....	4
1.2 アダプタータンパク質 SHC の役割.....	5
1.3 目的.....	7
第2章 p52SHC による GRB2 ダイナミクス of 二相性な時空間的調節.....	11
2.1 序論.....	12
2.2 材料と方法.....	14
2.2.1 プラスミドの構築.....	14
2.2.2 細胞の調製.....	14
2.2.3 一分子計測と解析.....	15
2.2.4 キネティクス解析.....	17
2.2.5 FCCS 計測.....	17
2.2.6 ウェスタンブロットティング.....	19
2.2.7 統計解析.....	19
2.3 結果.....	20
2.3.1 HRG 刺激時の SHC と GRB2 の固有の細胞膜移行ダイナミクス.....	20
2.3.2 SHC は GRB2 の膜移行の応答量と持続性の両方を制御する.....	20
2.3.3 SHC は GRB2 の細胞膜との相互作用動態に影響を与える.....	22
2.3.4 細胞質における SHC は GRB2 の細胞膜移行を阻害する.....	23
2.3.5 持続的な GRB2 の膜移行が下流シグナルに与える影響.....	23
2.4 考察.....	25
第3章 p52SHC は RAF 非依存的に ERK の持続的な活性化を調節する.....	39
3.1 序論.....	40
3.2 材料と方法.....	42
3.2.1 プラスミドの構築.....	42
3.2.2 細胞の調製.....	42
3.2.3 一分子計測と解析.....	42
3.2.4 MTT assay を用いた細胞増殖の定量.....	42
3.2.5 細胞分化の定量.....	43
3.2.6 ウェスタンブロットティング.....	43
3.2.7 統計解析.....	44
3.3 結果.....	45

3.3.1 持続的な SHC の膜局在は ERK の持続的な活性化と相関する.....	45
3.3.2 ERK の持続的な活性化には SHC を介した PI3K の活性化が必要である.....	46
3.3.3 PI3K は RAF 応答の持続性と非依存的に ERK の持続的活性化に関与する.....	46
3.3.4 SHC の細胞膜移行ダイナミクスは細胞運命決定に影響を与える.....	47
3.4 考察.....	49
第 4 章 結論と展望.....	65
4.1 結論.....	66
4.2 展望.....	67
第 5 章 謝辞.....	68
第 6 章 参考文献.....	69

# 第 1 章 序論

## 1.1 RTK-RAS-MAPK シグナル伝達

細胞内には複雑なシグナル伝達ネットワークが存在し、外部刺激に応答して、様々な細胞応答を示す。そこでは膨大なシグナル伝達タンパク質分子が適切なタイミングと適切な場所で、リン酸化反応や化学反応および構造変化し、シグナルの受け渡しを行っている。受容体型チロシンキナーゼ (Receptor tyrosine kinase; RTK) は、細胞外環境と細胞内環境を接続することで、生物学的プロセスにおいて多面的な役割を果たす。ヒトゲノムには 58 個の RTK 遺伝子が含まれていることが知られており (Manning et al., 2002; Robinson et al., 2000)、各 RTK タンパク質は上皮成長因子 (Epidermal growth factor; EGF)、神経成長因子 (Nerve growth factor; NGF) や、insulin を含む多様な細胞外リガンドを受け取ることで信号を開始する。それぞれの受容体は外部刺激に応じて異なる役割を果たすが、すべての RTK タンパク質の下流に存在するシグナル伝達経路は RAS-Mitogen-activated protein kinase (MAPK) システムを含めて非常によく類似している。このことから細胞生物学の中心的な問題の 1 つは、ほとんど同じ反応ネットワークが細胞外環境から異なる信号をどのように認識し、表現するかということである。RTK-RAS-MAPK 経路では、同一のネットワークを用いて、シグナル伝達の時間的応答の違いを認識し、異なる細胞応答を決定することが知られている (Kao et al., 2001; Marshall, 1995; Nagashima et al., 2007)。よって細胞挙動をより深く理解するためにはネットワークの構造的な情報だけでは不十分であり、シグナル伝達の時空間的な情報が必要である。

RTK-RAS-MAPK シグナル伝達経路では、RTK の細胞外ドメインがリガンドを受けとることで信号が開始される (図 1-1)。リガンドが結合した受容体のほとんどは別の単量体の受容体と二量体を形成し、その後互いの細胞質側領域のチロシン残基をリン酸化する (Zhang et al., 2006)。このようにヘテロ二量体を形成できることは、結合するリガンドが知られていない ERBB2 や、自己リン酸化活性が失活している ERBB3 を刺激によって活性化させるために重要である (Mujoo et al., 2014; Zhang et al., 2006)。このリン酸化されたチロシン残基は SHC、GRB2 を含むアダプタータンパク質などの結合部位として作用し、これらタンパク質の細胞膜移行を促進する。細胞膜へと移行された GRB2 はグアニンヌクレオチド交換因子 GEF である Son of Sevenless (SOS) の細胞膜移行を促進し、低分子量 G タンパク質である RAS の活性化に関与する。

RAS はこのネットワークの中心に位置し、様々な信号を受け取り、多様な基質タンパク質に信号を伝達するネットワークのハブとして機能する (Oda et al., 2005; Vojtek and Der, 1998)。これらの報告は特定の細胞応答を決定するために、RAS の活性化が適切に調節される必要があることを示唆している。RAS は活性化型 (GTP 結合型; GTP-RAS) と不活性型 (GDP 結合型; GDP-RAS) を行き来することで、上流からのシグナルを下流分子へと伝達する分子スイッチとして重要な役割を果たしている。GTP-RAS と GDP-RAS 間の移行は非常に遅く、細胞内では RAS GEF と RAS GTPase activation

protein (RAS GAP) がそれぞれ GDP の放出と GTP の加水分解を促進する (Boguski and McCormick, 1993; Margarit et al., 2003)。よって RAS の活性化を適切に調節し、細胞応答を決定するためには GEF および、GAP による両方の調節が重要である。

活性化した GTP-RAS は MAPK Kinase Kinase の一種 Rapidly accelerated fibrosarcoma protein (RAF キナーゼ)をはじめ、Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)、Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RALGDS) などを含む多くの基質タンパク質を活性化する (Buhrman et al., 2011; Mello et al., 1997)。その中で最も多く研究されている RAF キナーゼは、RAF - MEK (MAPKK) - ERK (MAPK) から成る三層のセリンスレオニンキナーゼカスケード (MAPK カスケード) に属している (Widmann et al., 1999)。このカスケードの最下流に位置する Extracellular signal-regulated kinase (ERK) は進化的によく保存されており、細胞増殖、生存、分化、アポトーシス、代謝といった多くの細胞プロセスの制御に関与する (O'Neill and Kolch, 2004; Wellbrock et al., 2004)。ERK はリン酸化されると核内へと移行し、核内でこれらの細胞プロセスに関わる転写因子を活性化し遺伝子の発現を調節する (Ebisuya et al., 2005; Kolch, 2005)。このとき ERK 活性化の持続時間の違いと、固有の細胞応答 (細胞増殖または分化) が相関することが広く認められている (Marshall, 1995)。

このように RTK-RAS-MAPK 経路は外部から刺激を受け取ると、タンパク質間で次々と信号を伝達する (図 1-2)。しかし、この経路ではこのような直線的なシグナル伝達だけでなく、経路内におけるフィードフォワード制御、フィードバック制御、また別の経路とのクロストークなどが複雑に影響し合いながらシグナルの量や方向性を制御している (図 1-1、図 1-2) (Corbalan-Garcia et al., 1996; Guy et al., 2009; Hanafusa et al., 2002; Langlois et al., 1995; Mendoza et al., 2011)。これらの制御はネットワーク内で複雑に影響し合っているため、細胞内ネットワークにおけるシグナル伝達制御を完全に理解することは非常に困難である。

## 1.2 アダプタータンパク質 SHC の役割

本研究では、アダプタータンパク質である SHC、GRB2 に焦点を当て研究を行った。これらのタンパク質は細胞内における恒常性を維持するために必要なタンパク質である。SHC は、酵素活性が欠如しているにもかかわらず、正常細胞と癌細胞の両方の細胞シグナル伝達において重要な役割を果たしており、乳がん患者の予後不良とも関連している (Davol et al., 2003; Gu et al., 2000; Ursini-Siegel et al., 2008)。これらのタンパク質は主に SOS の活性化を調節し、RTK からの信号を増幅する役割があると知られている (Lai and Pawson, 2000)。具体的には SHC、GRB2 は SOS の細胞膜上密度を刺激依存的に増加させ、それにより RAS の活性型への変換を促進する。また GRB2 は GRB2-associated binder1 (GAB1) と RTK の結合の促進にも関与することが報告されている

(Holgado-Madruga et al., 1996; Lock et al., 2003; Lock et al., 2002)。GAB1 と RTK の結合は、GAB1 上のチロシン残基のリン酸化を引き起こすことが知られている。これらの残基は、PI3K (Mattoon et al., 2004; Rodrigues et al., 2000)、RAS GAP (Montagner et al., 2005)、および SH2 domain-containing phosphatase 2 (SHP2) (Schaeper et al., 2000) との結合部位に位置しており、それらタンパク質との相互作用に関与する。これらの制御に対して SHC は、GRB2 の細胞膜上での結合部位となることで間接的にこの促進に関与していると考えられている。よって SHC、GRB2 は RAS 活性化の GEF、GAP の両方の調節に関与していると考えられる。

p52SHC は 3 つのアイソフォーム (p66、p52、および p46) のうちの一つであり、これらは共通してアミノ末端に phosphotyrosine binding (PTB) ドメイン、central region of collagen homology 1 (CH1) ドメイン、およびカルボキシ末端の Src homology 2 (SH2) ドメインを持つ (図 1-3) (Pelicci et al., 1992)。PTB および SH2 ドメインは SHC ファミリーの中で最も保存されている領域であり (Fagiani et al., 2007)、これらのドメインは SHC タンパク質が受容体チロシンキナーゼ (RTKs)、抗原受容体、G タンパク質などの細胞質側領域に存在する NXXY モチーフを認識することでこれらの受容体との相互作用を可能にする (Finetti et al., 2009; Gu et al., 2000; Sakaguchi et al., 1998; Smith et al., 2006)。GRB2 は RTK を含む上流タンパク質の pYXN モチーフを認識する SH2 ドメインと、下流のエフェクタータンパク質の proline-rich motif に結合する 2 つの SH3 ドメインを含んでいる (Songyang et al., 1994; Sparks et al., 1996)。

SHC の一般的な役割は、多様なシグナル伝達分子の足場として作用し、細胞膜上での多様なシグナル伝達反応を仲介することである。SHC タンパク質は受容体型チロシンキナーゼに結合し、下流にシグナルを伝達するタンパク質として特徴付けられていたため、SHC ファミリーはすべて細胞質タンパク質であると考えられてきた。しかし近年の研究から、それぞれのアイソフォームは、サブタイプごとに局在化場所は異なることが示されている。細胞が飢餓状態では、p52SHC と p46SHC は主に細胞質に分布している (Sato et al., 2000)。しかし細胞外シグナルを受け取り、受容体が活性化すると、それらを認識することで細胞膜へと移行し、細胞膜上でシグナルを伝達する。p66SHC は活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) の代謝に関与しているため、ミトコンドリアへの移行が観察されている (Nemoto et al., 2006)。これらアイソフォームの中で p52SHC (以下 SHC と記載) が RAS/MAPK 経路に信号を伝達する GRB2 シグナルに最も影響を与えるタンパク質として良く特徴づけられている (Ravichandran, 2001)。SHC は細胞膜上で RTK と結合すると CH1 ドメイン上の Tyr239/240 および Tyr313 (Tyr317) がリン酸化される (Ishihara et al., 1998; van der Geer et al., 1996)。これらのリン酸化チロシン残基は、GRB2 を含む SH2 ドメイン含有タンパク質の特異的結合部位として作用し、RAS/MAPK 経路、PI3K/AKT 経路を中心とする複数のシグナル伝達経路を活性化する (Ravichandran, 2001)。SHC はこのように GRB2 のようなタンパク質の細胞膜移行

の足場となることで、主にシグナル伝達の増幅に関与する。しかしながら **RTK-RAS-MAPK** シグナル伝達中における **SHC**、**GRB2** の時空間的な役割、さらには細胞応答決定時における役割についてはよくわかっていないことが多い。

### 1.3 目的

これまでの生化学的手法、数理モデルなどを用いた解析等からシグナル伝達タンパク質間のネットワーク図が明らかになり、さらに様々な経路における複雑な分子反応の制御機構が明らかになってきた。それでも動的なシステムとして機能する細胞内のシグナル伝達ネットワークの全体像が明らかになっておらず、細胞の本質的な挙動の再現には至っていない。ネットワークの上流タンパク質の反応の時間変化が下流タンパク質の反応の時間変化に与える影響を調べることで細胞応答を決定するために重要なシグナル伝達の方向性、持続時間の情報が得られるので理解がさらに進むと考えられるがそういった解析は行われていなかった。本研究では細胞内における複数のシグナル伝達タンパク質の応答を一細胞、あるいは一分子レベルで可視化しそれらの関係性を調べることで、細胞応答決定のメカニズムについて新たな情報の取得と、さらに細胞挙動の理解を進めることを目的とした。具体的には、**RTK-RAS-MAPK** 経路内におけるアダプタータンパク質 **p52SHC** と **GRB2** の刺激によるシグナル伝達の時間変化を計測した。そして、それらのシグナル伝達ダイナミクスの関係性を調べ、下流の **RAS** 活性化の時間変化に与える影響を明らかにした (第2章)。さらに **RAS/MAPK** シグナル伝達ダイナミクスに対しての **SHC** と **GRB2** の特異的機能と、さらに細胞運命の決定における役割について調べた (第3章)。



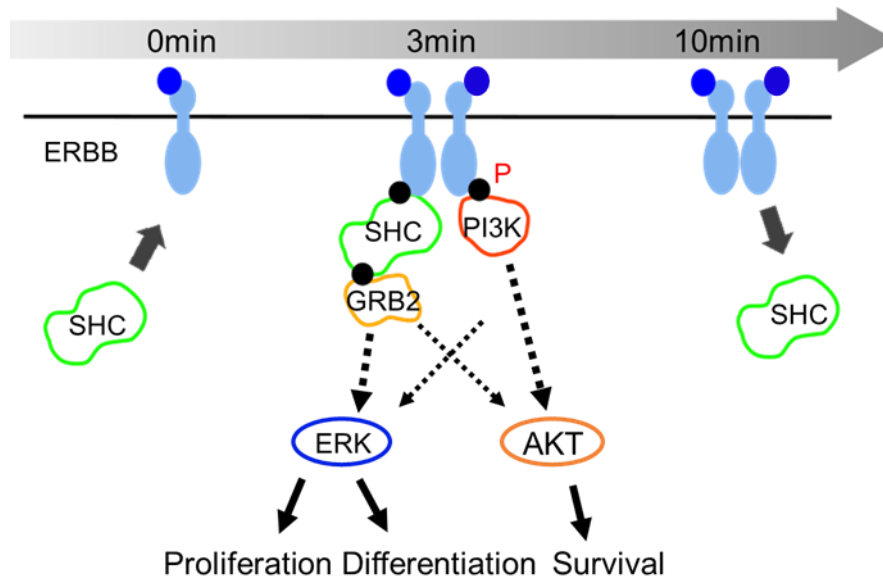


図 1-1. ERBB シグナル伝達

細胞表面受容体の ERBB 受容体にリガンドが結合すると、ホモあるいはヘテロ二量体を形成する。その後自己リン酸化された受容体の細胞質側領域（黒丸）に SHC、GRB2、PI3K が結合する。細胞膜上における SHC、GRB2 は主に MAPK/ERK 経路の ERK へと信号を伝達し、細胞の増殖、分化を引き起こす。一方で PI3K は AKT に信号を伝達し細胞の生存に関与する。

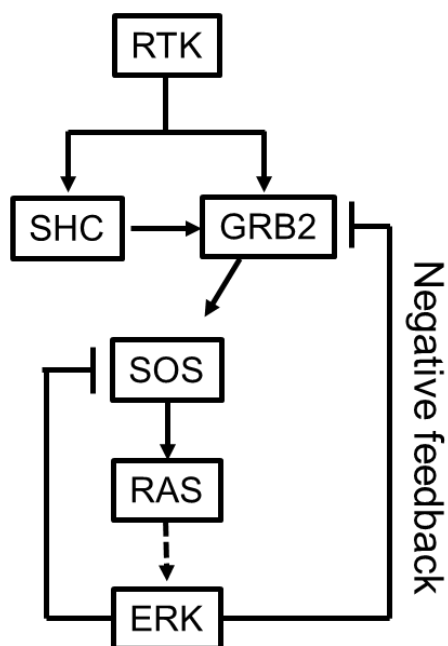


図 1-2. RTK-RAS-MAPK 経路の概略図

SHC、GRB2 を介して活性化される RAS/MAPK シグナル伝達。RTK と SHC によって活性化された GRB2 は SOS を介して RAS/MAPK 経路を活性化する。GRB2、SOS の膜結合は ERK からのネガティブフィードバックによって制御される。点線は間接的な相互作用を示す。

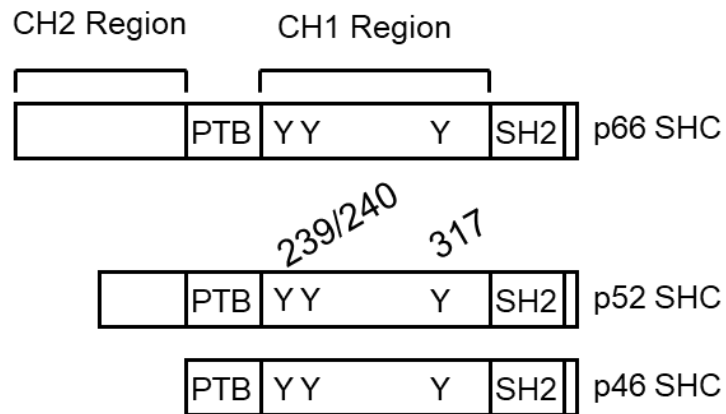


図 1-3. SHC タンパク質の構造

SHC の 3 つのアイソフォーム (p66、p52、および p46) は共通のモジュール構造を持つ (PTB ドメイン、CH1 region、SH2 ドメイン)。p66SHC と p52SHC は CH2 region を持つ。またすべてのアイソフォームは CH1 領域に保存された 3 つのリン酸化チロシン部位 (Y) を有している。

## 第 2 章

# p52SHC による GRB2 ダイナミクスの 二相性な時空間的調節

## 2.1 序論

受容体型チロシンキナーゼは、細胞外から EGF、NGF といった様々な刺激を受け取り、複雑なネットワークを用いて多様な細胞応答を示す。主要な経路の一つである RAS/MAPK 経路では、RTK シグナルの時間的応答を制御することにより細胞増殖、分化を決定する (Kao et al., 2001; Marshall, 1995; Nagashima et al., 2007)。そこでは増殖因子または分化因子の刺激による ERK の一過的な活性化 (10 分以内) と持続的な活性化 (数十分以上) はそれぞれ増殖と分化を誘導する。

しかしながら、驚くべきことに RTK-RAS-MAPK シグナル伝達において重要なプロセスである RAS の活性化は、ERK シグナル伝達のダイナミクスとは無関係に多くの場合一過的である。また制御できていない RAS シグナル活性の上昇はしばしば癌の進行を引き起こすため (Sharma et al., 2007)、細胞は RAS 活性化の応答量、持続時間を厳密に調節する必要がある。ERK から RTK および、アダプタータンパク質への負のフィードバックループが RAS の活性化持続時間の制御に重要であることが示唆されているが (Lake et al., 2016; Langlois et al., 1995; Porfiri and McCormick, 1996)、それだけでは不十分であり RAS 活性化の時間的制御の分子メカニズムは完全には理解されていなかった。

細胞外シグナル伝達分子の RTK への結合は、RTK の細胞質ドメインで複数のチロシンリン酸化を引き起こし、SHC および GRB2 を含むさまざまなアダプタータンパク質を細胞質から RTK が存在する細胞膜へと移行する (Mendoza et al., 2011; Nepstad et al., 2020)。SHC と GRB2 はそれぞれ PTB (Pawson and Scott, 1997) と SH2 ドメイン (Pelicci et al., 1992) を介して RTK のチロシンリン酸化を認識する。

SHC は活性化された RTK と結合すると、SHC の CH1 ドメインの Tyr239/240 および Tyr317 残基が RTK のキナーゼ活性によってリン酸化される (Rozakis-Adcock et al., 1992; van der Geer et al., 1996)。これらのリン酸化チロシン残基は、GRB2 を含む PTB および/または SH2 ドメイン含有タンパク質の特異的結合部位として作用する (Ravichandran, 2001)。これは、GRB2 が 2 つの分子相互作用によって、活性化された RTK へと移行することを意味している。1 つはリン酸化 RTK (pRTK) への直接結合と、もう 1 つはリン酸化 SHC (pSHC) を介した間接的結合である。

pRTK または pSHC を認識することで細胞膜へと移行した GRB2/SOS 複合体は、不活性型の GDP-RAS から活性型の GTP-RAS への変換を誘導する (Bisson et al., 2011; Pawson, 2007; Rozakis-Adcock et al., 1993)。その後 RAF、MEK、および ERK で構成される MAPK カスケードを活性化する (Widmann et al., 1999)。直接的および間接的な (pSHC を介した) GRB2 の pRTK への移行は、下流の RAS/MAPK シグナル伝達に関して、類似な能力を有していると考えられている (Oku et al., 2012; Saucier et al., 2004; Saucier et al., 2002)。一方で、SHC の存在がこれらのシグナル制御に重要であるという

報告もある。SHC は、低濃度刺激時の RAS/MAPK シグナル伝達の完全な活性化に重要な役割を果たし、(Lai and Pawson, 2000)、より強力な DNA 合成を誘導する (Oku et al., 2012)。これらの研究は、SHC が RAS/MAPK シグナル伝達の振幅を調節することを示唆している。

一方、RAS/MAPK シグナル伝達経路の時間的調節における SHC の役割については、詳細に議論または報告されていない。本研究ではヒト哺乳動物癌由来細胞株である MCF7 細胞を分化因子である Heregulin (HRG) で刺激すると、SHC と GRB2 が固有の細胞膜移行ダイナミクスを示すことを発見した。この SHC と GRB2 のシグナル伝達ダイナミクスの違いは、RAS/MAPK システムの時間的調節における SHC の固有の役割を示唆している。本章では細胞分化シグナル中に SHC が GRB2/SOS シグナル伝達をどのように調節するのかを調べた。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 プラスミドの構築

CMV-p52SHC および GFP-p52SHC プラスミドは、京都産業大学の佐藤健一氏から譲渡された。GFP の単量体変異した pmEGFP-C2 ベクター (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ, US) は、pmEGFP-C2 ベクターの A206K の直接点変異によって構築した (Hibino et al., 2011)。mEGFP-GRB2 ベクター (GFP-GRB2) を構築するために CMV-GRB2 (Morimatsu et al., 2007) を pmEGFP-C2 の *BglII-XhoI* 部位にサブクローニングした。Halo7-C1 ベクターは、EGFP-C1 ベクター (Takara Bio, Shiga, Japan) の mEGFP を Halo7 (pFN19HhaloTag@T7SP6Flexi vector; Promega, Madison, WI, US) と交換することにより構築した。Halo7-p52SHC (Halo-SHC) を構築するために、CMV-p52SHC を Halo7-C1 ベクターの *SacI-KpnI* 部位にサブクローニングした。Halo7-SHC3F (Halo-SHC3F; Y239/240F, Y313F) の cDNA は、SLiCE を用いて Halo-SHC の Tyr239/240、Tyr313 をフェニルアラニンに置換することで構築した。mEGFP-SOS1 ベクターを構築するために、pCGN-HA-hSos1 フラグメント (Chardin et al., 1993) を pmEGFP-C2 の *HindIII-SalI* 部位にサブクローニングした。GFP-RAF の構築については、以前に示されている方法で構築した (Hibino et al., 2003)。Halo7-SOS (Halo-SOS) の cDNA の構築は以前に示されている方法で行った (Nakamura et al., 2016)。Halo7-SOS (R1131K) の cDNA は以前に示されているように Halo-SOS の R1131K の直接変異によって構築した (Nakamura et al., 2017)。

### 2.2.2 細胞の調製

#### 培養条件

MCF7 細胞は、37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で、10% FBS (fetal bovine serum; Hyclone, Logan, UT) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で培養した。細胞の継代、トランスフェクションはクリーンベンチ内において滅菌処理下で行った。直径 60 mm の培養皿に MCF7 細胞を接着させ、10% FBS を含む DMEM を 4 mL 加え、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養を行った。細胞の密度が約 80% になるごとに継代を行った。5 mM EDTA を含む PBS 溶液 2 mL で洗浄を行い、その後 0.05% のトリプシンを含む PBS 溶液を加え、アスピレーターにより溶液を少量残して吸い取った。3、4 分室温で静置した後、DMEM (10% FBS 含有) を 2 mL 加え、ピペットマンで溶液を懸濁し、適度に希釈して新しい培養皿に植え継いだ。蛍光顕微鏡観察の際は、25 mm 丸型カバーガラス (MATSUNAMI MICRO COVER GLASS; MATSUNAMI GLASS, Osaka, Japan) を入れた 60 mm の培養皿に対して同様の手法により細胞をまいた。なおこの丸カバーガラスは 10 倍希釈した中性洗剤で洗浄後、濃硫酸処理したガラスを DMEM (10% FBS 含有) に浸し 24 時間以上 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で保存したものをを用いた。

## トランスフェクション法

トランスフェクション試薬である Lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, US)、Plus reagent (Invitrogen) を用いて細胞内にプラスミドを導入した。OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) 250  $\mu$ L に対して、Plus reagent 2  $\mu$ L を混合した。その後、目的の DNA を組み込んだプラスミドを最終濃度 0.2  $\mu$ g から 1  $\mu$ g の間で最適な濃度になるように加え 5 分間室温で静置した。この混合溶液に対して Lipofectamine LTX を 5  $\mu$ L 滴下し室温で 15 分間静置した。次にこの混合溶液を DMEM (10% FBS 含有) 3 mL と混合し、細胞が接着したカバーガラスの入った培養皿に滴下し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養を行った。3 時間後、新しい DMEM (10% FBS 含有) 3 mL に培地交換し再び CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 20 時間培養を行った。

SHC のノックダウンには ON-TARGETplus Human SHC1 siRNA (Dharmacon, Lafayette, CO, US) を使用し、2 日間培養を行った。

## Serum starvation

トランスフェクションを行った細胞を 0.1% BSA (アルブミン ウシ血清由来 IgG/プロテアーゼ不含; Wako Pure Chemical Industries)、1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>、0.3 mg/mL L グルタミン、15 mM HEPES (pH=7.4、2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic Acid; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含むイーグル MEM (Nissui, Tokyo, Japan) 溶液 (Starve 溶液) で 1 回洗浄し、培地を Starve 溶液に置き換えた。その後 CO<sub>2</sub> インキュベーター内において 24 時間以上、細胞を飢餓状態で培養し、細胞周期を同調させた。

## tetramethylrhodamine (TMR) による蛍光標識

飢餓状態で培養した細胞の入った培養皿に対して 100 nM HaloTag® TMR Ligand (Promega) を含む Starve 溶液を 2 mL 加え、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 15 分間培養を行った。その後、9.7 g/L Hank's Balanced salts (HBSS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)、0.3 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> を含む HBSS 溶液 2 mL で 2 回、Starve 溶液 2 mL で 1 回洗浄を行った。再び Starve 溶液を 2 mL 加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 15 分間インキュベートした。その後 Starve 溶液 2 mL で 1 回洗浄し、最後に Starve 溶液を 2 mL 加えた。

## 阻害剤実験

MEK のキナーゼ 阻害は U0126 (Promega) を使用した。細胞を刺激する 15 分前に 10  $\mu$ M の U0126 で細胞を処理し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

### 2.2.3 一分子計測と解析

#### 蛍光観察



蛍光標識を行った細胞が接着しているカバーガラスを AttoAttofluor® cell chamber (Invitrogen) で固定し、0.1% BSA (IgG/プロテアーゼ不含)、0.3 mg/mL L グルタミン、15 mM HEPES (pH=7.4) を含むイーグル MEM 溶液 (観察溶液) を 500  $\mu$ L 加えて観察を行った。室温 (25°C) の条件で、細胞膜上における蛍光標識した GFP-GRB2 と Halo-SHC の膜上分子を観察するために、倒立顕微鏡 (IX83; Olympus, Tokyo, Japan) に 60 $\times$ /1.49 油浸対物レンズ (Apo N; Olympus) を設置した全反射照明蛍光顕微鏡 (Total internal reflection fluorescence microscope; TIRF microscope) を使用した。GFP と TMR を選択的に励起するために全個体 OPAL レーザー (Sapphire 488 LP と Sapphire 561 LP; Coherent, Santa Clara, CA, US) と ZT 488/561 rpc dichroic mirror (Chroma Technology, Bellows Falls, VT, US) を使用した。505-530 nm (GFP) と 560-650 nm (TMR) の波長の発光信号を同時に取得するために、GFP 用の FF01-514/30-25 514 nm single-band bandpass filter (Semrock, Rochester, NY, US) と TMR 用の FF01-605/64-25 605/64 nmBrightLine® single-band bandpass filter (Laser 2000; Cambridgeshire, UK) および、T560lpxr dichroic mirror (Chroma Technology) を搭載した WVIEW GEMINI-2C (Hamamatsu Photonics K. K., Shizuoka, Japan) を使用した。蛍光画像は、2 台の ORCA-Flash 4.0 V3 デジタル CMOS カメラ (Hamamatsu Photonics K. K.) を使用して 20 frame/sec (露光時間 50 ms) で撮影した。

25°C の顕微鏡下で、細胞を最終濃度 10 nM の recombinant human NRG1- $\beta$ 1/HRG1- $\beta$ 1 EGF domain (HRG; R&D Systems, Minneapolis, MN, US) で刺激した。

## 画像処理と定量

ImageJ を用いて得られた画像に対して rolling ball アルゴリズムに基づいた Subtract background を適用することでなだらかにバックグラウンド減算処理を行った。この処理は画像のピクセル値の高さを三次元で表した空間に対して、設定した半径の ball が転がって背景を形成する。rolling ball (転がるボール) の半径を小さくするほど背景として認識される部分が多くなり、よりはっきりとした輝点のみをシグナルとする。本研究ではその半径を 25 ピクセルに設定しバックグラウンド減算処理を行い (一分子輝点は約 6 ピクセル以下)、非圧縮 Avi ファイル (8bit) に変換した。変換したファイルはタンパク質一分子蛍光観察画像用の輝点計測ソフトウェア G-Count (G-Angstrom, Miyagi, Japan) の 2 次元ガウスフィッティングにより輝点の検出を行った。シグナル/ノイズ比が高くなるようにパラメータ (intensity, ROI size 等) を最適化し輝点検出を行った。検出された輝点に対してそれぞれの蛍光強度を算出し、それぞれの時間における輝点から算出した蛍光強度を積算し、その時間における細胞膜上分子数とした。輝点を追跡する際は動画像において最低 6 フレーム以上連続して検出されたときに軌跡として追跡し (途中 1 フレーム輝点検出が外れても同じ軌跡としてつなぐ)、軌跡データをエクセルファイルの形式に変換した。Halo-SHC と GFP-GRB2 のダイナミクスは各細胞で

刺激する前の値で規格化した値を使用した。

#### 2.2.4 キネティクス解析

GRB2 の膜上でのキネティクス解析は、以前筆者が報告した方法により行った (Yoshizawa et al., 2017)。GFP-GRB2 の細胞膜への結合速度解析、膜からの解離速度解析は一分子観察から得られたデータに対して行った。一定時間における GFP-GRB2 の結合頻度を測定し、細胞の面積、撮影時間により規格化した (一次会合速度定数)。二次会合速度定数 ( $k_{on}$ ) の相対値は出現頻度を落射照明 (Epi) によって得られた GFP-GRB2 の細胞質濃度で規格化し決定した。

細胞膜上からの解離速度を求めるために、GFP-GRB2 の細胞膜上における滞在時間の累積分布を計算した。この累積分布は以下に示す二つの指数関数の和でフィッティングを行った。

$$f(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) \quad (1)$$

$(k_1, k_2 \text{ は GRB2 の膜からの解離速度定数 } k_1 > k_2)$

それぞれの速度定数の寄与率は以下の式より求めた。

$$A_1 \text{ 式の寄与率 } \frac{A_1}{A_1 + A_2} \quad A_2 \text{ 式の寄与率 } \frac{A_2}{A_1 + A_2} \quad (2)$$

#### 2.2.5 FCCS 計測

Fluorescence cross correlation spectroscopy (FCCS) 計測は 40×/1.2 の水浸対物レンズ (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を設置した ConfoCor2 instrument (Carl Zeiss) を使用して行った (Pack et al., 2014)。GFP と TMR の励起には、それぞれ 488-nm Ar<sup>+</sup> laser と 543-nm He-Ne laser を使用した。蛍光を 570-nm の beam splitter によって分割した後、2つの avalanche photodiodes を使用し、GFP (505-530 nm)、TMR の (600-650 nm) の蛍光波長を検出した。共焦点ピンホールの直径は検出量を調整するために、GFP チャネルでは 70 μm、TMR チャネルでは 78 μm に調整した。データ分析は ConfoCor2 ソフトウェアを使用して実行した (Pack et al., 2006; Pack et al., 2014)。蛍光自己相関関数と相互相関関数は、以下の式から計算した。

$$G(\tau) = \frac{\langle I_i(t) - \langle I_i(t) \rangle \rangle \langle I_j(t + \tau) - \langle I_j(t) \rangle \rangle}{\langle I_i(t) \rangle \langle I_j(t) \rangle} \quad (3)$$

$\tau$  は遅延時間、 $I$  は GFP ( $i$ ) と TMR ( $j$ ) チャネルの蛍光強度。 $\langle I \rangle$  は時間平均した蛍

光強度を示す。計算された  $G(\tau)$  は以下に示す式によってフィッティングを行った (Park et al., 2015)。

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \sum_i F_i \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{s^2 \tau_i}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (4)$$

$F_i$  と  $\tau_i$  はそれぞれ成分  $i$  の割合と拡散時間を示す。  $N$  は検出領域内の蛍光粒子数の平均値を示す。  $s$  は室温で Rhodamine-6G 標準溶液を使用して測定した構造パラメータを示す。 GFP ( $[GFP_{total}]$ )、Halotag-TMR ( $[TMR_{total}]$ ) および GFP-TMR 複合体 ( $[Complex]$ ) の相対濃度は以下の式で計算した。

$$[GFP_{total}] = \frac{1}{G_G(0)} \frac{1}{N_A} \frac{1}{V}, \quad (5)$$

$$[TMR_{total}] = \frac{1}{G_R(0)} \frac{1}{N_A} \frac{1}{V}, \quad (6)$$

$$[Complex] = \frac{G_{cross}(0)}{G_G(0) \times G_R(0)} \frac{1}{N_A} \frac{1}{V}, \quad (7)$$

$G_G(\tau)$  と  $G_R(\tau)$  はそれぞれ GFP、TMR チャンネルの蛍光自己相関関数であり、  $G_{cross}(\tau)$  は蛍光相互相関関数を示す。  $N_A$  はアボガドロ数、  $V$  は検出体積を示す。細胞内における SHC と GRB2 の総濃度 (プローブおよび内在性の総和)  $[SHC_{total}]$  と  $[GRB2_{total}]$ 、および補正された複合体濃度は  $[cComplex]$  は以下の式から求めた。

$$[GRB2_{total}] = \left(1 + \frac{GRB2_{en}}{GRB2_{ex}}\right) [GFP_{total}] \quad (8)$$

$$[SHC_{total}] = \left(1 + \frac{SHC_{en}}{SHC_{ex}}\right) [TMR_{total}] \quad (9)$$

$$[cComplex] = \left(1 + \frac{GRB2_{en}}{GRB2_{ex}} + \frac{SHC_{en}}{SHC_{ex}} + \frac{SHC_{en}}{SHC_{ex}} \times \frac{GRB2_{en}}{GRB2_{ex}}\right) [Complex] \quad (10)$$

GFP-GRB2 と Halo-SHC を同時発現した細胞における GRB2 と SHC の内在性とプローブの発現割合  $\left(\frac{GRB2_{en}}{GRB2_{ex}}\right)$ 、  $\left(\frac{SHC_{en}}{SHC_{ex}}\right)$  はそれぞれ 0.70、0.30 と推定された。これらの値は

ウェスタンブロットティング分析によって得られた発現量比  $\left(\frac{GRB2_{en}}{GRB2_{ex}}\right) = 1.47$  および

$\left(\frac{SHC_{en}}{SHC_{ex}}\right) = 1.26$  (図 2-1) と、これらのプローブが発現した細胞の割合  $GRB2 = 0.48$  および  $SHC = 0.24$  から決定した。解離定数 ( $K_d$ ) の定義から、複合体  $[cComplex]$  の  $[GRB2_{total}]$  または  $[SHC_{total}]$  に対する割合は、以下の式から導き出した (Sadaie et al., 2014)。

$$\frac{[cComplex]}{[GRB2_{total}]} = \frac{[SHC_{total}] - [cComplex]}{Kd + [SHC_{total}] - [cComplex]} \quad (11)$$

$$\frac{[cComplex]}{[SHC_{total}]} = \frac{[GRB2_{total}] - [Complex]}{Kd + [GRB2_{total}] - [Complex]} \quad (12)$$

### 2.2.6 ウェスタンブロットティング

細胞が接着した直径 60 mm の培養皿に対して PBS で一回洗浄し、SDS サンプルバッファーにより細胞を可溶化した。ERBB 受容体、SHC のリン酸化の時間変化を計測するために、室温で 10 nM HRG で刺激後、0、5、および 30 分時に SDS サンプルバッファーで反応を停止したサンプルをそれぞれ作成した。調製したサンプル溶液を 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、その後 PVDF メンブレン (Millipore, Burlington, MA, US) に転写した。ウェスタンブロットティング分析では、以下のタンパク質に対する一次抗体を使用して、発現レベルを定量化した：SHC (06-203; Millipore)、GRB2 (610111; BD biosciences)、 $\beta$ -actin (A5441; Sigma-Aldrich)。以下の一次抗体を使用して各タンパク質のリン酸化レベルを定量化した：anti-pERBB1 (pTyr1068; 3777S; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US)、anti-pERBB1 (pTyr1173; 4407; CST)、anti-pERBB2 (pTyr1139; ab53290; Abcam, Cambridge, UK)、anti-pERBB2 (pTyr1221/2; 2243; CST)、anti-pERBB3 (pTyr1262; AF5817-sp; R&D Systems)、anti-pERBB3 (pTyr1328; ab131444; Abcam)、anti-pERBB4 (pTyr1162; ab68478; Abcam)、anti-pERBB4 (pTyr1284; 4757; CST)、anti-pSHC (pTyr317; 2431; CST)。

免疫プロットデータからリン酸化レベルを比較するために2つの規格化を実行した。まずすべての実験データを $\beta$ -actinの染色強度により規格化した。その後、Wild type (WT) -SHCを発現させたMCF7細胞で得られた値 (刺激後5分) で規格化を行った。

### 2.2.7 統計解析

同一細胞から得られた時系列変化の比較は対応のある t 検定法でデータ群間の有意性を検証した。条件間の比較を行う際は、Fisher の F 検定法を用いてデータ群間の等分散性の確認を行い、Student の t 検定法または Welch の t 検定法でデータ群間の有意性を検証した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 HRG 刺激時の SHC と GRB2 の固有の細胞膜移行ダイナミクス

細胞分化シグナル中における SHC および GRB2 シグナルの時空間的特徴を理解するために、HRG 刺激した MCF7 細胞内におけるこれらタンパク質の細胞膜移行ダイナミクスを観察した。細胞内におけるこれらタンパク質を可視化するために、Halo と GFP タンパク質をそれぞれ SHC と GRB2 の N 末端に融合させた。(以下、Halo-SHC と GFP-GRB2 と呼ぶ) (図 2-1)。Halo-SHC および GFP-GRB2 タンパク質の見かけの分子量は、ウェスタンブロッティング解析によってそれぞれ 86 および 52 kDa と決定され (図 2-1 A)、これは予想される分子サイズと一致した。発現させた Halo-SHC と GFP-GRB2 の相対的な発現レベルは内因性分子の約 80% 以下であり、SHC、GRB2 の内在性の発現量には影響を与えなかった (図 2-1 B)。標識されたプローブの発現が低いことは、これらタンパク質分子の固有特性を大きく変えることなく、SHC および GRB2 の細胞膜移行ダイナミクスを解析できると考えられた。

全反射照明蛍光顕微鏡を使用して、基底膜の細胞質表面側における Halo-SHC および GFP-GRB2 を観察した (図 2-2)。本研究では、Halo タンパク質を TMR によって染色した。両方のアダプタータンパク質は主に細胞質中に分布しており、秒オーダーで細胞質と細胞膜の間を行き来していた (図 2-2 A、B)。細胞を HRG 刺激したときの細胞膜上におけるタイムラプス計測を行った (図 2-2 C、図 2-3 A)。HRG で細胞を刺激すると、細胞膜上におけるこれらタンパク質の密度が増加し、Halo-SHC の膜局在化の増加は刺激後少なくとも 60 分間持続したが (図 2-3 B)、GFP-GRB2 は一過的だった (図 2-3 C)。

細胞刺激後の GRB2 の細胞膜移行は、リン酸化された ERBB 受容体、およびリン酸化された ERBB 受容体に結合したリン酸化 SHC との結合によって引き起こされると一般的に考えられている。細胞イメージングと同条件下でのウェスタンブロッティング解析の結果、4 つの ERBB (ERBB1-B4) 受容体上の主要な SHC および GRB2 結合部位は刺激後 5 分まで増加した後減少したが、刺激後 30 分において有意に高いレベル (5 分のピークの 40-70%) でリン酸化が維持された (図 2-4 A)。また SHC と GRB2 の結合部位間でリン酸化レベルに有意な差は見られなかった。さらに SHC 上の GRB2 結合部位 (pTyr317) のリン酸化も HRG 刺激後に増加し、Halo-SHC の膜移行と同様に持続した (図 2-4 B)。これらの結果は、SHC と GRB2 が、これまでに知られていなかったメカニズムを介して、HRG 刺激された MCF7 細胞内において異なる固有の細胞膜移行ダイナミクスを持つことを示唆している。

### 2.3.2 SHC は GRB2 の膜移行の応答量と持続性の両方を制御する

SHC が GRB2 の細胞膜移行のダイナミクスに与える影響を調べるために、SHC

のドミナントネガティブ変異プローブ (SHC3F: Y239/240F、Y313F) を構築した (図 2-5 A)。これら 3 つのリン酸化チロシン部位は GRB2 の特異的な結合部位であり、RAS/MAPK シグナル伝達を活性化することが報告されている (Ursini-Siegel and Muller, 2008)。これら全てのリン酸化チロシン部位をフェニルアラニンに置換することで GRB2 との結合を阻害した (Ishihara et al., 1998; van der Geer et al., 1996)。さらに細胞内シグナル伝達における SHC の直接的な役割を評価するために SHC のノックダウン細胞を使用した。内在性 SHC の 3 つのアイソフォーム (p66、p52、および p46) の発現レベルは SHC のノックダウンによって約 60~70% に減少した (図 2-1 B)。しかし GFP-GRB2 の発現量、およびその内在性タンパク質分子の発現量には影響を与えなかった (図 2-1 B)。ERBB2-ERRB4 受容体の一部の SHC と GRB2 結合部位、および SHC (pTyr317) の HRG 刺激によるリン酸化は SHC をノックダウンした MCF7 細胞で減少した (図 2-4)。一方 Halo-SHC3F の共発現は内在性 SHC の 3 つのアイソフォームと GRB2 の発現量および ERBB 受容体のリン酸化にはほとんど影響を与えなかったが、内在性 SHC の 3 つのアイソフォームのリン酸化をわずかに減少させた (図 2-1 B、図 2-4)。これは内在性 SHC と Halo-SHC3F が ERBB 受容体に対して競合的結合を示したためであると考えられる。

次に、Halo-SHC3F を共発現させた条件で GFP-GRB2 の膜局在を調べた (図 2-5 B)。Halo-SHC3F の細胞膜移行ダイナミクスの応答量と応答の持続性は Halo-SHC と変わらなかった。SHC3F は GRB2 の細胞膜移行に対してドミナントネガティブな効果を期待したが、想定とは異なり Halo-SHC3F の発現により GRB2 の膜局在がより持続的になった (図 2-5 B)。一方、SHC ノックダウン細胞では HRG 刺激後の GFP-GRB2 の膜移行はシグナル伝達の初期段階 (<10 分) で大幅に抑制されていた (図 2-5 B)。これにはおそらく SHC ノックダウンによる ERBB 受容体の GRB2 結合部位のリン酸化の減少も影響していると考えられる (図 2-4 A)。これらのことから SHC はシグナルの初期段階 (<10 分) では GRB2 の膜局在の応答量の増加に寄与し、後期段階ではリン酸化されていない SHC が GRB2 の膜局在を正に調節することが考えられた。

ERK からの負のフィードバック経路は GRB2/SOS 複合体の膜移行を阻害することが知られており (Guy et al., 2009; Hanafusa et al., 2002; Sato et al., 2004)、GRB2 の膜移行ダイナミクスを一過的に制御する可能性があった。そこで ERK 活性化を抑制するため MEK 阻害剤である U0126 で細胞を処理後、これらのダイナミクスを計測した (図 2-5 C)。WT-SHC と SHC3F の膜局在は MEK 阻害剤の影響を受けなかった。一方で GRB2 の膜局在の持続時間は MEK 阻害剤処理によって延長され、SHC3F の発現によりさらに持続的になった。これらの結果はリン酸化 SHC による制御と MEK および/または ERK からの負のフィードバックが、GRB2 の膜局在化を付加的に抑制することを示唆している。まとめると SHC は ERBB 受容体のリン酸化が持続している場合でも、HRG 刺激後に GRB2 のダイナミクスを一過的にさせるのに関与していることが示

唆された。

### 2.3.3 SHC は GRB2 の細胞膜との相互作用動態に影響を与える

GRB2 を一過的な膜局在にさせるメカニズムについて、さらなる情報を得るために細胞膜上における GFP-GRB2 の速度論的解析を行った (図 2-6)。まず GFP-GRB2 の細胞膜上の結合部位に対する結合速度を一分子計測によって調べた。細胞内における GFP-GRB2 は秒オーダーで細胞質と細胞膜を行き来していた。そこで細胞膜上における単位時間および単位面積あたりの GFP-GRB2 分子の出現頻度を測定した (Yoshizawa et al., 2017)。GFP-GRB2 分子の出現頻度は落射照明によって観察された細胞質 (図 2-2 A) の蛍光強度 (GFP-GRB2 の相対的発現レベル) とほぼ直線的に正に相関した (図 2-6 A)。この出現頻度を相対的発現レベルで規格化し二次結合速度定数 ( $k_{on}$ ) の相対値を計算した (図 2-6 B、表 2-1)。 $k_{on}$  の時間変化は GRB2 の細胞膜移行ダイナミクスと同様な時間変化を示した (図 2-5 B)。Halo-SHC 共発現下では  $k_{on}$  は HRG 刺激後 5 分で増加し、細胞刺激後 30 分で基底値まで減少した。Halo-SHC3F 共発現下でも刺激後 5 分で  $k_{on}$  を増加しその後減少したが、少なくとも刺激する前よりも高いレベルで維持された。重要なことに、Halo-SHC3F 共発現下における GFP-GRB2 の  $k_{on}$  は Halo-SHC 共発現下の  $k_{on}$  より高い値を示した。

次に、細胞膜上における個々の GFP-GRB2 分子の膜滞在時間を測定し、膜からの解離速度を求めた (図 2-6 C-E)。GFP-GRB2 の膜滞在時間の分布は Halo-SHC または Halo-SHC3F が発現した細胞の両方において 2 成分指数関数的減衰関数でフィットされた (図 2-6 C)。2 つの解離速度定数 ( $k_{off1}$ 、 $k_{off2}$ ) と遅い成分の割合はフィッティング結果から計算した (図 2-6 D、E、表 2-2)。 $k_{off1}$  (早い成分) の値は Halo-SHC および Halo-SHC3F 共発現下の間で有意差を示さず、細胞刺激に対して一定だった (図 2-6 D)。 $k_{off2}$  (遅い成分) の値も  $k_{off1}$  と同様に Halo-SHC と Halo-SHC3F 共発現下の間で有意差はなかったが、両条件で HRG 刺激後に減少した。しかしながら、遅い成分の割合は Halo-SHC と Halo-SHC3F 共発現下の間で異なっていた。Halo-SHC 共発現では刺激後 30 分で減少したのに対して、Halo-SHC3F 共発現下では刺激後 5 分で増加し、刺激後 30 分で基底値レベルまで減衰した。また刺激後における遅い成分の割合は Halo-SHC3F を共発現させた方が高いことが分かった (図 2-6 E、表 2-2)。

これらの速度論的解析により刺激後後期 (30 分) でのより大きな  $k_{on}$  値と遅い解離成分の割合の増加が、Halo-SHC3F 発現を伴う細胞でより持続的な GRB2 の膜移行を引き起こすことが考えられた。以上のことから SHC は GRB2 の膜への結合速度、膜からの解離速度を刺激時間依存的に制御することで GRB2 の膜局在の持続時間を調節することが考えられた。また上記の結果は非リン酸化 SHC がシグナルの後期段階において、GRB2 の膜局在の持続性を正に調節する可能性を示唆している。

### 2.3.4 細胞質における SHC は GRB2 の細胞膜移行を阻害する

SHC は GRB2 の膜解離にも影響を与えていたが、遅い成分の割合の変化はあまり大きくなかったため (~5%) (表 2-2)、SHC の GRB2 の膜への結合頻度に対する調節が GRB2 の一過的な細胞膜移行ダイナミクスにより強く寄与することが予想された。一つの可能性として、細胞膜から解離したリン酸化 SHC が GRB2 の細胞膜への移行を調節していることが考えられた。この仮説を確かめるために、蛍光相互相関分光法 (FCCS) を使用して細胞質中における Halo-SHC と GFP-GRB2 の相互作用を測定した (図 2-7 A)。蛍光自己相関分光 (Fluorescence correlation spectroscopy, FCS) 信号に加えて、有意なレベルの相互相関信号を検出した (図 2-7 B)。FCS 計測から決定された Halo-SHC、Halo-SHC3F および GFP-GRB2 の細胞質濃度は刺激時間によって有意に変化しなかったことから、これらタンパク質の膜結合画分は細胞質画分に対して非常に小さいことが考えられた (図 2-7 C)。細胞質内の Halo-SHC (または Halo-SHC3F) と GFP-GRB2 との間の解離定数 ( $K_d$ ) の値を TIRF イメージングと同条件下で決定した (図 2-8 A)。TMR プローブと GFP プローブ間の見かけ上の  $K_d$  値は非蛍光性の内在性分子 (内在性タンパク質とプローブ分子の相対的発現量から計算) との相互作用を含む値に変換した。この計算では SHC と GRB2 の総量は測定中一定であると仮定した (図 2-1 B、図 2-7 C)。

HRG で細胞を刺激すると、細胞質内の WT-SHC と GRB2 間の  $K_d$  値は約 2 分の 1 に減少し、この減少は HRG 刺激後少なくとも 30 分間持続した (図 2-8 A)。一方、SHC3F と GRB2 間では  $K_d$  値の低下は見られなかった。内在性タンパク質を含むこれらのタンパク質の総量に対する SHC/GRB2 複合体の割合を推定した (図 2-8 B)。SHC/GRB2 複合体の割合は細胞刺激後に SHC 総量の約 30%、GRB2 総量の約 20% に増加した。これらのことから細胞質中における SHC と GRB2 の相互作用は刺激依存的に増加することが考えられた。以上のことから SHC/GRB2 複合体の増加は GRB2 を細胞膜から細胞質へと隔離させ、GRB2 の細胞膜移行ダイナミクスを一過的にさせる要因の一つであることが示唆された。

### 2.3.5 持続的な GRB2 の膜移行が下流シグナルに与える影響

次に GRB2 の膜局在が SHC によって制御されることが下流シグナルにどのような影響を与えているのかについて調べた。細胞膜に移行された GRB2/SOS 複合体は細胞膜上で RAS を活性化する。その後活性化された RAS は細胞質から RAF の細胞膜移行を誘導する。そこで HRG 刺激後の細胞内における GFP-SOS および GFP-RAF の細胞膜移行を測定した (図 2-9)。GFP-SOS の細胞膜移行ダイナミクスは本研究で調べた 3 つの実験条件の全てで一過的応答を示した (図 2-9 A)。また刺激後初期の応答は SHC3F の発現および SHC ノックダウンした細胞で大幅に抑制された。また RAF の細胞膜移行ダイナミクスは SOS のダイナミクスを反映するように同様な応答を示した。

Halo-SHC3F を発現した細胞では GRB2 の細胞膜移行の持続性の増加が観察さ



れたにも関わらず (図 2-5 B)、SOS の膜局在の持続性は延長されなかった (図 2-9 A)。おそらく正常状態な細胞では、SHC は主に刺激後初期段階における GRB2-RAF シグナル伝達の増幅に作用し、後期段階における GRB2 の膜移行を抑制する機能は、SOS シグナルと同時に作用する他のメカニズムによって隠されている可能性が考えられた。その一つとして、ERK からの負のフィードバック経路が SOS と RAF の細胞膜移行ダイナミクスに影響を与えている可能性がある。ERK が SOS を直接リン酸化することで GRB2 との相互作用が弱められ、SOS の細胞膜移行を阻害することが報告されている (Corbalan-Garcia et al., 1996; Langlois et al., 1995)。これらのメカニズムが GRB2 の膜局在が持続的な条件下でも、SOS のダイナミクスを一過的にさせていた可能性が考えられた。

ERK 活性化を阻害するため、MEK 阻害剤で細胞を前処理した後、HRG 刺激後の細胞内における GFP-SOS および GFP-RAF の細胞膜移行を測定した (図 2-9 A)。MEK 阻害剤は SOS および、RAF 膜移行の持続時間を増加させた (図 2-9 A、表 2-3)。しかし SOS のダイナミクスは GRB2 のダイナミクスよりも大幅に一過的であり、SHC3F は MEK 阻害後のこれらのダイナミクスにそれ以上の影響を与えなかった。このことは GRB2 のダイナミクスとは独立した SOS の細胞膜移行調節が MEK 阻害剤によってすべて無くならなかったことが考えられた。

そこで GRB2/SOS 複合体形成に対する負のフィードバック効果を RAS シグナル伝達のステップから分離するために、次に細胞内における SOS の R1131K 変異体のダイナミクスを計測した (図 2-9 B)。この変異体は GRB2/SOS の会合を増加させ、GRB2 の SOS 結合ドメインに対する GRB2 以外の影響を軽減することが示唆されている (Nakamura et al., 2017)。予想通り、SOS の細胞膜局在の持続時間は GRB2 のそれと同じくらいに延長され、SHC3F の共発現後にさらに持続的になった (図 2-9 B、表 2-3)。以上のことから負のフィードバックループによる SOS のリン酸化に加えて、SHC による GRB2 の膜局在制御が付加的に作用することで、一過的な RAS 活性化を誘導することを示唆している。

## 2.4 考察

GRB2/SOS-RAS シグナル伝達は RTK から ERK への主要な経路であり、正常な細胞機能にとって重要な経路である。RAS の活性化は上流の多様なシグナル伝達ダイナミクス下においても、一過的になるように厳密に制御されている。同じくアダプタータンパク質である p52SHC は GRB2/SOS シグナルの振幅を調節することで RAS シグナルの増幅を引き起こすことが可能であるが、時間的調節に関しては完全に理解されていなかった。

本研究では全反射照明蛍光顕微鏡を用いて MCF7 細胞内における HRG 刺激後の SHC および GRB2 の細胞膜移行の時間変化を計測した。HRG 刺激後の SHC と GRB2 の細胞膜移行の時間変化は異なっており、SHC の膜移行は持続的だったが、GRB2 の膜移行は一過的だった (図 2-3 B、C)。この結果は細胞膜上における SHC と GRB2 間の相互作用が HRG 刺激後に持続しないことを示していた。これは細胞膜上における SHC のリン酸化が GRB2 を細胞質から細胞膜へと移行する従来のモデルを考えると予想外の発見だった (図 1-1) (Zheng et al., 2013)。この現象の完全なメカニズムについてはいまだに分かっていないが、少なくとも刺激後初期と後期において以下のような SHC による二相的な調節が GRB2 のダイナミクスに影響を与えていることが明らかになった (図 2-10)。SHC はシグナル伝達の初期段階 (< 10 分) では細胞膜上で GRB2 の膜局在の応答量の増加に寄与し、後期段階では細胞質中のリン酸化された SHC が GRB2 の膜移行を抑制することが考えられた。したがって、SHC は細胞シグナル伝達中に空間局在が時間によって変化し、GRB2/SOS-RAS シグナル伝達を制御する異なるメカニズムを複数持っていると考えられる。

本研究の解析結果から、SHC が GRB2 の膜局在を刺激後の時空間依存的に異なる調節を行っていることが考えられた。それらの調節が GRB2 の膜局在の応答量と持続性の両方を調節することが考えられた。SHC の発現量の減少は GRB2 の初期段階の膜移行を大幅に低下させたのに対して、SHC のドミナントネガティブ変異である SHC3F は GRB2 の膜局在の持続時間をかえって延長した (図 2-5 B)。SHC3F 変異は GRB2 の特異的な 3 つのリン酸化部位を置換した変異体であり、GRB2 との相互作用を阻害することが知られている (Ursini-Siegel and Muller, 2008)。本研究の FCCS 計測でも細胞質中における SHC3F と GRB2 との相互作用は HRG 刺激後に増加しなかった (図 2-8)。したがって少なくとも細胞質中においては、SHC3F は GRB2 との相互作用がチロシン残基のフェニルアラニン置換によって阻害されていたことが考えられた。一方で細胞質中における WT-SHC と GRB2 との相互作用は HRG 刺激依存的に増加することがわかった (図 2-8 B)。また Halo-SHC と内在性 SHC のリン酸化は HRG 刺激によって増加した後、長時間に渡って持続していた (図 2-4 B)。このことから細胞膜上の ERBB 受容体によってリン酸化された SHC が細胞質へと解離し、リン酸化状態を維持したまま細胞質

中で GRB2 と複合体を形成したことが示唆された。以前の研究では、HRG 刺激した細胞内で SHC と GRB2 の相互作用が持続するといった報告があり (Olayioye et al., 2001)、この考えを支持していると考えられる。しかしこの報告では、細胞内全体で相互作用が持続することを示していたが、本研究の結果から細胞膜上では一過的に相互作用し、その後は細胞質中で相互作用していることが明らかになった。

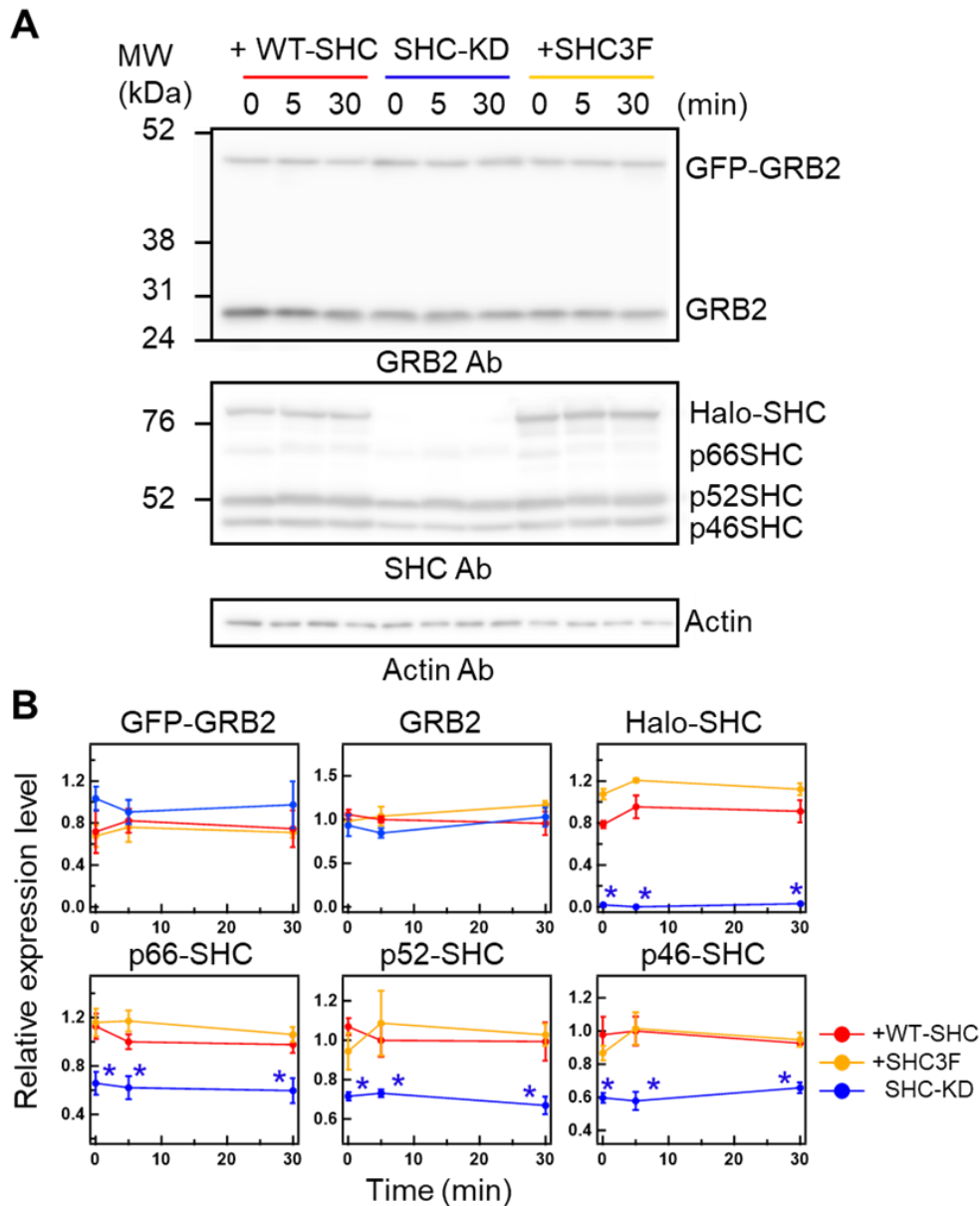
速度論的解析の結果、Halo-SHC3F を発現した細胞では刺激後後期 (30 分) での GRB2 のより大きな膜への結合頻度と、膜解離が遅い成分の増加が GRB2 の持続的な膜局在を引き起こすことが考えられた (図 2-6)。SHC3F が細胞膜上で GRB2 と相互作用できないとすると、pERBB に直接相互作用した GRB2 の割合が増加したことが、遅い膜解離成分の増加の要因の一つであることが考えられた。GRB2 は pERBB 受容体に直接結合する、または pSHC を介して細胞膜へと移行する。これらの相互作用の様式が異なっており、pERBB 受容体との直接的な相互作用が膜解離の遅い成分に対応していたことが考えられた。言い換えれば、WT-SHC を発現した細胞では pSHC (GRB2 との解離が早い) と結合した pERBB が、単体の pERBB よりも細胞膜上に多く蓄積することで GRB2 の膜局在の低下を引き起こした可能性が考えられた。しかしながらこの遅い成分の割合の増加は大きくなかったため (~5%)、このメカニズムの効果はそれほど大きくないことが考えられた。よって刺激後後期における膜への結合頻度の低下が GRB2 の一過的な膜局在に大きく影響を与えていたことが考えられた。

キネティクス計測と FCCS 計測の実験結果から、細胞質中における pSHC と GRB2 の複合体の増加は GRB2 の細胞膜への移行を阻害することが考えられた (図 2-6 B、2-8 B)。細胞質中における GRB2 の有効濃度が刺激後に形成された pSHC との複合体形成によって減少したことが、細胞膜移行の抑制に関与することが示唆された (図 2-8 B)。また細胞質中における SHC、GRB2 の濃度が刺激によって変化しなかったことは、細胞膜画分の割合が細胞質画分と比較して非常に低いことを示唆している (図 2-7 C)。おそらくこのことも細胞質中における反応が細胞膜画分の反応に強く影響を与えた要因であることが考えられた。GRB2 の膜への結合頻度の減少は細胞膜上における ERBB 受容体のリン酸化の減少によっても引き起こされると考えられるが、観察された pERBB の減少は一過的な GRB2 の細胞膜移行を説明するには不十分であった (図 2-4 A)。またリガンドが結合して活性化した RTK はクラスリンを介したエンドサイトーシスによって細胞質中に取り込まれることが報告されている (Di Guglielmo et al., 1994; Kholodenko, 2003)。しかし今回使用した HRG リガンドが結合した ERBB 受容体のエンドサイトーシスは遅いという報告もあるため (Wang et al., 2015)、細胞膜上に受容体が残っていると考えられる。よって細胞膜上における ERBB 受容体の活性化の時間変化のみでは、SHC と GRB2 の細胞膜移行ダイナミクスの違いを説明できないと考えられる。本研究結果から、細胞質中における pSHC が GRB2 の膜移行を抑制する働きが GRB2 の膜への結合頻度の減少、さらには一過的な膜局在に影響を与えていることが考えられ

た。

RAS/MAPK シグナルのダイナミクス計測から SHC による GRB2 の膜局在制御は、刺激後初期では RAS 活性化の応答量を正に調節し、刺激後後期時では ERK の負のフィードバックループと付加的に作用することで RAS 活性化の持続時間を調節することが示唆された (図 2-9、図 2-10)。細胞膜に移行された GRB2/SOS 複合体は RAS を活性化し、活性化された RAS は RAF の細胞膜移行を促進する (Bisson et al., 2011; Pawson, 2007; Rozakis-Adcock et al., 1993)。本研究では SHC3F、SHC ノックダウンによって SOS、RAF の細胞膜移行が低下したが、GRB2 の細胞膜移行が持続的になる条件 (Halo-SHC3F 共発現) でも一過的応答を示した (図 2-9 A)。SOS は ERK からのネガティブフィードバックによって GRB2 との複合体形成が阻害され、細胞膜移行が阻害される (Corbalan-Garcia et al., 1996; Guy et al., 2009; Hanafusa et al., 2002; Langlois et al., 1995)。これらのメカニズムによって GRB2 の膜局在が持続する条件下でも、SOS の一過的な膜局在が観察された可能性は考えられる。MEK 阻害剤により ERK の活性化を阻害すると SOS、RAF の膜局在の持続が見られ、ERK のネガティブフィードバックがこれらタンパク質の応答の持続性に関与することを示唆している (図 2-9 A)。しかし SHC3F の共発現による SOS、RAF の膜局在時間のさらなる延長は見られなかった (表 2-3)。このことから、SOS、RAF の膜局在時間は、主に ERK のネガティブフィードバックによって制御されていることが示唆された。その一方で、MEK 阻害剤処理後も SOS、RAF の細胞膜移行ダイナミクスが GRB2 の細胞膜移行ダイナミクスと完全に一致しなかったことは、ERK のネガティブフィードバック以外の制御がこれらの膜局在時間の調節に関与することも示唆している。GRB2 結合ドメインに変異を入れた SOS (R1131K) は、細胞膜局在の持続時間の延長が観察され、SHC3F の発現によってさらに持続時間の延長が見られた (図 2-9 B、表 2-3)。SOS の R1131K 変異は GRB2/SOS の会合を増加させることが報告されており (Nakamura et al., 2017)、GRB2 とは独立した SOS の細胞膜移行の制御 (ERK のネガティブフィードバックなど) の影響が軽減されたため、変化が見られたと考えられる。よってこれらの結果から、SHC による GRB2 の膜局在制御は SOS、RAS の活性化の持続時間にも影響を与えていることが考えられた。

以上のことから、SHC による GRB2 の膜局在制御は、刺激後初期では RAS 活性化の応答量の制御に関与し、刺激後後期では RAS の一過的な活性化に付加的に作用することを示している。



### 図 2-1. Halo-SHC と GFP-GRB2 プローブの発現

(A) GFP-GRB2、Halo-SHC または Halo-SHC3F およびそれぞれに対応する内在性タンパク質の発現量をそれぞれの抗体 (Ab) を用いてウェスタンブロッティングにより評価した。MW は分子量マーカを示す。(B) HRG 刺激 (0、5、および 30 分) 後の GRB2 および SHC の発現量の変化。値は「材料と方法」の項で説明したように actin の発現量により細胞数を規格化した後、WT-SHC を発現した細胞 (刺激後 5 分) で規格化した。GFP-GRB2 と Halo-SHC の発現レベルは、それぞれに対応する内在性タンパク質で規格化した。図には 3 回の独立した実験の平均、標準誤差を示した。アスタリスクは、WT-SHC を発現した細胞で得られた値と比較したときの統計的有意性を示した (すべて Student の t 検定で  $p < 0.05$ 、ただし Halo-SHC は Welch の t 検定で  $p < 0.05$ )。

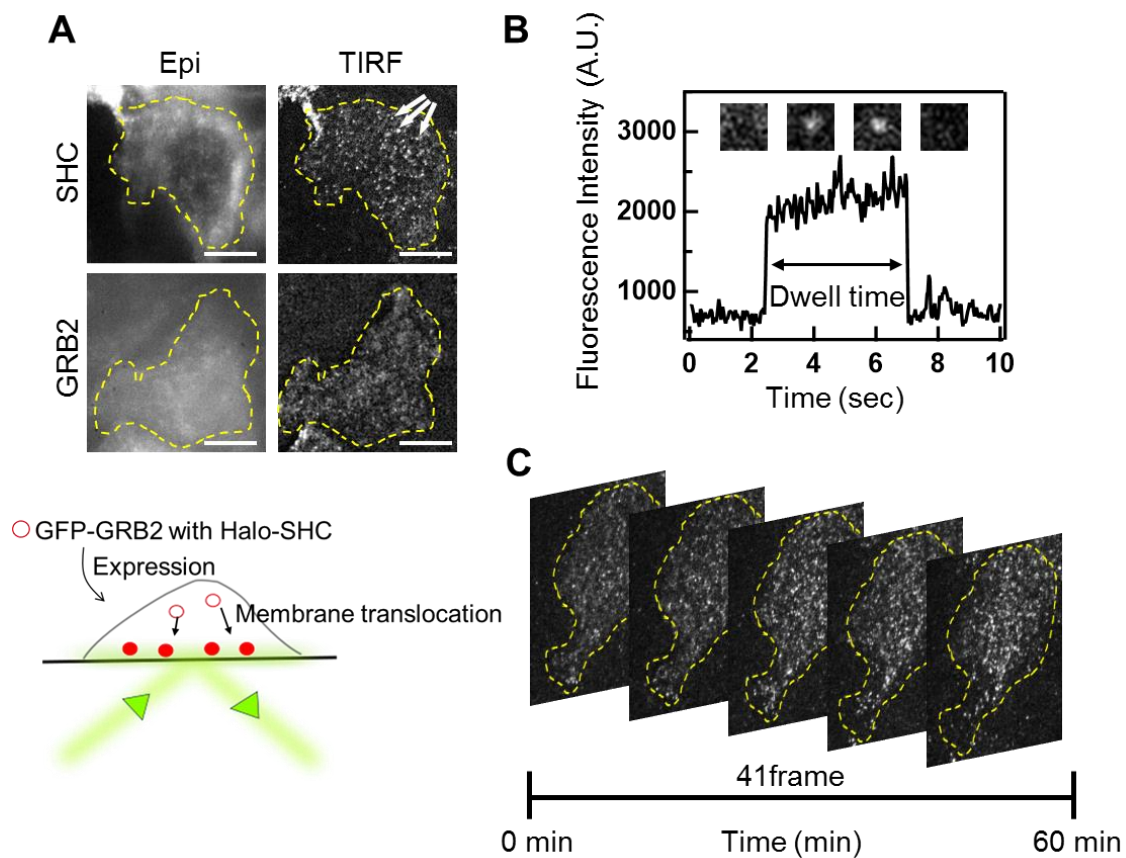


図 2-2. 一細胞ダイナミクス計測

(A) MCF7 細胞内における Halo-SHC および GFP-GRB2 の落射照明画像 (Epi) および全反射照明画像 (TIRF) (上図)。スケールバーは  $10\ \mu\text{m}$ 。細胞膜上 (黄点線内) に存在する輝点が蛍光標識した SHC または GRB2 分子を示す。矢印は典型的な Halo-SHC 分子の一例を示した。MCF7 細胞に Halo-SHC と GFP-GRB2 を発現させ、全反射照明によって細胞の基底膜上におけるそれぞれの分子を計測した (下図)。赤丸と白丸はそれぞれ光励起された蛍光分子と光励起されていない蛍光分子を示す。緑矢印は励起光を示す。

(B) 典型的な SHC 分子の蛍光強度の時間変化。細胞膜に出現すると輝点が出現し蛍光強度が増加する。(C) 細胞膜上の Halo-SHC 分子数の経時的計測。時間 0 で  $10\ \text{nM}$  HRG で細胞を刺激し、1.5 分ごとに 60 分間計測した。

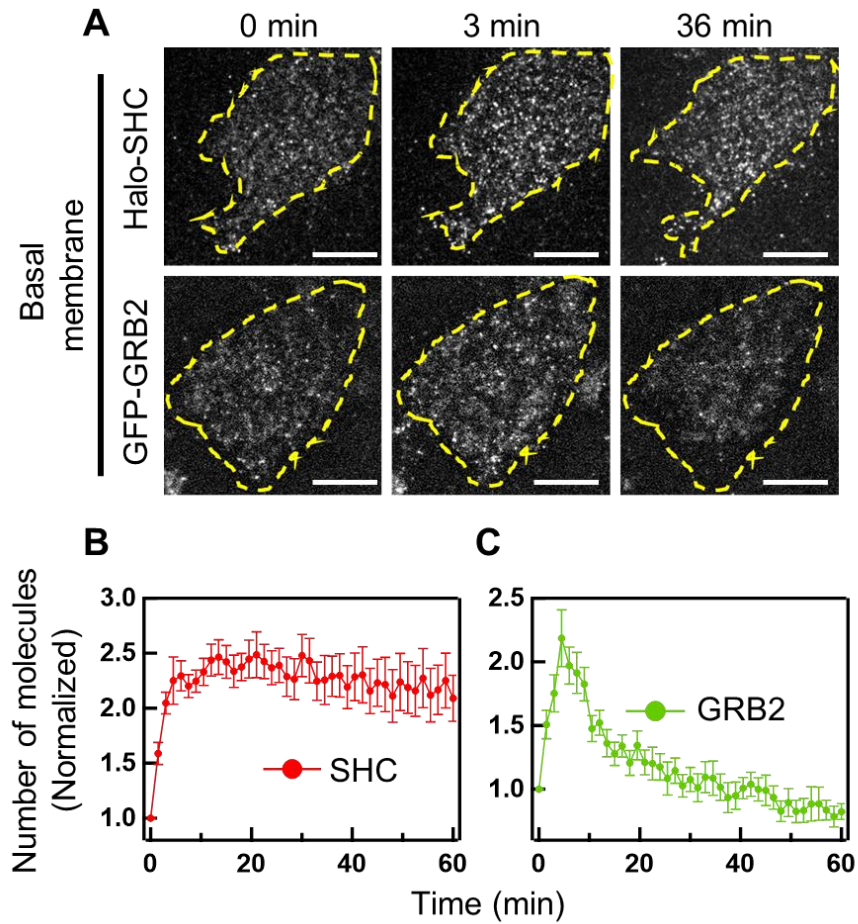


図 2-3. SHC と GRB2 の細胞膜移行ダイナミクス

(A) MCF7 細胞膜上における Halo-SHC (上段)、GFP-GRB2 (下段) 粒子の全反射照明蛍光画像。図には刺激前 (0 分) および HRG 刺激後 (3 分、36 分) を示した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。(B、C) 0 min で 10 nM HRG で細胞を刺激したときの Halo-SHC (B) および GFP-GRB2 (C) の細胞膜上分子数の経時的変化。値は刺激前の細胞膜上分子数によって規格化した。図には SHC (24 細胞)、GRB2 (32 細胞) の平均値、標準誤差を示した。

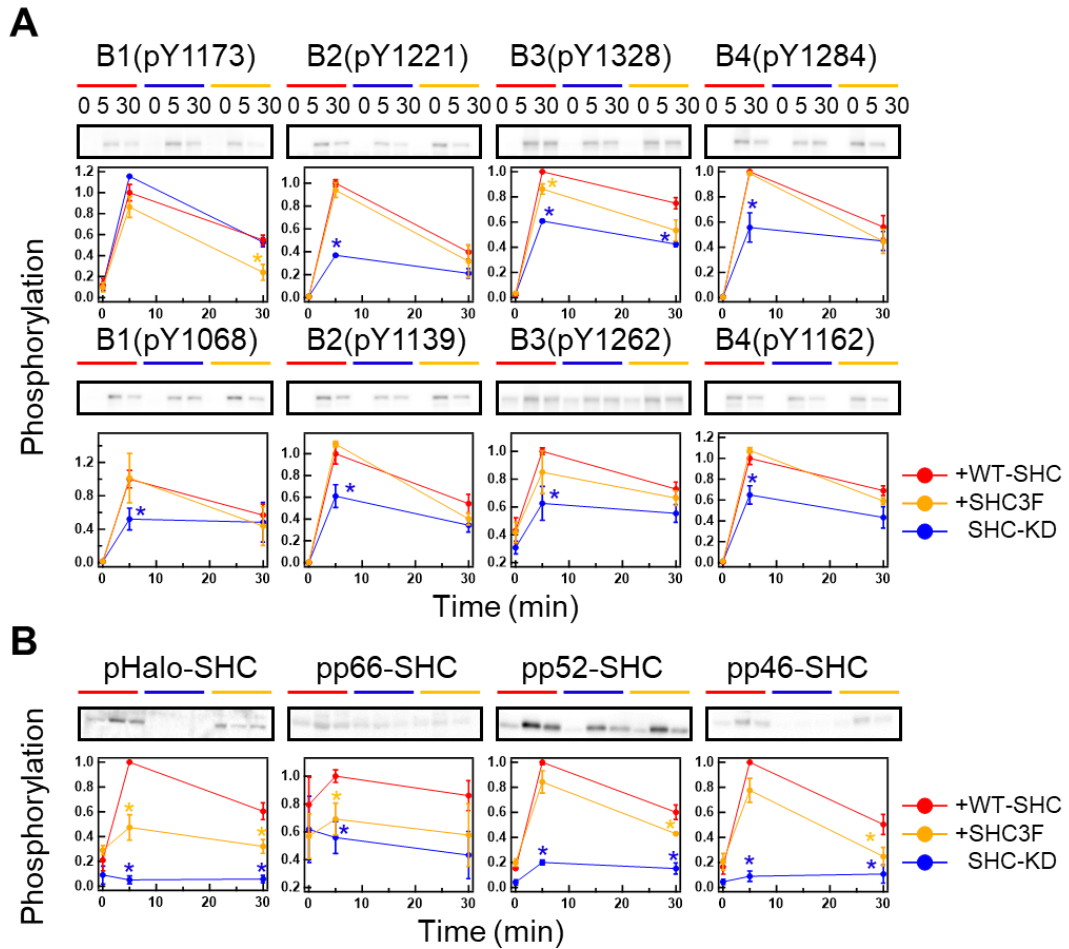


図 2-4. ERBB 受容体と SHC のリン酸化ダイナミクス

(A, B) HRG 刺激後 (0, 5, および 30 分) の ERBB 受容体 (A) と SHC アイソフォーム (p66, p52, および p46) (B) のリン酸化の時間変化。ERBB 受容体は SHC の主要な結合部位 (上段) と GRB2 の主要な結合部位 (下段) を示した。値は「材料と方法」の項で説明したように actin の発現量により細胞数を規格化した後、WT-SHC を発現した細胞 (刺激後 5 分) で規格化した。図には 3 回の独立した実験の平均、標準誤差を示した。アスタリスクは、WT-SHC を発現した細胞で得られた値と比較したときの統計的有意性を示した (Student の t 検定で  $p < 0.05$ )。



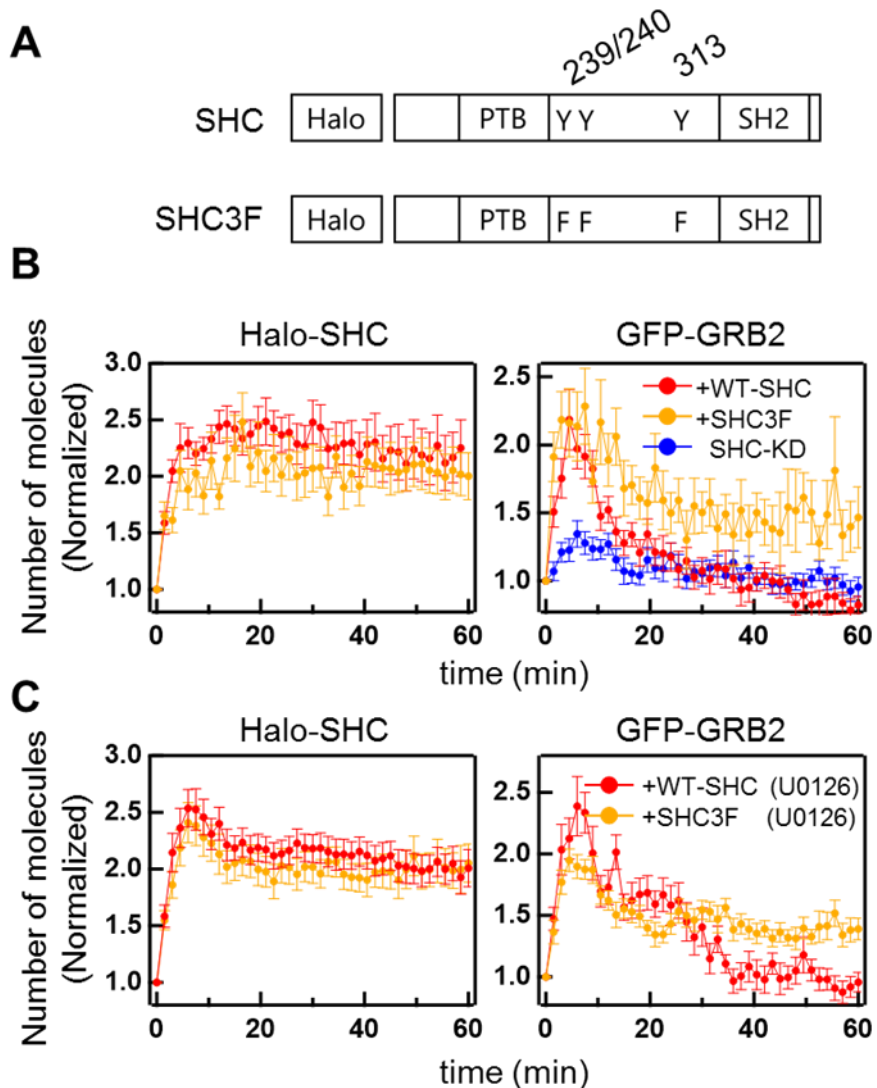


図 2-5. SHC のドミナントネガティブな効果

(A) SHC コンストラクトの構造。Halo tag はコンストラクトの N 末端に融合させた。数字はアミノ酸残基の位置を示した。(B、C) 0 min で 10 nM HRG で細胞を刺激したときの Halo-SHC および GFP-GRB2 の細胞膜上分子数の経時的変化。GFP-GRB2 と Halo-SHC (赤) または Halo-SHC3F (オレンジ) を共発現して計測した。また SHC ノックダウン細胞 (青) における GRB2 についても調べた。細胞を MEK 阻害剤の U0126 (C) で前処理した細胞内でも同様に計測を行った。値は刺激前の細胞膜上分子数によって規格化した。図には 16-32 細胞 (B)、13-28 細胞 (C) の平均値、標準誤差を示した。

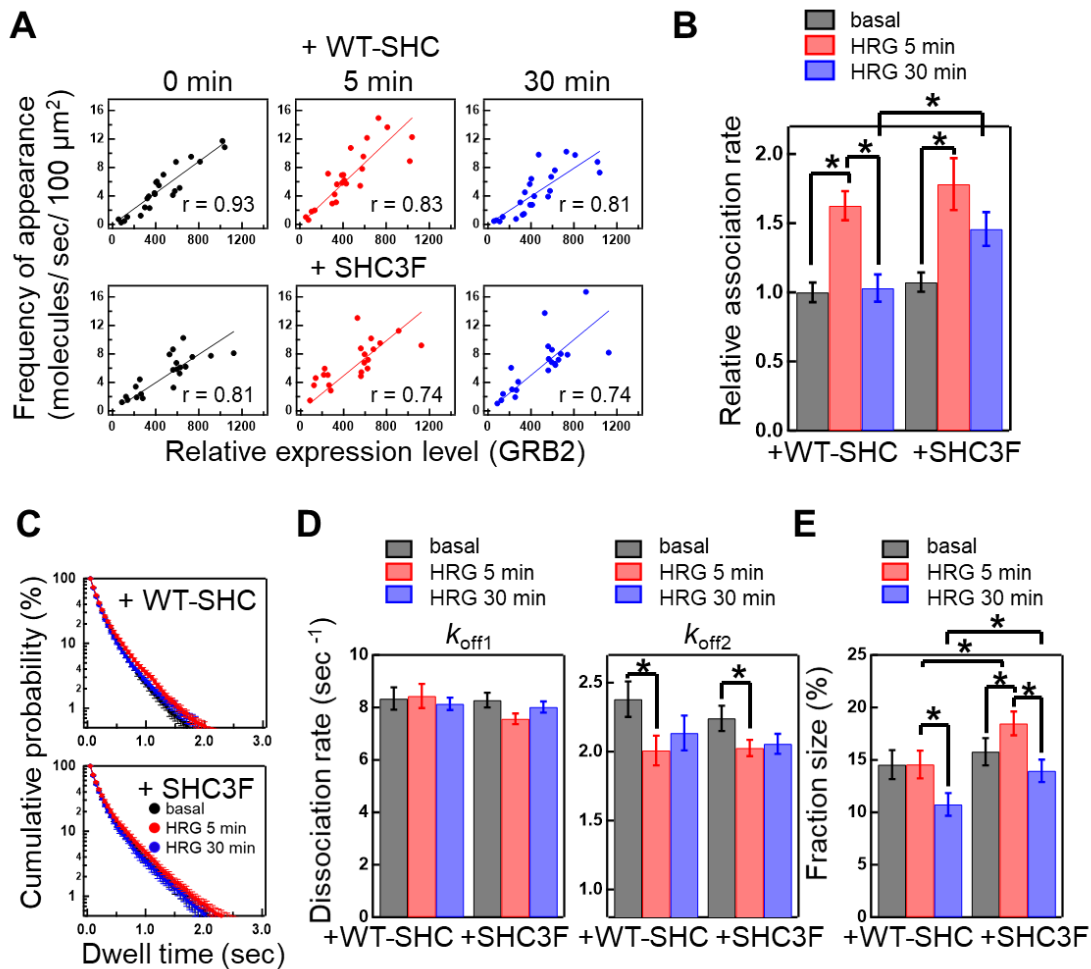


図 2-6. GRB2 の細胞膜上におけるキネティクス解析

(A) 単位時間、単位面積あたりに細胞膜に出現した GFP-GRB2 分子数 (相対分子数/sec/100  $\mu\text{m}^2$ ) を経時計測した。それぞれの細胞で得られた GFP-GRB2 の膜出現頻度を落射照明によって観察された GFP-GRB2 の相対的発現レベルに対してプロットした。線形フィッティングの結果は相関係数  $r$  で示した。(B) GRB2 の膜への相対的会合速度定数。(C) 細胞の基底膜上における GFP-GRB2 粒子の膜滞在時間分布を経時的に求めた。(D) GRB2 の膜からの解離速度定数 (早い成分;  $k_{\text{off}1}$ ) と (遅い成分;  $k_{\text{off}2}$ ) (E) GRB2 の膜からの解離が遅い成分の割合。(A-E) の細胞は、GFP-GRB2 と WT-SHC または SHC3F を共発現した細胞で解析を行った。(B、D、E) には、刺激前 (黒)、HRG 刺激後 5 分 (赤)、30 分 (青) を示した。図には 21-23 細胞 (B) および 27-32 (D、E) 細胞の平均値、標準誤差を示した。アスタリスクは統計的有意性を示した (時間変化は対応のある  $t$  検定で  $p < 0.05$ 、+WT-SHC と +SHC3F 間の比較は Student の  $t$  検定で  $p < 0.05$ )。

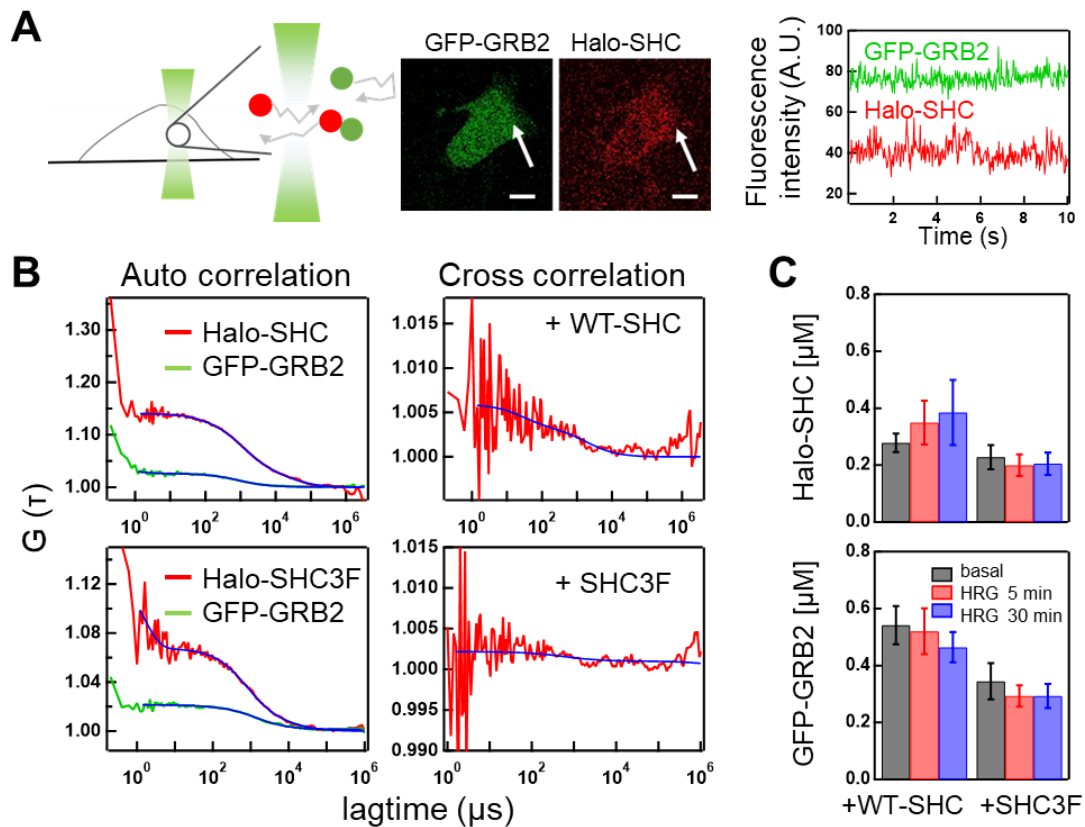


図 2-7. 細胞質中における SHC と GRB2 の相互作用解析

(A) FCCS 計測の概略図 (左図) と Halo-SHC と GFP-GRB2 を共発現した細胞の蛍光顕微鏡写真 (中央図)。スケールバーは  $10\ \mu\text{m}$ 。矢印は測定した領域を示す。FCCS 分析では検出ボリューム内の (左図の丸内) の蛍光強度 (カウントレート) の変動を検出した (右図)。(B) Halo-SHC (赤) と GFP-GRB2 (緑) の典型的な自己相関曲線 (左図) と、同じ検出ボリューム内での相互相関曲線 (右図)。曲線 (青線) は「材料と方法」の項で説明した関数によりフィットした線を示す。(C) Halo-SHC (WT または 3F; 上図) と GFP-GRB2 (下図) との相対濃度は自己相関曲線から決定した。図には 14-16 細胞を刺激した時の相対濃度の変化の平均値と標準誤差を示した。これら濃度は刺激によって変化しなかった。

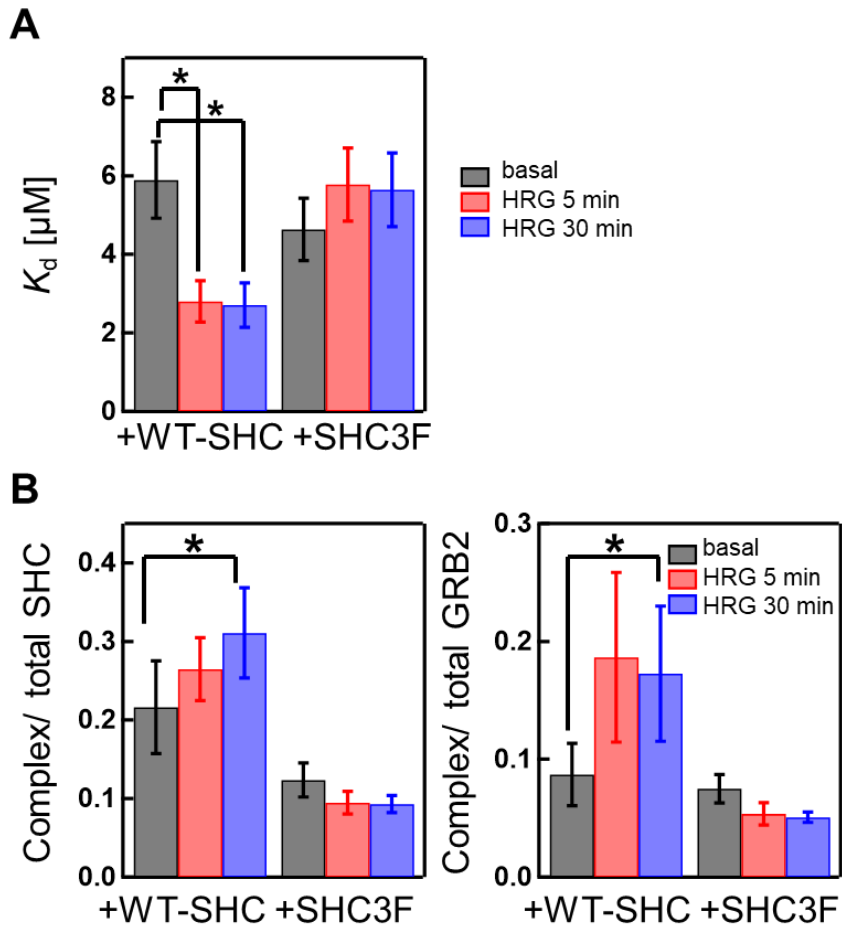


図 2-8. 細胞質中における SHC と GRB2 の複合体形成

(A) SHC/GRB2 複合体の解離定数 ( $K_d$ ) は図 2-7 B の相互相関曲線と自己相関曲線から決定した。(B) SHC 総量と GRB2 総量に対する複合体の割合は、「材料と方法」の項で説明した計算により算出した。図には 14-16 細胞の平均値と標準誤差を示した。アスタリスクは統計的有意性を示した (対応のある t 検定で  $p < 0.05$ )。

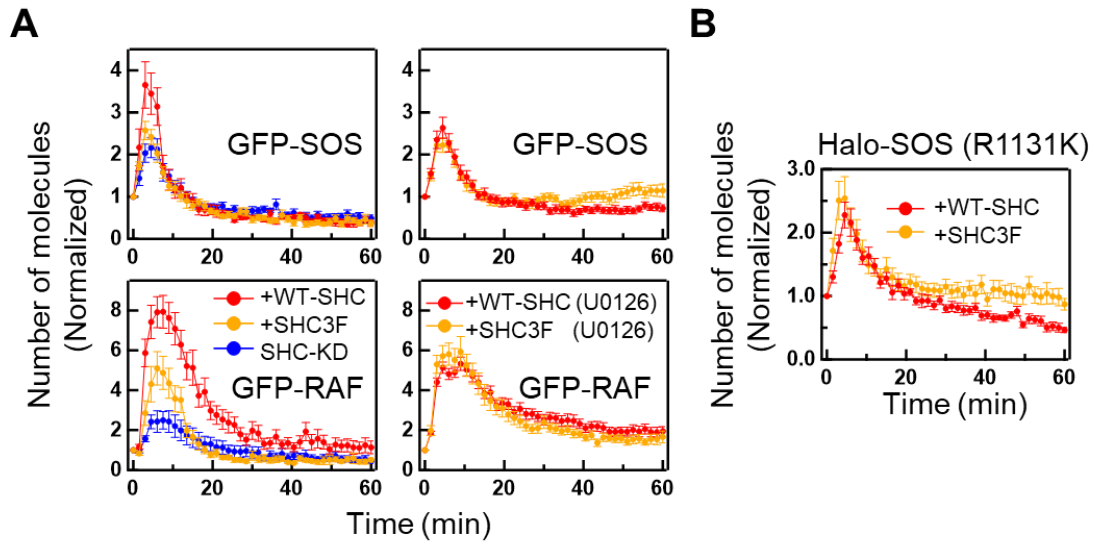


図 2-9. SOS と RAF の細胞膜移行ダイナミクスと MEK 阻害剤の効果

(A) Halo-SHC (赤) または Halo-SHC3F (オレンジ) の共発現、および SHC ノックダウン (青) した細胞内における GFP-SOS (上段) と GFP-RAF (下段) の細胞膜上分子数の経時的変化。右図では HRG 刺激する 15 分前に MEK 阻害剤の U0126 で前処理を行った。(B) WT-SHC (赤) または SHC3F (オレンジ) を発現した細胞内における Halo-SOS R1131K の細胞膜上分子数の経時的変化。(A、B) の値は刺激前の細胞膜上分子数によって規格化した。図には 8-40 細胞 (A)、8-16 細胞 (B) の平均値、標準誤差を示した。

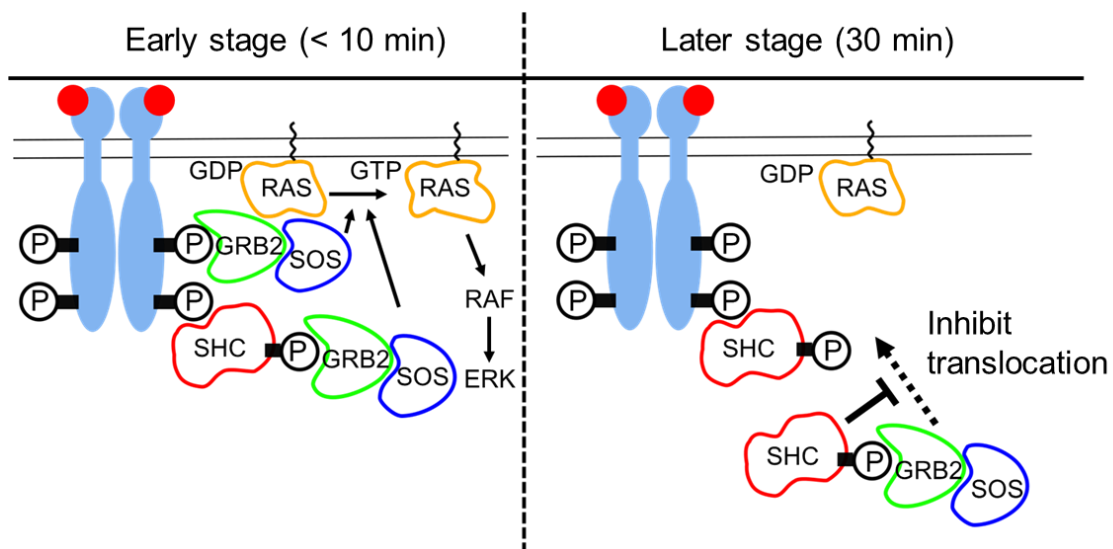


図 2-10. SHC による GRB2 の二相的な時空間的調節

SHC と GRB2 は活性化された ERBB 受容体のリン酸化部位 (P) を認識することで細胞膜に移行する。シグナルの初期段階 (<10 分) では、SHC は細胞膜上の GRB2/SOS 複合体の密度を増加させ、RAS 活性化の振幅を増加させる。一方で後期段階 (30 分) では、SHC は細胞質中で GRB2 と複合体を形成し GRB2 の細胞膜移行を阻害する。この制御は RAS の活性化を抑制する。

表 2-1. GRB2 の膜への相対的な結合速度定数

	HRG	0 min	5 min	30 min
GRB2 + WT-SHC		1.00 ± 0.07 <sup>a</sup> (4.90 ± 0.7) <sup>b</sup>	1.63 ± 0.10 (7.33 ± 0.9)	1.03 ± 0.10 (5.03 ± 0.8)
GRB2 +SHC3F		1.07 ± 0.07 (5.14 ± 0.6)	1.78 ± 0.19 (7.28 ± 0.7)	1.46 ± 0.12 (7.16 ± 0.9)

<sup>a</sup> 相対的な二次結合速度定数の平均値 (+/-SE)。これらの値は WT-SHC を発現させた刺激前の速度で正規化した。

<sup>b</sup> GFP-GRB2 分子の膜への出現頻度 (molecules/sec/100 μm<sup>2</sup>)。

時間は HRG 刺激後の時間を示している。表には 21-23 細胞の平均と標準誤差を示した。

表 2-2. GRB2 の膜からの解離速度定数

	HRG	0 min		5 min		30 min	
	fraction	$k_{off1}$	$k_{off2}$	$k_{off1}$	$k_{off2}$	$k_{off1}$	$k_{off2}$
GRB2 + WT-SHC		8.34 ± 0.42 <sup>a</sup> (85.4 ± 1.4) <sup>b</sup>	2.38 ± 0.13 (14.6 ± 1.4)	8.43 ± 0.46 (85.4 ± 1.3)	2.01 ± 0.11 (14.6 ± 1.3)	8.14 ± 0.24 (89.3 ± 1.1)	2.14 ± 0.13 (10.7 ± 1.1)
GRB2 +SHC3F		8.28 ± 0.28 (84.2 ± 1.3)	2.24 ± 0.09 (15.8 ± 1.3)	7.57 ± 0.20 (81.5 ± 1.1)	2.03 ± 0.06 (18.5 ± 1.1)	7.57 ± 0.20 (81.5 ± 1.1)	2.06 ± 0.07 (14.0 ± 1.1)

<sup>a</sup> 解離速度定数の平均値 (+/-SE) (sec<sup>-1</sup>)。

<sup>b</sup> 速度成分割合の平均値 (+/-SE) (%)。

時間は HRG 刺激後の時間を示している。表には 27-32 細胞の平均と標準誤差を示した。

表 2-3. SOS と RAF の細胞膜移行ダイナミクスの持続性

	U1026				
	+WT-SHC	+SHC3F	SHC-KD	+WT-SHC	+SHC3F
GFP-SOS	5.6 ± 0.5 (8)	6.6 ± 0.8 (21)	6.0 ± 1.4 (8)	* 7.2 ± 0.4 (21)	* 8.2 ± 0.4 (20)
HaloSOS-R1131K	* 9.2 ± 1.0 (8)	* 9.8 ± 1.2 (16)			
GFP-RAF	11.8 ± 0.6 (40)	* 8.5 ± 0.6 (27)	9.6 ± 1.3 (19)	* 20.9 ± 1.9 (30)	* 18.8 ± 2.3 (12)

それぞれのダイナミクスのピーク値から半値幅と算出した。表には細胞ごとに得られたダイナミクスの半値幅の平均値と標準誤差を示した。括弧内の数字は測定した細胞数を示す。アスタリスクは WT-SHC を発現した細胞との統計的有意性を示した (黒は Student の t 検定で  $p < 0.05$ 、赤は Welch の t 検定で  $p < 0.05$ )。

## 第 3 章

**p52SHC は RAF 非依存的に  
ERK の持続的な活性化を調節する**



### 3.1 序論

多数の種類 of 細胞表面受容体はアダプタータンパク質とともに機能し、細胞外シグナルの細胞質への伝達と増幅を促進し、様々な細胞応答を刺激する。受容体型チロシンキナーゼファミリーの 1 つである ERBB 受容体は、このような細胞表面受容体に属している。ERBB2 を除く ERBB1 (EGFR)、ERBB3、ERBB4 にはそれぞれ選択的に結合する細胞外リガンドが存在する (Olayioye et al., 2000)。細胞外リガンドの結合に応じて 4 種類の ERBB 受容体間でホモあるいはヘテロ二量体が形成され、細胞内領域に存在するチロシンキナーゼ部位は受容体細胞質側領域のチロシン残基をリン酸化する (Zhang et al., 2006)。受容体は活性化後、SHC や GRB2 などのアダプタータンパク質と相互作用することで RAS/MAPK および PI3K/AKT (PKB) 経路に成長因子シグナルを伝播し細胞増殖、分化、アポトーシス、および代謝の調節を行う (Mendoza et al., 2011; Nepstad et al., 2020)。

リン酸化 SHC と GRB2 間の相互作用は細胞膜上における GRB2-SOS 複合体の密度を増加させ、ERBB 受容体から RAS へのシグナル増幅に寄与する。また細胞が低濃度の成長因子で刺激された場合、RAS/MAPK シグナル伝達の完全な活性化には SHC が必要であることも報告されている (Lai and Pawson, 2000)。さらに SHC は 14-3-3、PI3K の複合体と相互作用して、RAS/MAPK および PI3K/AKT シグナル伝達経路を活性化する (Suen et al., 2018; Ursini-Siegel et al., 2012)。

リン酸化された ERBB 受容体および SHC と相互作用することで細胞膜へと移行した GRB2 は、SOS および GAB1 を含むエフェクタータンパク質の細胞膜への移行を介して RAS/MAPK および PI3K/AKT シグナル伝達経路の活性化を誘導する (Bisson et al., 2011; Pawson, 2007)。したがって、受容体活性化時の細胞膜への SHC および GRB2 の細胞膜移行は RAS/MAPK および PI3K/AKT シグナル伝達経路の促進のための生物学的に冗長なプロセスであると考えられてきた (Oku et al., 2012; Saucier et al., 2004; Saucier et al., 2002)。しかしながら、本研究結果 (第 2 章) から SHC と GRB2 は固有のシグナル伝達ダイナミクスを示し、それぞれのタンパク質の固有の役割が示唆された。

RAS/MAPK シグナル伝達経路では、ERK の活性化の持続時間の違いが、異なる細胞応答、増殖または分化と相関することが広く知られている (Marshall, 1995)。ERK は刺激後、核内へと移行し核転写因子の活性化を調節する (Bouchard et al., 2004; Brunet et al., 1999; Caunt and McArdle, 2012)。MCF7 および PC12 細胞では、EGF による ERK の一過的な活性化が細胞増殖を誘導し、HRG または NGF による ERK の持続的な活性化が細胞分化を引き起こす (Kao et al., 2001; Marshall, 1995; Nagashima et al., 2007)。ERK の活性化ダイナミクスの調節には様々なメカニズムが示唆されている。成長因子依存的調節 (Birtwistle et al., 2007)、RAF-MEK-ERK の正および負のフィードバックループ (Avraham and Yarden, 2011; Santos et al., 2007)、RAS/MAPK 経路と PI3K/AKT 経路間の

クロストーク (Egan et al., 1993; Kiyatkin et al., 2006)、および RAS と RAP に依存的な制御 (Kao et al., 2001; Nakakuki et al., 2008; Sasagawa et al., 2005) などが挙げられる。しかし、ERK の活性化ダイナミクスの調節と細胞運命の決定における SHC と GRB2 の役割については、これまで深く議論も報告もされていない。

本章では RAS/MAPK シグナル伝達ダイナミクスに対しての SHC と GRB2 のそれぞれの機能と、さらに細胞運命の決定における固有の役割を理解することを目的とした。ヒト哺乳動物癌由来細胞株である MCF7 細胞内において、分化シグナル中における SHC、GRB2、および RAS/MAPK 経路の活性化ダイナミクスを観察した。これらのダイナミクスを解析した結果、RAS-MAPK システムの時間的調節における SHC の特定の機能、さらにその後の細胞運命決定における SHC の新しい役割を示唆している。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 プラスミドの構築

Halo-SHC、GFP-GRB2 ベクターは第 2 章で述べた方法により構築した。mEGFP-ERK2 ベクター (GFP-ERK) を構築するために、CMV-ERK 断片 (Takahashi et al., 2012) を pmEGFP-C2 の *Bgl*II-*Bam*HI 部位にサブクローニングした。Halo7-p85 $\alpha$ ベクター (Halo-p85 $\alpha$ ) は p85 $\alpha$ を *Eco*RI-*Bam*HI 部位にサブクローニングすることで構築した。

### 3.2.2 細胞の調製

#### 培養条件

MCF7 細胞および MCF7 細胞に EGFR を過剰発現させた安定発現株 (B1MCF7) (Nagashima et al., 2015) を 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養を行い、上記のプラスミドを発現させた。細胞を飢餓状態にした後、Halo-SHC、Halo-p85 $\alpha$ は TMR により蛍光標識した。プラスミドの構築、細胞の調製の詳細は第 2 章に示した。

#### 阻害剤実験

EGFR、PI3K のキナーゼ阻害は 100 nM の Tyrphostin AG1478 (AG1478)、200 nM (または) 1  $\mu$ M の Wortmannin (Wako Pure Chemical Industries) をそれぞれ使用した。細胞を刺激する 30 分前にそれぞれの阻害剤を細胞に前処理し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養を行った。

### 3.2.3 一分子計測と解析

#### 蛍光観察

細胞膜上における Halo-SHC、GFP-GRB2、および細胞質中における GFP-ERK は倒立顕微鏡 (IX83; Olympus) を基盤とした全反射照明蛍光顕微鏡によって観察した。細胞質から細胞膜への Halo-SHC と GFP-GRB2 の移行ダイナミクス、および細胞から核内への GFP-ERK の移行ダイナミクスは TIRF と Epi 照明を自動で切り替えながら HRG 刺激後 60 分間経時計測することで取得した (1.5 分間隔)。ORCA-Flash 4.0 V3 デジタル CMOS カメラによって得られた細胞画像に対して ImageJ を用いて画像処理を行った。ERK の相対的な核内濃度を定量するために核内における GFP-ERK の平均輝度値を計算した。GFP-ERK の核内移行ダイナミクスは各細胞で刺激する前の値で規格化した値を使用した。これらの蛍光観察、画像処理の詳細は第 2 章で述べた。

25°C の顕微鏡下で、細胞を最終濃度 10 nM の HRG (第 2 章記載) または、16 nM Rcombinant Murine EGF (EGF; PeproTech, Cranbury, NJ, US) で刺激した。

### 3.2.4 MTT assay を用いた細胞増殖の定量

MCF7、B1MCF7細胞の細胞増殖の定量にはCytoSelect™ MTT Cell Proliferation Assay (Cell Biolabs, San Diego, CA, US) を用いて行った。生細胞内の還元酵素によってキットのMTTが還元されホルマザンになることで黄色から紫色に呈色に変化する。540 nmの吸光によって細胞増殖をモニタリングする。96ウェルのCorning™ Costar™ Flat Bottom Cell Culture Plates (Thermo Fisher Scientific) に細胞を接着させ、DMEM (10% FBS含有) または10 nM HRGを含むDMEM (10% FBS含有) で0-6日間、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養を行った。2日ごとに新しいDMEM (10% FBS含有) または10 nM HRGを加えたDMEM (10% FBS含有) に置き換えながら培養を行った。0-6日間培養した細胞が入った96ウェルプレートの各ウェルに、CytoSelect™ MTT Cell Proliferation Assay Reagent 10 μLを加え、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で3.5時間インキュベートした。その後Detergent Solution 100 μLを加え室温で2時間静置し可溶化した。吸光度専用・プレートリーダー (Epoch2; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, US) によって540 nmの光学濃度を測定した。

### 3.2.5 細胞分化の定量

MCF7細胞の分化 (油滴の形成) の定量にはAdipocyte Fluorescent Staining Kit (Primary Cell, Hokkaido, Japan) を用いて行った。8ウェルのNunc™ Lab-Tek™ Chambered Coverglass (Nunc, Rochester, NY, US) に細胞を接着させ、DMEM (10% FBS含有) または10 nM HRGを含むDMEM (10% FBS含有) で4日間、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養を行った。2日ごとに新しいDMEM (10% FBS含有) または10 nM HRGを含むDMEM (10% FBS含有) に置き換えながら培養を行った。4日間培養した細胞に対して、3%パラホルムアルデヒド (Wako Pure Chemical Industries) を含むPBS溶液を200 μL加え室温で10分間静置して細胞を固定した。PBSで4回洗浄した後、各ウェルに脂肪球染色 (BODIPY®) 100 μLを加え30分間室温で静置し、油滴の染色を行った。PBSで2回洗浄後、封入剤を200 μLずつ加え、4°Cで30分以上静置した。染色された油滴を観察するために、倒立顕微鏡 (IX-81; Olympus) に60×/1.45油浸対物レンズ (PlanApo; Olympus) を設置した蛍光顕微鏡を使用した。脂肪球染色 (BODIPY®) の (励起極大波長498 nm/蛍光極大波長503 nm) を励起するための光源として高圧水銀ランプ (U-HGLGPS; Olympus) を用いた。励起極大波長、蛍光極大波長からダイクロイックミラーはU-MNIBA2 DM505 (Olympus) を使用した。サンプルから発せられた蛍光をORCA-Flash4.0 V2デジタルCMOSカメラ (Hamamatsu Photonics K. K.) で2 frame/sec (露光時間500 ms) で撮影し、Tiff形式 (16bit) の画像を得た。

### 3.2.6 ウェスタンブロッティング

キナーゼタンパク質 (RAF、MEK、およびERK) のリン酸化の時間変化を計測するために、室温で10 nM HRGで刺激後、0、5、30分時にSDSサンプルバッファーで反

応を停止したサンプルをそれぞれ作成した。ウェスタンブロッティング分析では、第2章で示した一次抗体と、以下のタンパク質に対する一次抗体を使用して発現レベルを定量化した：ERBB1 (sc-03; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, US)、ERBB2 (2165; CST)、ERBB3 (sc-285; Santa Cruz Biotechnology)、ERBB4 (sc-283; Santa Cruz Biotechnology)、MIG6/ERRFI1 (11630-1-AP; proteintech, Rosemont, IL, US)、ERK (4696S; CST)。第2章で示した一次抗体と以下の一次抗体を使用して各タンパク質のリン酸化レベルを定量した：anti-pRAF (pSer338; 05-538; Millipore)、anti-pMEK1/2 (pSer217/221; 9121S; CST)、anti-pERK1/2 (pThr202/pTyr202; 9106S; CST)、anti-p-PI3K p85 $\alpha$  (pTyr508; sc-12929-R; Santa Cruz Biotechnology)、anti-pAKT (pThr308; 9275S; CST)。免疫ブロットデータからリン酸化レベルを比較するために3つの規格化を実行した。まずすべての実験データを $\beta$  actinの染色強度により規格化した。次に同じ実験から得られた時系列データは5分で観察された最大強度によって規格化した。その後、WT-SHCを発現させたMCF7細胞で得られた値（刺激後5分）で規格化を行った。

### 3.2.7 統計解析

第2章で述べた方法によりデータ群間の有意性を検証した。

## 3.3 結果

### 3.3.1 持続的な SHC の膜局在は ERK の持続的な活性化と関連する

これまでに、SHC と GRB2 が HRG 刺激された MCF7 細胞内において異なる固有の細胞膜移行ダイナミクスを持ち、さらに SHC による GRB2 のシグナル制御が RAS 活性化を調節することが明らかになった (第 2 章)。そこでさらに RAS/MAPK シグナル伝達経路の時間的調節における SHC、GRB2 の役割について詳細に調べた。RAS/MAPK 経路の最下流に存在する ERK の活性化を調べた。ウェスタンブロッティング解析から決定された GFP-ERK の分子量は 72 kDa (図 3-1 A) であり、予想される分子サイズと一致した。また内在性の ERK の発現量もプローブの発現によって変化しなかった (図 3-1 B)。MCF7 細胞内に GFP 標識した ERK を発現させ細胞質から核内への移行のダイナミクスを計測した (図 3-2 A)。先行研究では、MCF7 細胞を HRG 刺激することで ERK の持続的な活性化を引き起こし、細胞分化を誘導することが報告されていた (Kao et al., 2001; Marshall, 1995; Nagashima et al., 2007)。先行研究と一致して、HRG 刺激後に GFP-ERK が核内に移行し、刺激後少なくとも 60 分まで持続的に核内に局在した (図 3-2 A、B)。また ERK のリン酸化も核移行同様に持続的応答を示した (図 3-2 C)。EGF 刺激時では、ERK は一過的に核内へと移行し、持続的な核局在化は見られなかった。刺激依存的な応答の違いを捉えることができたので、今回の解析で用いたプローブは ERK の核移行の時間変化を正確に捉えることが可能であることが考えられた。

SHC、GRB2、および ERK のシグナル伝達持続性の関連性を調べるために、これらのダイナミクスに摂動を与え、個々のダイナミクスの影響と相関関係を調べた。以前、EGFR の過剰発現が乳がん細胞における RAS/MAPK シグナル伝達の負の調節因子である Receptor-associated late transducer/Mitogen-inducible gene 6 protein (以下 MIG6) の発現誘導に関連することが報告されていた (Anastasi et al., 2005; Fiorini et al., 2002; Nagashima et al., 2009)。そこで SHC と GRB2 のダイナミクスと ERK のダイナミクスの間の相関関係を評価するために、MCF7 細胞に由来する EGFR を過剰発現させた安定発現株 (B1MCF7) を使用した。B1MCF7 細胞内における ERBB2-ERBB4 の発現量は親 MCF7 細胞内と比較してほとんど変わらなかったが、EGFR と MIG6 は有意に高いレベルの発現を確認した (図 3-3)。しかし B1MCF7 細胞内においても 4 つの ERBB 受容体上の主要な SHC および GRB2 結合部位は親 MCF7 細胞と同等レベルに HRG 刺激後持続的にリン酸化された (図 3-4)。

B1MCF7 細胞内に Halo-SHC、GFP-GRB2 を発現させ、HRG 刺激後の細胞膜移行ダイナミクスを計測した (図 3-5 A、B)。SHC の細胞膜移行ダイナミクスは B1MCF7 細胞で親 MCF7 細胞よりも一過的になり、EGFR キナーゼ阻害剤である AG1478 で前処理された B1MCF7 細胞ではより持続的になった (図 3-5 C)。しかし GRB2 のダイナミクスには MCF7 細胞と B1MCF7 細胞間、また AG1478 の有無で有意な差が見られな

った (図 3-5 D)。ERK の核移行ダイナミクスは SHC と同様に B1MCF7 細胞で持続性の低下が見られ、AG1478 処理により EGFR 過剰発現の影響を減少させた (図 3-5 E)。また ERK のリン酸化の時間変化も EGFR シグナル摂動により ERK の核移行と同等な影響が見られた (図 3-4)。これらのことから、SHC と ERK の移行ダイナミクスは正常状態時と EGFR シグナル摂動時の両方の条件下で同程度のシグナル持続性を示すことが考えられた。

### 3.3.2 ERK の持続的な活性化には SHC を介した PI3K の活性化が必要である

ERK の核移行ダイナミクスの調節における SHC の直接的な役割を評価するために、SHC をノックダウンした細胞で ERK の核移行ダイナミクスを観察した (図 3-6 A)。HRG 刺激後の ERK の核移行は SHC のノックダウンの影響を受け、初期段階 (<10 分) におけるピークレベルの低下と、応答の持続性の両方が低下した (図 3-6 E)。SHC のノックダウンは GRB2 の初期段階の膜移行も大幅に低下させていたことから (図 3-6 D)、SHC が GRB2 の一過的な膜局在化と ERK の持続的な核移行の両方を調節していることが示唆された。

PI3K (p85 $\alpha$  subunit) の活性化部位である Tyr508 残基のリン酸化も SHC をノックダウンした MCF7 細胞で減少したことは (図 3-7 A)、SHC が PI3K 活性化を正に調節していることを示している。そこで次に、PI3K のキナーゼ阻害剤 (Wortmannin) で前処理した MCF7 細胞における GRB2 と ERK のダイナミクスを計測し、PI3K 活性化が ERK の持続的な活性化に関与しているかどうかを調べた (図 3-6 B)。SHC と GRB2 の膜局在化は高濃度 (1  $\mu$ M) の Wortmannin 処理によって抑制されたが、低濃度 (200 nM) の Wortmannin 処理では変化しなかった (図 3-6 C、D)。ERBB 受容体の GRB2 結合部位のリン酸化も低濃度の Wortmannin 処理ではわずかにしか減少しなかった (図 3-8 A、B)。しかし、ERK の核移行は低濃度の Wortmannin 処理でも応答量が大幅に減少し、応答の持続性も低下することがわかった (図 3-6 E)。したがって、PI3K の完全な活性化には正常レベルの SHC の発現が必要であり、低レベルの PI3K 活性阻害は SHC、GRB2 の膜移行に影響を与えることなく ERK の持続的な核局在化を抑制することが考えられた (図 3-7 B)。

### 3.3.3 PI3K は RAF 応答の持続性と非依存的に ERK の持続的活性化に関与する

PI3K (p85 $\alpha$ ) は、HRG 刺激後に細胞質から細胞膜上に移行し、SHC と同様なダイナミクスが観察された (図 3-8 D)。すなわち、親 MCF7 細胞内では持続的応答を示し、B1MCF7 細胞内では一過的応答を示した。また AG1478 処理した B1MCF7 細胞内では親 MCF7 細胞内と同様な持続的応答を示した。細胞膜上での PI3K 活性による IP<sub>3</sub> の産生は AKT を細胞質から細胞膜へと移行し、PI3K シグナルの下流により AKT の Thr308、Ser473 のリン酸化を誘導することが知られている (Belham et al., 1999;

Vanhaesebroeck and Alessi, 2000)。本研究でも PI3K 阻害は AKT (Thr308) のリン酸化を低下させた (図 3-8 C)。しかし EGFR シグナルの摂動によって PI3K のダイナミクスが変化したにも関わらず、この条件では AKT のリン酸化の時間変化はその影響を受けないことがわかった (図 3-8 E)。このことから ERK の一過的な活性化をもたらすためには AKT リン酸化の減少は必ずしも必要ではないことが考えられた。

PI3K が ERK の持続的な活性化にどのように関与しているかを調べるために、次に RAF、MEK1/2、および ERK1/2 のリン酸化の時間変化を測定した (図 3-9 A)。RAF の主要な活性化を示すリン酸化部位 (Ser338) は ERK の核移行の持続性とは無関係に、全ての条件下で HRG 刺激後に持続的にリン酸化された (図 3-9 B)。一方、HRG 刺激後の B1MCF7 細胞内における MEK1/2 (Ser217/221) および ERK1/2 (Thr202/Tyr202) のリン酸化の持続性は、親 MCF7 細胞内と比較して有意に減少した (図 3-9 C、D)。また SHC のノックダウン、低濃度の PI3K 阻害剤処理の条件においても、MEK および ERK のリン酸化の持続性が低下した。RAF のリン酸化の持続性は変化せずに、MEK および ERK のリン酸化の持続性が低下したこれらの条件下では、SHC および ERK の応答の持続性も低下していた (図 3-5 C-E、図 3-6 C-E)。これらの結果から、SHC によって調節された PI3K 活性は、MEK の上流で RAF とは独立したシグナル伝達プロセスを介して ERK ダイナミクスを調節する可能性が高いことが考えられた。

### 3.3.4 SHC の細胞膜移行ダイナミクスは細胞運命決定に影響を与える

最後に、実験で観察された SHC と ERK の細胞内局在ダイナミクスの変化が細胞運命の決定に影響を与え得るのかについて調べた。MCF7 細胞を用いた以前の研究では、EGF 刺激による ERK の一過的な活性化は細胞増殖を誘導するのに対し、HRG 刺激による ERK の持続的な活性化は細胞分化を誘導することが報告されている (Kao et al., 2001; Marshall, 1995; Nagashima et al., 2007)。ここでは、親 MCF7 と B1MCF7 細胞の細胞増殖と分化を定量した。親 MCF7 細胞の細胞密度の増加は HRG リガンドの有無で有意差を示さなかったが、B1MCF7 細胞の細胞密度の増加は HRG の存在下で有意に早くなった (図 3-10)。したがって EGFR の過剰発現は、HRG 刺激時の細胞増殖を促進した。これには、ERK 活性化の持続性の低下が影響していることが考えられた。細胞質中における脂肪の蓄積と脂肪滴の形成は、MCF7 細胞における HRG 誘導性の分化の指標である (Giani et al., 1998; Nagashima et al., 2007)。そこで次に親 MCF7 と B1MCF7 細胞の脂肪滴を定量した (図 3-11)。以前の報告と一致して、HRG 含有培地で培養した親 MCF7 細胞では脂肪滴が観察されたが、HRG の非存在下では観察されなかった (図 3-12 A)。親 MCF7 細胞同様、HRG 含有培地で培養した B1MCF7 細胞の一部に脂肪滴が観察されたが、同条件下において細胞質内の脂質蓄積と脂肪滴を含む細胞の割合は親 MCF7 細胞よりも有意に低かった (図 3-12 B、D、E)。これらの結果は EGFR の過剰発現が HRG 刺激時の細胞分化を弱めることを示していた。これにも ERK 活性の持続性の低下が関



与していることが考えられた。したがって、B1MCF7 細胞で観察された SHC と ERK の細胞内局在ダイナミクスの変化は HRG シグナルを分化誘導から増殖誘導に切り替え、細胞運命の決定に影響を与える可能性が考えられた。HRG シグナル中における分化誘導するための SHC 活性の必要性は、SHC のノックダウンを行った MCF7 細胞でも確認された (図 3-12 C、D、E)。

### 3.4 考察

SHC は、受容体型チロシンキナーゼと下流のシグナル伝達経路をつなぐ重要なアダプタータンパク質の 1 つである。SHC は同じくアダプタータンパク質の GRB2 と相互作用することで、受容体から RAS/MAPK および PI3K/AKT 経路にシグナルを伝達する。SHC を介したシグナル伝達経路は RAS/MAPK シグナルの増幅を引き起こすことが可能であるが、これら 2 つのアダプタータンパク質のシグナル伝達経路における定性的な役割の違いは完全に理解されていなかった。

本研究では、MCF7 細胞内における HRG 刺激後の SHC、GRB2、および ERK の細胞膜移行ダイナミクスを計測し、細胞分化シグナル伝達中の SHC および GRB2 の特異的な機能について調べた。細胞分化を誘導する HRG リガンドは ERBB3 と ERBB4 のリガンドであり、ERBB 間のヘテロ二量体化を誘導し 4 つ全ての受容体のチロシンリン酸化を誘導する。本研究結果（第 2 章）から SHC と GRB2 は固有のシグナル伝達ダイナミクスを持つことが明らかになり、SHC は持続的な応答を示したのに対して、GRB2 は一過的な応答を示した。これには SHC による時空間依存的な二相的な調節と、MEK および/または ERK からのネガティブフィードバックがこれらアダプタータンパク質の細胞膜移行ダイナミクスの違いを生じさせる要因であることが考えられた（第 2 章）。

本章の結果は、HRG 刺激後の ERK の持続的な活性化が SHC の持続的な細胞膜への局在化と正の相関があるが、GRB2 の一過的な局在化とは正の相関がないことを示している（図 3-4、図 3-5 C-E）。このことから、SHC と GRB2 のシグナル伝達中における機能は冗長的ではないことを示唆している。さらに SHC が ERK 活性化の時間的調節において重要な役割を果たすことを示している（図 3-13）。

以前の報告では、EGF 刺激下での SHC を介した RAS/MAPK シグナル伝達のモデルが提案されている (Zheng et al., 2013)。このモデルでは、SHC は細胞膜に移行し、そこでリン酸化された EGFR と相互作用し、GRB2 と複合体を形成する。細胞膜上における SHC と GRB2 の複合体は、AKT からの負のフィードバックループによって調節された EGFR の脱リン酸化のために減少する。このモデルでは、EGF 刺激中の SHC および GRB2 の類似な細胞膜移行ダイナミクスを提案している。しかし本研究結果から、SHC と GRB2 の細胞膜移行ダイナミクスは必ずしも類似しているわけではなく、成長因子と細胞の種類によって異なることが考えられた。

今回の実験で観察された SHC と GRB2 の細胞膜移行ダイナミクスの違いは、EGFR 摂動下における ERBB 受容体上の結合部位のリン酸化の時間変化の違いでは説明できなかった（図 3-4）。しかしながら、ERBB 受容体のクラスターサイズの違いが SHC および GRB2 との明確な相互作用を引き起こした要因の一つである可能性は考えられる。MIG6 の発現レベルは、EGFR を過剰発現した MCF7 細胞で増加した（図 3-3 B）。MIG6 は EGFR、ERBB2、および ERBB4 のチロシンキナーゼドメインと相互作用

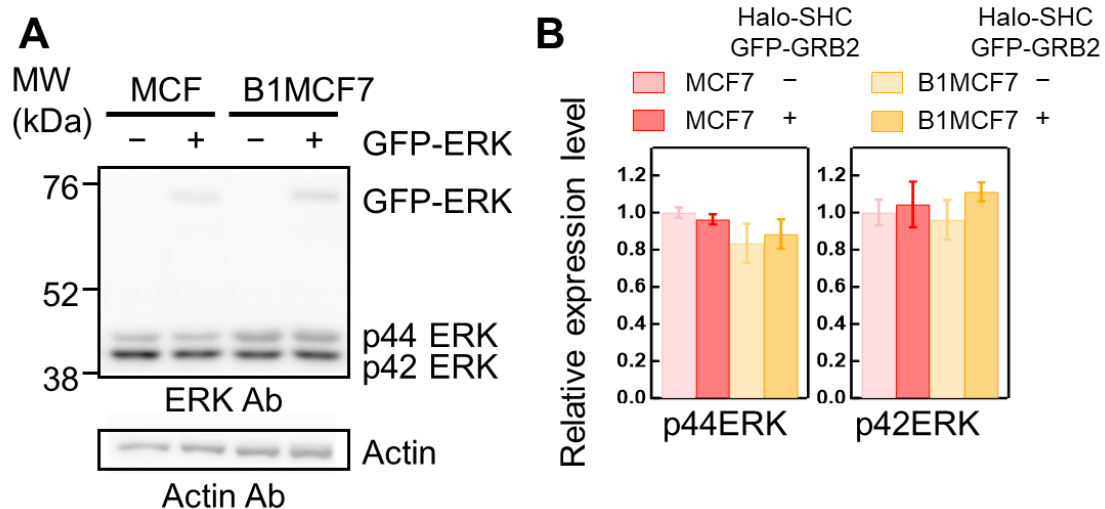
することで受容体の二量体化を阻害する細胞質タンパク質である (Anastasi et al., 2003; Hackel et al., 2001; Nagashima et al., 2009; Zhang et al., 2007)。よって EGFR 過剰発現細胞において SHC の膜局在が一過的になった結果は、ERBB 受容体の二量体化およびまたはクラスター化状態がアダプタータンパク質に対する親和性を明確に調節している可能性を示唆している。以前の研究でも EGFR のクラスターリングが GRB2 に対する親和性を高め、細胞膜上に GRB2 を保持させることも報告されている (Hiroshima et al., 2018; Jadwin et al., 2016)。

本研究結果から、SHC が HRG 刺激下の MCF7 細胞における PI3K 活性化を介して ERK の持続的な活性化を調節することが示唆された (図 3-7 B)。HRG リガンドが結合する ERBB3 受容体は、ERBB サブタイプの中で PI3K に対して最も高い親和性を持つことが知られている (Dey et al., 2015; Falls, 2003; Schulze et al., 2005)。このことが PI3K の制御が ERK ダイナミクス調節に重要な役割を果たし、今回の観察結果の根底にある可能性がある (図 3-8 D)。GRB2 と PI3K が関与する正のフィードバックループは以前に報告されており、GRB2 が GAB1 を介して PI3K の活性化を促進し、RAS/MAPK シグナル伝達の持続時間を延長する (Aasrum et al., 2013; Kiyatkin et al., 2006)。この報告では GAB1-PI3K 相互作用が GRB2-SOS 複合体、および RAS GAP シグナル伝達を負に調節する SHP2 の細胞膜への移行を増加させることで、RAS/MAPK シグナル伝達を正に調節することを発見した。本研究では、SHC ノックダウンまたは PI3K の強力な阻害により、GRB2 の膜局在化が減少し、ERK の活性化ダイナミクスがより一過的になった (図 3-6 D, E)。これらの結果は GRB2-PI3K の正のフィードバックループが ERK 活性化を増加させるという考えと一致している。

一方で低濃度の PI3K 阻害剤は ERK のリン酸化を減少させ、ERK の核移行ダイナミクスをより一過的にするが GRB2 ダイナミクスには影響を与えなかった (図 3-6 D, E)。この条件下では HRG 刺激された MCF7 細胞内における MEK と ERK のリン酸化の持続性は低下したが、RAF の持続性は大きく変化しなかった (図 3-9 B-D)。EGFR の過剰発現と SHC のノックダウンも、低濃度の PI3K 阻害剤と同様の MEK、ERK の持続性の低下をもたらした。(図 3-9 B-D)。これらの結果から、上記の GRB2/RAF 依存性経路に加えて、SHC が RAF 非依存的に PI3K を介して ERK 活性化を調節する別のシグナル伝達経路が存在することが示された (図 3-7 B、図 3-13)。GRB2 依存性経路は ERK の初期応答の振幅を調節するのに対して、GRB2 および RAF 非依存性経路は、ERK の応答の持続性を調節することが考えられた。

本研究で示唆された GRB2 および RAF 非依存的に PI3K から MEK へ伝達する経路が ERK シグナルの持続性を制御する ERBB システムの一部として機能することはこれまでに説明されていない。増殖および分化実験の結果は (図 3-10、図 3-12) SHC によって調節される PI3K-MEK シグナル伝達が細胞運命決定のための重要な経路であるという考えを支持していると考えられる。p21-activated kinase (PAK) および 3-

phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) は、PI3K の下流で機能し RAS/MAPK シグナル伝達経路に参与するプロテインキナーゼである (Rodriguez-Viciano et al., 1997; Toker and Cantley, 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997)。PAK は RAF (Ser338) と MEK1 (Ser298) をリン酸化して、MEK1 の活性化部位 (Ser218/222) のリン酸化を誘導する (Eblen, 2018; Park et al., 2007; Zang et al., 2002)。PDK1 は AKT (Thr308) をリン酸化し、多くのプロテインキナーゼのリン酸化と活性化に参与する (Belham et al., 1999; Vanhaesebroeck and Alessi, 2000)。PDK1 が RAF の活性に影響を与えることなく MEK1/2 (Ser222/226) を直接リン酸化することも報告されている (Sato et al., 2004)。SHC によって調節される PI3K 活性は PAK および/または PDK1 を活性化して、HRG 刺激中に MEK および ERK の持続的なリン酸化を誘導する可能性がある。しかし、これらのキナーゼは ERBB-RAS-MAPK シグナル伝達経路の複数のタンパク質のリン酸化に参与しているため、生細胞内においてそれぞれのキナーゼによって制御されるリン酸化反応を特定して解析することは困難である。将来の研究により、このリン酸化反応ネットワークの詳細なダイナミクスがさらに明らかになることが期待される。



**図 3-1. ERK の発現量**

(A) GFP-ERK と対応する内在性タンパク質の発現量は抗体 (Ab) を用いてウェスタンブロットングにより評価した。MW は分子量マーカを示す。各細胞の左側のレーンのブロットはそれぞれのコントロール (トランスフェクションなし) の MCF7 および B1MCF7 内の発現量を示した。(B) MCF7 および B1MCF7 細胞内における内在性 ERK の発現量。値は actin の発現量によって細胞数を規格化した後、コントロール MCF7 細胞内の発現量で規格化した。図には 3 回の独立した実験の平均、標準誤差を示した。

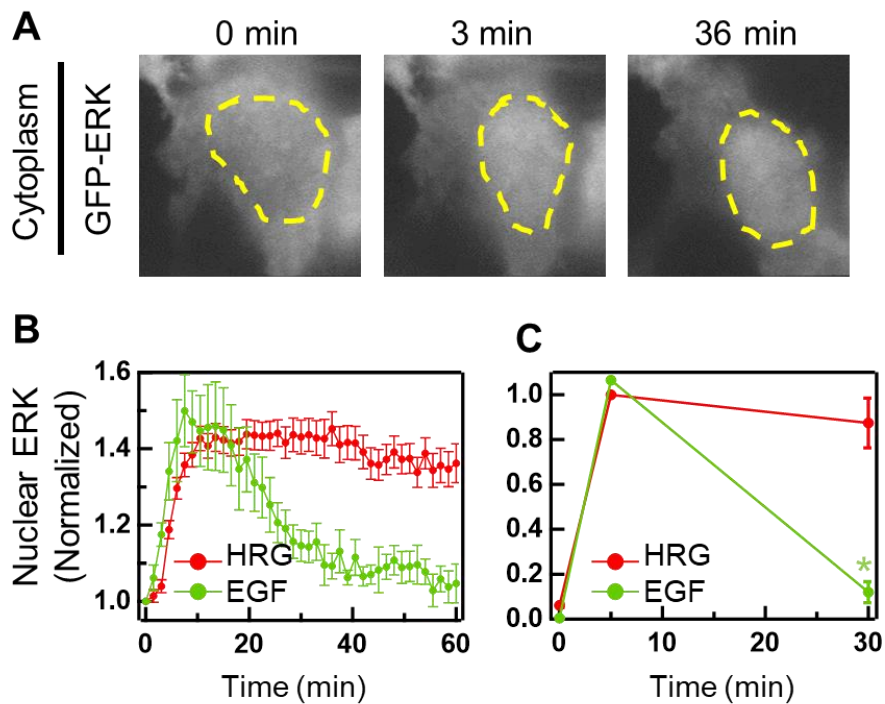


図 3-2. ERK の核移行とリン酸化のダイナミクス

(A) MCF7 細胞中における GFP-ERK の落射照明画像。図には刺激前 (0 分) および HRG 刺激後 (3 分、36 分) を示した。スケールバーは  $10\ \mu\text{m}$ 。(B) 0 min で  $10\ \text{nM}$  HRG で細胞を刺激したときの GFP-ERK の核内濃度の経時変化 (赤)。コントロールとして  $16\ \text{nM}$  EGF 刺激した時の GFP-ERK のダイナミクスを示した (緑)。値は刺激前の核内濃度によって規格化した。図には 31 細胞 (HRG)、6 細胞 (EGF) の平均値、標準誤差を示した。(C) HRG 刺激 (0、5、および 30 分) 後の ERK のリン酸化の時間変化。コントロールとして  $16\ \text{nM}$  EGF 刺激した時の ERK のリン酸化の時間変化を示した。値は「材料と方法」の項で説明したように actin の発現量により細胞数を規格化した後、それぞれの (刺激後 5 分) で規格化した。図には 3 回の独立した実験の平均、標準誤差を示した。アスタリスクは、EGF と HRG 刺激した時の細胞で得られた値と比較したときの統計的有意性を示した (Student の t 検定で  $p < 0.05$ )。

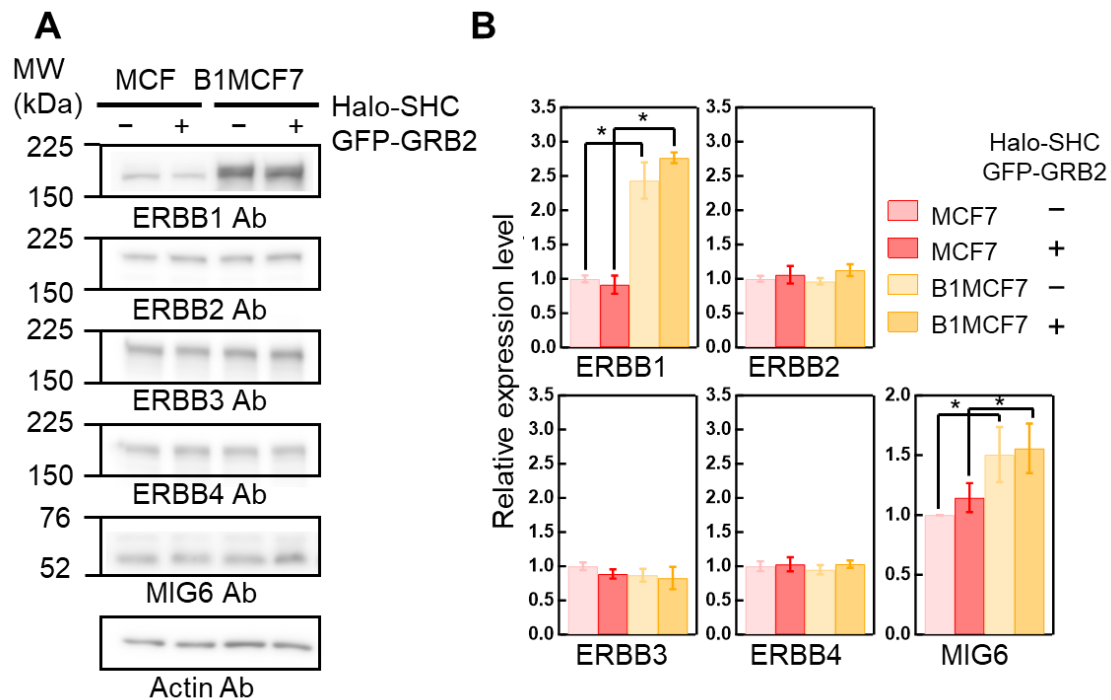


図 3-3. MCF7 および B1MCF7 細胞内における ERBB 受容体の発現レベル

(A) 4つの ERBB 受容体と MIG6 の発現レベルはそれぞれの抗体 (Ab) を用いてウェスタンブロッティングによって評価した。各細胞の左側のレーンのプロットはそれぞれのコントロール (トランスフェクションなし) の MCF7 および B1MCF7 細胞内の発現量を示した。MW は分子量マーカを示す。(B) ERBB 受容体と MIG6 の相対的な発現量。値は actin の発現量によって細胞数を規格化した後、コントロール MCF7 細胞内の発現量で規格化した。図には 3 回の独立した実験の平均、標準誤差を示した。アスタリスクはコントロール MCF7 細胞で得られた値との統計的有意性を示した (すべて Student の t 検定で  $p < 0.05$ 、ただし ERBB1 の MCF7+ と B1MCF7+ との比較は Welch の t 検定で  $p < 0.05$ )。

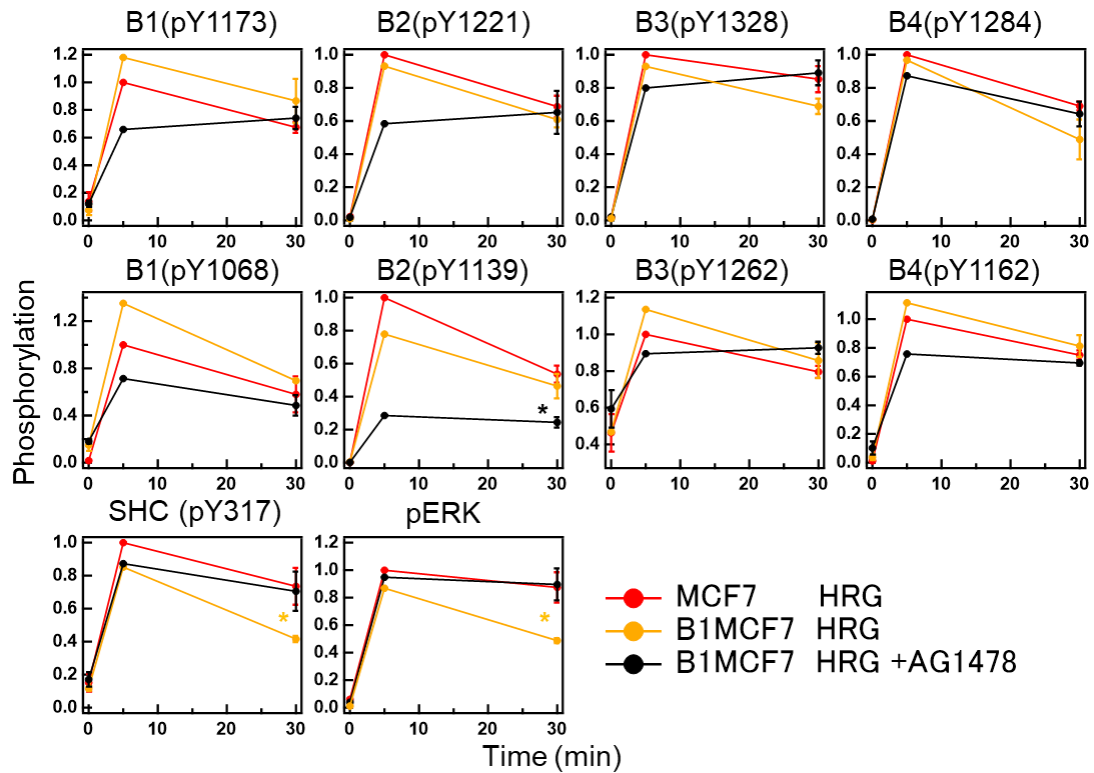


図 3-4. MCF7 および B1MCF7 細胞内におけるリン酸化の時間変化

HRG 刺激後 (0、5、および 30 分) の ERBB 受容体、SHC および ERK のリン酸化の時間変化。ERBB 受容体は SHC の主要な結合部位 (上段) と GRB2 の主要な結合部位 (中段) を示した。図には MCF7 細胞 (赤) と、100 nM AG1478 で前処理した時 (黒) としない時 (オレンジ) の B1MCF7 細胞内で計測したデータを示した。値は「材料と方法」の項で説明したように actin の発現量により細胞数を規格化した後、それぞれの (刺激後 5 分) で規格化した。図には 3 回の独立した実験の平均、標準誤差を示した。アスタリスクは、MCF7 細胞で得られた値と比較したときの統計的有意性を示した (Student の t 検定で  $p < 0.05$ )。



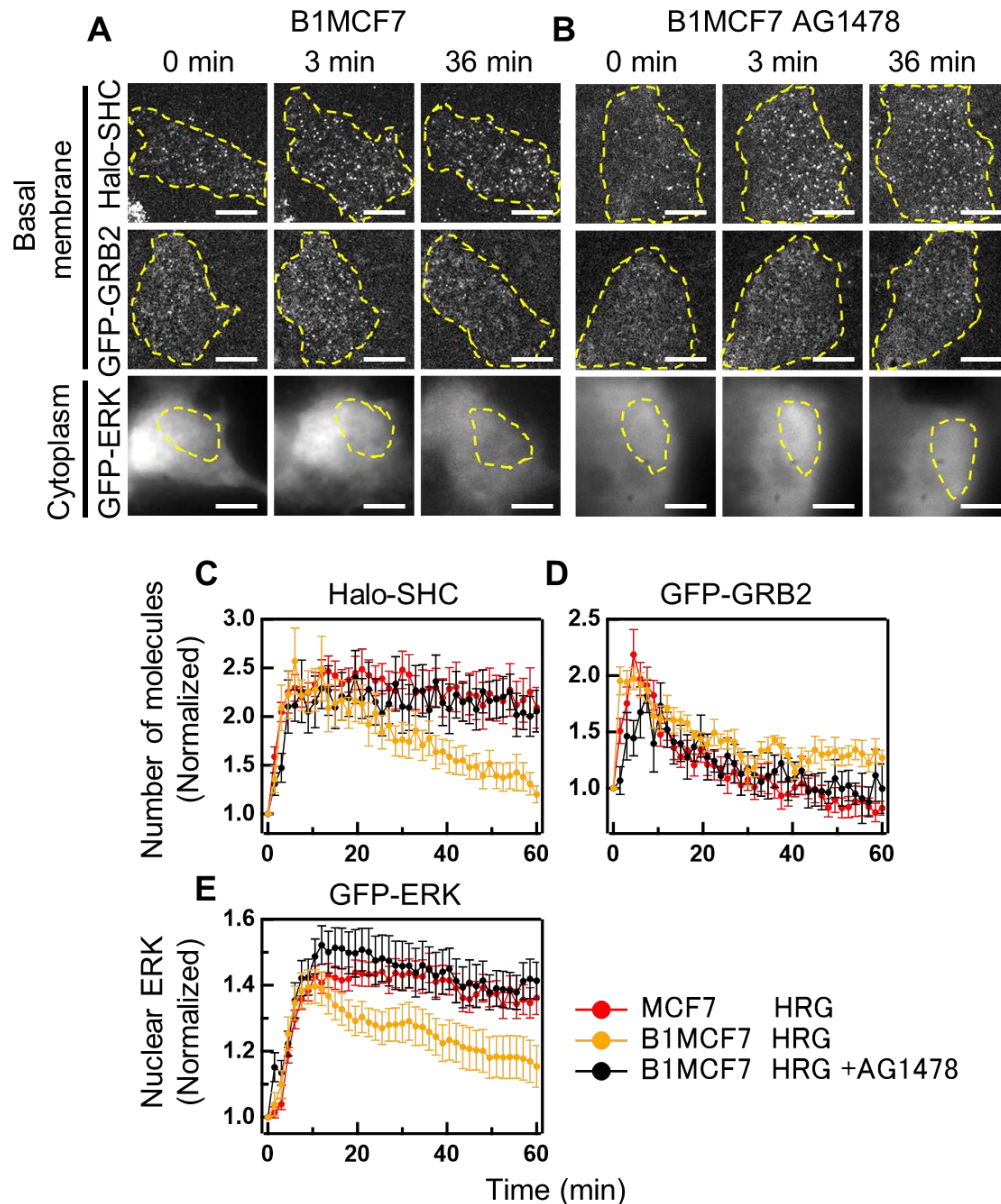


図 3-5. SHC、GRB2、および ERK のダイナミクスと EGFR 過剰発現の影響

(A, B) B1MCF7 細胞膜上の Halo-SHC (上段) および、GFP-GRB2 (中段) 粒子の TIRF 画像と、GFP-ERK (下段) の Epi 画像。100 nM AG1478 で前処理した時 (B) としない時 (A) で計測した。図には刺激前 (0 分) および HRG 刺激後 (3 分、36 分) を示した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。(C-E) 0 min で 10 nM HRG で細胞を刺激したときの Halo-SHC (C) および GFP-GRB2 (D) の細胞膜上分子数および、GFP-ERK (E) の核内濃度の経時的変化。AG1478 で前処理なし (オレンジ) またはあり (黒) の B1MCF7 細胞を示した。親 MCF7 細胞 (図 2-3 B、C、図 3-2 B) の時間変化を比較として示した (赤)。値は刺激前の細胞膜上分子数によって規格化した。図には 7-32 細胞の平均値、標準誤差を示した。

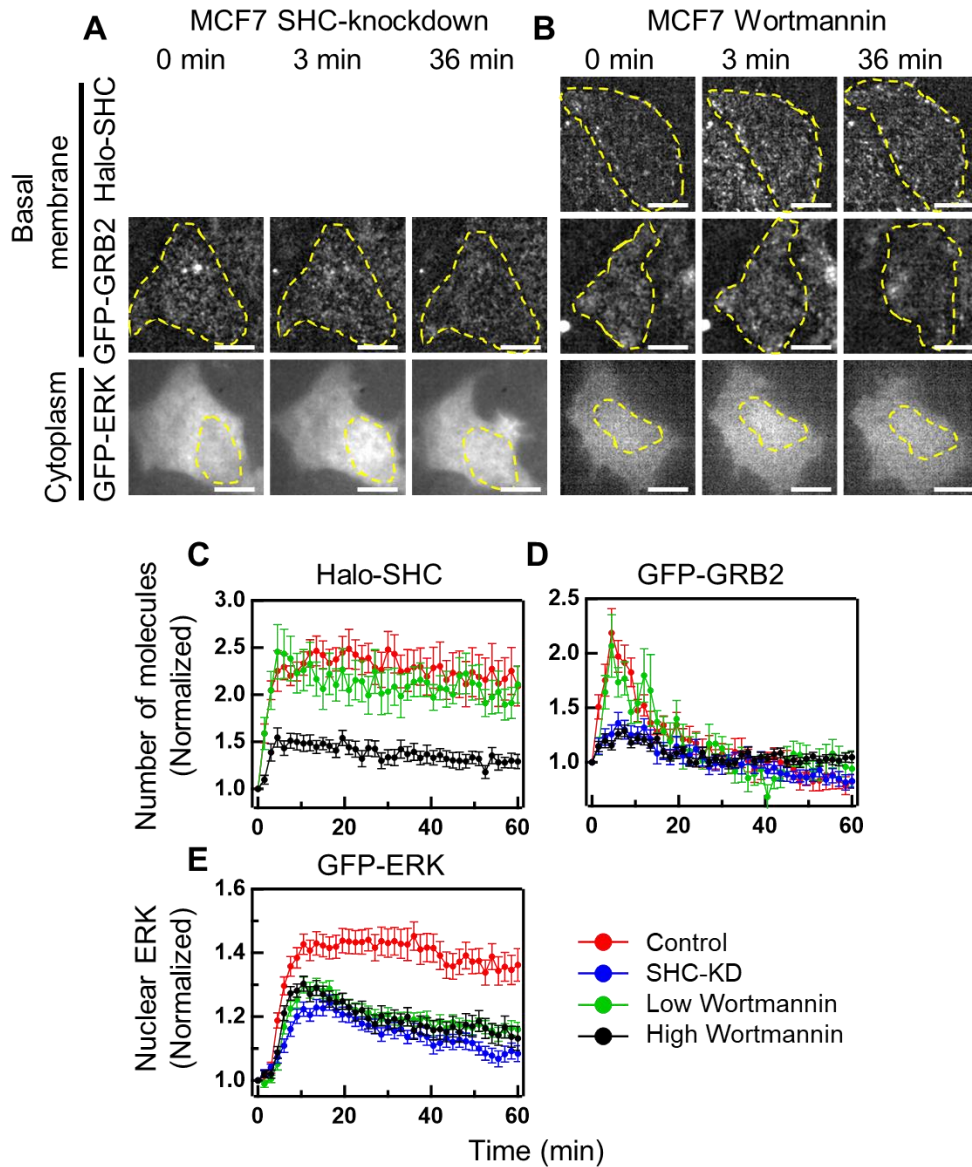


図 3-6. SHC、GRB2、および ERK のダイナミクスと PI3K キナーゼ阻害の影響

(A、B) MCF7 細胞膜上の Halo-SHC (上段) および、GFP-GRB2 (中段) 粒子の TIRF 画像と、GFP-ERK (下段) の Epi 画像。SHC をノックダウンした細胞 (A) および 200 nM Wortmannin で前処理した細胞 (B) で計測した。図には刺激前 (0 分) および HRG 刺激後 (3 分、36 分) を示した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。(C-E) 0 min で 10 nM HRG で細胞を刺激したときの Halo-SHC (C) および GFP-GRB2 (D) の細胞膜上分子数および、GFP-ERK (E) の核内濃度の経時的変化。SHC ノックダウン (青)、および 200 nM (緑) または 1  $\mu\text{M}$  (黒) の Wortmannin で前処理した MCF7 細胞を示した。親 MCF7 細胞 (図 2-3 B、C、図 3-2 B) の時間変化を比較として示した (赤)。値は刺激前の細胞膜上分子数によって規格化した。図には 13-35 細胞の平均値、標準誤差を示した。

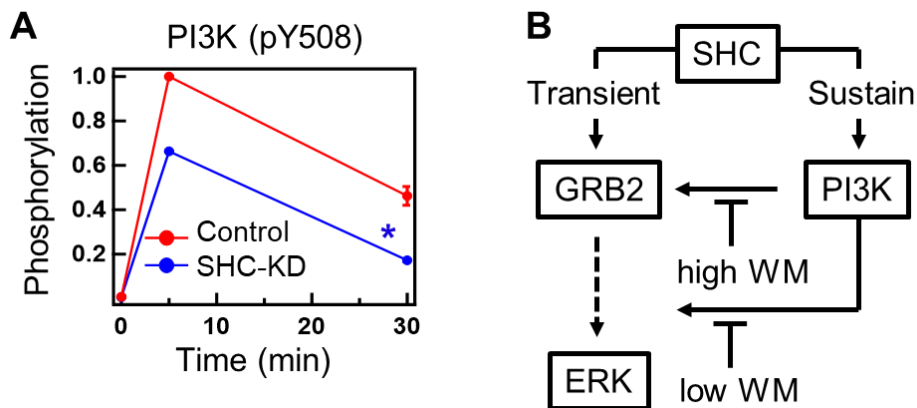


図 3-7. PI3K シグナルが RAS/MAPK 経路に与える影響

(A) HRG 刺激後 (0、5、および 30 分) の PI3K (Tyr508) のリン酸化の時間変化。図には MCF7 細胞 (コントロール; 赤) と SHC をノックダウンした細胞 (青) で計測したデータを示した。値は「材料と方法」の項で説明したように actin の発現量により細胞数を規格化した後、それぞれの (刺激後 5 分) で規格化した。図には 3 回の独立した実験の平均、標準誤差を示した。アスタリスクは、MCF7 細胞で得られた値と比較したときの統計的有意性を示した (Student の t 検定で  $p < 0.05$ )。 (B) RAS/MAPK シグナル伝達を調節する回路の簡略化された概略図。low WM と high WM はそれぞれ 200 nM と 1  $\mu$ M の Wortmannin 処理を示す。

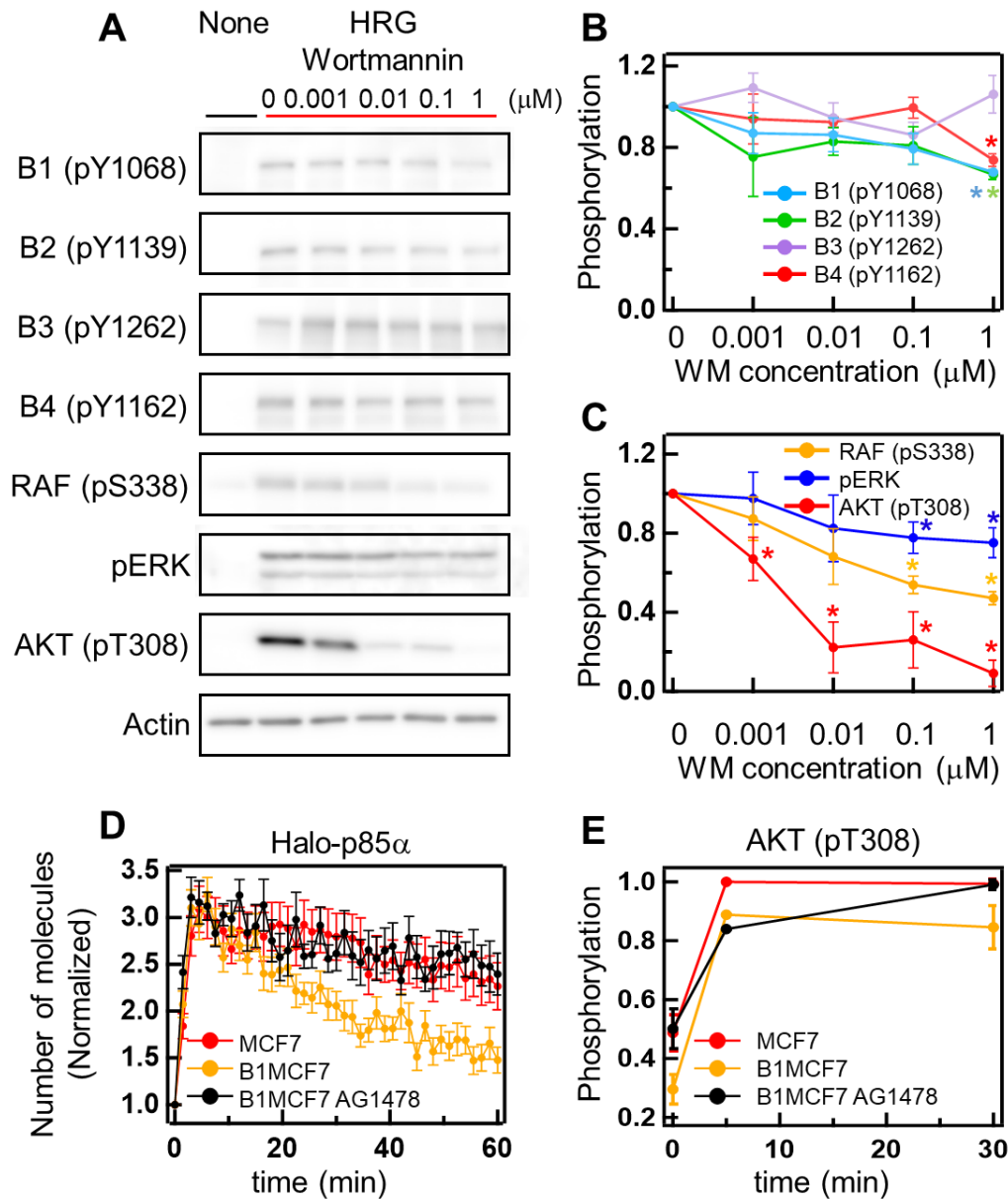


図 3-8. RAS/MAPK および PI3K/AKT シグナル伝達に対する PI3K キナーゼ阻害の影響

(A) PI3K キナーゼ阻害条件下での ERBB 受容体、RAF、ERK1/2、および AKT のリン酸化レベルをウェスタンブロッティングによって検出した。MCF7 細胞を刺激する 30 分前に Wortmannin で前処理した (対数濃度 0-1  $\mu\text{M}$ )。 (B、C) それぞれのタンパク質のリン酸化レベル。図には 3 回の独立した実験の平均、標準誤差を示した。アスタリスクは、MCF7 細胞で得られた値と比較したときの統計的有意性を示した (対応のある t 検定で  $p < 0.05$ )。 (D、E) 0 min で 10 nM HRG で細胞を刺激したときの Halo-p85 $\alpha$ 細胞膜上分子数および、AKT (Thr308) のリン酸化の時間変化。MCF7 細胞 (赤) および AG1478 前処理あり (黒)、またはなし (オレンジ) の B1MCF7 細胞について示した。図には 10-38 細胞 (D) と 3 回の独立した実験 (E) の平均値と標準誤差を示した。

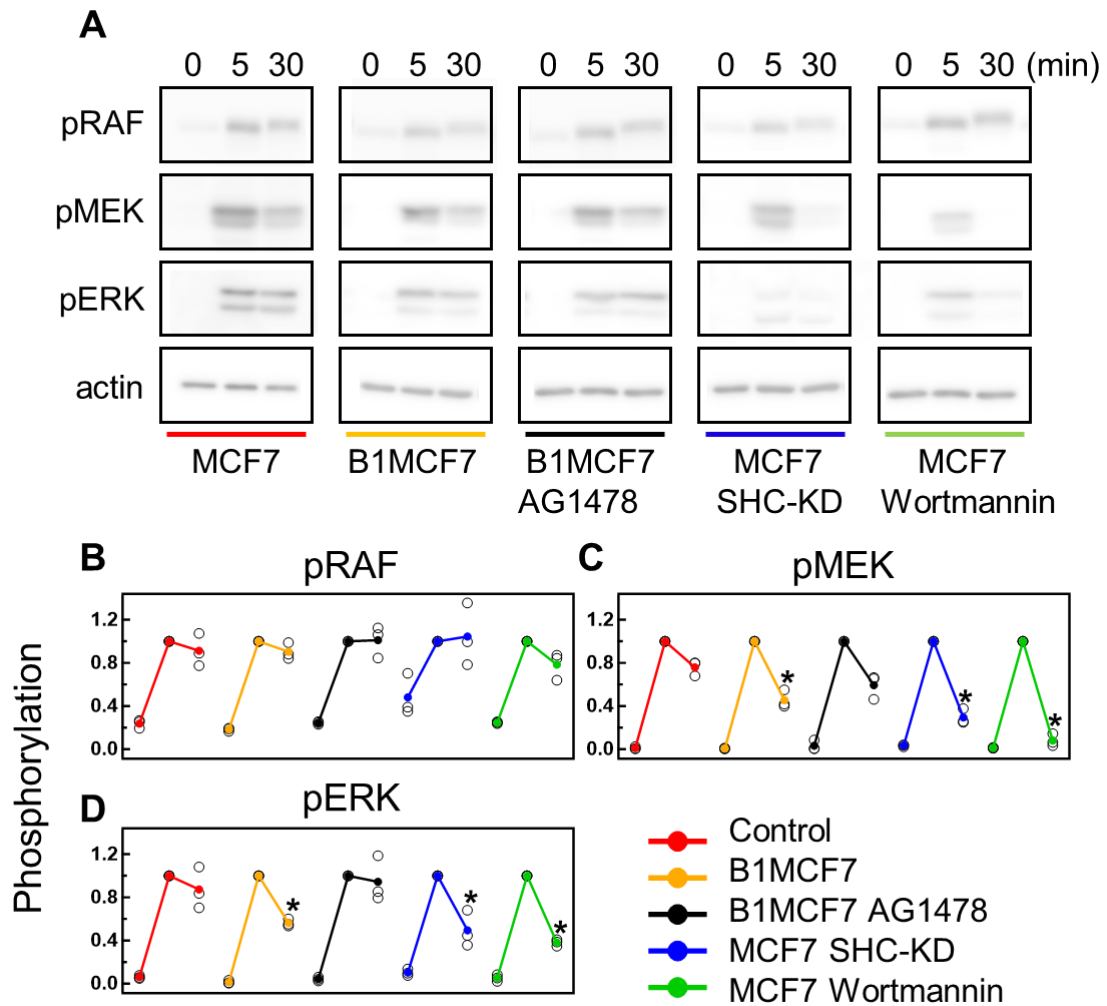


図 3-9. HRG 刺激後の RAF、MEK1/2、および ERK1/2 のリン酸化ダイナミクス (A) それぞれの条件下における RAF (pSer338)、MEK1/2、および ERK1/2 のリン酸化レベルをウェスタンブロッティングによって検出した。Wortmannin は低濃度 (200 nM) を使用。(B-D) HRG 刺激後の RAF (pSer338) (B)、MEK1/2 (C) および ERK1/2 (D) のリン酸化の時間変化 (左から右に 0、5、および 30 分)。値は「材料と方法」の項で説明したように actin の発現量により細胞数を規格化した後、それぞれの (刺激後 5 分) で規格化した。図には 3 回の独立した実験の結果 (白丸) を平均値 (黒丸) とともにプロットした。アスタリスクは、刺激後 5 分の値と比較したときの統計的有意差を示した。(Student の t 検定で  $p < 0.05$ )。

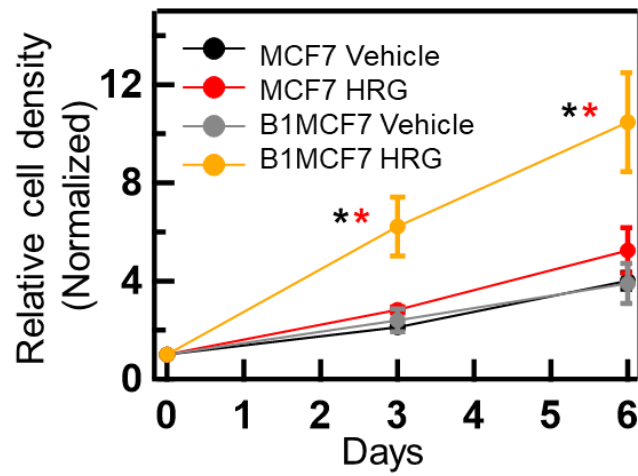


図 3-10. MCF7 と B1MCF7 細胞の増殖

MTT アッセイ（光学濃度 OD 540 nm）により評価した MCF7 および B1MCF7 細胞の細胞増殖率の時間変化。細胞は 96 ウェルプレート上で Vehicle（DMEM + 10% FBS）または HRG（DMEM + 10% FBS + 10 nM HRG）により 0-6 日培養した。縦軸は 0 日目の密度で規格化した値を示した。3 回の独立した実験の平均値と標準誤差を示した。アスタリスクは MCF7 細胞と B1MCF7 間の比較（黒）と Vehicle と HRG の比較（赤）での統計的有意差を示した（Student の t 検定で  $p < 0.05$ ）。

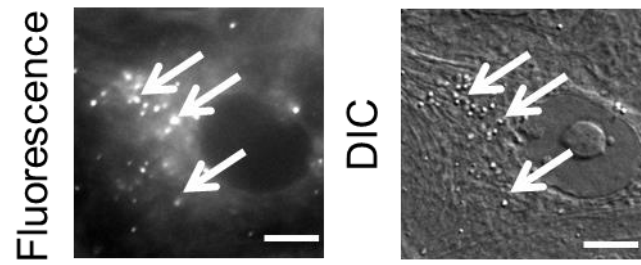


図 3-11. 細胞分化の定量

HRG 処理した MCF7 細胞中における油滴形成を BODIPY 蛍光染色（左図）によって定量した。右図は同視野の DIC 画像を示した。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。矢印は BODIPY で染色された油滴を示す。

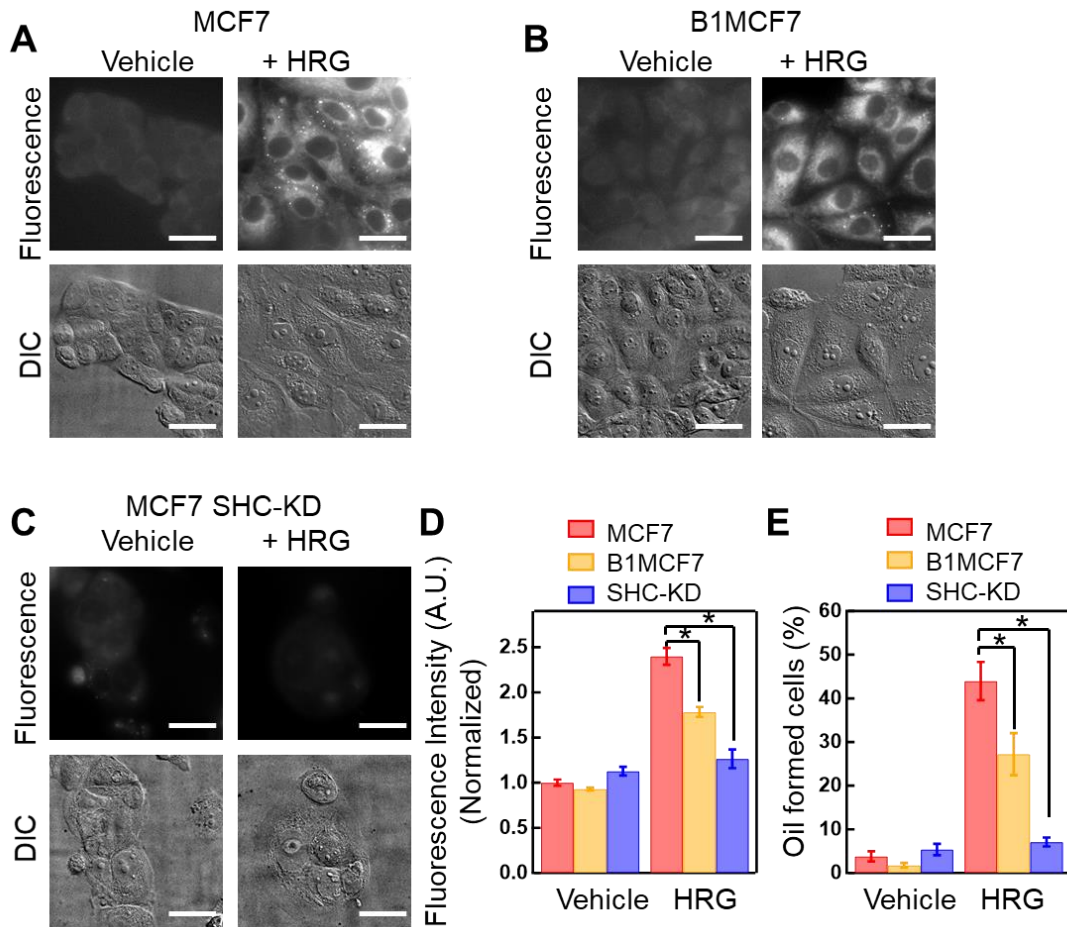


図 3-12. MCF7 と B1MCF7 細胞の分化

(A-C) MCF7 (A)、B1MCF7 (B)、および SHC をノックダウンした MCF7 細胞 (C) における油滴形成を BODIPY 蛍光染色 (上図) によって定量した。下図は同視野の DIC 画像を示した。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。細胞は Vehicle (DMEM + 10% FBS) または HRG (DMEM + 10% FBS + 10 nM HRG) により 4 日間培養した。(D、E) Vehicle または HRG で培養された MCF7 (赤)、B1MCF7 (オレンジ)、および SHC をノックダウンした MCF7 細胞 (青) における細胞質の蛍光強度 (D)、および油滴形成された細胞の割合 (E)。11-14 視野中の 111-557 細胞の平均値と標準誤差を示した。アスタリスクは MCF7 と比較した時の統計的有意差を示した (D; Welch の t 検定で  $p < 0.05$ 、E; Student の t 検定で  $p < 0.05$ )。



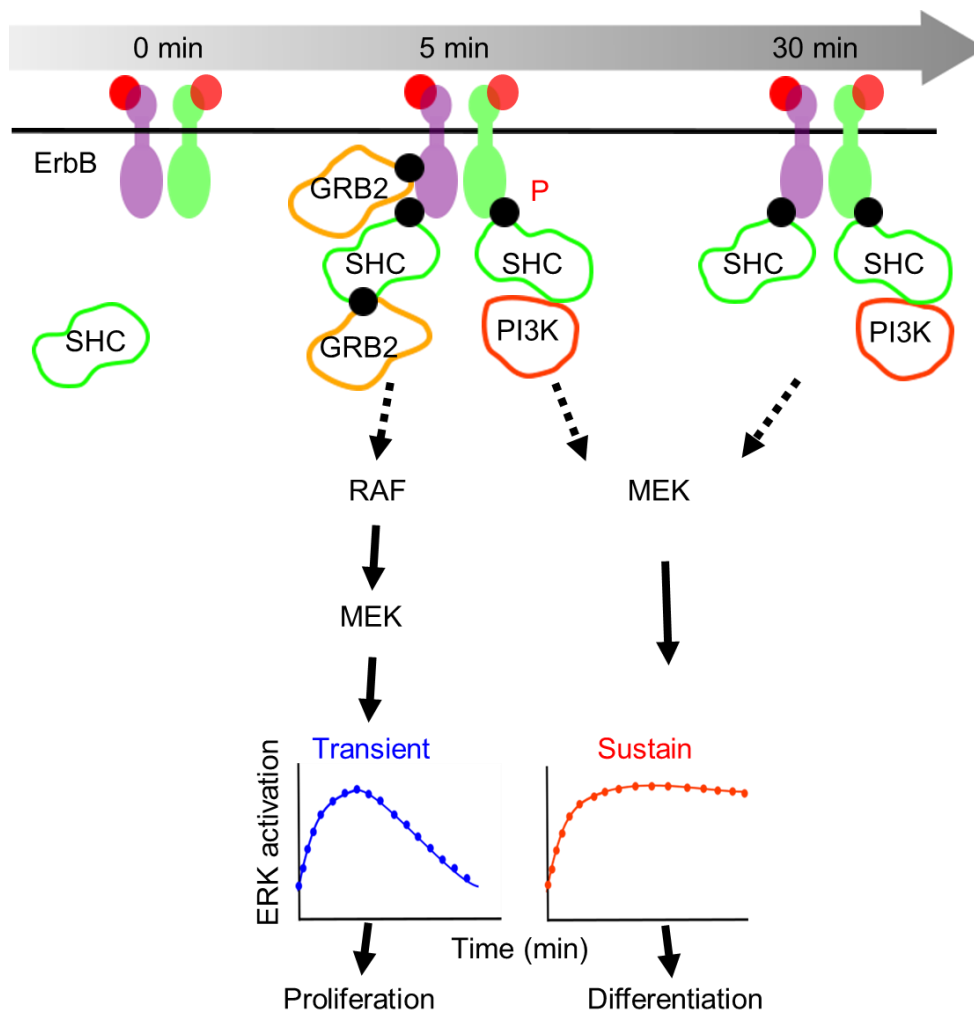


図 3-13. SHC による ERK 活性化の時間的調節モデル

静細胞中では SHC は細胞質に局在する。細胞を刺激後、SHC は細胞膜に移行し、ERBB 受容体のリン酸化部位（黒丸）を認識する。細胞膜に局在化した SHC は、GRB2 と PI3K の一過的および持続的な膜局在化を調節し、それぞれが RAF、MEK に信号を伝達する。これらの制御メカニズムは、それぞれ ERK 活性化の初期段階と後期段階にそれぞれ作用する。

## 第4章 結論と展望

## 4.1 結論

本研究では生細胞内の RTK-RAS-MAPK シグナル伝達経路における、アダプタータンパク質の SHC、GRB2 の刺激に伴う細胞膜移行ダイナミクスを計測し、さらに RAS/MAPK シグナル伝達経路における時間的調節について調べた。SHC は主要な経路である GRB2/SOS シグナルと、間接的な PI3K/AKT シグナル経路の両方を調節することで RAS/MAPK シグナル伝達の時間変化を制御していることが明らかになった。

HRG 刺激された MCF7 細胞では SHC と GRB2 はそれぞれ固有のダイナミクスを示し、本研究結果から SHC が GRB2 のダイナミクスを時間依存的に調節する二相性モデルを示唆された (第 2 章)。シグナル伝達の初期段階では、SHC は ERBB 受容体のリン酸化レベルを増加させ、GRB2 の応答量を増加させる。この制御は細胞膜上で実行される。後期段階では SHC は GRB2 の細胞膜移行を抑制する働きがある。この後期段階における SHC の役割は細胞質中で GRB2 と複合体形成をすることで、細胞質中における GRB2 の有効濃度を減少させることである。このように SHC は細胞内シグナル伝達中に時間と空間依存的に GRB2 のシグナル伝達を正負に制御していることが明らかになった。

これまでに SHC と GRB2 は RAS/MAPK シグナル伝達の振幅を調節することは示唆されていたが (Lai and Pawson, 2000; Oku et al., 2012)、本研究では刺激後後期時における新しいシグナル抑制のメカニズムを提案した。以前から細胞質および、エンドソーム中における SHC と GRB2 の相互作用は示唆されてきたが (Kholodenko, 2003)、細胞質中における複合体の役割については徹底的には議論されてきていなかった。エンドソーム中における受容体と GRB2 の複合体は下流のシグナル伝達経路の活性化に影響を与えることが示唆されてきたが (Fortian and Sorkin, 2014)、今回の計測で用いた HRG リガンドではエンドソーム中のシグナル伝達の影響は低いと考えられる (Wang et al., 2015)。さらに SHC は GRB2 の細胞膜移行を時間依存的に正負に制御することで RAS 活性化の振幅、さらに持続時間の調節に関与することが明らかになった。持続時間の調節には MEK の負のフィードバックループを含む複数のメカニズムがこのプロセスに関与し (Lake et al., 2016; Langlois et al., 1995; Porfiri and McCormick, 1996)、SHC による制御は付加的に影響を与えていると考えられる。

細胞内における SHC、GRB2 の固有のシグナル伝達ダイナミクスは細胞に非冗長的な機能をもたらすことが明らかになった (第 3 章)。GRB2 依存的経路は主に ERK の初期応答の振幅調節に関与し、SHC の GRB2-RAF 非依存的経路は ERK の応答の持続性を調節する。この SHC の制御には RAS/MAPK 経路との関連がよく知られている PI3K-AKT 経路の PI3K の活性化を介して調節されることが示唆された (Aasrum et al., 2013; Kiyatkin et al., 2006)。しかしこれまで知られていたメカニズムでは今回の研究結果を全て説明することはできず、本研究では新しいメカニズムを提案した。今後、生細胞内に

おけるリン酸化ネットワークの詳細なダイナミクス計測をすることでさらに詳細なメカニズムが明らかになると期待される。

このように SHC は GRB2 のシグナル伝達を制御し、RAS 活性化を調節するだけでなく、PI3K 依存的経路を制御することで ERK 活性化の持続時間を調節することが明らかになった。また SHC による ERK 活性化の持続時間の調節は、細胞増殖、分化の細胞応答決定にも重要な役割を果たしており、SHC のダイナミクス変化はこれらの細胞応答決定のバイアスに影響を与えることが示唆された。

## 4.2 展望

本研究では全反射蛍光顕微鏡を用いて一細胞ごとに分子集団の挙動と個々の分子の挙動を時空間的に調べた。その結果、これまで冗長的なプロセスであると考えられてきた SHC と GRB2 の固有の機能を明らかにした。これらのアダプタータンパク質は酵素活性が欠如しており、空間局在変化がシグナル伝達に重要であると考えられている (Wills and Jones, 2012)。本研究ではこのようなタンパク質のシグナル伝達を細胞内で可視化し、下流のシグナル伝達の時間変化との相関関係を調べた。さらに様々な摂動、経路阻害した条件でこれらの相関関係を調べることで、それぞれのタンパク質のシグナル伝達における役割を明らかにした。しかし細胞内におけるシグナル伝達は複雑に影響し合っているため (Kholodenko, 2006)、一つの摂動、経路阻害が明らかになったメカニズム以外にも影響を与えていた可能性は否定できない。このことを解決することは本研究だけでなく、今日における細胞生物学においても重要な課題であると考えられる。

今後の研究では、同一細胞内において複数のタンパク質の情報の受け渡しを同時計測し統計的および数理的な解析を行う。それによって細胞応答決定に重要なシグナル伝達の方向性の決定、持続時間の情報が得ることができる。それに加えて、複数のシグナル伝達タンパク質間で受け渡される情報量を比較することで、それぞれのタンパク質の寄与、シグナルバイアスについて明らかにできることを期待する。それによってほぼ同一のネットワークから異なる応答を示す細胞応答決定メカニズムについて新しい情報が得られ、細胞の動的なシステムを理解し、細胞生物学研究をさらに進めることを期待する。

## 第5章 謝辞

本研究の遂行において、ご指導、ご助言をして頂きました東京大学大学院総合分化研究科 村田昌之教授に心よりお礼申し上げます。本研究の一分子計測を中心とする実験の指導、ご助言をして頂きました理化学研究所佐甲細胞情報研究室主任研究員の佐甲靖志さんにも心より感謝いたします。また、本研究の内容や発展に魅力的なご助言、解析手法を指導して頂きました、同所属の研究員の梅木伸久さんには本当にお世話になりました。心より感謝いたします。また本研究で使用したプラスミドの構築に技術的な支援をしてくださった研究補助員の佐藤裕美さんに感謝いたします。最後に、東京大学大学院総合分化研究科村田研究室のみなさん、理化学研究所佐甲細胞情報研究室のみなさんには、日ごろから親切にとっても適切なアドバイスをして頂きました。研究員の方々から刺激を受けながら、とてもよい環境で研究を進められたことに心より感謝いたします。ありがとうございました。本研究成果は日本学術振興会特別研究員 DC2 の助成金によって支援されました。

## 第 6 章 参考文献

Aasrum, M., J. Odegard, D. Sandnes, and T. Christoffersen. 2013. The involvement of the docking protein Gab1 in mitogenic signalling induced by EGF and HGF in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1833:3286-3294.

Anastasi, S., L. Fiorentino, M. Fiorini, R. Fraioli, G. Sala, L. Castellani, S. Alema, M. Alimandi, and O. Segatto. 2003. Feedback inhibition by RALT controls signal output by the ErbB network. *Oncogene*. 22:4221-4234.

Anastasi, S., G. Sala, C. Huiping, E. Caprini, G. Russo, S. Iacovelli, F. Lucini, S. Ingvarsson, and O. Segatto. 2005. Loss of RALT/MIG-6 expression in ERBB2-amplified breast carcinomas enhances ErbB-2 oncogenic potency and favors resistance to Herceptin. *Oncogene*. 24:4540-4548.

Avraham, R., and Y. Yarden. 2011. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:104-117.

Belham, C., S. Wu, and J. Avruch. 1999. Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol*. 9:R93-96.

Birtwistle, M.R., M. Hatakeyama, N. Yumoto, B.A. Ogunnaike, J.B. Hoek, and B.N. Kholodenko. 2007. Ligand-dependent responses of the ErbB signaling network: experimental and modeling analyses. *Mol Syst Biol*. 3:144.

Bisson, N., D.A. James, G. Ivosev, S.A. Tate, R. Bonner, L. Taylor, and T. Pawson. 2011. Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nature biotechnology*. 29:653-658.

Boguski, M.S., and F. McCormick. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. 366:643-654.

Bouchard, C., J. Marquardt, A. Bras, R.H. Medema, and M. Eilers. 2004. Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *Embo j*. 23:2830-2840.

Brunet, A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse, and J. Pouyssegur. 1999. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo j.* 18:664-674.

Buhrman, G., C. O'Connor, B. Zerbe, B.M. Kearney, R. Napoleon, E.A. Kovrigina, S. Vajda, D. Kozakov, E.L. Kovrigin, and C. Mattos. 2011. Analysis of binding site hot spots on the surface of Ras GTPase. *J Mol Biol.* 413:773-789.

Caunt, C.J., and C.A. McArdle. 2012. ERK phosphorylation and nuclear accumulation: insights from single-cell imaging. *Biochemical Society transactions.* 40:224-229.

Chardin, P., J.H. Camonis, N.W. Gale, L. van Aelst, J. Schlessinger, M.H. Wigler, and D. Bar-Sagi. 1993. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science.* 260:1338-1343.

Corbalan-Garcia, S., S.S. Yang, K.R. Degenhardt, and D. Bar-Sagi. 1996. Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Mol Cell Biol.* 16:5674-5682.

Davol, P.A., R. Bagdasaryan, G.J. Elfenbein, A.L. Maizel, and A.R. Frackelton, Jr. 2003. Shc proteins are strong, independent prognostic markers for both node-negative and node-positive primary breast cancer. *Cancer Res.* 63:6772-6783.

Dey, N., C. Williams, B. Leyland-Jones, and P. De. 2015. A critical role for HER3 in HER2-amplified and non-amplified breast cancers: function of a kinase-dead RTK. *American journal of translational research.* 7:733-750.

Di Guglielmo, G.M., P.C. Baass, W.J. Ou, B.I. Posner, and J.J. Bergeron. 1994. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J.* 13:4269-4277.

Ebisuya, M., K. Kondoh, and E. Nishida. 2005. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci.* 118:2997-3002.

Eblen, S.T. 2018. Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to

- Control Biological Outcomes. *Advances in cancer research*. 138:99-142.
- Egan, S.E., B.W. Giddings, M.W. Brooks, L. Buday, A.M. Sizeland, and R.A. Weinberg. 1993. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*. 363:45-51.
- Fagiani, E., G. Giardina, L. Luzi, M. Cesaroni, M. Quarto, M. Capra, G. Germano, M. Bono, M. Capillo, P. Pelicci, and L. Lanfrancone. 2007. RaLP, a new member of the Src homology and collagen family, regulates cell migration and tumor growth of metastatic melanomas. *Cancer Res*. 67:3064-3073.
- Falls, D.L. 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res*. 284:14-30.
- Finetti, F., M.T. Savino, and C.T. Baldari. 2009. Positive and negative regulation of antigen receptor signaling by the Shc family of protein adapters. *Immunol Rev*. 232:115-134.
- Fiorini, M., C. Ballaro, G. Sala, G. Falcone, S. Alema, and O. Segatto. 2002. Expression of RALT, a feedback inhibitor of ErbB receptors, is subjected to an integrated transcriptional and post-translational control. *Oncogene*. 21:6530-6539.
- Fortian, A., and A. Sorkin. 2014. Live-cell fluorescence imaging reveals high stoichiometry of Grb2 binding to the EGF receptor sustained during endocytosis. *J Cell Sci*. 127:432-444.
- Giani, C., P. Casalini, S.M. Pupa, R. De Vecchi, E. Ardini, M.I. Colnaghi, A. Giordano, and S. Menard. 1998. Increased expression of c-erbB-2 in hormone-dependent breast cancer cells inhibits cell growth and induces differentiation. *Oncogene*. 17:425-432.
- Gu, H., H. Maeda, J.J. Moon, J.D. Lord, M. Yoakim, B.H. Nelson, and B.G. Neel. 2000. New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol*. 20:7109-7120.
- Guy, G.R., R.A. Jackson, P. Yusoff, and S.Y. Chow. 2009. Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links? *J Endocrinol*. 203:191-202.
- Hackel, P.O., M. Gishizky, and A. Ullrich. 2001. Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biological chemistry*. 382:1649-1662.



Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga, and E. Nishida. 2002. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol.* 4:850-858.

Hibino, K., T. Shibata, T. Yanagida, and Y. Sako. 2011. Activation kinetics of RAF protein in the ternary complex of RAF, RAS-GTP, and kinase on the plasma membrane of living cells: single-molecule imaging analysis. *J Biol Chem.* 286:36460-36468.

Hibino, K., T.M. Watanabe, J. Kozuka, A.H. Iwane, T. Okada, T. Kataoka, T. Yanagida, and Y. Sako. 2003. Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to cRaf-1 visualized on the plasma membrane of living cells. *Chemphyschem.* 4:748-753.

Hiroshima, M., C.G. Pack, K. Kaizu, K. Takahashi, M. Ueda, and Y. Sako. 2018. Transient Acceleration of Epidermal Growth Factor Receptor Dynamics Produces Higher-Order Signaling Clusters. *J Mol Biol.* 430:1386-1401.

Holgado-Madruga, M., D.R. Emler, D.K. Moscatello, A.K. Godwin, and A.J. Wong. 1996. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature.* 379:560-564.

Ishihara, H., T. Sasaoka, T. Wada, M. Ishiki, T. Haruta, I. Usui, M. Iwata, A. Takano, T. Uno, E. Ueno, and M. Kobayashi. 1998. Relative involvement of Shc tyrosine 239/240 and tyrosine 317 on insulin induced mitogenic signaling in rat1 fibroblasts expressing insulin receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 252:139-144.

Jadwin, J.A., D. Oh, T.G. Curran, M. Ogiue-Ikeda, L. Jia, F.M. White, K. Machida, J. Yu, and B.J. Mayer. 2016. Time-resolved multimodal analysis of Src Homology 2 (SH2) domain binding in signaling by receptor tyrosine kinases. *Elife.* 5:e11835.

Kao, S., R.K. Jaiswal, W. Kolch, and G.E. Landreth. 2001. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem.* 276:18169-18177.

Kholodenko, B.N. 2003. Four-dimensional organization of protein kinase signaling cascades: the roles of diffusion, endocytosis and molecular motors. *J Exp Biol.* 206:2073-2082.

Kholodenko, B.N. 2006. Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat Rev Mol Cell Biol.*

7:165-176.

Kiyatkin, A., E. Aksamitiene, N.I. Markevich, N.M. Borisov, J.B. Hoek, and B.N. Kholodenko. 2006. Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J Biol Chem.* 281:19925-19938.

Kolch, W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:827-837.

Lai, K.M., and T. Pawson. 2000. The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes & development.* 14:1132-1145.

Lake, D., S.A. Correa, and J. Muller. 2016. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell Mol Life Sci.* 73:4397-4413.

Langlois, W.J., T. Sasaoka, A.R. Saltiel, and J.M. Olefsky. 1995. Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *J Biol Chem.* 270:25320-25323.

Lock, L.S., M.M. Frigault, C. Saucier, and M. Park. 2003. Grb2-independent recruitment of Gab1 requires the C-terminal lobe and structural integrity of the Met receptor kinase domain. *J Biol Chem.* 278:30083-30090.

Lock, L.S., C.R. Maroun, M.A. Naujokas, and M. Park. 2002. Distinct recruitment and function of Gab1 and Gab2 in Met receptor-mediated epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 13:2132-2146.

Manning, G., D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298:1912-1934.

Margarit, S.M., H. Sondermann, B.E. Hall, B. Nagar, A. Hoelz, M. Pirruccello, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan. 2003. Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell.* 112:685-695.

Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained

extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 80:179-185.

Mattoon, D.R., B. Lamothe, I. Lax, and J. Schlessinger. 2004. The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol.* 2:24.

Mello, L.V., D.M. van Aalten, and J.B. Findlay. 1997. Comparison of ras-p21 bound to GDP and GTP: differences in protein and ligand dynamics. *Protein Eng.* 10:381-387.

Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 36:320-328.

Montagner, A., A. Yart, M. Dance, B. Perret, J.P. Salles, and P. Raynal. 2005. A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *J Biol Chem.* 280:5350-5360.

Morimatsu, M., H. Takagi, K.G. Ota, R. Iwamoto, T. Yanagida, and Y. Sako. 2007. Multiple-state reactions between the epidermal growth factor receptor and Grb2 as observed by using single-molecule analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:18013-18018.

Mujoo, K., B.K. Choi, Z. Huang, N. Zhang, and Z. An. 2014. Regulation of ERBB3/HER3 signaling in cancer. *Oncotarget.* 5:10222-10236.

Nagashima, T., N. Inoue, N. Yumoto, Y. Saeki, S. Magi, N. Volinsky, A. Sorkin, B.N. Kholodenko, and M. Okada-Hatakeyama. 2015. Feedforward regulation of mRNA stability by prolonged extracellular signal-regulated kinase activity. *Febs j.* 282:613-629.

Nagashima, T., H. Shimodaira, K. Ide, T. Nakakuki, Y. Tani, K. Takahashi, N. Yumoto, and M. Hatakeyama. 2007. Quantitative transcriptional control of ErbB receptor signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation. *J Biol Chem.* 282:4045-4056.

Nagashima, T., R. Ushikoshi-Nakayama, A. Suenaga, K. Ide, N. Yumoto, Y. Naruo, K. Takahashi, Y. Saeki, M. Taiji, H. Tanaka, S.F. Tsai, and M. Hatakeyama. 2009. Mutation of epidermal growth factor receptor is associated with MIG6 expression. *FEBS J.* 276:5239-5251.

Nakakuki, T., N. Yumoto, T. Naka, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and M. Hatakeyama. 2008. Topological analysis of MAPK cascade for kinetic ErbB signaling. *PLoS One.* 3:e1782.

- Nakamura, Y., K. Hibino, T. Yanagida, and Y. Sako. 2016. Switching of the positive feedback for RAS activation by a concerted function of SOS membrane association domains. *Biophys Physicobiol.* 13:1-11.
- Nakamura, Y., N. Umeki, M. Abe, and Y. Sako. 2017. Mutation-Specific Mechanisms of Hyperactivation of Noonan Syndrome SOS Molecules Detected with Single-molecule Imaging in Living Cells. *Sci Rep.* 7:14153.
- Nemoto, S., C.A. Combs, S. French, B.H. Ahn, M.M. Fergusson, R.S. Balaban, and T. Finkel. 2006. The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J Biol Chem.* 281:10555-10560.
- Nepstad, I., K.J. Hatfield, I.S. Grønningsæter, and H. Reikvam. 2020. The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *Int J Mol Sci.* 21.
- O'Neill, E., and W. Kolch. 2004. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer.* 90:283-288.
- Oda, K., Y. Matsuoka, A. Funahashi, and H. Kitano. 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol.* 1:2005 0010.
- Oku, S., T. van der Meulen, J. Copp, G. Glenn, and P. van der Geer. 2012. Engineering NGF receptors to bind Grb2 directly uncovers differences in signaling ability between Grb2- and ShcA-binding sites. *FEBS letters.* 586:3658-3664.
- Olayioye, M.A., A. Badache, J.M. Daly, and N.E. Hynes. 2001. An essential role for Src kinase in ErbB receptor signaling through the MAPK pathway. *Exp Cell Res.* 267:81-87.
- Olayioye, M.A., R.M. Neve, H.A. Lane, and N.E. Hynes. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19:3159-3167.
- Pack, C., K. Saito, M. Tamura, and M. Kinjo. 2006. Microenvironment and effect of energy depletion in the nucleus analyzed by mobility of multiple oligomeric EGFPs. *Biophys J.* 91:3921-3936.

- Pack, C.G., H. Yukii, A. Toh-e, T. Kudo, H. Tsuchiya, A. Kaiho, E. Sakata, S. Murata, H. Yokosawa, Y. Sako, W. Baumeister, K. Tanaka, and Y. Saeki. 2014. Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. *Nat Commun.* 5:3396.
- Park, E.R., S.T. Eblen, and A.D. Catling. 2007. MEK1 activation by PAK: a novel mechanism. *Cell Signal.* 19:1488-1496.
- Park, H., S.S. Han, Y. Sako, and C.G. Pack. 2015. Dynamic and unique nucleolar microenvironment revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *FASEB J.* 29:837-848.
- Pawson, T. 2007. Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Current opinion in cell biology.* 19:112-116.
- Pawson, T., and J.D. Scott. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science.* 278:2075-2080.
- Pelicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, F. Grignani, T. Pawson, and P.G. Pelicci. 1992. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.* 70:93-104.
- Porfiri, E., and F. McCormick. 1996. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by phosphorylation of the ras exchange factor hSOS1. *J Biol Chem.* 271:5871-5877.
- Ravichandran, K.S. 2001. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene.* 20:6322-6330.
- Robinson, D.R., Y.M. Wu, and S.F. Lin. 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 19:5548-5557.
- Rodrigues, G.A., M. Falasca, Z. Zhang, S.H. Ong, and J. Schlessinger. 2000. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 20:1448-1459.
- Rodriguez-Viciano, P., P.H. Warne, A. Khwaja, B.M. Marte, D. Pappin, P. Das, M.D. Waterfield, A. Ridley, and J. Downward. 1997. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell.* 89:457-467.

Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, and D. Bowtell. 1993. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*. 363:83-85.

Rozakis-Adcock, M., J. McGlade, G. Mbamalu, G. Pelicci, R. Daly, W. Li, A. Batzer, S. Thomas, J. Brugge, P.G. Pelicci, J. Schlessinger, T. Pawson, and et al. 1992. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature*. 360:689-692.

Sadaie, W., Y. Harada, M. Matsuda, and K. Aoki. 2014. Quantitative in vivo fluorescence cross-correlation analyses highlight the importance of competitive effects in the regulation of protein-protein interactions. *Mol Cell Biol*. 34:3272-3290.

Sakaguchi, K., Y. Okabayashi, Y. Kido, S. Kimura, Y. Matsumura, K. Inushima, and M. Kasuga. 1998. Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells. *Mol Endocrinol*. 12:536-543.

Santos, S.D., P.J. Verveer, and P.I. Bastiaens. 2007. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol*. 9:324-330.

Sasagawa, S., Y. Ozaki, K. Fujita, and S. Kuroda. 2005. Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol*. 7:365-373.

Sato, K., M. Kimoto, M. Kakumoto, D. Horiuchi, T. Iwasaki, A.A. Tokmakov, and Y. Fukami. 2000. Adaptor protein Shc undergoes translocation and mediates up-regulation of the tyrosine kinase c-Src in EGF-stimulated A431 cells. *Genes Cells*. 5:749-764.

Sato, S., N. Fujita, and T. Tsuruo. 2004. Involvement of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in the MEK/MAPK signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 279:33759-33767.

Saucier, C., H. Khoury, K.M. Lai, P. Peschard, D. Dankort, M.A. Naujokas, J. Holash, G.D. Yancopoulos, W.J. Muller, T. Pawson, and M. Park. 2004. The Shc adaptor protein is critical for VEGF induction by Met/HGF and ErbB2 receptors and for early onset of tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2345-2350.

Saucier, C., V. Papavasiliou, A. Palazzo, M.A. Naujokas, R. Kremer, and M. Park. 2002. Use of signal specific receptor tyrosine kinase oncoproteins reveals that pathways downstream from Grb2 or Shc are sufficient for cell transformation and metastasis. *Oncogene*. 21:1800-1811.

Schaeper, U., N.H. Gehring, K.P. Fuchs, M. Sachs, B. Kempkes, and W. Birchmeier. 2000. Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol*. 149:1419-1432.

Schulze, W.X., L. Deng, and M. Mann. 2005. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol*. 1:2005 0008.

Sharma, S.V., D.W. Bell, J. Settleman, and D.A. Haber. 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 7:169-181.

Smith, M.J., W.R. Hardy, J.M. Murphy, N. Jones, and T. Pawson. 2006. Screening for PTB domain binding partners and ligand specificity using proteome-derived NPXY peptide arrays. *Mol Cell Biol*. 26:8461-8474.

Songyang, Z., S.E. Shoelson, J. McGlade, P. Olivier, T. Pawson, X.R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, H. Hanafusa, T. Yi, and et al. 1994. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol*. 14:2777-2785.

Sparks, A.B., J.E. Rider, N.G. Hoffman, D.M. Fowlkes, L.A. Quillam, and B.K. Kay. 1996. Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1540-1544.

Suen, K.M., C.C. Lin, C. Seiler, R. George, G. Poncet-Montange, A.B. Biter, Z. Ahmed, S.T. Arold, and J.E. Ladbury. 2018. Phosphorylation of threonine residues on Shc promotes ligand binding and mediates crosstalk between MAPK and Akt pathways in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 94:89-97.

Takahashi, M., T. Shibata, T. Yanagida, and Y. Sako. 2012. A protein switch with tunable steepness reconstructed in Escherichia coli cells with eukaryotic signaling proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 421:731-735.

Toker, A., and L.C. Cantley. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-

OH kinase. *Nature*. 387:673-676.

Ursini-Siegel, J., W.R. Hardy, Y. Zheng, C. Ling, D. Zuo, C. Zhang, L. Podmore, T. Pawson, and W.J. Muller. 2012. The ShcA SH2 domain engages a 14-3-3/PI3'K signaling complex and promotes breast cancer cell survival. *Oncogene*. 31:5038-5044.

Ursini-Siegel, J., W.R. Hardy, D. Zuo, S.H. Lam, V. Sanguin-Gendreau, R.D. Cardiff, T. Pawson, and W.J. Muller. 2008. ShcA signalling is essential for tumour progression in mouse models of human breast cancer. *EMBO J*. 27:910-920.

Ursini-Siegel, J., and W.J. Muller. 2008. The ShcA adaptor protein is a critical regulator of breast cancer progression. *Cell Cycle*. 7:1936-1943.

van der Geer, P., S. Wiley, G.D. Gish, and T. Pawson. 1996. The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions. *Curr Biol*. 6:1435-1444.

Vanhaesebroeck, B., and D.R. Alessi. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 346 Pt 3:561-576.

Vanhaesebroeck, B., S.J. Leever, G. Panayotou, and M.D. Waterfield. 1997. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*. 22:267-272.

Vojtek, A.B., and C.J. Der. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem*. 273:19925-19928.

Wang, Q., X. Chen, and Z. Wang. 2015. Dimerization drives EGFR endocytosis through two sets of compatible endocytic codes. *J Cell Sci*. 128:935-950.

Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:875-885.

Widmann, C., S. Gibson, M.B. Jarpe, and G.L. Johnson. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*. 79:143-180.

Wills, M.K., and N. Jones. 2012. Teaching an old dogma new tricks: twenty years of Shc adaptor



signalling. *Biochem J.* 447:1-16.

Yoshizawa, R., N. Umeki, M. Yanagawa, M. Murata, and Y. Sako. 2017. Single-molecule fluorescence imaging of RalGDS on cell surfaces during signal transduction from Ras to Ral. *Biophys Physicobiol.* 14:75-84.

Zang, M., C. Hayne, and Z. Luo. 2002. Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem.* 277:4395-4405.

Zhang, X., J. Gureasko, K. Shen, P.A. Cole, and J. Kuriyan. 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 125:1137-1149.

Zhang, X., K.A. Pickin, R. Bose, N. Jura, P.A. Cole, and J. Kuriyan. 2007. Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature.* 450:741-744.

Zheng, Y., C. Zhang, D.R. Croucher, M.A. Soliman, N. St-Denis, A. Pasculescu, L. Taylor, S.A. Tate, W.R. Hardy, K. Colwill, A.Y. Dai, R. Bagshaw, J.W. Dennis, A.C. Gingras, R.J. Daly, and T. Pawson. 2013. Temporal regulation of EGF signalling networks by the scaffold protein Shc1. *Nature.* 499:166-171.