

学位論文

転写抑制補因子 CtBP を介した新規
ERK 基質分子 MCRIP1 による上皮間葉
転換制御機構の解明

(The regulation mechanism of epithelial
mesenchymal transition by a novel ERK
substrate, MCRIP1 (MAPK-regulated
Co-Repressor Interacting Protein 1)
mediating transcriptional co-repressor CtBP)

平成 27 年 1 月 博士 (理学) 申請
東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻
市川 研史

目次

第 1 章 概要	..3
第 2 章 序論	
1. シグナル伝達	..5
2. MAP キナーゼカスケード	..5
3. MAP キナーゼカスケードの特異性	..6
4. ERK MAP キナーゼ経路	..7
5. ERK MAP キナーゼ	..8
6. ERK 経路の恒常的活性化と疾患の関係	..9
7. 上皮間葉転換 (EMT) と TGF β 経路	..9
8. EMT 誘導因子 TGF β	..11
9. TGF β 経路と ERK 経路の関係	..11
10. EMT 誘導時の遺伝子発現制御機構	..12
11. 転写抑制補因子 CtBP	..13
第 3 章 結果	
1. 新規 ERK 基質分子 MCRIP1 の同定	..16
2. MCRIP1 アミノ酸配列解析	..18
3. MCRIP1 抗体の作製と MCRIP1 の発現解析	..19
4. MCRIP1 は ERK によって特異的にリン酸化される	..20
5. MCRIP1 S21 と T30 は ERK によってリン酸化される	..22
6. MCRIP1 は CtBP と直接的に結合する	..25
7. MCRIP1 は CtBP と共局在し、CtBP の機能を阻害する	..27
8. MCRIP1 のリン酸化は CtBP と MCRIP1 との結合を抑制する	..29
9. MCRIP1 P \times DLS サイトは CtBP との結合に重要である	..31
10. MCRIP1 は ZEB1 と CtBP の結合を競合的に阻害する	..33
11. MCRIP1 は CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在を 阻害する	..35
12. ERK のキナーゼ活性は、EMT 誘導に必須である	..36

13. CtBP と安定に結合する MCRIP1 AA 変異体は ERK 過剰発現 による EMT 誘導を阻害する	..38
14. EMT が誘導された細胞株は運動能と浸潤能が亢進する	..40
15. MCRIP1 は E-カドヘリン遺伝子のクロマチン構造を制御する	..42
16. MCRIP1 は TGF β で誘導される EMT を制御する	..44
17. まとめ : MCRIP1 は CtBP の機能を阻害する事により、 ヒストンの翻訳後修飾を制御する	..46
第 4 章 考察	
1. E-カドヘリン以外の標的遺伝子の解明	..47
2. MCRIP1 の発現制御機構の解明	..47
3. MCRIP1 と ERK2 との結合様式の解明	..48
4. MCRIP1 のリン酸化による CtBP との結合親和性の消失の解明	..48
5. MCRIP1 の生理機能の解明	..49
第 5 章 材料及び実験方法	..50
第 6 章 謝辞	..56
第 7 章 参考文献	..57

第 1 章 概要

上皮間葉転換 (EMT) は、上皮細胞が間葉系細胞へと形態変化する現象であり、発生、創傷治癒などの生理機能に重要な役割を果たしている。EMT が誘導された細胞は、E-カドヘリン遺伝子の発現が低下して上皮組織から離脱し、周囲の組織に遊走・浸潤する。最近、癌細胞における EMT 誘導が、癌の転移能獲得に寄与することが見出された。従って、EMT の制御機構および E-カドヘリン遺伝子の発現抑制機構を解明することは、様々な生理現象の理解に重要であると考えられる。

近年、癌細胞で観察される EMT の一因として、ERK MAPK 経路の活性化が重要である事が報告された。しかしこの時、ERK がどのようなタンパク質分子をリン酸化し、遺伝子発現制御を行っているかは不明である。一方で、E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に、転写抑制補因子である CtBP が寄与する事が知られている。CtBP は、ZEB などの転写抑制因子と結合し、E-カドヘリン遺伝子の発現を抑制する。この様に EMT の誘導には、ERK と CtBP の両分子が寄与するが、これらがどの様にして相互作用するかに関しては、これまでに全く知見がない。

そこで、ERK 基質分子の探索を行った結果、新たな基質分子 MCRIP1 (MAPK-regulated Co-Repressor Interacting Protein1) を単離する事に成功した。さらに MCRIP1 の生理機能解析を行い、MCRIP1 が CtBP と結合して、CtBP が有する転写抑制補因子としての作用を阻害する機能を持つことを明らかにした。興味深い事に、ERK により MCRIP1 がリン酸化されると、MCRIP1 が CtBP から解離して CtBP の転写抑制能が回復し、E-カドヘリンの発現が阻害されることを見出した。一方、ERK でリン酸化されない MCRIP1 点変異体を発現する細胞では、ERK 依存的な EMT 誘導がほぼ完全に抑制されて E-カドヘリンの発現が亢進した。さらに、TGF β 刺激で EMT を誘導しても、ERK でリン酸化されない MCRIP1 点変異体を発現する細胞では、E-カドヘリンの発現が維持され、EMT 誘導が阻害される事を明らかにした。以上の結果から、MCRIP1 は CtBP の機能を阻害しているが、EMT 誘導時には活性化した ERK により MCRIP1 の CtBP 阻害機能が抑制される事が明らかとなった。

Abstract

EMT is an important physiological event in developmental processes, tissue reorganization and cancer *metastasis*. *When EMT is induced, epithelial cells detach from the epithelial tissue and acquire migratory properties, as the expression of the epithelial cell adhesion protein E-cadherin is repressed.* Thus, elucidating the mechanism of E-cadherin gene repression during EMT is essential for understanding of normal developmental processes as well as cancer *metastasis*.

Recently, it was reported that hyper-activation of the ERK pathway, by oncogenic Ras or by over-expression of ERK2, induces EMT and repression of E-cadherin in some cell lines. It is also known that the transcriptional co-repressor CtBP is involved in suppressing the E-cadherin gene expression during EMT. Although both ERK and CtBP repress E-cadherin expression and induce EMT, their functional relationship, if any, was unknown. For this thesis study, I hypothesized that a mediator would exist between ERK signaling and CtBP in the EMT regulation.

I first screened for human ERK substrates, and identified MCRIP1 (MAPK-regulated Co-Repressor Interacting Protein 1). MCRIP1 was selectively phosphorylated by ERK. Furthermore, MCRIP1 interacted with CtBP, thereby inhibiting the function of CtBP as a transcriptional co-repressor. Interestingly, ERK-dependent MCRIP1 phosphorylation disrupted the MCRIP1-CtBP interaction. Finally, I found that an MCRIP1 mutant that cannot be phosphorylated by ERK stably binds to CtBP, inhibits the repressor function of CtBP, keeps E-cadherin expression at a high level, and inhibits EMT induced by ERK. From these results, I conclude that MCRIP1 is a novel regulator of EMT that mediates the functional interaction between ERK signaling and CtBP.

第2章 序論

1. シグナル伝達

多細胞生物は、細胞間で情報をやり取りする事により、様々な環境に適応している。例えば、隣接する細胞間では、ギャップ結合などの細胞間接着結合を介して情報を伝達する事で、協調して代謝応答する事が知られている。また、生体内では離れた細胞同士で情報のやり取りをする。個体の中ではこうした情報は、増殖因子、ホルモン、サイトカインあるいは疎水性シグナル分子（ステロイド、レチノイドなど）としてシグナル伝達細胞より放出される。これらの分子は、血液やリンパ液などを介して標的細胞へと伝達される。こうした標的細胞が外部からの情報を捉えるために、細胞膜上あるいは細胞内に受容体を発現している。受容体には、リガンドに応じて様々なタイプがあり、細胞膜上で発現している代表的な受容体として G タンパク質共役型受容体、受容体型チロシンキナーゼ、ヘッジホッグ受容体、TGFβ受容体、Notch 受容体などがある。いずれの受容体もリガンドの結合によって細胞内の様々なシグナル伝達分子を活性化し、多くの場合情報は核内へと伝えられ、最終的に遺伝子発現や細胞周期などを制御する。以上のようにして、外部からの情報を遺伝子発現という形で出力する事により、標的細胞は増殖、分化、細胞死などの応答を示す。

2. MAP キナーゼカスケード

MAP キナーゼカスケードは、真核生物で高度に保存されたリン酸化シグナル伝達経路である。ヒトの MAP キナーゼ経路には大きく分類すると増殖刺激によって活性化する ERK 経路と、炎症性サイトカインやストレス刺激などによって活性化する p38 経路および JNK 経路が存在する^{1,2} (Fig.1)。いずれの経路も

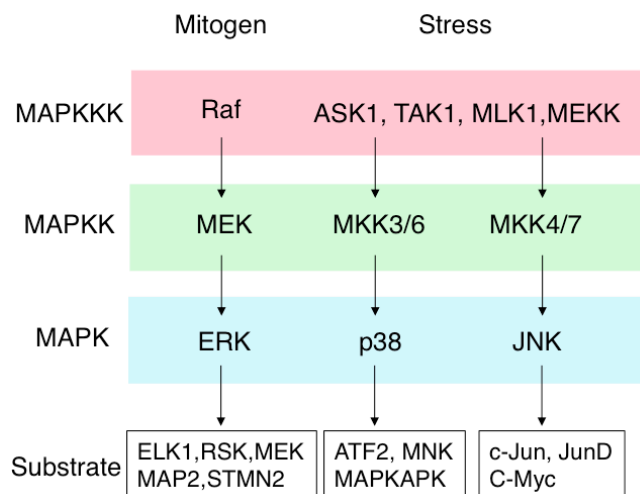


Fig.1 MAP キナーゼカスケード

MAPKK キナーゼ (MAPKKK)、MAPK キナーゼ (MAPKK)、MAP キナーゼ

(MAPK) により構成されており、刺激後速やかに活性化する。各 MAP キナーゼは、細胞質や核内に存在するそれぞれに特異的な基質分子をリン酸化する事で、遺伝子発現やタンパク質の合成を制御している。

MAP キナーゼのサブドメイン VII と VIII の間に存在している活性化ループ内には、保存されたスレオニン残基とチロシン残基がある。各 MAP キナーゼに特異的な MAPK キナーゼ (MEK 及び MKK) は、これらのスレオニン残基とチロシン残基をリン酸化し、活性化を誘導する³。

活性化した MAP キナーゼは Ser-Pro あるいは、Thr-Pro というアミノ酸配列のセリンあるいはスレオニン残基をリン酸化する^{4,5}。リン酸化されるセリン、スレオニン残基の直後にプロリン残基が存在している事が、MAP キナーゼのリン酸化コンセンサス配列の特徴である。活性化状態の ERK2 の構造解析により、リン酸化された活性化ループ内のチロシン残基 (pThr-Glu-pTyr) が基質結合ポケットを占有しており、プロリン残基がはまり易い構造になっているために、MAP キナーゼはプロリン指向性であることが知られている⁶。

3. MAP キナーゼカスケードの特異性

これら複数の類似した MAPK カスケードがシグナルの混線を起こさない理由として、大きく 2 つが明らかにされている。

1 つ目は、足場タンパク質による経路構成因子の制御である。足場タンパク質は特定の経路の構成因子と結合する事により、カスケード間の混線を防止すると同時に細胞内に分散している構成因子を効率的に局所に集合させる機能があると考えられている^{7,8}。例えば KSR は ERK 経路の構成因子の足場タンパク質として、ERK 経路を時空間的に制御することが知られている⁹。

2 つ目は酵素と基質の結合特異性である。キナーゼドメイン内の対応する位置に ERK は Thr-Thr (TT サイト)、p38 は Glu-Asp (ED サイト) というアミノ酸配列を有している (Fig.2)。このサイトを異なるキナーゼのサイトで置換すると、ERK は p38 に特異的な結合分子と、p38 は ERK に特異的な結合分子と結合できるようになる¹⁰。したがって、ERK の TT サイトと p38 の ED サイトは、それぞれの

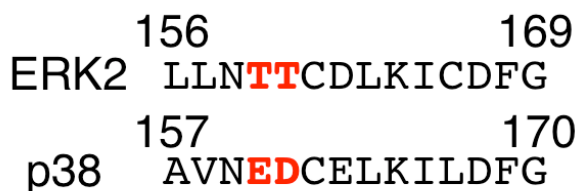


Fig.2 ERK2、p38 の基質特異性を規定するサイト領域

基質分子を区別するために重要であると考えられている。

さらに、ERKは基質分子の Phe-X-Phe-Pro という特異的なアミノ酸配列に結合する事が知られており、この結合様式は p38 や JNK にはない特徴的なものである^{11, 12, 13}。

各 MAP キナーゼとそれぞれの基質の特異性という意味での重要性はそれほど高いと考えられてはいないが、ERK、p38、JNK はいずれも CD ドメイン (Conserved Docking ドメイン) というドッキングドメインを有している (Fig.4)。CD ドメインは、アスパラギン酸やグルタミン酸などの負電荷を持つアミノ酸と疎水性のアミノ酸とから成り立っている。一方で、結合分子 (MAPK キナーゼ、ホスファターゼなど) にはリジンやアルギニンなどの正電荷を持つアミノ酸と疎水性のアミノ酸から成り立っている D ドメインがある。したがって、MAP キナーゼと基質分子との結合は、静電相互作用と疎水性相互作用により強まる事が明らかになっている^{14, 15}。

4. ERK MAP キナーゼ経路

ERK 経路は、細胞増殖刺激によって活性化するリン酸化シグナル伝達経路である。このシグナル伝達経路は MAPKKK である Raf、MAPKK である MEK、MAPK である ERK により構成されている。ERK 経路が活性化されるメカニズムの概要は以下の様である。

増殖因子の作用によって二量体化した受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、細胞質側のキナーゼドメインがトランスに自己リン酸化を誘導する。このリン酸化部位にアダプタータンパク質である Grb2 が SH2 ドメインを介して結合する。さらに、Grb2 は SH3 ドメインを介して SOS と結合して、SOS の細胞膜局在を安定化させる。SOS は、細胞膜に局在する低分子量 GTPase である Ras を活性型に変換する。活性化した Ras は MAPKKK

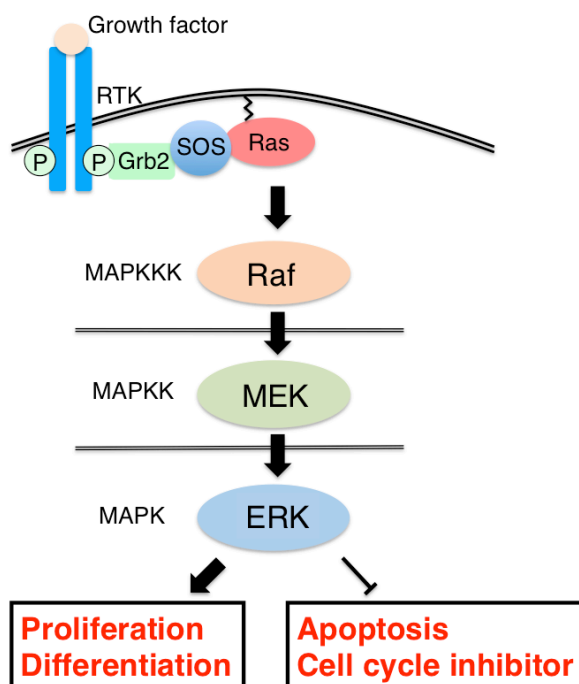


Fig.3 ERK 経路の活性化メカニズム

である Raf を活性化し、Raf は MEK を、MEK は ERK をリン酸化する事によって活性化する。このようにして、活性化した ERK は細胞質や核内の様々な基質分子をリン酸化する事により、細胞周期の進行に関わる遺伝子発現を亢進させる¹⁶。一方で、ERK 経路の活性化によって、アポトーシスやチェックポイントに関与する遺伝子の発現が抑制される事が明らかにされている¹⁷ (Fig. 3)。

しかしながら、ERK 下流の遺伝子発現制御機構は不明な点が数多く存在している。特に、ERK の活性化によって上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal transition, EMT) が誘導される事が報告されているが^{18, 19, 20}、EMT 誘導時における ERK による遺伝子発現制御機構はほとんど明らかにされていない。

5. ERK MAP キナーゼ

ヒト ERK MAP キナーゼである ERK1 と ERK2 は、84%の相同性を持ち、ERK1 は 379 アミノ酸、ERK2 は 360 アミノ酸から構成されている (Fig. 4)。ERK1/2 はともに、MAPK キナーゼである MEK1/2 により活性化され、細胞増殖や分化に機能する事が知られている。いずれも同様の基質分子をリン酸化する事が知られているが、必ずしも ERK1 と ERK2 が機能的に補完関係にないことがノックアウトマウスの解析により明らかにされている。すなわち、ERK2 ノックアウトマウスが胎生致死である一方で、ERK1 ノックアウトマウスでは胎生致死にはならず、個体も正常な大きさであるが、胸腺細胞の成熟が著しく減少する^{21, 22, 23}。また近年、乳腺上皮細胞の EMT 誘導に ERK2 が重要である事が報告されている²⁰。しかし、ERK1 によっては EMT が誘導されない。したがって、両分子が必ずしも機能的に補完してはならず、ERK1 と ERK2 の2つのホモログが存在している意義が徐々に明らかにされてきている。

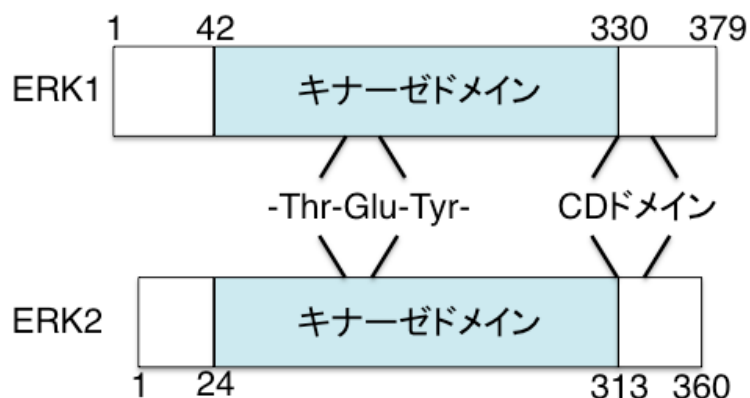


Fig.4 ERK1/2 の一次構造

6. ERK 経路の恒常的活性化と疾患の関係

ERK 経路の上流に位置する Ras はヒトの癌のおよそ 30% で変異が確認されている²⁴。さらに、ERK 経路の MAPKK キナーゼである Raf はヒトの癌のおよそ 7% で活性型の変異が確認されている²⁵。BRAF の活性型変異は 70% の悪性黒色腫、40% の甲状腺がん、30% の卵巣がん、20% の大腸がんで発見されている²⁶。

また、MEK の変異は先天的奇形症候群である Costello 症候群、Noonan 症候群、Cardio-Facio-Cutaneous 症候群で発見されている²⁷。これらの疾患では ERK-MAPK 経路の恒常的な活性化が観察されており、高い発癌率を示す。

以上のように、ERK 経路構成因子の活性型変異は悪性癌で多くの報告があり、ERK 経路が癌細胞の増殖や生存のみならず、運動能や浸潤能などのがん転移機構にも関与している事が予想されている。

7. 上皮間葉転換 (EMT) と TGF β 経路

上皮間葉転換 (EMT) は上皮細胞が間葉系細胞に分化する現象である。隣接する細胞同士の細胞間接着結合 (密着結合、接着結合、デスモソーム結合、ギャップ結合) は、細胞外部の環境を局所で隔てており、これが上皮細胞に極性を与えている。EMT 誘導シグナルを受容した上皮細胞では、細胞間接着結合分子の分解や遺伝子発現抑制がおこり、隣接する細胞との接着能を消失する。その結果、上皮細胞組織から離脱し、マトリクスメタロプロテアーゼの活性化により、運動能や浸潤能が亢進する²⁸ (Fig. 5)。

EMT は発生段階における原始線条形成において、その現象が提唱された²⁹。現在では、形態形成のみならず、創傷治癒、線維症にも重要である事が報告されている。さらに、

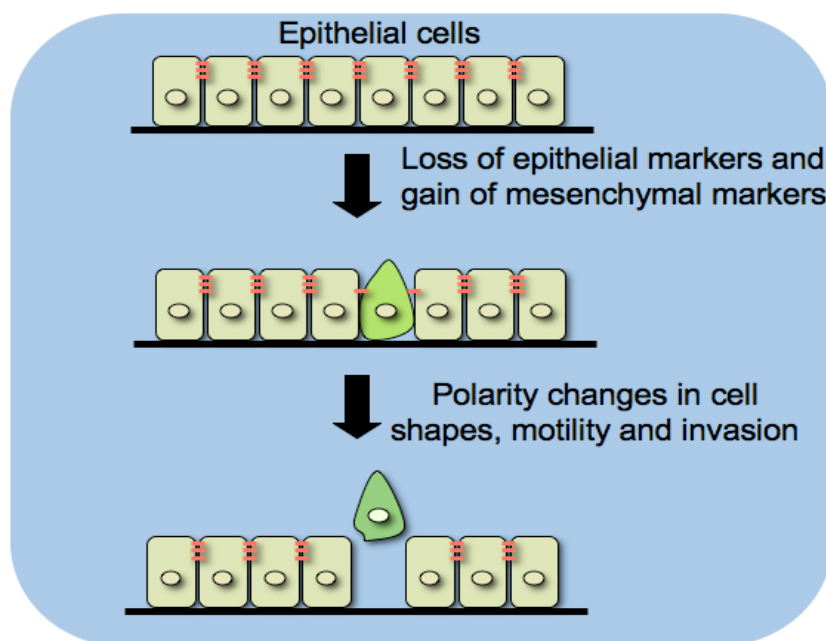


Fig.5 上皮間葉転換 (EMT) の概要

EMT が癌の転移過程において重要である事が明らかにされている³⁰。

EMT 誘導の分子メカニズムは様々な培養細胞を用いた実験で明らかになってきた。その中で、TGFβが EMT 誘導のキーファクターである事が明らかにされた³¹。TGFβ受容体は主に I 型、II 型、III 型が存在しているが、III 型は細胞質側にキナーゼドメインを持たず、TGFβを I 型、II 型受容体に効率よく結合させる機能を有している。TGFβの結合によって I 型と II 型の受容体がヘテロ四量体を形成すると、II 型受容体が I 型受容体のセリンリッチ領域をリン酸化する事で、I 型受容体のキナーゼ活性を亢進させる³² (Fig.6)。活性化した I 型受容体は、細胞内の Smad2/3 タンパク質をリン酸化する^{33, 34}。リン酸化された Smad2/3 は、Smad4 と三量体を形成し、核内へと移行し、標的遺伝子の発現を調節する。特に Smad 複合体は ZEB ファミリーなどの転写抑制因子の遺伝子発現を亢進する事により、細胞間接着結合を介在する E-カドヘリン遺伝子の発現抑制を起こす事が知られている。EMT 誘導に伴い、E-カドヘリン遺伝子の発現が極端に減少するため、E-カドヘリンは EMT の重要な分子マーカーとなっているが、これ以外にも様々な遺伝子発現パターンのスイッチが起こり上皮細胞としての特徴が消失される (Table.1)。

さらに、EMT が可逆的な現象である事が分かっている。EMT 誘導により間葉系細胞に分化した細胞が再び上皮系の遺伝子発現パターンにスイッチする事が報告されており、これを間葉上皮転換 (MET) という。MET も体節形成

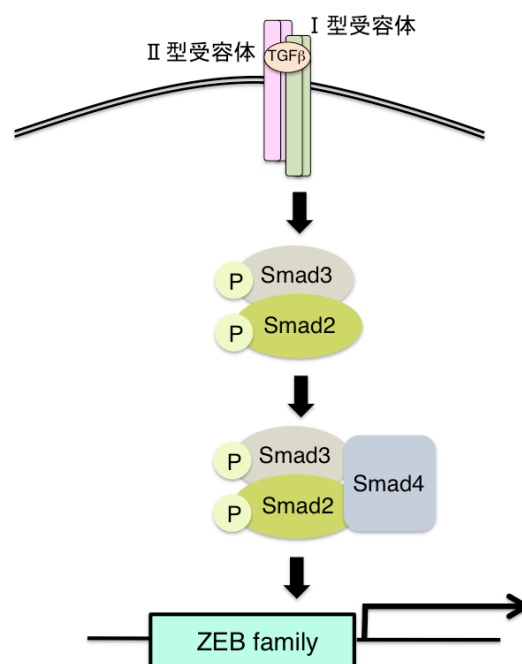


Fig.6 TGFβシグナル伝達経路

Table.1 上皮細胞と間葉系細胞で特異的に発現している遺伝子

	上皮細胞	間葉系細胞
E-cadherin	+	-
Claudin	+	-
Desmoplakin	+	-
ZO1	+	-
Fibronectin	-	+
Vimentin	-	+
N-cadherin	-	+
ZEB	-	+
Twist	-	+

や肝臓形成など数多くの器官形成において重要であるとされている³⁵。さらには、原発巣から転移した癌細胞が転移した組織に生着するために MET が関与している可能性が示唆されている。

8. EMT 誘導因子 TGFβ

TGFβは、細胞の増殖抑制、分化誘導、細胞死など様々な作用を及ぼす事が知られている。TGFβにはアミノ酸配列に 70~80%の相同性を有する5つのアイソフォームの存在が知られている。細胞外に分泌された TGFβは、N 末側のシグナル配列とプロドメインが切断されると、C 末側がジスルフィド結合によってホモ二量体を形成し、これが成熟 TGFβとして、受容体に結合する^{36, 37, 38}。TGFβは増殖抑制に関与する事が知られてきたが、癌細胞によっては増殖促進に働き、EMT 誘導により運動能や浸潤能を亢進させる事が癌細胞を悪性化する原因であると考えられている³⁹。

9. TGFβ経路と ERK 経路の関係

最近では、ERK 経路も EMT 誘導に重要である事が知られている¹⁸。ERK 経路は、RTK からのシグナル伝達と比較すると微弱であるが、TGFβ受容体からも活性化される事が報告されている⁴⁰。Fig.7 に示すように、活性化された TGFβ I 型受容体は、アダプタータンパク質である Shc のチロシン残基をリン酸化する。その結果、リン酸化されたチロシン残基に Grb2 がリクルートされ、以下 RTK からのシグナル

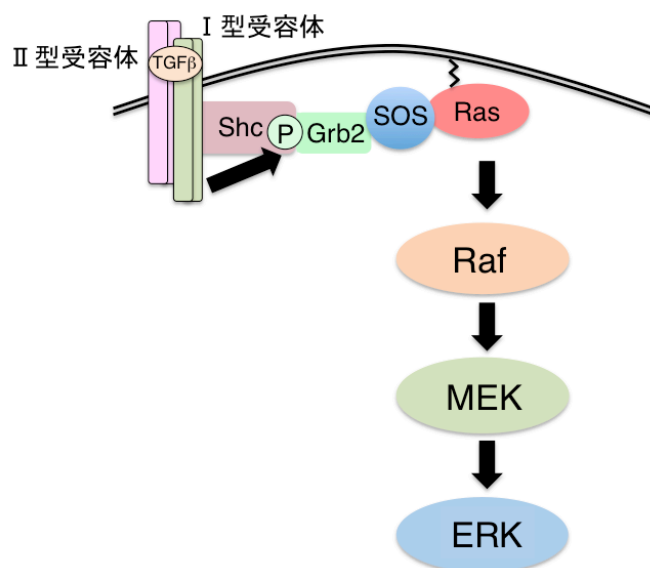


Fig.7 TGFβ受容体に活性化される ERK 経路

伝達と同様の分子メカニズムによって ERK 経路を活性化する。TGFβ刺激と同時に MEK 阻害剤 U0126 を添加すると、乳腺 (NMuMG 細胞) や尿管 (MCT 細胞) に由来する培養細胞の EMT 誘導が抑制される^{18, 19, 41}。さらに、乳腺上皮細胞 (MCF10A 細胞) に ERK2 を過剰発現する事で、E-カドヘリンの発現が抑制され、EMT が誘導される²⁰。以上のように、EMT 誘導時における E-カドヘ

リン遺伝子の発現抑制に ERK 経路が重要な役割を果たしているが、その分子メカニズムは分かっていない。

10. EMT 誘導時の遺伝子発現制御機構

細胞が増殖や分化を誘導するシグナルを受容すると、それまでに発現していた遺伝子パターンが変化する。このとき、遺伝子は転写活性化因子あるいは転写抑制因子によって制御を受ける。

EMT 誘導時に限って言えば、極性の維持や細胞間接着結合を介在する遺伝子の発現は急激に抑制される。一方で、細胞の形態変化をもたらす細胞骨格や中間系フィラメントの発現が亢進する。この際に、様々な転写制御因子が関与している。ZEB (Zinc-finger E-box binding homeobox) は、EMT 誘導に機能しており、細胞の運動能や浸潤能の獲得に寄与している事が知られている。ZEB は E-カドヘリン遺伝子プロモーターの E2 ボックスに直接的に結合し、遺伝子発現を抑制する事が知られている^{42, 43}。さらに、転写抑制補因子 CtBP と結合し、協調的に遺伝子発現抑制に関与している事も分かっている⁴⁴。

しかし、遺伝子発現は転写制御因子によってのみ制御されているのではなく、ヒストンの翻訳後修飾によっても制御を受けている。ヒストンは DNA との相互作用により、クロマチン構造を規定している。H2A、H2B、H3、H4 と名付けられたヒストンはおよそ 120 アミノ酸からなるタンパク質であり、いずれも正に荷電した塩基性アミノ酸を多く有しており、負に荷電した DNA と相互作用する。ヒストン八量体 (H2A、H2B、H3、H4)₂ がヌクレオソームのコアとなり、DNA と相互作用する事によりクロマチン構造を形成する。いずれのヒストンもアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など多彩な翻訳後修飾を受ける事によって、DNA との相互作用が制御され、クロマチン構造の変化を引き起こす^{45, 46, 47} (Fig. 8)。E-カドヘリン遺伝子も同様に、ヒストンの翻訳後修飾によりクロマチン構造が制御されている。特に、E-カドヘリン遺伝子の発現が亢進している場合は、ヒストン H3 は 9 番目のリジン残基が主にアセチル化修飾されて、DNA との相互作用が阻害される。一方で、遺伝子発現が阻害されている場合には、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基はメチル化修飾されて、クロマチン構造が凝集し、転写活性化因子や RNA ポリメラーゼと DNA との相互作用が抑制される⁴⁸。したがって、ヒストン修飾は E-カドヘリン遺伝子発現のエピジェネティックな制御に重要である事が分かっている。

ヒストンH2A SGRGKQGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNV

ヒストンH2B PEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQQKDSKRRKRSRKESYSV

ヒストンH3 ARTKQTAR⁹STGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPH

ヒストンH4 SFRFKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIRRLAR

赤:リン酸化
橙:アセチル化
青:メチル化
緑:アセチル化、メチル化

Fig.8 ヒストンの翻訳後修飾

11. 転写抑制補因子 CtBP

EMT 誘導時に、E-カドヘリン遺伝子と相互作用するヒストンの翻訳後修飾には CtBP という転写抑制補因子が関与している。

CtBP は、アデノウイルス由来の E1A タンパク質に結合する分子として同定された⁴⁹。ヒトには相同性の高い CtBP1 と CtBP2 が有る。2つに機能的な差異はほとんど明らかにされていないものの、CtBP2 だけをノックアウトしたマウスが胎生致死である事が分かっている⁵⁰。

CtBP は転写抑制因子 ZEB1 と結合し、協調して E-カドヘリン遺伝子の発現を抑制する事⁴⁴、CtBP と ZEB1 の結合が ERK の活性化により亢進する事などが知られている⁵¹。

さらに CtBP 結合タンパク質のスクリーニング実験によって、転写抑制因子

Table.2 CtBP 結合タンパク質

Transcriptional repressor	ZEB1 RREB1 ZNF217 Evi1 KLF8
Histone modification	G9a GLP LSD1 HDAC
Corepressor	CoREST LCoR

のみならず、ヒストン修飾酵素 (Histone Deacetylase, HDAC や Histone methyltransferase, HMTase など)とも結合する事が明らかにされ、CtBP が転写抑制因子とヒストン修飾酵素の結合を仲介して転写抑制複合体のコアとなる事が分かっている⁵²

(Table. 2 前頁)。CtBP には DNA 結合能がなく、単独で遺伝子発現を抑制する事はできないが、DNA 結合能を持つ ZEB と結合する事によって、ヒストン修飾酵素を E-カドヘリン遺伝子にリクルートし、エピ

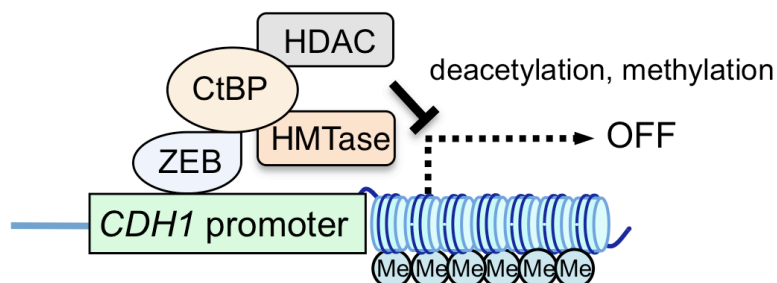


Fig.9 CtBP は ZEB により E-カドヘリン遺伝子近傍に局在し、ヒストン修飾酵素をリクルートする

ジェネティックに遺伝子発現を抑制する (Fig. 9)。

CtBP とその結合分子との結合様式には特徴がある。CtBP 結合分子の多くは PxDSL というアミノ酸配列を有しており (Fig. 10)、この配列に変異を導入すると CtBP との結合が減弱する事が知られている^{44, 53, 54}。ZEB などの転写抑制因子は PxDSL サイトを介して CtBP と結合しているが、ヒストン修飾酵素は PxDSL 配列を持たず、別の結合様式によって CtBP と結合していると考えられている。

CtBP の N 末側には PxDSL 結合ドメインがあり、このドメインが PxDSL サイトとの結合に重要である事が構造生物学的に明らかにされた⁵⁵。さらに、この結合サイトに点変異 (A52E、V66R)を導入すると、PxDSL 配列との結合が顕著に減弱する事が明らかにされている⁵⁵ (Fig. 11)。

ZEB1(731-741)	PLDLS
RREB1(931-941)	PIDLs
ZNF217(104-114)	PLDKS
Pinin(525-535)	PEDLS
BKLF3(83-93)	PVDLS
<hr/>	
<i>Consensus</i>	<i>PXDSL</i>

Fig.10 CtBP 結合コンセンサス配列

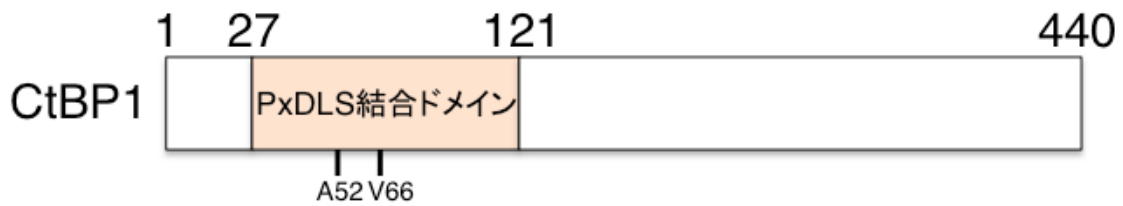


Fig.11 CtBP1 の一次構造

CtBP は、EMT 誘導時に発現が消失する E-カドヘリン遺伝子の発現抑制のみならず⁵⁶、p21、Noxa、Bax などチェックポイント機構やアポトーシスに関連する遺伝子の発現抑制にも関与する^{57, 58, 59}。しかし、その際にどのような転写抑制因子によって標的遺伝子にリクルートされるかなどの具体的な分子メカニズムは明らかにされていない。

以上のように、EMT 誘導時に TGFβ刺激依存的に ERK 活性が亢進する事、また EMT 誘導時に CtBP が E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に寄与している事が分かっている。CtBP による E-カドヘリン遺伝子の発現抑制機構は明らかにされつつあるが、ERK がどのように EMT 誘導時における E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に関与しているのかは不明である。そこで、ERK と CtBP を仲介する分子が存在し、E-カドヘリン遺伝子の発現制御を担っているのではないかと考えた。EMT 誘導時における ERK 経路の細胞機能制御機構を解明すべく、始めに ERK 新規基質分子の探索を行った。

本研究では新規 ERK 基質分子として MCRIP1 を同定し、これが CtBP と結合する事を明らかにした。さらに、MCRIP1 が ZEB と CtBP との結合を競合阻害する事により、CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害している事を解明した。また、この分子メカニズムが EMT の制御に重要である事を明らかにした。

第3章 結果

1. 新規 ERK 基質分子 MCRIP1 の同定

EMT 誘導時における ERK 下流の遺伝子発現制御機構を解明する事を目的として、ERK 基質分子の探索を酵母スリーハイブリッド法により行った。実験の原理は以下の様である。ERK は Ser-Pro あるいは Thr-Pro というアミノ酸配列をリン酸化するプロリン指向性のセリンスレオニンキナーゼである⁶。そこで、ベイトには PLK2 の Polo box ドメインを利用した (Fig.12 a)。この Polo box ドメインはリン酸化された Ser-Pro あるいは Thr-Pro に結合する事が知られている^{60, 61, 62} (Fig.12 b)。

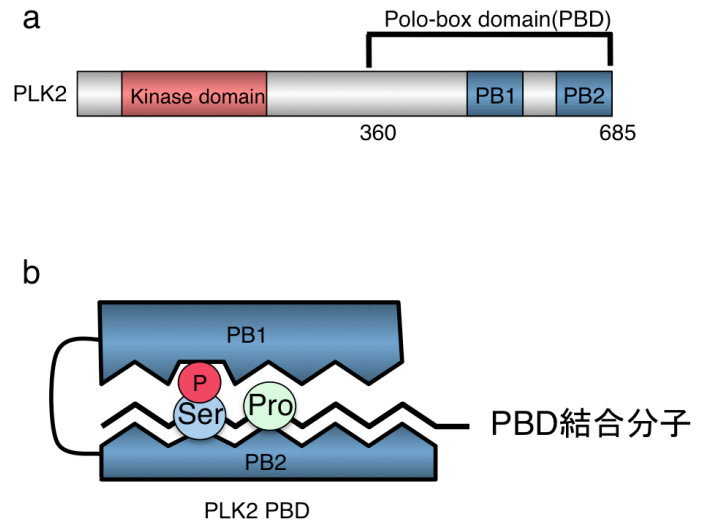


Fig.12 PLK2 と Polo ボックスドメインの結合様式

(a) PLK2 一次構造

(b) Polo ボックスドメインの結合様式

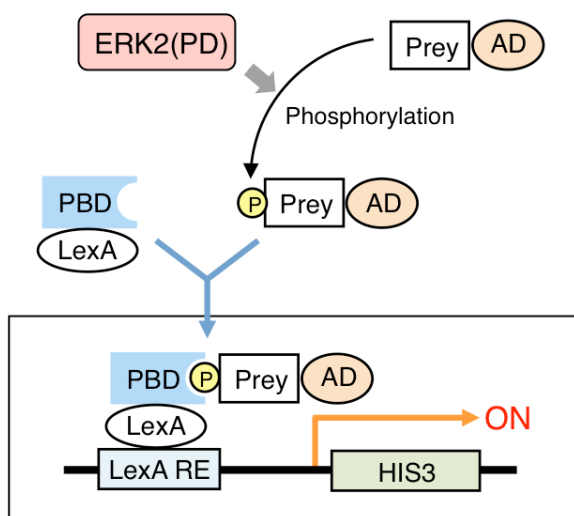


Fig.13 酵母スリーハイブリッド法の模式図

ERK リン酸化コンセンサス配列と Polo box ドメイン結合配列とが共通である事を利用し、スクリーニング実験を行った。

酵母細胞に Polo box ドメイン (PBD) 発現ベクター、ERK2 恒常的活性型変異体 (ERK2 PD) 発現ベクター、及び cDNA (肝臓、脳、胎盤由来) ライブラリーを遺伝子導入した。酵母細胞内で発現した cDNA ライブラリー由来のタンパク質 (図中 白四角 Prey) が ERK 基質分子であった場合には、

共発現させた活性型 ERK2 によってリン酸化される。その結果、ベイトである Polo box ドメインに結合し、LexA の転写活性が亢進する。最終的に、レポーター遺伝子である His3 遺伝子の発現が誘導され、His 欠損培地上で生育可能となる (Fig. 13)。His 欠損培地上で生育した酵母細胞からプラスミドを精製し、cDNA をコードする ORF 領域のみを特異的に PCR で増幅し、その配列を解読した。およそ 3.75×10^5 個の cDNA をスクリーニングした結果、ERK 基質分子の候補として、USP11、STMN2、CIB など、複数の分子を同定した (Table. 3)。これらの候補分子の内、CIB は既に PLK2 の結合分子として報告されており、また STMN2 (Stathmin-like 2) は ERK の基質分子として報告されている事から^{63, 64}、実験系が機能している事が示された。これらの分子以外に、機能未知の新規遺伝子を同定し、本研究で明らかにした機能に基づき、MCRIP1 (MAPK-regulated Co-Repressor Interacting Protein 1) と命名した。

Table.3 同定した ERK 基質候補分子

	function	SP/ TP sites	Phosphorylation by ERK
MCRIP1	Unknown	3/1	Unknown
USP11	deubiquitilation	6/1	Unknown
Stathmin like 2	cytoskeleton metabolism	2/0	S62/S73
CIB	cytoskeleton metabolism	2/1	Unknown

MCRIP1 がリン酸化非特異的にレポーター遺伝子の発現を誘導した訳ではない事を証明するために、野生型 MCRIP1 及び ERK リン酸化サイトをアラニンに置換した MCRIP1 発現ベクター (リン酸化サイトの同定は Fig. 20)、活性型 ERK、LexA-PBD 及び LexA-PBD mutant (W507F、H629A、K631M) 発現ベクターを酵母細胞内に遺伝子導入し、ヒスチジン欠損培地上で培養した。その結果、野生型 MCRIP1 を遺伝子導入した酵母細胞だけで生育が観察された。一方、PBD 変異体を発現させた場合や、ERK リン酸化サイトをアラニンに置換した MCRIP1 を発現させた場合は、MCRIP1 と PBD が結合できないために、酵

母細胞が生育しなかった (Fig. 14)。以上の結果から、上記のスクリーニング実験が機能しており、MCRIP1 が ERK でリン酸化される事が示唆された。

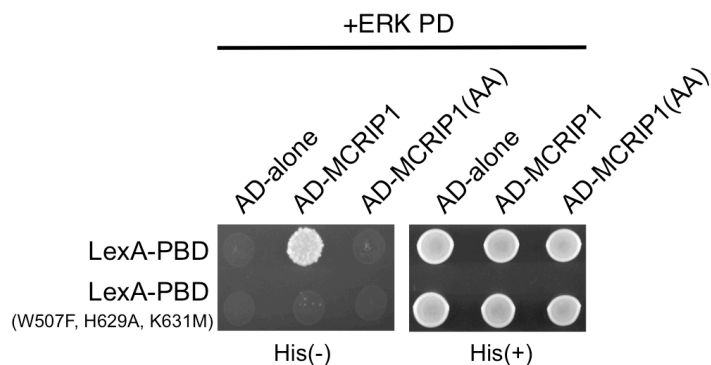


Fig.14 MCRIP1 は酵母細胞内で ERK によりリン酸化される。
酵母スリーハイブリッドが機能している事を確認した。

2. MCRIP1 アミノ酸配列解析

次に MCRIP1 が他の種で保存されているかを BLAST サーチにより検索した。その結果、MCRIP1 は魚からヒトに至る脊椎動物間で保存されている事が分かった (Fig. 15)。モチーフ配列解析により、MCRIP1 は N 末側に 4 つの SP/TP リン酸化モチーフを有している事が分かった (S4、S18、S21、T30)。また、これらのうち、21 番目のセリン残基と 30 番目のスレオニン残基のみが進化的に保存されている事が明らかになった (Fig. 15 赤四角)。さらに、MCRIP1 の C 末側には CtBP 結合モチーフである PxDSL が存在している事が明らかになり、このサイトが脊椎動物間で保存されている事も明らかになった (Fig. 15 緑四角)。

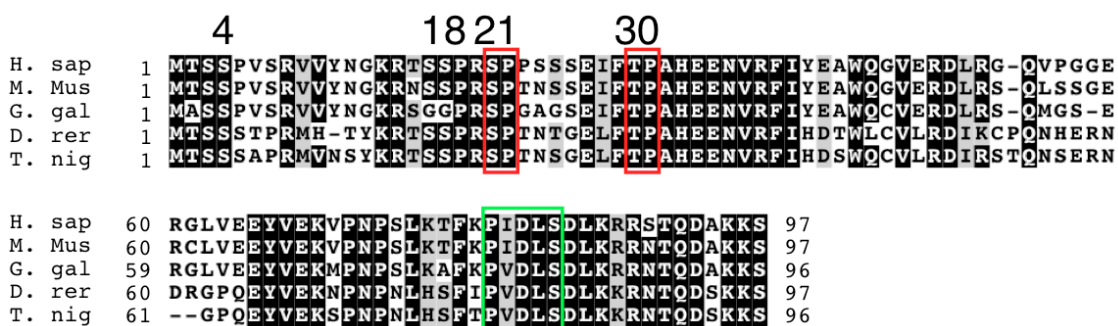


Fig.15 MCRIP1 の一部の ERK リン酸化サイト (赤四角) と CtBP 結合サイト (緑四角) は脊椎動物間で保存されている。

3. MCRIP1 抗体 の 作製 と MCRIP1 の 発現 解析

次に、MCRIP1 タンパク質の発現を解析するため、抗 MCRIP1 抗体を作製した。大腸菌で大量発現させた GST-MCRIP1 をアフィニティ精製し、GST タグをプロテアーゼで切断し、MCRIP1 タンパク質を得た。これを用いて、抗 MCRIP1 ポリクローナル抗体を作製した（株式会社スクラムに依頼）。作製した抗体が細胞内の MCRIP1 タンパク質を特異的に認識するかどうか検証すべく、以下の実験を行った。HEK293 細胞に MCRIP1 発現ベクターを遺伝子導入し、24 時間後に細胞抽出液を作製した。これを試料として SDS-PAGE を行いメンブレンに転写し、抗 MCRIP1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、MCRIP1 の推定分子量

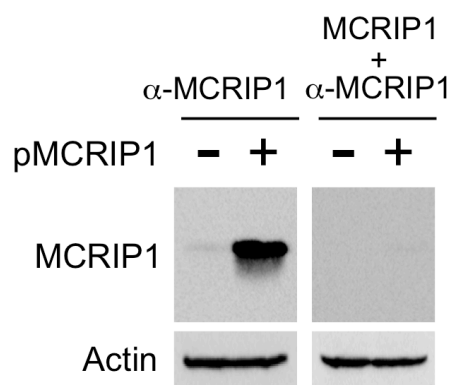


Fig.16 抗 MCRIP1 抗体チェック
抗 MCRIP1 抗体は MCRIP1 を特異的に認識する。

とほぼ同じ位置に特異的なバンドが検出された (Fig. 16 左)。また、抗 MCRIP1 抗体と抗体作製に用いた MCRIP1 精製タンパク質とを反応させ、抗 MCRIP1 抗体の抗原認識部位をマスクした。この抗 MCRIP1 抗体-MCRIP1 複合体を用いて同様の細胞抽出液でウェスタンブロッティングを行ったところ、MCRIP1 と思われるバンドは検出されなかった (Fig. 16 右)。以上の結果から、作製した抗 MCRIP1 抗体は特異的に MCRIP1 タンパク質を認識する事を確認した。

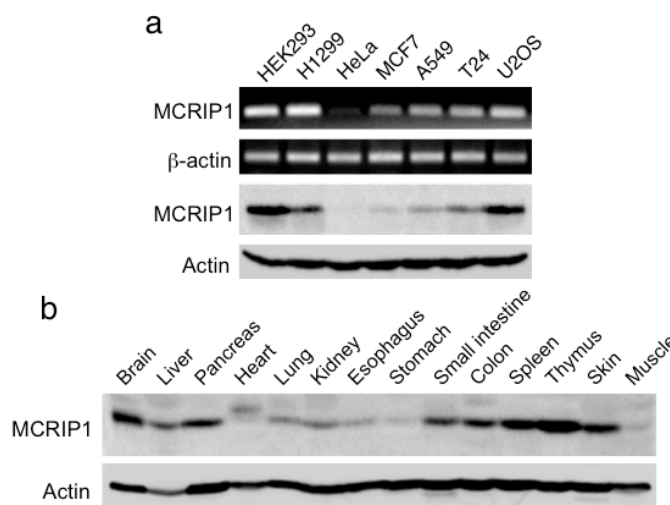


Fig.17 培養細胞と各組織における MCRIP1 発現パターン解析
(a) 培養細胞における MCRIP1 mRNA と MCRIP1 の発現解析。
mRNA の発現量はタンパク質の発現量とほぼ相関している。
(b) マウスの各組織における MCRIP1 発現パターンを解析。
普遍的な発現が観察された。

さらに、MCRIP1 がどの種類の培養細胞や組織で発現しているかを解析する

ために以下の実験を行った。HEK293 (ヒト胎児腎臓由来)、H1299 (ヒト非小細胞肺癌由来)、HeLa (ヒト子宮頸癌由来)、MCF7 (ヒト乳癌細胞由来)、A549 (ヒト肺胞基底上皮腺癌由来)、T24 細胞 (膀胱癌由来)、U2OS (骨肉腫由来) 細胞における MCRIP1 mRNA を半定量 RTPCR 法により、また MCRIP1 タンパク質の発現量をウェスタンブロッティング法により検証した。その結果、各種培養細胞における mRNA とタンパク質の発現量がほぼ相関する事が明らかとなった(Fig. 17a)。また、マウスの各組織から細胞抽出液を作製し、MCRIP1 の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、ほぼ全ての組織で発現が確認できたものの、脾臓、胸腺、皮膚において発現量が顕著に高い事が明らかになった(Fig. 17b)。

4. MCRIP1 は ERK によって特異的にリン酸化される

続いて、MCRIP1 が MAP キナーゼでリン酸化されるかを検証するために、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。HEK293 細胞に各種 MAPK キナーゼ及び MAP キナーゼ発現ベクターを導入し、細胞抽出液を作製した。その後、免疫沈降を行い、活性化されていない MAP キナーゼ及び活性型 MAP キナーゼを精製した。精製した MAP キナーゼに、大腸菌を用いて大量精製した MCRIP1 リコンビナントタンパク質を基質として加え、さらに

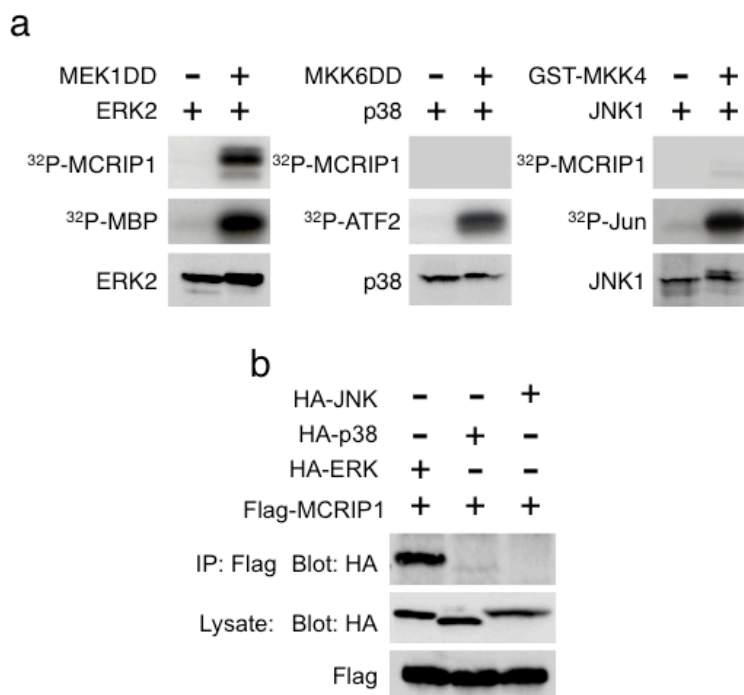


Fig.18 MCRIP1 は ERK によって特異的にリン酸化される。(a) 精製した GST-MCRIP1 を基質として、各種 MAPK によるリン酸化を *in vitro* キナーゼアッセイにより検証した。MCRIP1 は ERK により特異的にリン酸化される。(b) MCRIP1 と各種 MAPK の共沈実験。HEK293 細胞に各種 HA-MAPK 及び Flag-MCRIP1 を過剰発現し、24 時間後に細胞抽出液を作製した。Flag 抗体で免疫沈降し、共沈した MAPK をウェスタンブロッティングにより解析した。

$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP を加えて酵素反応を行った。そして、MCRIP1 による $\gamma^{32}\text{P}$ の取り込みをオートラジオグラフィーによって検出した。その結果、MCRIP1 が ERK によりリン酸化される事が明らかになった(Fig. 18a)。一方で、p38 や JNK などのストレス応答性 MAP キナーゼは MCRIP1 をリン酸化しない事が分かった。

また、細胞内に各 MAP キナーゼと MCRIP1 を共発現し、両分子間の結合を共沈実験により検証した。その結果、ERK と MCRIP1 との結合は観察されたが、p38 や JNK と MCRIP1 との結合は観察されなかった(Fig. 18b)。以上の結果から、MCRIP1 が ERK によってのみ特異的にリン酸化される事が示唆された。

次に MCRIP1 が細胞内で ERK によりリン酸化されるか検証するために以下の実験を行った。

リン酸化されたタンパク質は SDS-PAGE での移動度が遅くなる事がある。そこで、HEK293 細胞を EGF で刺激して ERK 活性を亢進させる事により、MCRIP1 のシフトアップが観察されるかをウェスタンブロッティングにより検証した。その結果、ERK の活性化に伴いシフトアップした MCRIP1 (EGF 刺激後 1 時間で最大) の蓄積が観察された(Fig. 19a)。また、p38 や JNK によっても MCRIP1 がシフトアップするかを検証するために、アニソマイシン刺激によりストレス応

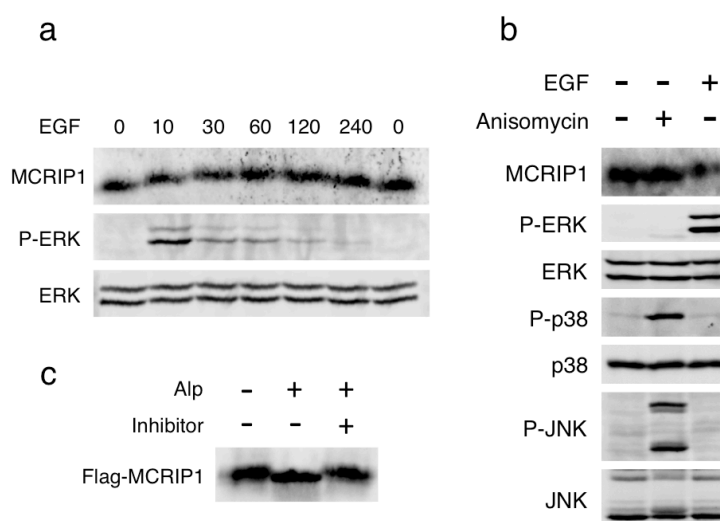


Fig.19 MCRIP1 は EGF 下流のキナーゼによってリン酸化される。(a) MCRIP1 は ERK 活性化刺激により、シフトアップする。HEK293 細胞に EGF (100 ng/ml) を添加し、刺激後各時間で細胞抽出液を作製した。これを用いて SDS-PAGE を行い、抗 MCRIP1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。(b) MCRIP1 は p38 や JNK の活性化刺激ではシフトアップしない。HEK293 細胞内の p38 及び JNK を活性化するためにアニソマイシン (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激した。刺激後 20 分で細胞抽出液を作製し、ウェスタンブロッティングを行った。(c) ERK 活性化刺激による MCRIP1 のシフトアップはリン酸化が原因である。HEK293 細胞に Flag-MCRIP1 を過剰発現し、TPA で刺激した。Flag 抗体で免疫沈降し、MCRIP1 を精製後、アルカリホスファターゼあるいはホスファターゼ阻害剤を加えて、30°C で 30 分間脱リン酸化反応を行った。

答性 MAP キナーゼの活性化を誘導し、同様の実験を行った。その結果、p38 や JNK の場合は活性化しても MCRIP1 のシフトアップは観察されなかった (Fig. 19b)。また、このシフトアップがリン酸化に依存している事を確認するためにアルカリホスファターゼアッセイを行った。その結果、ホスファターゼ処理により MCRIP1 のシフトアップが消失したため、EGF 刺激による MCRIP1 のシフトアップはリン酸化である事が示された (Fig. 19c)。以上の結果から、MCRIP1 は EGF などの増殖刺激で活性化するキナーゼによりリン酸化される事が示された。

5. MCRIP1 S21 と T30 は ERK によってリン酸化される

次に、ERK による MCRIP1 のリン酸化サイトを同定するために、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。MCRIP1 は N 末に 4 つの ERK リン酸化モチーフ配列を有している (Fig. 15)。そこで、これらのセリン・スレオニン残基をアラニンに置換した MCRIP1 変異体のリコンビナントタンパク質を大腸菌を用いて精製した。このリコンビナントタンパク質を基質として用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った結果、21 番目のセリン残基と 30 番目のスレオニン残基をそれぞれアラニンに置換すると、リン酸化シグナルが減弱し、さらに両残基をアラニンに置換するとよりシグナルが減弱する事が分かった (Fig. 20a)。以上の結果から、MCRIP1 S21 と T30 が ERK によってリン酸化される事が示唆された。

次に、細胞内でも同様に MCRIP1 S21 と T30 がリン酸化されるかを解明するために、HEK293 細胞に MCRIP1 の S21 と T30 のアラニン置換変異体を発現するプラスミドを遺伝子導入し、EGF 刺激に依存してシフトアップするかどうか検証した。その結果、野生型 MCRIP1 は EGF 刺激に依存してシフトアップする事が観察された。一方、21 番目のセリン残基と 30 番目のスレオニン残基をアラニンに置換した変異体 (MCRIP1 S21A, T30A) は EGF 刺激によってもシフトアップが観察されなかった (Fig. 20b)。以上の結果から、細胞内でも MCRIP1 S21 と T30 がリン酸化されることが示された。

次に、培養細胞内で実際に S21 と T30 がリン酸化される事をリン酸化 SP/TP 抗体を用いて検出した。その結果、野生型 MCRIP1 と単一置換変異体 MCRIP1 S21A、MCRIP1 T30A はリン酸化されている事が明らかになった。しかし、両アミノ酸のアラニン置換変異体においてはシグナルが検出されなかった (Fig. 20c)。以上の結果から、細胞内においても MCRIP1 の S21 と T30 が ERK に

よりリン酸化される事が明らかになった (Fig. 20d, Fig. 15 赤四角)。

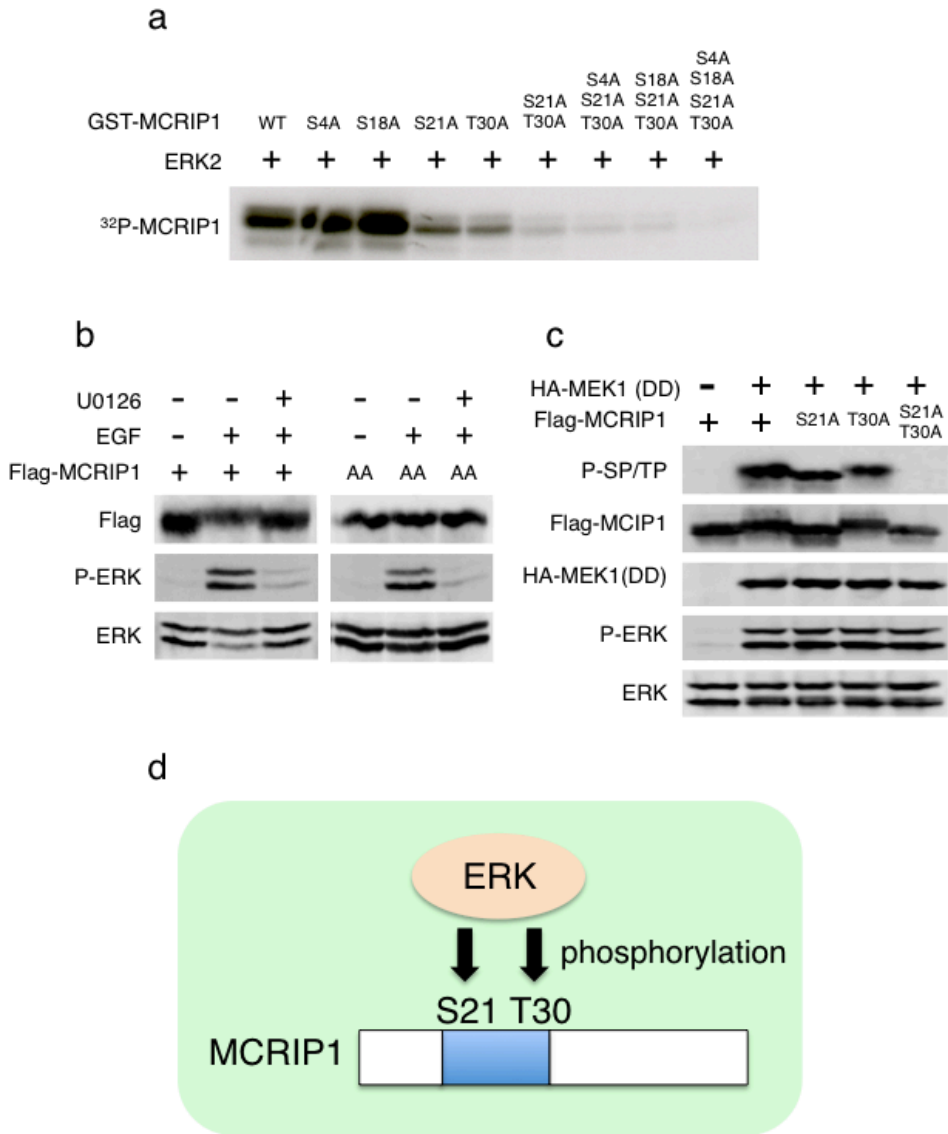


Fig.20 MCRIP1 S21とT30はERKによってリン酸化される。

(a) MCRIP1のERKリン酸化コンセンサス配列をアラニン置換したリコンビナントタンパク質を精製し、これを基質として *in vitro* キナーゼアッセイを行った。HEK293細胞にHA-ERK2及び活性型MEKを遺伝子導入した。細胞抽出液を作製し、HA抗体でMAPKを免疫沈降して活性型ERK2を特異的に精製した。これに各種MCRIP1変異体と $\gamma^{32}\text{P}$ -ATPを加えて、30℃、30分間酵素反応を行った。MCRIP1の $\gamma^{32}\text{P}$ -ATPの取り込みをオートラジオグラフィで検出した。

(b) HEK293細胞に野生型MCRIP1及びMCRIP1 S21A/T30Aを過剰発現し、EGF刺激あるいはU0126添加によってERKの活性化と抑制をそれぞれ誘導し、その結果起こるMCRIP1のシフトアップをウェスタンブロットティングにより検証した。

(c) MCRIP1 S21とT30は細胞内でERKによってリン酸化される。リン酸化SP/TP抗体を用いて、MCRIP1のリン酸化サイトの同定を行った。各種MCRIP1と活性型MEKをHEK293細胞に過剰発現し、ERKによるMCRIP1のリン酸化を誘導した。Flag抗体によりMCRIP1を精製後、リン酸化SP/TP抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。

(d) MCRIP1はERKによって21番目のセリン残基と30番目のスレオニン残基がリン酸化される。

6. MCRIP1 は CtBP と直接的に結合する

MCRIP1 の C 末には CtBP 結合モチーフ配列が存在し、かつ脊椎動物間で保存されている事が配列解析により分かっている (Fig.15 緑四角)。そこで、MCRIP1 が CtBP と結合する可能性を検証した。そのために、HEK293 細胞に CtBP、MCRIP1 発現ベクターを遺伝子導入し、細胞抽出液を作製して共沈実験を行った。その結果、MCRIP1 が CtBP と結合する事を明らかにした (Fig. 21a, b)。また、HEK293 細胞の内在性タンパク質同士の結合も同様の方法によって確認した (Fig. 21c, d)。

さらに、MCRIP1 と CtBP が第三のタンパク質を介してではなく、直接結合しているかどうかを検証するために精製タンパク質を用いて GST プルダウンアッセイを行った。その結果、MCRIP1 と CtBP が直接結合する事が分かった (Fig. 21e)。また、培養細胞から精製した活性型 ERK 変異体と MCRIP1 を ATP 存在下で反応し、リン酸化を誘導した MCRIP1 は CtBP との結合が減弱することが示唆された。

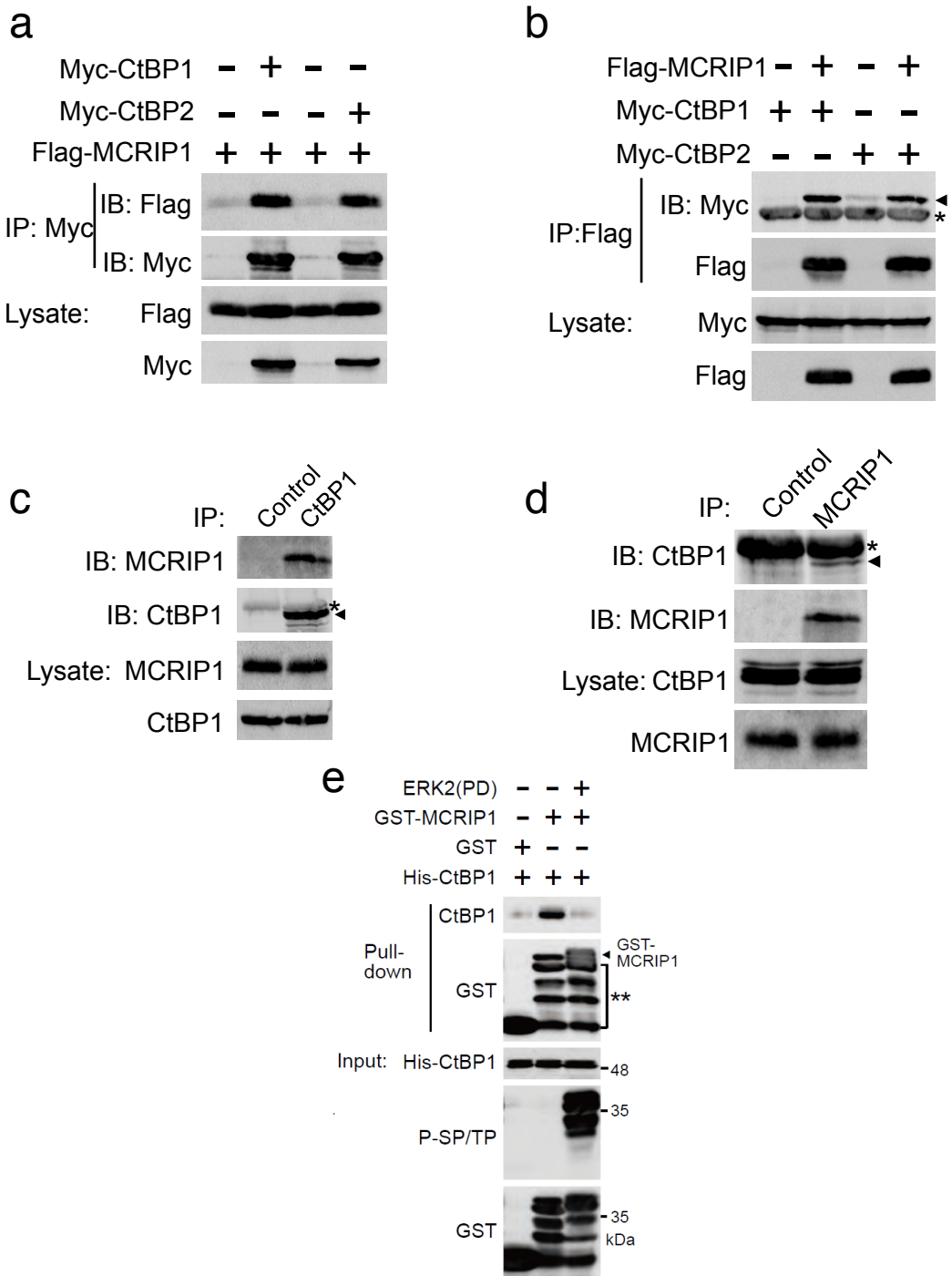


Fig.21 MCRIP1はCtBPと直接的に結合する。

(a, b) MCRIP1とCtBPは結合する。HEK293細胞にFlag-MCRIP1とMyc-CtBPを過剰発現し、FlagあるいはMyc抗体で免疫沈降し、共沈したCtBPあるいはMCRIP1をウェスタンブロッティングにより検出した。矢印, Myc-CtBP、*, 免疫沈降に用いた抗体の重鎖

(c, d) HEK293細胞の内在性MCRIP1とCtBPとの共沈実験。細胞抽出液を作製し、CtBP抗体及びMCRIP1抗体で免疫沈降し、共沈したMCRIP1及びCtBPをウェスタンブロッティングにより検出した。矢印, CtBP、*, 免疫沈降に用いた抗体の重鎖

(e) MCRIP1とCtBPは直接的に結合する。MCRIP1がCtBPと直接結合する事を、精製タンパク質を用いたGSTプルダウンアッセイにより明らかにした(真ん中レーン)。また、培養細胞内で発現させ精製したERK活性型変異体(ERK2(PD))と反応させた後、同様にプルダウンアッセイを行なった(右レーン)。

**, GST-MCRIP1の分解産物

7. MCRIP1 は CtBP と共局在し、CtBP の機能を阻害する

また、両分子の細胞内における局在部位を調べるために、HeLa 細胞に Flag-MCRIP1 と Myc-CtBP を過剰発現し、それぞれのタグに反応する抗体で免疫染色をした。その結果、MCRIP1 と CtBP はいずれも細胞内全体に分散しているが、その多くは核に局在している事が分かった (Fig. 22a)。

次に、MCRIP1 が CtBP の機能をどのように制御しているかを調べるために、E-カドヘリンレポーターアッセイを行った。CtBP は E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に機能しており、この実験は CtBP の活性を測定する際によく用いられる手法である⁶⁵。解析の結果、MCRIP1 の遺伝子導入量の増加に伴い CtBP の機能が阻害されて、E-カドヘリンプロモーターの活性が上昇する事が分かった (Fig. 22b)。以上の結果から、MCRIP1 は CtBP による E-カドヘリン遺伝子の発現抑制を解除する事が示唆された。

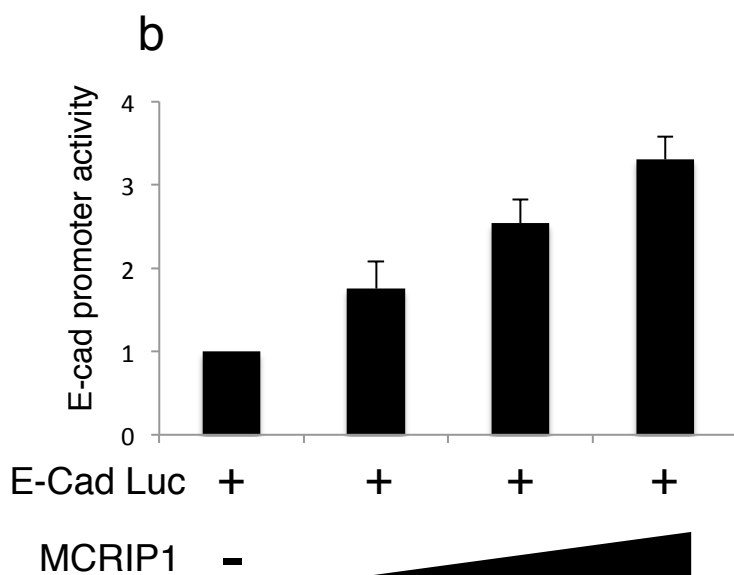
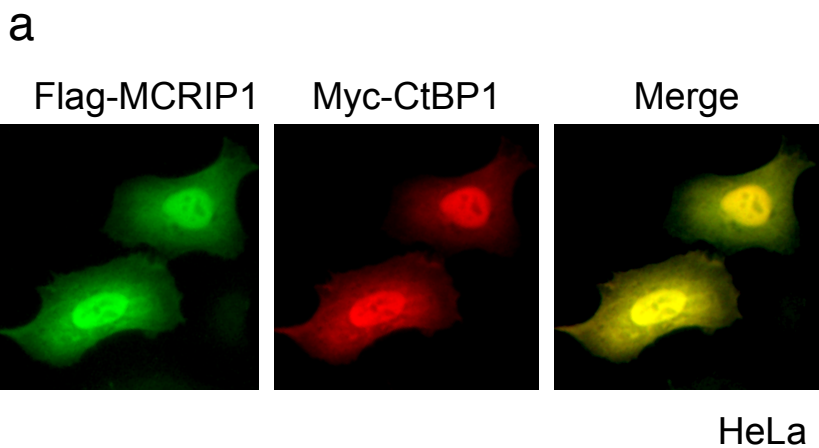


Fig.22 MCRIP1はCtBPと共局在し、CtBPの機能を阻害する。
 (a) MCRIP1とCtBPは共局在し、両分子は主に核内に局在している。HeLa細胞にFlag-MCRIP1及びMyc-CtBPを過剰発現し、両分子の局在を免疫染色により検出した。
 (b) MCRIP1はCtBPの転写抑制補因子としての機能を阻害する。U2OS細胞にE-カドヘリンプロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだプラスミド、野生型MCRIP1を過剰発現した。24時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。

8. MCRIP1 のリン酸化は CtBP と MCRIP1 との結合を抑制する

続いて、ERK による MCRIP1 の 21 番目のセリン残基と 30 番目のスレオニン残基のリン酸化が、MCRIP1 の局在や安定性に影響するか検証を行った。その結果、リン酸化によって MCRIP1 自身の局在や安定性に変化が無い事が分かった。

そこで、ERK による MCRIP1 のリン酸化が、CtBP と MCRIP1 との結合に影響するかどうかを検証した。始めに MCRIP1 のリン酸化サイトを 2 つともアラニンに置換した変異体 (MCRIP1 AA) と、アスパラギン酸に置換しリン酸化を擬態した変異体 (MCRIP1 DD) を作成した (Fig. 23a)。

これらの変異体を用いて CtBP との結合を共沈実験により検証した結果、ERK によるリン酸化を擬態した MCRIP1 DD は、CtBP との結合が減弱する事が示された (Fig. 23b)。

また、ERK 上流のキナーゼである MEK の恒常的活性型変異体を遺伝子導入し、ERK による MCRIP1 のリン酸化を誘導すると、MCRIP1 と CtBP の結合が減弱する事が分かった。一方で ERK 活性化を誘導しても、ERK リン酸化サイトをアラニンに置換した MCRIP1 AA では、CtBP との結合が維持された (Fig. 23c)。以上の結果から、ERK による MCRIP1 のリン酸化が CtBP との結合を減弱させる事が分かった。

さらに内在性タンパク質同士でも同様に、TPA 刺激による ERK 活性化で、MCRIP1 と CtBP との結合が減弱する事を明らかにした (Fig. 23d)。

次に、MCRIP1 のリン酸化を擬態する変異体 (S21D、T30D、S21D/T30D) が CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害できるかどうかを検証するために、E-カドヘリンレポーターアッセイを行った。その結果、いずれのリン酸化擬態変異体も、野生型 MCRIP1 と比較して E-カドヘリンプロモーター活性の上昇は観察されなかった (Fig. 23e)。以上の結果から、MCRIP1 は ERK によるリン酸化で CtBP との結合が減弱する事、さらに MCRIP1 が CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害するためには、MCRIP1 と CtBP との結合が重要である事が示された。

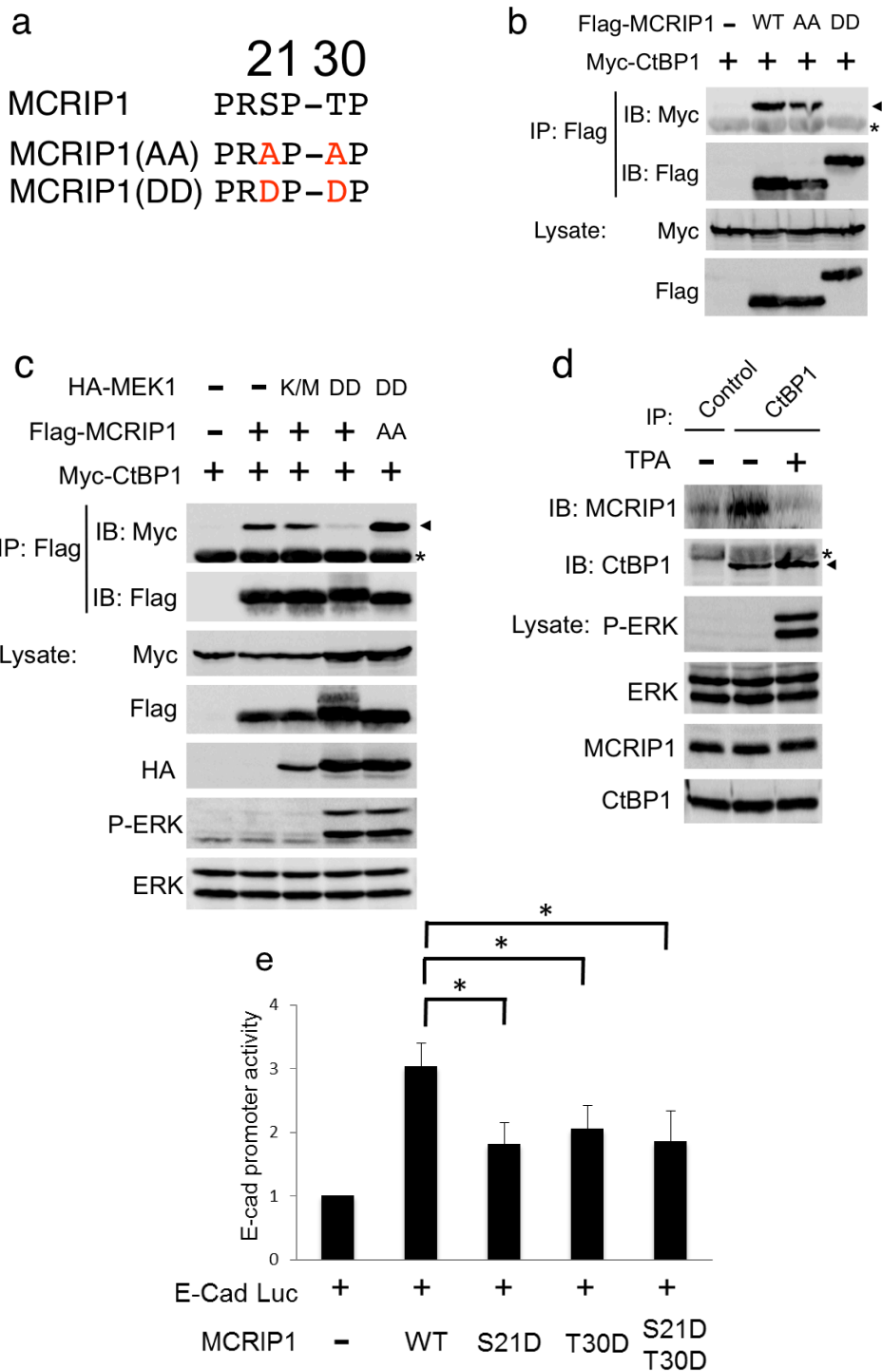


Fig23. ERKによるMCRIP1のリン酸化はMCRIP1とCtBPの結合を減弱させる。
(a) MCRIP1のERKリン酸化サイトをアラニンに置換した変異体 (MCRIP1 AA) とアスパラギン酸に置換した変異体 (MCRIP1 DD) を作製した。
(b) MCRIP1リン酸化擬態変異体 (MCRIP1 DD) はCtBPと結合できない。HEK293細胞に各種MCRIP1及び、CtBPを過剰発現し、共沈実験を行った。矢印, Myc-CtBP、*,免疫沈降に用いた抗体の重鎖
(c) ERKによるMCRIP1のリン酸化は、MCRIP1とCtBPとの結合を減弱させる。HEK293細胞に各種MCRIP1、CtBPを過剰発現した。さらに活性化型MEKを過剰発現させ、ERKによるMCRIP1のリン酸化を誘導した。細胞抽出液を作製し、共沈実験を行った。矢印, Myc-CtBP、*,免疫沈降に用いた抗体の重鎖
(d) ERK活性化により、HEK293細胞の内在性MCRIP1とCtBPの結合は減弱する。HEK293細胞をTPA (50ng/ml) で20分間刺激し、細胞抽出液を作製した。これを試料として、共沈実験を行った。矢印, CtBP、*,免疫沈降に用いた抗体の重鎖
(e) MCRIP1リン酸化擬態変異体の過剰発現ではE-カドヘリンレポーター活性があまり増加しない。U2OS細胞に各種MCRIP1リン酸化擬態変異体及び、E-カドヘリンプロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだプラスミドを過剰発現した。24時間後、ルシフェラーゼアッセイを行いレポーター活性の検証を行った。*, P<0.05

9. MCRIP1 PxDLS サイトは CtBP との結合に重要である

次に、MCRIP1 と CtBP の結合サイトを決定するために、それぞれの変異体を作製し、共沈実験を行った。MCRIP1 は、CtBP 結合サイトである PxDLS 配列を有している。CtBP との結合が報告されている ZEB などの転写抑制因子もこのアミノ酸配列を有している (Fig. 10)。そこで、MCRIP1 も同様の結合様式であるかを検証するために MCRIP1 の PxDLS サイト変異体を作成した (MCRIP1 BM1, BM2)^{65, 66} (Fig. 24a)。これらの MCRIP1 変異体を用いて、CtBP との結合を共沈実験により検証した。その結果、MCRIP1 BM 変異体では CtBP との結合が顕著に減弱する事が分かった (Fig. 24b 左)。

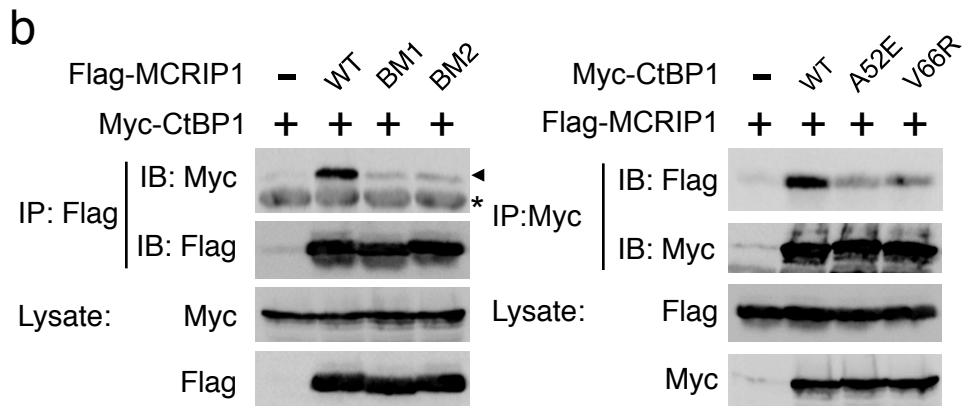
また、構造生物学的な解析により、CtBP の N 末には PxDLS サイトとの結合に重要なドメインが存在している事が明らかにされており、PxDSL サイトとの結合に重要なアミノ酸も同定されている (Fig. 11)⁵⁵。そこで、樹立されている CtBP PxDSL 結合ドメインの点変異体 (CtBP A52E, V66R) と MCRIP1 の共沈実験を行った。その結果、いずれの CtBP 点変異体においても MCRIP1 との結合が減弱する事が分かった (Fig. 24b 右)。以上の結果から、MCRIP1 は C 末側に存在する PxDSL サイトを介して CtBP と結合している事が明らかになった。また、CtBP は N 末側に存在する PxDSL 結合ドメインを介して MCRIP1 と結合する事が明らかになった (Fig. 24c)。

さらに、MCRIP1 が CtBP の機能を阻害するためには、両者の結合が重要であるかを検証するために MCRIP1 BM1, BM2 を用いて、E-カドヘリンレポーターアッセイを行った。その結果、CtBP に結合できない MCRIP1 変異体の発現では、野生型と比較して E-カドヘリンプロモーター活性の上昇が弱いことが分かった (Fig. 24d)。

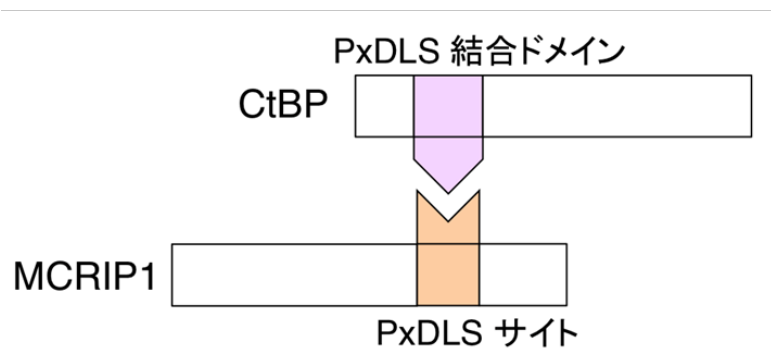
以上の結果から、MCRIP1 は CtBP と結合する事により、CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害している事が明らかになった。

a

ZEB1(731-741)	PLDLS
RREB1(931-941)	PIDLS
ZNF217(104-114)	PLDKS
MCRIP1	PIDLS
MCRIP1 BM1	AADLS
MCRIP1 BM2	PIASS



c



d

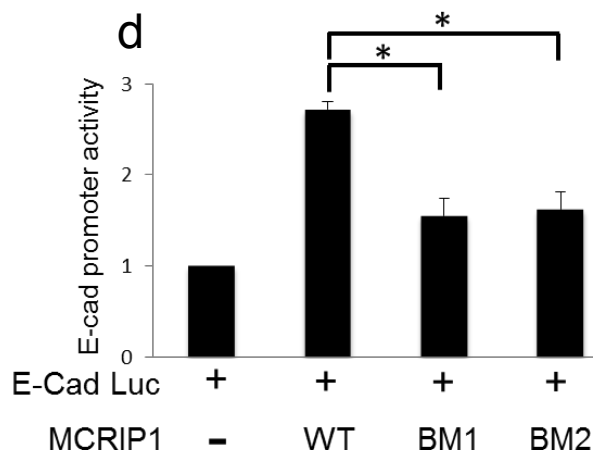


Fig.24 MCRIP1はPxDLSサイトを介してCtBPと結合する事でCtBPの機能を阻害する。

(a) MCRIP1 PxDLSサイトの変異体を作製した。2つの変異体をMCRIP1 BM1 (PIDLS→AADLS)、MCRIP1 BM2 (PIDLS→PIASS)と命名した。

(b) MCRIP1はPxDLSサイトを介してCtBPと結合する。HEK293細胞に各種MCRIP1及び、野生型CtBPを過剰発現し、細胞抽出液を作製し、Flag抗体を用いて免疫沈降した。共沈したCtBPをウェスタンブロッティングにより検出した。また、HEK293細胞に各種CtBP (A52E, V66R) 及び、野生型MCRIP1を過剰発現し、細胞抽出液を作製し、Myc抗体を用いて免疫沈降した。共沈したMCRIP1をウェスタンブロッティングにより検出した。矢印, Myc-CtBP、*,免疫沈降に用いた抗体の重鎖

(c) MCRIP1は自身のPxDSLサイトを介してCtBPと結合する事、CtBPはPxDSL結合ドメインを介してMCRIP1と結合する事が分かった。

(d) MCRIP1はCtBPと結合する事によって、CtBPの転写抑制補因子としての機能を阻害する。

U2OS細胞に各種MCRIP1及び、E-カドヘリンプロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだプラスミドを過剰発現した。24時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。*, P<0.05

10. MCRIP1 は ZEB1 と CtBP の結合を競合的に阻害する

これまでの研究により、MCRIP1 が CtBP と結合することで、CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害する事が明らかになった。しかし、MCRIP1 が CtBP に結合する事によってなぜ CtBP の機能を阻害するのかは不明である。そこで、一つの仮説を構築し、これを検証する事で MCRIP1 による CtBP の機能を阻害する分子メカニズムの解明を目指した。

転写抑制因子である ZEB1 タンパク質は CtBP と協調的に機能して、E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に寄与している事が報告されている⁴⁴。このとき、ZEB1 は PxDSL サイトを介して CtBP と結合する事が知られている。一方で、MCRIP1 は自身の PxDSL サイトを介して CtBP と結合し、CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害する事をこれまでに明らかにした。つまり、MCRIP1 と ZEB1 は同様の結合様式であるにも関わらず、CtBP の機能や E-カドヘリン遺伝子の発現には正反対の作用をもたらしている。以上の事実から、MCRIP1 が ZEB1 と CtBP の結合を競合的に阻害しているのではないかと考え、この仮説を検証するために以下の実験を行った。

始めに、MCRIP1 と ZEB1 が結合するかどうかを共沈実験により検証した。その結果、MCRIP1 が ZEB1 とは結合しない事を確認した (Fig. 25a)。

次に、MCRIP1 の発現量を増大させて、CtBP と ZEB1 の結合に影響があるかを共沈実験により検証した。その結果、MCRIP1 の発現増加に伴い、CtBP と ZEB1 の結合が減弱する事が明らかになった (Fig. 25b)。

また、CtBP との結合が弱い事が分かっている MCRIP1 BM1、MCRIP1 DD 変異体 (Fig. 24b, 23b) は、CtBP と ZEB1 の結合を阻害しない事を共沈実験により明らかにした (Fig. 25c)。

さらに、MCRIP1 による CtBP と ZEB1 の結合阻害が遺伝子発現に影響しているかを E-カドヘリンレポーターアッセイにより検証した。その結果、ZEB1 による E-カドヘリンプロモーター活性の抑制が、野生型 MCRIP1 の過剰発現により消失する事が分かった。一方で、CtBP と結合できない MCRIP1 BM1 と MCRIP1 DD の過剰発現によっては、野生型 MCRIP1 ほど E-カドヘリンプロモーター活性の回復が観察されなかった (Fig. 25d)。以上の結果から、MCRIP1 が CtBP の機能を抑制しているメカニズムは、MCRIP1 が ZEB1 と CtBP の結合を競合的に阻害するためであるという事が示唆された。また、この分子機構が E-カドヘリン遺伝子の発現制御に重要である事を明らかにした。

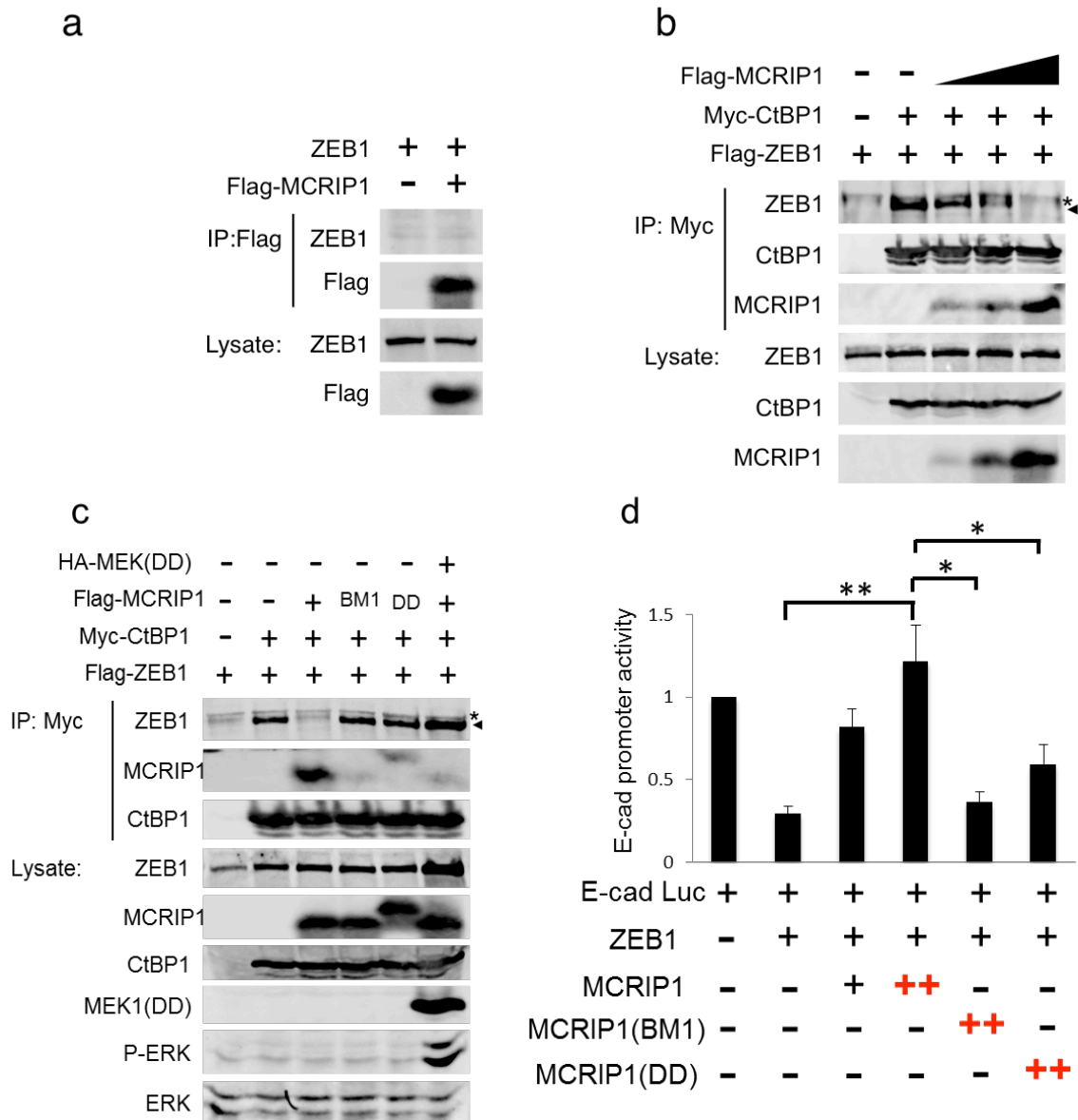


Fig.25 MCRIP1 は CtBP と ZEB1 の結合を競合的に阻害する。

(a) MCRIP1 と ZEB1 は結合しない。HEK293 細胞に MCRIP1 と ZEB を過剰発現し、共沈実験を行った。

(b) MCRIP1 は CtBP と ZEB1 の結合を競合的に阻害する。HEK293 細胞に ZEB1、CtBP、MCRIP1 を過剰発現し、Myc 抗体で免疫沈降して共沈した ZEB と MCRIP1 をウェスタンブロットティングにより検出した。矢印, Flag-ZEB、*, 非特異的バンド

(c) CtBP と結合できない MCRIP1 変異体は、ZEB と CtBP の結合を阻害できない。矢印, Flag-ZEB、*, 非特異的バンド

(d) MCRIP1 は ZEB と CtBP の結合を阻害する事で、CtBP の機能を阻害する。U2OS 細胞に ZEB1、各種 MCRIP1 及び、E-カドヘリンプロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだプラスミドを過剰発現した。24 時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。*, P<0.05;

** , P<0.01

11. MCRIP1 は CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在を阻害する

CtBP は DNA 結合領域を持たず、ZEB1 が CtBP を、さらに CtBP がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) やヒストンメチル化酵素 (HMTase) を、標的遺伝子にリクルートする事が知られている^{52, 67} (Fig. 9)。これまでの研究結果で、MCRIP1 が CtBP と ZEB1 の結合を競合的に阻害する事が示唆された。そこで、MCRIP1 は CtBP の E-カドヘリン遺伝子における局在を阻害しているという仮説を立てた。これを検証するために MCRIP1 をノックダウンする事により、CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在が亢進するかを ChIP アッセイにより解析した。

MCRIP1 siRNA は 2 種類使用し、いずれも MCRIP1 発現を抑制する事を確認した (Fig. 26a)。これらの siRNA を用いて、MCRIP1 をノックダウンすると CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在が亢進するか検証を行った。そこで、抗 CtBP 抗体によりクロマチン免疫沈降を行い、E-カドヘリンプロモーターに特異的なプライマーで PCR をして、CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在を観察した。解析の結果、MCRIP1 のノックダウンにより、CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在が亢進する事を明らかにした (Fig. 26b)

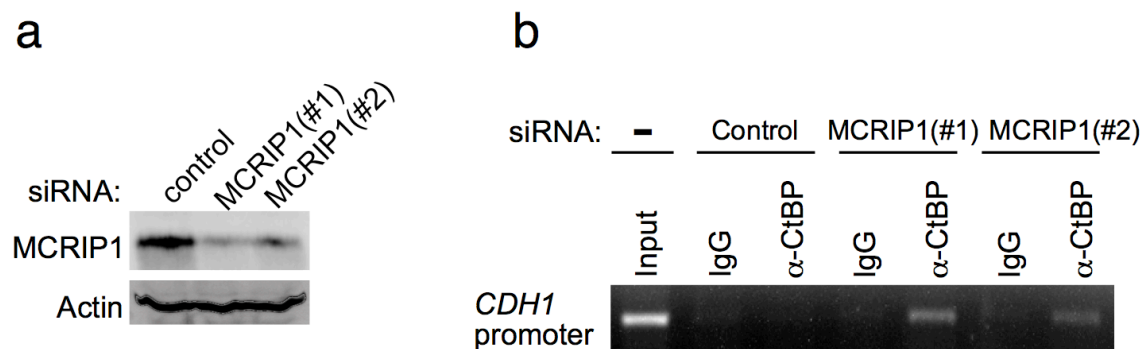


Fig.26 MCRIP1 は E-カドヘリン遺伝子における CtBP の局在を制御する。

(a) MCRIP1 siRNA は MCRIP1 の発現を抑制する。

(b) MCRIP1 のノックダウンによって CtBP の E-カドヘリンプロモーターへの局在が亢進する。HEK293 細胞に MCRIP1 siRNA を導入した。核内抽出液を作製し、CtBP 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、DNA を精製後、PCR によって E-カドヘリンプロモーター領域を特異的に増幅し、アガロース電気泳動により E-カドヘリンプロモーターにおける CtBP の局在を検出した。

12. ERK のキナーゼ活性は、EMT 誘導に必須である

これまでの結果から、MCRIP1 は CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害する事を明らかにした。また CtBP を阻害するためには、MCRIP1 が CtBP と結合する事が重要である事を明らかにした。また MCRIP1 は ERK によるリン酸化によって、CtBP との結合が減弱する事を明らかにした。

一方で先行研究によって、乳腺上皮細胞に ERK2 を過剰発現すると、EMT が誘導される事が分かっている²⁰。また、CtBP は EMT 誘導時において、E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に機能している事が知られており、その際の ERK との関連性も報告されている^{56, 51}。そこで、MCRIP1 による CtBP 機能の制御が、EMT 誘導時に重要であるか検証するために以下の実験を行った。

乳腺上皮細胞に ERK2 を過剰発現すると EMT が誘導される事は分かっていたが、ERK2 のキナーゼ活性が必須であるかは明らかにされていなかった。そこで、ERK キナーゼ活性が EMT 誘導に必須であるかを検証するために、以下の実験を行った。

ヒト乳腺由来の上皮細胞、MCF10A 細胞をウイルス感染により ERK2 あるいは酵素活性欠失型 ERK2 (ERK2 K/N) を安定発現する株を樹立した。これらの細胞を用いて、EMT が誘導されているかを検証した。その結果、ERK2 を安定発現する細胞株は、上皮細胞の分子マーカーである E-カドヘリンの発現が消失し、間葉系細胞の分子マーカーであるビメンチンの発現が亢進している事をウェスタンブロッティングと免疫染色により確認した。一方で、ERK2 酵素活性欠失変異体 (ERK2 K/N) は上皮細胞と同じ様に E-カドヘリンの発現を維持している事が明らかになった。以上の結果から、ERK2 下流で起こる EMT の誘導には、ERK2 のキナーゼ活性が必要である事を明らかにした (Fig. 27a,b)。すなわち、EMT 誘導時に ERK は何らかの基質分子をリン酸化する事で EMT 誘導を駆動している事が示唆された。

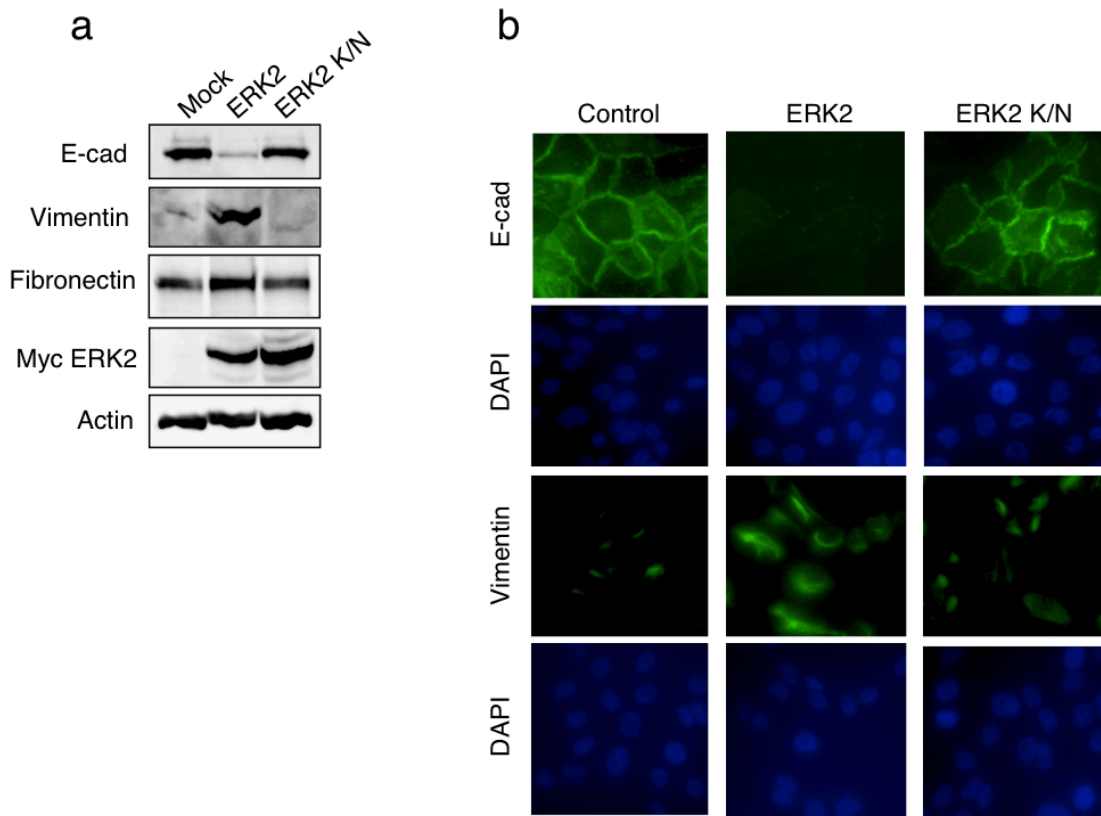


Fig.27 ERK2過剰発現により誘導される乳腺上皮細胞のEMT誘導にはERK2のキナーゼ活性が必須である。
 (a) ERK2、ERK2 K/N (キナーゼデッド) を安定発現する細胞から抽出液を作製し、上皮細胞マーカーと間葉系細胞マーカーを用いてウェスタンブロッティングを行った。
 (b) 樹立した細胞におけるE-カドヘリンとビメンチンの発現を免疫染色により解析した。

13. CtBP と安定に結合する MCRIP1 AA 変異体は ERK 過剰発現による EMT 誘導を阻害する

第 12 節の実験系を用いて、ERK2 によって誘導される EMT において、E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に MCRIP1 が影響するかどうか検証するために実験を行った。ウイルス感染により各種 MCRIP1 変異体を安定発現する MCF10A 細胞株を樹立した。さらにこれらの細胞に ERK2 をウイルス感染により安定発現し、EMT が誘導されるか否か検証を行った。

始めに、樹立した各細胞株の形態を観察した。その結果、ERK2 でリン酸化されて CtBP との結合が減弱する野生型 MCRIP1、CtBP と結合できない MCRIP1 BM1、MCRIP1 BM1+AA では、間葉系細胞のような形態に変化する事を明らかにした (Fig. 28a)。一方で、ERK でリン酸化されず、CtBP と安定に結合する事で CtBP の機能を恒常的に阻害する MCRIP1 アラニン置換変異体 (Fig. 23) では、上皮細胞の形態 (敷石状) を維持している事が分かった。

さらにこれらの細胞の E-カドヘリン、ビメンチンの発現を免疫染色とウェスタンブロッティングにより観察した。その結果、間葉系細胞の形態に変化した細胞では E-カドヘリンの発現が低下し、ビメンチンや N-カドヘリンなどの間葉系分子マーカーの発現が亢進している事を明らかにした (Fig. 28b,c)。一方で、MCRIP1 アラニン置換変異体を発現する細胞では、E-カドヘリンの発現が維持され、EMT が誘導されていない事を明らかにした。さらに各種 MCRIP1 の過剰発現が ERK シグナルの阻害に影響していないことを確かめるために、Elk1 (既知 ERK 基質分子) のリン酸化を解析した。その結果、樹立した全ての細胞において Elk1 のリン酸化が検出されており、各細胞株において発現する MCRIP1 が ERK シグナル阻害をしていないことを確認した。

また、各種 MCRIP1 変異体のみを発現しても、EMT が誘導されない事を確認した (Fig. 28d)。

最後に、樹立した各細胞における MCRIP1 と CtBP、ZEB と CtBP の結合を共沈実験により検証した。その結果、EMT 誘導が観察されなかった MCRIP1 AA を発現する細胞で、CtBP と ZEB の結合が阻害されていることが分かった (Fig. 28e)。

以上の結果から、MCRIP1 は EMT 誘導時において、ERK の影響下で CtBP 機能を制御している事が示唆された。

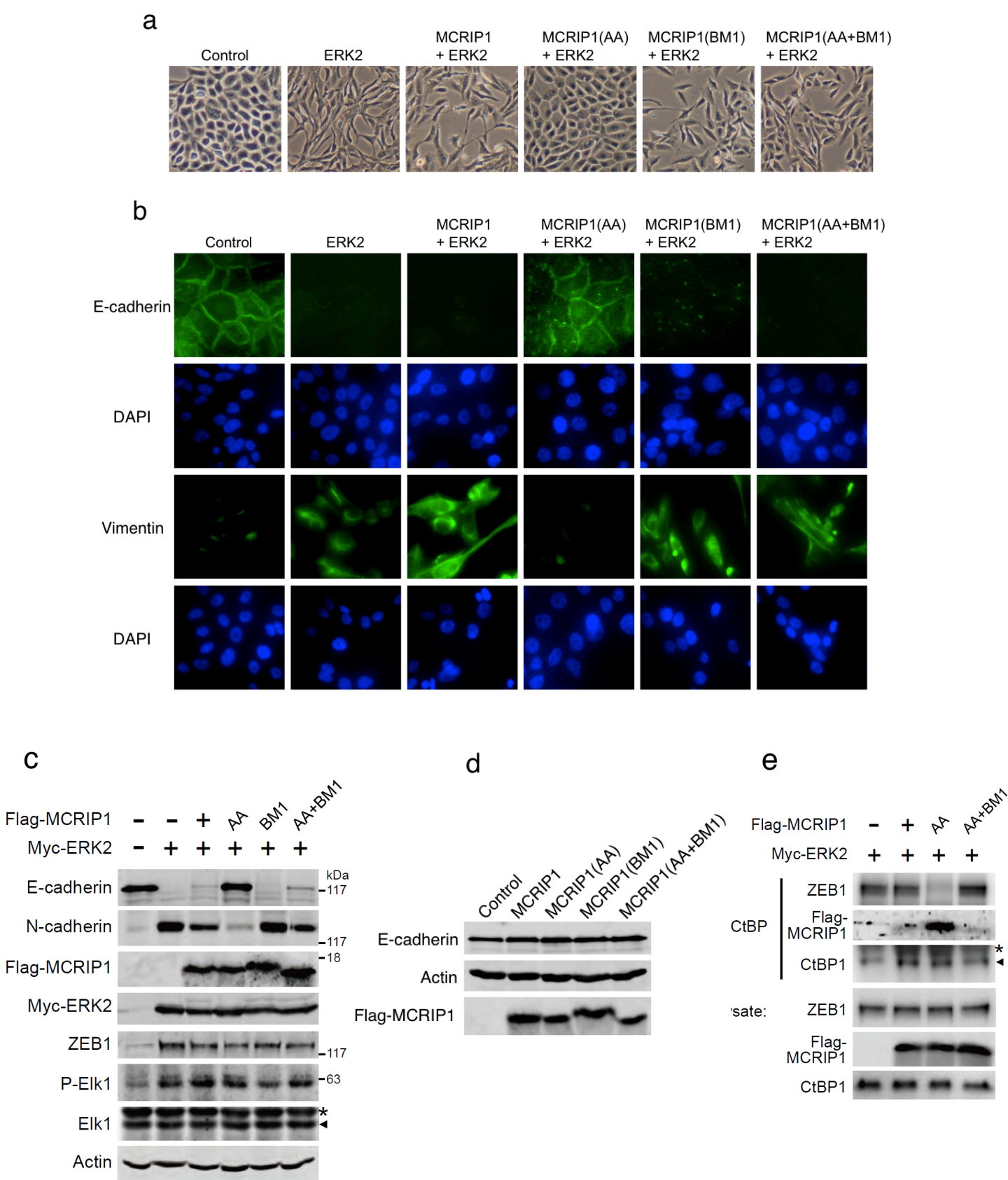


Fig.28 MCRIP1はEMT誘導時においてERK2の下流でCtBPの機能を制御する。

(a)各種MCRIP1及びERK2を安定発現する細胞株を樹立し、それぞれの細胞形態を位相差顕微鏡により観察した。

(b, c) MCRIP1 AAを発現する細胞は、EMTが誘導されずE-カドヘリンの発現が維持される。樹立した各細胞のE-カドヘリン(上皮細胞マーカー)とビメンチンやN-カドヘリン(間葉系細胞マーカー)の発現を免疫染色とウェスタンブロッティングによりそれぞれ解析した。また、各種MCRIP1がERKシグナル阻害に影響していないかを検証するためにElk1(既知ERK基質分子)のリン酸化を解析した。矢印、Elk1*、非特異的バンド

(d) 各種MCRIP1の発現のみではEMTは誘導されない。

(e)樹立した各種細胞株におけるMCRIP1とCtBPおよびZEBとCtBPの結合を共沈実験により検証した。

矢印、CtBP*、免疫沈降に用いた抗体の重鎖

14. EMT が誘導された細胞株は運動能と浸潤能が亢進する

第 13 節で樹立した細胞を用いて、細胞の遊走能と浸潤能を解析するために、マイグレーションアッセイ (Fig. 29a, c) とインベーションアッセイ (Fig. 29b, d) をそれぞれ行った。

マイグレーションアッセイは、Oris Cell Migration Kit を用いて行った。96 穴プレートに付属のストッパーをはめ込み、各ウェルの中央には細胞が接着しないようにした。ここに、樹立した各種 MCRIP1 及び ERK2 発現細胞株を播種し、翌日ストッパーを外した (Fig. 29a, 0day)。細胞増殖を抑制し、純粋に運動能のみを検出するためにマイトマイシン C (25 ng/ml) を含む EGF 溶液 (35 ng/ml) で細胞培養液を置換した。3 日後、細胞が移動した様子を顕微鏡で撮影し (Fig. 29a, 3day)、移動した細胞の個数を勘定し、細胞運動の度合いをグラフにした (Fig. 29c)。その結果、EMT が誘導された細胞では、遊走能が亢進している事を明らかにした (Fig. 29a, c)。

インベーションアッセイは、BD Bio Coat インベーションアッセイキットを用いて行った。24 穴プレートの各ウェルに EGF 溶液 (30 ng/ml) を満たした。EGF 溶液と接するようにチャンバーをセットし、各チャンバーに細胞溶液を加えた。一晩 37°C インキュベーターで培養し、細胞外マトリクスを分解し、浸潤した細胞の個数を検出するために、メンブレン上の細胞をメタノールで固定し、クリスタルバイオレットで染色を行い、顕微鏡で観察した (Fig. 29b)。また、染色された細胞数を勘定し、浸潤した割合を、グラフで表した (Fig. 29d)。その結果、マイグレーションアッセイと同様、EMT の誘導と相関して、細胞の浸潤能が亢進している事が明らかにされた。

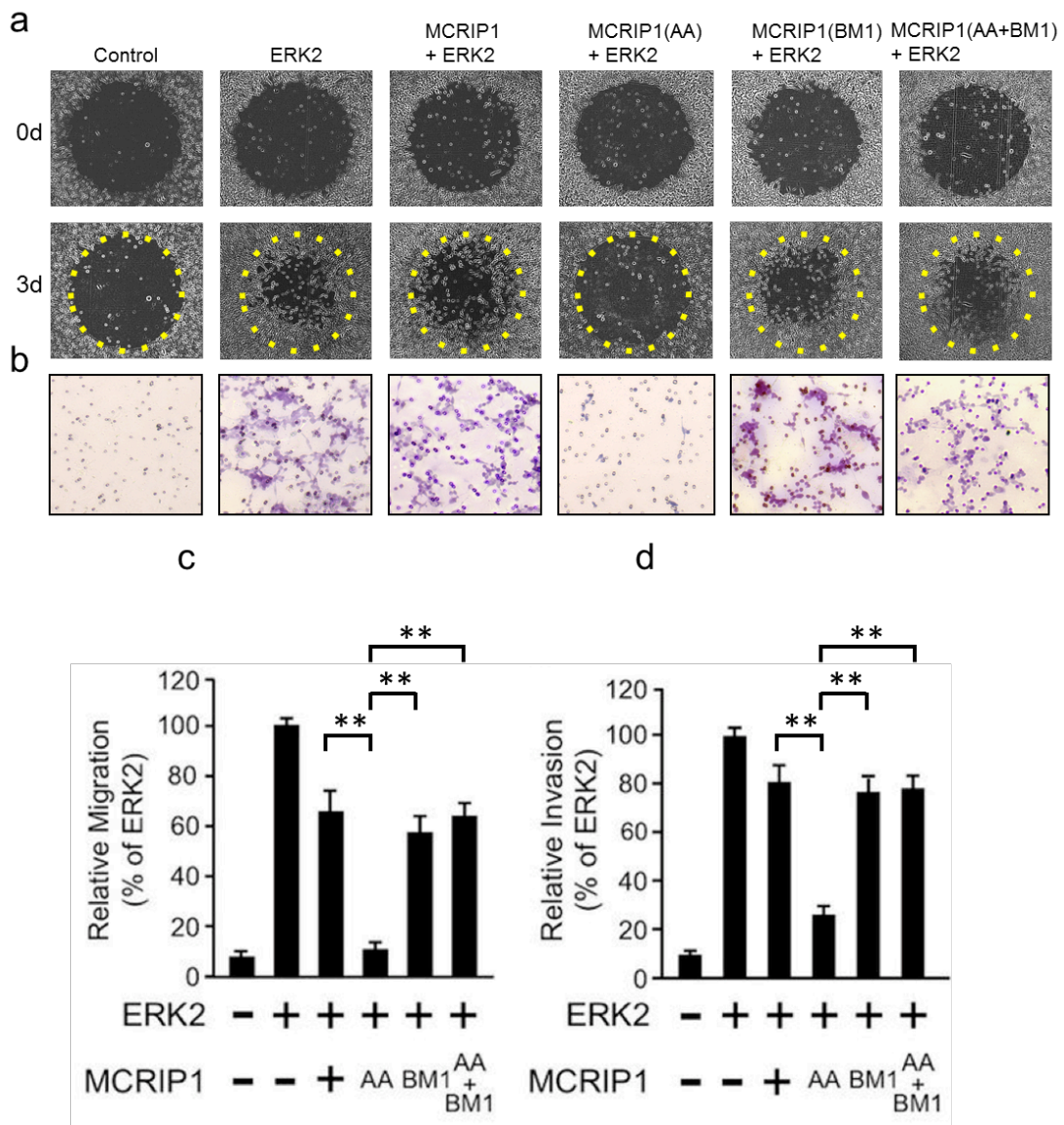


Fig.29 ERK 過剰発現により EMT が誘導された細胞は運動能と浸潤能が亢進する。

(a, c) Fig. 28 で樹立した細胞を Oris セルマイグレーションキットに播種した。EGF (35 ng/ml)溶液中で培養し、各細胞の遊走能を測定した。**, P<0.01

(b, d) マトリゲルインバージョンアッセイにより、樹立した細胞の浸潤能を検証した。細胞外マトリクスでコートされたメンブレンの下層に EGF (35 ng/ml)を含む培養液で満たし、上層に細胞を播種した。24 時間後、クリスタルバイオレットにより浸潤した細胞を染色し、細胞を数え、播種した細胞数で割りグラフ化した。**, P<0.01

15. MCRIP1 は E-カドヘリン遺伝子のクロマチン構造を制御する

これまでに、CtBP はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) やヒストンメチル化酵素 (HMTase) をリクルートする事で E-カドヘリン遺伝子のクロマチン構造を変化させ、遺伝子発現を抑制する事が知られている⁵²。E-カドヘリン遺伝子と相互作用するヒストン H3 の 9 番目に存在するリジン残基はアセチル化とメチル化両方の修飾がなされる事により、エピジェネティックに遺伝子発現を制御する事が知られている。E-カドヘリン遺伝子の発現が亢進している場合には、ヒストン H3-K9 がアセチル化されているためヒストンと DNA の相互作用が阻害されている。一方で、遺伝子発現が抑制されている場合にはヒストン H3-K9 が脱アセチル化されるだけでなくメチル化修飾されるため、クロマチン構造の凝集が誘導される事が知られている。

そこで、13 節で樹立した各種 MCF10A 細胞を用いて E-カドヘリンプロモーターにおける CtBP の局在を解析し、さらに E-カドヘリン遺伝子と相互作用するヒストン H3-K9 のアセチル化及びメチル化修飾を解析するために、ChIP アッセイを行った。

始めに、樹立した各細胞の、CtBP が E-カドヘリンプロモーターに局在しているか検証した。その結果、EMT が誘導された細胞においてのみ CtBP が E-カドヘリン遺伝子に局在している事が明らかにされた (Fig. 30a)。以上の結果から、MCRIP1 が CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在を結合に依存して制御している事が示唆された。

また、各細胞の E-カドヘリン遺伝子の発現抑制と、ヒストン H3-K9 のアセチル化が相関しているかを検証するために以下の実験を行った。各細胞において抗アセチル化ヒストン H3-K9 抗体でクロマチン免疫沈降を行い、E-カドヘリンプロモーター近傍のヒストン修飾を解析した。その結果、E-カドヘリン遺伝子の発現が抑制されている細胞では、ヒストン H3-K9 のアセチル化が消失している事が示された (Fig. 30b)。一方で、E-カドヘリン遺伝子の発現を維持している MCF10A や MCRIP1 AA を発現する細胞においては、ヒストン H3-K9 のアセチル化が観察された。

さらに抗メチル化ヒストン H3-K9 抗体でクロマチン免疫沈降を行い、E-カドヘリンプロモーター近傍のヒストン修飾を解析した結果、EMT が誘導され E-カドヘリン遺伝子の発現が抑制されている細胞では、ヒストン H3-K9 のメチル化が亢進している事が示唆された (Fig. 30c)。以上の結果から、MCRIP1 は CtBP の E-カドヘリンプロモーターにおける局在を阻害しており、その結果 CtBP によるヒストン修飾酵素 (HDAC や HMTase) のリクルートを抑制し、E-カドヘリン遺伝子と相互作用するヒストンの翻訳後修飾を制御しているという事を明らかにした。

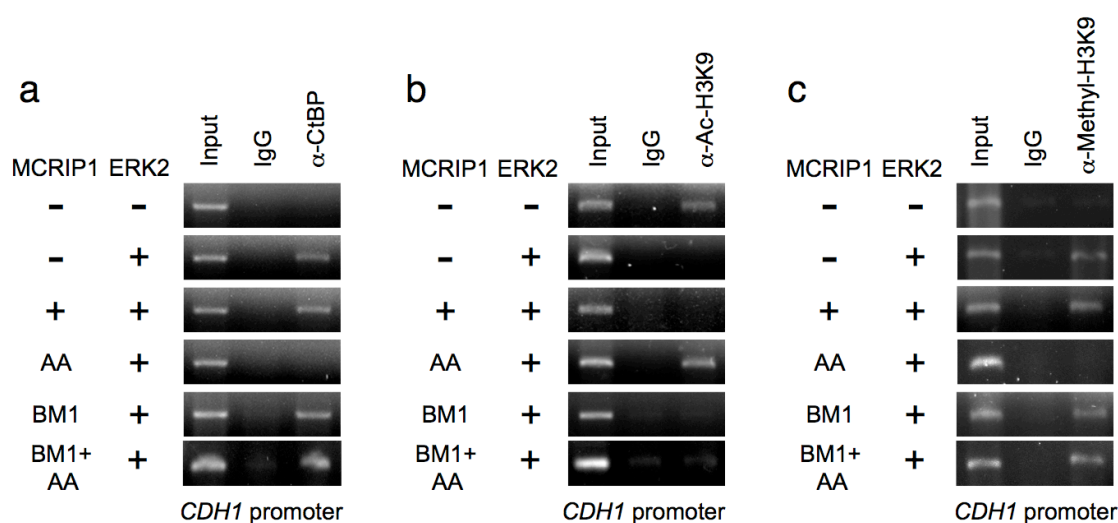


Fig.30 MCRIP1 は E-カドヘリン遺伝子における CtBP の局在を制御し、E-カドヘリンのヒストンアセチル化、メチル化修飾を制御する。

(a) E-カドヘリンの発現を消失し、EMT が誘導された細胞では、CtBP が E-カドヘリンプロモーターに局在する。樹立した各細胞の核内抽出液を作製し、CtBP 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、DNA を精製後、PCR によって E-カドヘリンプロモーター領域を特異的に増幅し、アガロース電気泳動により E-カドヘリンプロモーターにおける CtBP の局在を検出した。

(b) E-カドヘリンの発現を維持し、EMT が誘導されていない細胞ではヒストン H3-K9 のアセチル化が維持されている。樹立した各細胞の核内抽出液を作製し、ヒストンアセチル化抗体を用いて ChIP アッセイを行った。

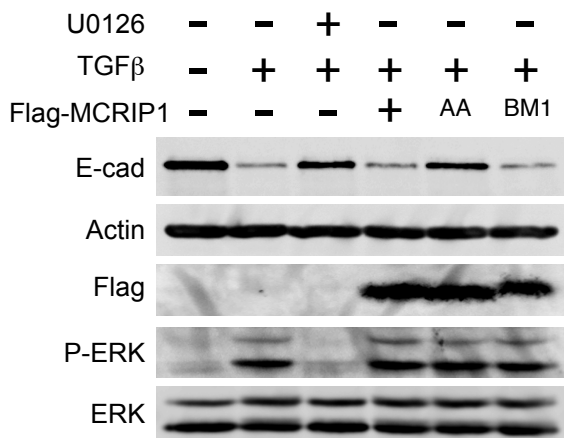
(c) E-カドヘリンの発現を消失し、EMT が誘導された細胞では、ヒストン H3-K9 のメチル化が亢進している。樹立した各細胞の核内抽出液を作製し、ヒストンメチル化抗体を用いて ChIP アッセイを行った。

16. MCRIP1 は TGFβ で誘導される EMT を制御する

これまでに、TGFβシグナルの下流で ERK が活性化する事、さらに EMT 誘導時に ERK が重要な機能を果たしている事が知られている^{18,19,41}。また、上記のように MCRIP1 が ERK 下流で EMT 誘導を阻害している事を発見した。そこで、Fig. 28d で樹立した各種 MCRIP1 を安定発現する細胞株を用いて、TGFβにより誘導される EMT を MCRIP1 が阻害するかどうか検証を行った。これまでに、MCF10A 細胞に TGFβ処理を行うと、EMT が誘導されて細胞の形態が線維芽細胞のようになる事が知られている。また、MCF10A 細胞と同じマウス由来の乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞や尿管上皮細胞である MCT 細胞では、TGFβ刺激をしても、ERK 経路を U0126 により遮断した場合には、EMT 誘導が阻害される事が知られている¹⁸。そこで、MCF10A 細胞の TGFβ処理により誘導される EMT にも ERK 経路が重要であるかを検証すべく U0126 添加による影響を観察した。

その結果、U0126 添加により ERK 経路の活性化を阻害すると、E-カドヘリン遺伝子の発現が維持されて、EMT 誘導が阻害される事が分かった (Fig. 31a レーン 3)。また、TGFβ処理により活性化した ERK によってリン酸化され、CtBP と結合が减弱する野生型 MCRIP1、CtBP と結合できない MCRIP1 BM1 を発現する細胞株では、E-カドヘリンの発現低下が観察された (Fig. 31a レーン 4,6)。一方で、ERK リン酸化サイトをアラニンに置換した MCRIP1 変異体は、TGFβ処理によっても、E-カドヘリンの発現を維持している事が明らかになった (Fig. 31a レーン 5)。さらに、TGFβ処理によって E-カドヘリンの発現が减弱した細胞は、間葉系細胞様の形態を示す事が明らかにされた (Fig. 31b)。以上の結果から、MCRIP1 は TGFβの下流においても EMT 誘導を阻害する事が明らかになった。

a



b

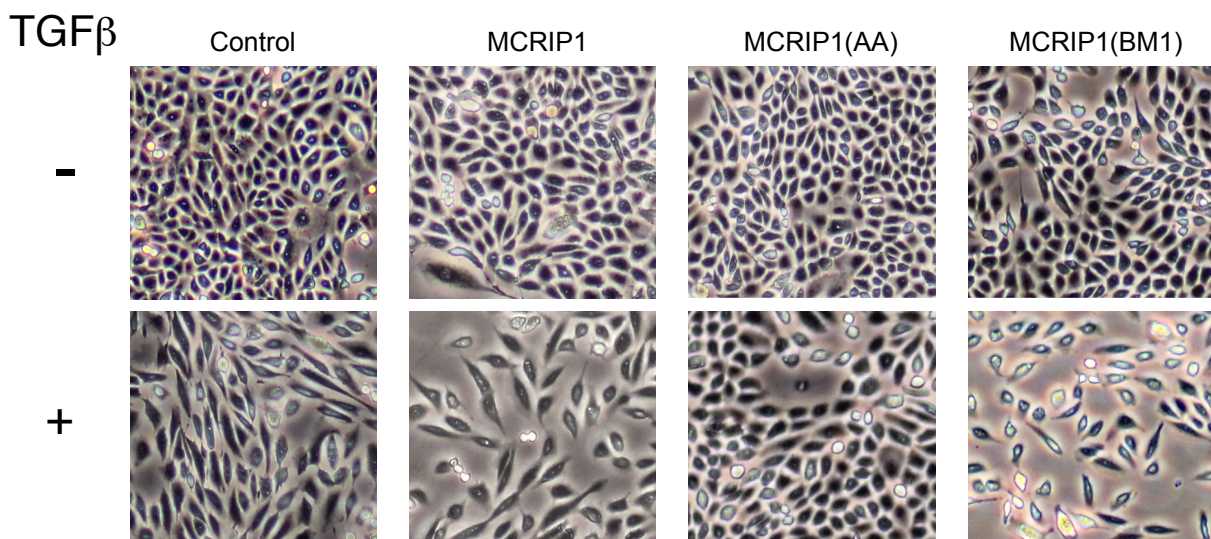


Fig.31 MCRIP1はTGFβによって誘導されるEMTの制御に関与する。

(a) MCRIP1 AAは、TGFβによって誘導されるEMT誘導を阻害する。MCF10A細胞及び各種MCRIP1発現細胞株をTGFβ (5 ng/ml) で刺激し、EMTを誘導した。また試料によってはU0126 (1 μM) を添加し、EMT誘導が阻害されるかを検証した。3日後に細胞抽出液を作製し、ウェスタンブロッティングによりE-カドヘリン遺伝子が発現しているかを検証した。

(b) aで薬剤処理した細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した。

17. まとめ：MCRIP1 は CtBP の機能を阻害する事により、ヒストンの翻訳後修飾を制御する

以上の結果から、MCRIP1 は EMT 誘導時において ERK と CtBP のシグナルを仲介する分子である事が明らかになった。以下はこれまでに明らかしてきた事のまとめである。

ERK 活性が低い条件では、MCRIP1 は CtBP と安定的に結合する事で、ZEB と CtBP の結合を競合的に阻害する事を明らかにした。その結果、CtBP は E-カドヘリン遺伝子に局在できず、CtBP の転写抑制補因子としての機能が阻害される事が分かった(Fig.32 左)。

一方、TGFβや増殖刺激などによって ERK 活性化が亢進すると、MCRIP1 はリン酸化され、CtBP との結合能が減弱する。その結果、CtBP は ZEB1 などの転写抑制因子と結合する事で、ヒストン修飾酵素 (HDAC やヒストンメチル化酵素) を E-カドヘリン遺伝子の近傍にリクルートする。最終的に、クロマチン構造の凝集が誘導されて、遺伝子発現が抑制される事を明らかにした (Fig. 32 右)。

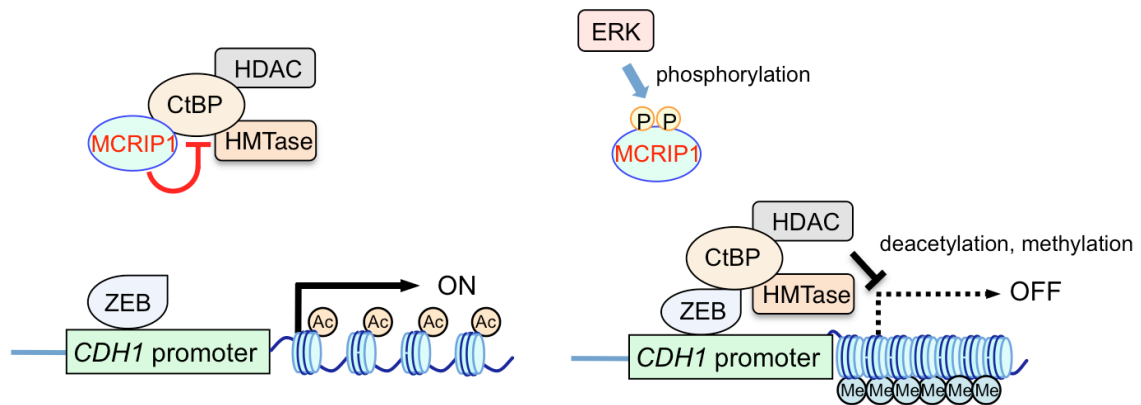


Fig.32 MCRIP1 は ERK によるリン酸化によって CtBP との結合が制御されており、E-カドヘリン遺伝子の発現を制御する。

第4章 考察

1. E-カドヘリン以外の標的遺伝子の解明

本研究により、MCRIP1 が CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害する事によって EMT 誘導を阻止する事を明らかにした。以前から TGFβ刺激により ERK 活性化が亢進する事、さらに、ERK と CtBP が EMT 誘導を制御している事が報告されていたが、本研究により MCRIP1 が ERK と CtBP のシグナルを仲介している事を見出した。しかしながら、CtBP の機能は EMT 誘導時における E-カドヘリン遺伝子の発現抑制のみならず、p21、PTEN、Bax などの増殖抑制に関与する遺伝子やアポトーシス誘導性遺伝子の発現を負に制御する事が知られている^{68, 57}。

癌細胞の場合、EMT が誘導され上皮細胞組織から離脱すると、足場接着に依存しない生存能を獲得する事が知られている。この原因として、ERK の恒常的活性化が挙げられる。正常な細胞では、ERK の活性化は足場接着に依存して起こるため、上皮細胞は浮遊状態では生存・増殖不全に陥り、やがて細胞死が誘導される。このような足場接着不全によるアポトーシスをアノイキスと言う。しかし、癌細胞では ERK 経路構成因子の活性型変異が生じるために足場非依存的な生存・増殖能を獲得していることが報告されている。また上述のように、悪性癌細胞では CtBP は E-カドヘリン遺伝子のみならず、Bax などのアノイキスを促進するタンパク質分子の遺伝子発現を抑制する事が予想される。したがって、ERK と CtBP の活性化が、癌細胞における EMT の誘導だけでなく、アノイキス抵抗性の獲得に寄与している事が考えられる。以上の事実から、MCRIP1 は EMT 誘導の阻害のみならず、アノイキス抵抗性獲得の阻害にも関与している可能性が予想される。

2. MCRIP1 の発現制御機構の解明

MCRIP1 の発現プロファイルを得るために、各種培養細胞の MCRIP1 mRNA とタンパク質の発現量を解析した (Fig. 17)。興味深い事に、MCRIP1 は癌組織由来の培養細胞において発現が減弱している事が明らかにされた (HeLa 細胞、MCF7 細胞、A549 細胞、T24 細胞)。MCRIP1 は EMT 誘導を阻害するタンパク質分子であるため、癌細胞は悪性形質転換の結果 MCRIP1 をリン酸化する事

だけでなく、発現抑制する機構を獲得する可能性が考えられる。これまでの解析で、MCRIP1 のタンパク質が安定である事、mRNA とタンパク質の発現量が相関している事、またデータベース検索により MCRIP1 の遺伝子領域がメチル化されて発現が減少しているような報告が無い事が分かっている。以上を考慮すると、MCRIP1 は転写レベルで制御されているか、あるいは MCRIP1 mRNA を分解/安定化するような分子機構が存在している可能性が高い。特に癌細胞では、MCRIP1 の転写が抑制されているか、mRNA 分解機構などが働き、MCRIP1 タンパク質の発現が抑制されているのではないかと考えられる。

また、癌由来の細胞で MCRIP1 の発現量が顕著に低下しているが、実際の癌組織において同様であるか組織染色などによって検討する必要がある。

3. MCRIP1 と ERK2 との結合様式の解明

MCRIP1 が ERK2 と結合する事を共沈実験によって明らかにした (Fig. 18b)。ERK は基質分子と結合する際に主に 2 つの結合様式を取っており、1 つは CD ドメインと D ドメインを介した結合、2 つ目は基質分子の FXFP サイトを認識して結合する様式である。MCRIP1 の C 末には、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸からなる短い D ドメイン様サイトが存在している。また、MCRIP1 の中央には FxYE というサイトが存在している。ペプチドスクリーニングによって ERK は FXFP サイトだけでなく、F がチロシンであっても結合能がほとんど変わらない事が明らかになった⁶⁹。したがって、MCRIP1 には D ドメイン様サイトと、FXFP 様サイトの 2 種類が存在しており、ERK2 はいずれの結合様式でも MCRIP1 と結合できる事が予想される。

4. MCRIP1 のリン酸化による CtBP との結合親和性の消失の解明

本研究によって MCRIP1 がリン酸化されると CtBP との結合が減弱する事が明らかになったが、どのような分子メカニズムによって結合親和性が弱まるかは依然として不明である。少なくとも ERK 活性化による MCRIP1 のリン酸化を誘導しても、MCRIP1 は局在を変えず、核内にとどまり続けている。また、リン酸化によって MCRIP1 タンパク質の安定性にも全く影響はない。したがって、リン酸化される事によって、MCRIP1 タンパク質の高次構造に何らかの変化が生じる事により、自身で PxDLS サイトを覆い、CtBP との結合能が減弱する可能性が考えられる。また、MCRIP1 がリン酸化された結果、別のタンパク

質との結合親和性が上昇する可能性が考えられる。その結果、CtBP との結合が減弱すると予想される。

興味深い事にプロテオーム解析によって、MCRIP1 の CtBP との結合に重要なサイト (PxDLS) と隣接するリジン残基がアセチル化される事が報告されている。MCRIP1 がアセチル化される事によって、CtBP との結合が減弱する事が考えられる。したがって、ERK によるリン酸化が前段階のシグナルとして、アセチル化酵素との親和性の上昇をもたらしているとも予想される。

5. MCRIP1 の生理機能の解明

本研究により、MCRIP1 が EMT 制御に重要な役割を果たしている事を明らかにした。EMT は発生初期でその存在が提唱されてから、創傷治癒、癌細胞の転移など様々な局面に関与している事が明らかにされている。しかしながら、それぞれの局面における EMT 制御を全て同じタンパク質分子が制御しているのか、それとも異なる局面においては別の分子が関与しているのかは解明されていない。本研究で同定した MCRIP1 は、脊椎動物にのみ保存されているタンパク質分子である。一方で、CtBP はショウジョウバエなどの無脊椎動物でも発現しており、発生に重要である事が報告されている⁷⁰。したがって、高等動物の発生には MCRIP1 による CtBP の厳密な制御が必須である事、あるいは MCRIP1 は線維症や癌転移などの疾患において EMT 制御に関わっている事が予想される。これらを解明するために、個体レベルで解析する事が必要であると考えており、現在 MCRIP1 ノックアウトマウスの作製に着手している。

第5章 材料及び実験方法

酵母スリーハイブリッド法

酵母スリーバイブリッド法は TM414 (L40 *ura3*) 株を用いて行われた。始めに、pBTM117-Polo box domain (PLK2 由来)、p426ADH1-ERK2(PD) 発現ベクターを TM414 株に遺伝子導入した。これらの形質転換された細胞に胎盤、脳、肝臓由来のヒト cDNA ライブラリー (pACT2 ベクターに挿入されている) を遺伝子導入した。これらの細胞をヒスチジン類似体である 3-アミノトリアゾール (15 mM) を含む培地上 (-His, -Ura, -Trp, -Leu) に播種した。数日後、コロニーをピックアップし、 β -gal 検定を行った。青色を呈色した細胞群を培養し、cDNA の抽出を行い、シーケンシング PCR 法により目的遺伝子の配列解析を行った。

バッファー

リシスバッファーA 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1% トリトン X-100, 0.5% デオキシコレート、10% グリセロール、137 mM 塩化ナトリウム水溶液、2 mM エチレンジアミン四酢酸、54 mM β -グリセロールリン酸塩, 10 mM フッ化ナトリウム, 2 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1 mM ジチオトレイトール (還元剤), 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (セリンプロテアーゼ阻害剤), 10 μ g/ml ロイペプチン, 10 μ g/ml アプロチニン (プロテアーゼ阻害剤). Lysis buffer B 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5), 1% NP-40, 0.1% デオキシコレート, 10% グリセロール, 137 mM 塩化ナトリウム水溶液, 2 mM エチレンジアミン四酢酸, 54 mM β -グリセロールリン酸塩, 10 mM フッ化ナトリウム, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1 mM ジチオトレイトール (還元剤), 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (セリンプロテアーゼ阻害剤), 110 μ g/ml ロイペプチン, 10 μ g/ml アプロチニン (プロテアーゼ阻害剤).

プラスミド

MCRIP1 は cDNA ライブラリーよりクローニングを行い、pcDNA3 Flag ベクター、pQCXIP ベクター、pGEX6P ベクターに挿入した。CtBP と ZEB は、pcDNA3 ベクター (Invitrogen) に挿入した。ERK2 は、pQCXIH ベクターに挿入した。各種変異体は、PCR mutagenesis により作製した。

細胞培養

HEK293 細胞、H1299 細胞、HeLa 細胞、MCF7 細胞、A549 細胞、T24 細胞、U2OS 細胞、MDCK 細胞は、10% ウシ血清、L-グルタミン酸、ペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM (グルコース 1.0 g/l) で培養した。MCF10A 細胞は、5% ウマ血清、EGF (20 ng/ml)、ヒドロコルチゾン (0.5 mg/ml)、コレラトキシン (100 ng/ml)、インスリン (10 µg/ml)、ペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM/F12 (GIBCO) で培養した。

トランスフェクション

培養細胞内に遺伝子を導入するために、Effectene transfection reagent (QIAGEN) を使用した。各種培養細胞を 35mm 培養皿に播種し、プラスミドベクターの合計量が 0.4µg になるように調整し、遺伝子導入を行った。

siRNA による標的遺伝子のノックダウン

HEK293 細胞を 10cm 培養皿に播種した。24 時間後に MCRIP1 siRNA を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) により導入した。72 時間後に実験に用いた。

本研究において使用した siRNA は以下の様である。

MCRIP1 siRNA #1 5'-ccg gag cac gca gga tgc caa-3'

MCRIP1 siRNA #2 5'-cag agt cgt gta caa cgg caa-3'.

リコンビナントタンパク質の精製

各種 GST-MCRIP1 及び、His-CtBP の精製を行った。大腸菌株 DH5α に pGEX6p1 GST-MCRIP1 (野生型、各種アラニン置換変異体) 及び、pHis-CtBP を遺伝子導入した。37°C で 16 時間培養した後、生育したコロニーを、アンピシリンを含む LB 培地 50ml に溶かし、一晩液体培養した。翌日、アンピシリンを含む 450ml の LB 培地にこれを加え、IPTG (最終濃度 0.1M) を添加し、大腸菌内におけるタンパク質の発現を誘導した (30°C、8 時間)。これを 3000rpm、4°C、15 分で遠心分離させ、菌液から効率的に大腸菌を回収した。これを GST バッファーで懸濁し、超音波処理により大腸菌細胞壁を破碎した。さらに、トリトン X-100 を最終濃度 1% になるように加え、15000rpm、4°C、15 分で遠心分離した。上清をチューブにあつめ、GSH ビーズを加えて一晩回転培養した。翌日、

GSH ビーズを各種バッファーで洗浄し、グルタチオンを含む抽出溶液を加えて、リコンビナントタンパク質の抽出を行った。

安定発現株の樹立

Myc-ERK2、Myc-ERK2 kinase dead、各種 Flag-MCRIP1 の MCF10A 発現株の樹立は以下の手順で行った。GP2-293 細胞を播種し、24 時間後 pVSV ベクターと各種 pQCXIH-ERK2 ベクターあるいは各種 pQCXIP-MCRIP1 ベクターを遺伝子導入した。さらに 24 時間後培地交換した。翌日、各種ウイルスを含む培養液上清をろ過し、ポリブレンを加えた。前日に播種した MCF10A 細胞の培地を作製したウイルス培養液で置換した。数日後、ウイルス感染がなされた細胞をハイグロマイシンとピューロマイシンで選別した。

In vitro キナーゼアッセイ

HEK293 細胞に各種 MAP キナーゼ、MAPK キナーゼを過剰発現し、免疫沈降法により活性型 ERK、p38、JNK を精製した。これにリコンビナントタンパク質 (GST-MCRIP1、MBP、ATF2、Jun)、 γ -³²P-ATP を加え 30°C、30 分間反応させた。MAP キナーゼによるリン酸化の程度は、オートラジオグラフィーにより検出を行った。MCRIP1 アラニン置換変異体を用いた *in vitro* キナーゼアッセイにおいても同様の処理を行った。

半定量的 RT-PCR

各種培養細胞を播種し、24 時間後に TRIzol 1ml を培養皿に加え、細胞抽出液を作製した。これに、0.2ml のクロロホルムを加え、ボルテックスミキサーでよく混ぜた。12000g、4°C、15 分間遠心し、上清を新しいチューブに置き換えた。さらにエタノール沈殿法により RNA を精製した。精製した全 RNA を用いて、mRNA を効率的に cDNA にする目的で逆転写反応を行った。逆転写反応産物を PCR により増幅し、各種培養細胞における相対的な MCRIP1 及びアクチン mRNA の発現量をアガロースゲルにより検出した。用いたプライマーは以下の様である。

MCRIP1

5'-CCA CGA GGA GAA CGT CCG CTT CA-3'

5'-GGT TAG GGA CCT TCT CCA CAT AC-3'

アルカリホスファターゼアッセイ

HEK293 細胞に Flag-MCRIP1 発現ベクターを遺伝子導入した。24 時間後、細胞に TPA を添加し、ERK 活性化を誘導した。刺激から 20 分後、細胞抽出液を作製し、免疫沈降法により MCRIP1 タンパク質を特異的に精製した。精製した MCRIP1 タンパク質にアルカリホスファターゼ (54.9 unit/tube) を加えて、25°C、30 分ホスファターゼ反応を行った。ホスファターゼ阻害剤として 25mM β グリセロール、25mM フッ化ナトリウム、2mM オルトバナジン酸ナトリウムを使用した。

抗体

抗 Flag 抗体 M2 (Sigma); 抗 HA 抗体 3F10 (Roche), 抗 Myc 抗体 9E10, 抗 ERK2 抗体, 抗 ZEB1 抗体, 抗 GST 抗体 (Santa cruz); 抗 CtBP 抗体 (abcam), 抗リン酸化 ERK 抗体 (CST); 抗 E カドヘリン抗体, 抗 N カドヘリン抗体, 抗ビメンチン抗体, (BD) 抗 MCRIP1 抗体

免疫共沈降

①MCRIP1 と各種 MAP キナーゼの共沈実験では、100mM 塩化ナトリウム、0.5% NP-40、0.1% デオキシコレートによるリシスバッファーを用いて細胞抽出液を作製した。Flag 抗体で MCRIP1 を免疫沈降し、プロテイン G セファロースビーズを加えて回転培養した。これを 0.5% NP-40 を含む 1×PBS 溶液で 2 回、リシスバッファーで 1 回ビーズの洗浄を行った。MCRIP1 と共沈降した MAP キナーゼを検出するために、ビーズに結合したタンパク質をサンプルバッファーに溶出し、SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングで解析を行った。

②MCRIP1 と CtBP の共沈実験では、137mM 塩化ナトリウム、1% NP-40、0.1% デオキシコレートによるリシスバッファーを用いて細胞抽出液を作製した。Flag 抗体で MCRIP1 を、Myc 抗体で CtBP を免疫沈降し、リシスバッファーでビーズを 3 回洗浄した。以下は上記と同様の手順により、結合分子の検出を行った。

免疫染色

HEK293 細胞および、ERK/各種 MCRIP1 安定発現株 (MCF10A 細胞)をカバ

ーガラス上に播種した。24 時間後、1×PBS 溶液で 2 回洗浄を行い、パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定した。さらに1×PBS 溶液で2回洗浄後、0.1% トリトン X100 で細胞の膜構造を不安定化させた。再び 1×PBS 溶液で洗浄し、BlockAce (雪印)で 1 時間ブロッキングした。1×PBS 溶液で 2 回洗浄後、一次抗体を加え 50 分室温で反応させた。1×PBS 溶液にて 4 回洗浄後、蛍光標識された二次抗体を加え、遮光し 30 分室温で反応させた。1×PBS 溶液にて 4 回洗浄後、DAPI を加え、遮光して 10 分室温で反応した。反応終了後、1×PBS 溶液にて 2 回洗浄し、さらに精製水で1回洗浄し、サンプルを作製し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

ルシフェラーゼアッセイ

U2OS あるいは MDCK 細胞を 24 穴プレートに播種した。24 時間後、pGL-3 E カドヘリンルシフェラーゼレポーターベクター、pcDNA3-ZEB ベクター、各種 pcDNA3-MCRIP1 ベクター、内部標準としてシーパンジールシフェラーゼ発現ベクターを遺伝子導入した。また、pcDNA3 ベクターは遺伝子導入するプラスミドの濃度を同一にするために加えられた。さらに 24 時間後、各ルシフェラーゼの発現量をデュアルルシフェラーゼ定量システム (Promega) により検出した。

マイグレーションアッセイ

マイグレーションアッセイでは、Oris セルマイグレーションアセンブリキットを使用した。ストッパーをはめた 96 穴の各ウェルに、MCF10A 細胞を 5.0×10^4 個播種した。24 時間後ストッパーを外し、マイトマイシン C (25ng/ml) をふくむ EGF 溶液 (35ng/ml) に置換した。3 日後、空洞に移動した細胞の個数を測定しグラフにした。

マトリゲルインベーションアッセイ

インベーションアッセイでは、BD BioCoat マトリゲルインベーションチャンバー (ポアサイズ 8 μ m)を使用した。誘因物質として EGF (30ng/ml)を使用し、各チャンバーに MCF10A 細胞を 1.0×10^6 播種した。24 時間後、メンブレンは 1×PBS 溶液で 2 回洗浄され、細胞はメタノールで固定された。クリスタルバイオレットで染色後、精製水でメンブレンを洗浄した。メンブレンは光学顕微鏡

で観察し、無作為に選ばれた視野内の細胞を計測し、グラフにした。

クロマチン免疫沈降

クロマチン免疫沈降は、SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit を使用した。細胞を 10cm 培養皿に播種し、翌日ホルムアルデヒドでタンパク質と DNA のクロスリンクを行った。その後、グリシン溶液を添加し、5 分間振盪した。反応後、細胞を 2 回 1×PBS 溶液で洗浄し、細胞をチューブに集めた。細胞膜を破碎した後、ミクロコッカスヌクレアーゼにより DNA を断片化し、超音波破碎により核膜の破碎を行った。遠心後、DNA 断片が溶解した上清を回収し、抗体とプロテイン G アガロースビーズを加えて免疫沈降を行った。ビーズを洗浄後、ビーズからクロマチンの抽出を行った。これに塩化ナトリウム溶液とプロテアーゼ K を添加し、脱クロスリンク反応を行った。DNA をカラムによって精製し、これを PCR の鋳型とした。PCR は 95 °C 5 分、{95 °C 30 秒 62 °C 30 秒 72 °C 30 秒}を 30-45 サイクル、72 °C 5 分のプログラムで行われた。

使用したプライマーは以下の様である。

E-cadherin promoter specific primers

5'-GTA AAA GCC CTT TCT GAT CCC AGG-3'

5'-TCA CAG GTG CTT TGC AGT TCC GA-3'

第6章 謝辞

本研究を遂行するために、指導教員として日々ご指導頂いた斎藤春雄教授に感謝申し上げます。

また、研究の方向性に関する議論のみならず実験手技などのご指導頂いた武川睦寛教授に感謝申し上げます。

活発な議論、研究支援をしていただきました、東京大学医科学研究所 分子細胞情報分野ならびに分子シグナル制御分野に所属する全ての方々に感謝申し上げます。

E-カドヘリンレポーター遺伝子を快く供与してくださった Stephen P. Sugrue 博士に大変感謝致します。

最後に、大学院生活を心身共に支えてくださった両親に深く感謝申し上げます。

第 7 章 参考文献

1. Roskoski, R., Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* **66**, 105-143 (2012).
2. Kyriakis, J.M. & Avruch, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* **92**, 689-737 (2012).
3. Roux, P.P. & Blenis, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-344 (2004).
4. Clark-Lewis, I., Sanghera, J.S. & Pelech, S.L. Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* **266**, 15180-15184 (1991).
5. Gonzalez, F.A., Raden, D.L. & Davis, R.J. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem* **266**, 22159-22163 (1991).
6. Davis, R.J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**, 14553-14556 (1993).
7. Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 827-837 (2005).
8. Dhanasekaran, D.N., Kashef, K., Lee, C.M., Xu, H. & Reddy, E.P. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**, 3185-3202 (2007).
9. Morrison, D.K. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* **114**, 1609-1612 (2001).
10. Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M. & Nishida, E. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J* **20**, 466-479 (2001).
11. Fantz, D.A., Jacobs, D., Glossip, D. & Kornfeld, K. Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to

- phosphorylate specific residues. *J Biol Chem* **276**, 27256-27265 (2001).
12. Jacobs, D., Beitel, G.J., Clark, S.G., Horvitz, H.R. & Kornfeld, K. Gain-of-function mutations in the *Caenorhabditis elegans* lin-1 ETS gene identify a C-terminal regulatory domain phosphorylated by ERK MAP kinase. *Genetics* **149**, 1809-1822 (1998).
 13. Murphy, L.O., Smith, S., Chen, R.H., Fingar, D.C. & Blenis, J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**, 556-564 (2002).
 14. Rubinfeld, H., Hanoch, T. & Seger, R. Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem* **274**, 30349-30352 (1999).
 15. Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. & Nishida, E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**, 110-116 (2000).
 16. Raman, M., Chen, W. & Cobb, M.H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-3112 (2007).
 17. Yamamoto, T. *et al.* Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* **16**, 1171-1182 (2006).
 18. Xie, L. *et al.* Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* **6**, 603-610 (2004).
 19. Li, Q. & Mattingly, R.R. Restoration of E-cadherin cell-cell junctions requires both expression of E-cadherin and suppression of ERK MAP kinase activation in Ras-transformed breast epithelial cells. *Neoplasia* **10**, 1444-1458 (2008).
 20. Shin, S., Dimitri, C.A., Yoon, S.O., Dowdle, W. & Blenis, J. ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol Cell* **38**, 114-127 (2010).
 21. Pages, G. *et al.* Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**, 1374-1377 (1999).
 22. Yao, Y. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12759-12764

- (2003).
23. Nekrasova, T. *et al.* ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **175**, 2374-2380 (2005).
 24. Bos, J.L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**, 4682-4689 (1989).
 25. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954 (2002).
 26. Garnett, M.J. & Marais, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* **6**, 313-319 (2004).
 27. Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* **311**, 1287-1290 (2006).
 28. Kalluri, R. & Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-1428 (2009).
 29. Hay, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* **154**, 8-20 (1995).
 30. Thiery, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 442-454 (2002).
 31. Zavadil, J. & Bottinger, E.P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764-5774 (2005).
 32. Feng, X.H. & Derynck, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 659-693 (2005).
 33. Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C.H. & ten Dijke, P. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* **112**, 4557-4568 (1999).
 34. Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.H. & Moustakas, A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* **16**, 1987-2002 (2005).
 35. Polyak, K. & Weinberg, R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits.

- Nat Rev Cancer* **9**, 265-273 (2009).
36. Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. & Liotta, L.A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 541-573 (1993).
 37. Barcellos-Hoff, M.H. & Dix, T.A. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* **10**, 1077-1083 (1996).
 38. Wipff, P.J. & Hinz, B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur J Cell Biol* **87**, 601-615 (2008).
 39. Derynck, R., Akhurst, R.J. & Balmain, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* **29**, 117-129 (2001).
 40. Lee, M.K. *et al.* TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* **26**, 3957-3967 (2007).
 41. Javle, M.M. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* **14**, 3527-3533 (2007).
 42. Grooteclaes, M.L. & Frisch, S.M. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* **19**, 3823-3828 (2000).
 43. Moreno-Bueno, G., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* **27**, 6958-6969 (2008).
 44. Postigo, A.A. & Dean, D.C. ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6683-6688 (1999).
 45. Kurdistani, S.K. & Grunstein, M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 276-284 (2003).
 46. Klose, R.J. & Zhang, Y. Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 307-318 (2007).
 47. McGinty, R.K., Kim, J., Chatterjee, C., Roeder, R.G. & Muir, T.W. Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated

- intranucleosomal methylation. *Nature* **453**, 812-816 (2008).
48. Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M. & Cano, A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* **24**, 306-319 (2004).
 49. Boyd, J.M. *et al.* A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *EMBO J* **12**, 469-478 (1993).
 50. Hildebrand, J.D. & Soriano, P. Overlapping and unique roles for C-terminal binding protein 1 (CtBP1) and CtBP2 during mouse development. *Mol Cell Biol* **22**, 5296-5307 (2002).
 51. Shirakihara, T. *et al.* TGF- β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J* **30**, 783-795 (2011).
 52. Shi, Y. *et al.* Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* **422**, 735-738 (2003).
 53. Chinnadurai, G. CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol Cell* **9**, 213-224 (2002).
 54. Roukens, M.G. *et al.* Control of endothelial sprouting by a Tel-CtBP complex. *Nat Cell Biol* **12**, 933-942 (2010).
 55. Nardini, M. *et al.* CtBP/BARS: a dual-function protein involved in transcription co-repression and Golgi membrane fission. *EMBO J* **22**, 3122-3130 (2003).
 56. Chinnadurai, G. The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. *Cancer Res* **69**, 731-734 (2009).
 57. Kovi, R.C., Paliwal, S., Pande, S. & Grossman, S.R. An ARF/CtBP2 complex regulates BH3-only gene expression and p53-independent apoptosis. *Cell Death Differ* **17**, 513-521 (2010).
 58. Choi, H.J. *et al.* Bcl3-dependent stabilization of CtBP1 is crucial for the inhibition of apoptosis and tumor progression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **400**, 396-402 (2010).

59. Bergman, L.M. & Blaydes, J.P. C-terminal binding proteins: emerging roles in cell survival and tumorigenesis. *Apoptosis* **11**, 879-888 (2006).
60. Elia, A.E. *et al.* The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115**, 83-95 (2003).
61. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**, 321-330 (2006).
62. Archambault, V. & Glover, D.M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 265-275 (2009).
63. Antonsson, B. *et al.* Identification of in vitro phosphorylation sites in the growth cone protein SCG10. Effect Of phosphorylation site mutants on microtubule-destabilizing activity. *J Biol Chem* **273**, 8439-8446 (1998).
64. Antonsson, B. *et al.* Purification, characterization, and in vitro phosphorylation of the neuron-specific membrane-associated protein SCG10. *Protein Expr Purif* **9**, 363-371 (1997).
65. Alpatov, R. *et al.* Nuclear speckle-associated protein Pnn/DRS binds to the transcriptional corepressor CtBP and relieves CtBP-mediated repression of the E-cadherin gene. *Mol Cell Biol* **24**, 10223-10235 (2004).
66. Izutsu, K. *et al.* The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. *Blood* **97**, 2815-2822 (2001).
67. Kuppuswamy, M. *et al.* Role of the PLDLS-binding cleft region of CtBP1 in recruitment of core and auxiliary components of the corepressor complex. *Mol Cell Biol* **28**, 269-281 (2008).
68. Grooteclaes, M. *et al.* C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4568-4573 (2003).
69. Sheridan, D.L., Kong, Y., Parker, S.A., Dalby, K.N. & Turk, B.E. Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J Biol Chem* **283**,

19511-19520 (2008).

70. Poortinga, G., Watanabe, M. & Parkhurst, S.M. *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J* **17**, 2067-2078 (1998).