

## 論文内容の要旨

### 論文題目

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)

氏名 市川研史

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る。EMT は初期胚発生でその存在が明らかとなったことを皮切りに、創傷治癒や線維症発症の原因として研究されてきた。これらの他にも EMT は癌細胞の転移メカニズムに関与している事が明らかになってきた。

上皮細胞は隣接する細胞と細胞間接着により秩序立って整列している。しかしながら、EMT が誘導された細胞において、細胞間接着を介在する E-カドヘリンの分解と発現抑制が起こり、上皮細胞組織から離脱する事が知られている。

近年、MAP キナーゼである ERK の下流で、E-カドヘリン遺伝子の発現が抑制される事が明らかにされた。さらにその結果、EMT が誘導される事が報告された。しかしながら、EMT のきっかけとも言える E-カドヘリン遺伝子発現抑制機構において、ERK の役割は不明であった。

一方で、EMT における 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 が重要である事が報告された。CtBP は、ZEB などの E-カドヘリンプロモーターを標的とする転写抑制因子と結合する。また、CtBP はヒストン修飾酵素 (HDAC, HMT) とも

結合し、結果的に CtBP をコアとする複合体が E-カドヘリンプロモーターの近傍のクロマチン構造を変化させ、エピジェネティックに E-カドヘリン遺伝子発現を抑制する事が知られている。CtBP は転写抑制因子と結合する際に、結合分子側の PxDLS というアミノ酸配列と結合する事が明らかにされている。

以上のように、ERK と CtBP は EMT 誘導時に E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に寄与する事が分かっている。しかしながら、ERK と CtBP が互いをどのように制御しているかについては未解明のままであった。

そこで私は、EMT が誘導される際に ERK と CtBP を仲介するタンパク質分子が存在するのではないかと仮定した。この仲介分子を探索すべく、酵母スリーハイブリッド法を利用して ERK 基質分子のスクリーニング実験を行った。

酵母スリーハイブリッド法による ERK 基質分子の探索の結果、機能未知の遺伝子を同定した。これを MCRIP1 (MAPK-regulated Co-Repressor Interacting Protein 1) と命名した。BLAST サーチの結果、MCRIP1 が魚からヒトに至る脊椎動物間で保存されている事、MAPK のリン酸化モチーフサイトを有している事、CtBP 結合サイト (PxDLS サイト) を有している事が明らかとなった。

続いて、MCRIP1 が ERK でリン酸化されるかを検証すべく *in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、MCRIP1 は ERK でリン酸化されたが、p38 や JNK ではリン酸化されない事が分かった。また、細胞内に MCRIP1 と各 MAPK を過剰発現し、共沈実験を行ったが、こちらも同様に MCRIP1 は ERK とのみ特異的に結合する事が明らかになった。さらに、MCRIP1 が細胞内で ERK によりリン酸化されるかを SDS-PAGE により検証を行った。その結果、EGF 刺激により、MCRIP1 のシフトアップが観察された。このシフトアップがリン酸化によるものである事を、ホスファターゼアッセイにより確認した。また細胞を U0126 で前処理した後に、EGF 刺激を行うと MCRIP1 のシフトアップが観察されなかった事から、MCRIP1 が細胞内で ERK によりリン酸化されることが明らかになった。

続いて、ERK により MCRIP1 のどのサイトがリン酸化されるかを *in vitro* キナーゼアッセイにより検証を行なった。その結果、MCRIP1 の 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事を明らかにした。また、細胞内で過剰発現させた MCRIP1 変異体を Phospho-SP/TP 認識抗体で検出したところ、同様に 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事が分かった。

さらに、MCRIP1 が CtBP と結合するかを共沈実験により検証した。その結果、MCRIP1

が CtBP と結合する事を明らかにした。次に MCRIP1 が CtBP の機能をどのように制御しているのかを検証すべく、E-カドヘリンプロモーターアッセイを行った。すると、MCRIP1 の発現量増大に伴い、E-カドヘリンプロモーター活性が上昇する事が分かった。CtBP は E-カドヘリン遺伝子の発現を抑制する事が知られているので、この結果から MCRIP1 が CtBP の転写抑制補因子としての機能を阻害している事が示唆された。

続いて、共沈実験により MCRIP1 は自身の PxDSL サイトを介して、CtBP と結合する事を明らかにした。さらに CtBP と結合できない MCRIP1 PxDSL サイトの変異体を用いて E-カドヘリンレポーターアッセイを行った結果、野生型よりも E-カドヘリンレポーター活性が上昇しなかった。

次に、ERK による MCRIP1 のリン酸化が MCRIP1 と CtBP の結合に影響するかどうか検証を行った。その結果、ERK による MCRIP1 のリン酸化により CtBP と MCRIP1 の結合が減弱する事が分かった。一方で、MCRIP1 の ERK リン酸化サイトをアラニンに置換した変異体では、ERK が活性化を誘導しても CtBP と安定的に結合する事が分かった。また、MCRIP1 の ERK リン酸化サイトをアスパラギン酸に置換したリン酸化擬態変異体においても、同様に CtBP との結合が減弱する事が分かった。さらに、MCRIP1 リン酸化擬態変異体を用いて E-カドヘリンプロモーターアッセイを行った結果、これらの変異体では E-カドヘリンプロモーター活性が野生型 MCRIP1 ほど上昇しなかった。以上の結果から、MCRIP1 は CtBP との結合によって、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。また、ERK による MCRIP1 のリン酸化により、MCRIP1 は CtBP から解離するため、CtBP の機能を阻害する事ができない事が示された。

続いて、MCRIP1 が CtBP の機能をどのような分子メカニズムで阻害しているのかを解明すべく、以下の仮説に関して検証を行う事とした。転写抑制因子である ZEB は自身の PxDSL サイトを介して CtBP と結合し、この複合体が協調的に E-カドヘリン遺伝子の転写を抑制する事が知られている。一方で上述のように MCRIP1 は自身の PxDSL サイトを介して CtBP と結合して、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。ZEB と MCRIP1 は CtBP と結合様式が同じであるにもかかわらず、E-カドヘリン遺伝子発現において真逆の作用を示すという事実に着目し、MCRIP1 は CtBP と ZEB の結合を競合的に阻害するのではないかという仮説を立て、これを検証するために共沈実験を行った。その結果、MCRIP1 の発現量を増大させると、CtBP と ZEB の結合が減弱する事を明らかにした。また、E-カドヘリンプロモーターアッセイでも同様に MCRIP1 の発現量に依存して、プロモーター活性が上昇する事を明らかにした。しかし、CtBP との結合が減弱する MCRIP1 PxDSL 変異体やリン酸化擬態変異体においては、ZEB と CtBP

との結合のみならず、ZEB-CtBP 複合体による E-カドヘリン遺伝子発現抑制を阻害できない事が明らかになった。

これまでに、CtBP は EMT 誘導時に E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に関与している事が知られている。また、ERK は EMT 誘導時に活性化して E-カドヘリン遺伝子の発現抑制に寄与する事が知られている。そこで、MCRIP1 が EMT 誘導時に両分子に関連するかを解明するために、上皮細胞内に野生型 MCRIP1 あるいは各種 MCRIP1 変異体及び ERK を過剰発現する事で EMT を誘導させた。その結果、ERK リン酸化サイトをアラニンに置換して、CtBP と安定に結合する MCRIP1 変異体を発現する細胞は、親株の上皮細胞と同様に E-カドヘリンの発現が維持されている事が免疫染色とウェスタンブロット法により明らかになった。EMT が誘導された細胞は運動性が亢進する事が知られている。そこで、作成した細胞株を用いて細胞の遊走性と浸潤性を検証するために、マイグレーションアッセイとインベーションアッセイをそれぞれ行った。その結果、MCRIP1 アラニン置換変異体を発現する細胞では、親株の上皮細胞とほぼ同程度の低い運動性を示す事が観察された。また、各種 MCRIP1 変異体を発現する細胞株に EMT 誘導因子である TGF $\beta$ 刺激を行い、EMT 誘導の検証を行った。その結果、MCRIP1 アラニン置換変異体を発現する細胞株では E-カドヘリンの発現が維持され、EMT が誘導されない事が分かった。

CtBP は、HDAC などのヒストン修飾酵素を標的遺伝子にリクルートする事で遺伝子発現をエピジェネティックに抑制する事が知られている。そこで、各種 MCRIP1 及び ERK を発現する細胞株を用いて ChIP (クロマチン免疫沈降法)アッセイを行い、CtBP の E-カドヘリンプロモーターにおける局在を観察した。その結果、EMT が誘導された細胞のみで CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在が観察された。さらに、HDAC によるヒストン修飾の効果を ChIP アッセイで検証した結果、EMT が誘導されなかった細胞では、E-カドヘリンプロモーターに関わるヒストンがアセチル化修飾されている事が明らかとなり、遺伝子発現が活性化している事が示唆された。また、siRNA による MCRIP1 のノックダウンで、CtBP の E-カドヘリンプロモーター局在が亢進する事が明らかになった。

以上の結果から、MCRIP1 は CtBP の転写抑制複合体形成を阻害する機能を有し、EMT 誘導時に ERK によるリン酸化で MCRIP1 は CtBP から解離する事により、E-カドヘリン遺伝子の発現が抑制される事が示唆された。