

博士論文（要約）

ERK 経路の異常活性化により発現誘導
される機能未知遺伝子の同定および機能解析

高木 祐輔

ERK 経路の異常活性化により発現誘導される機能未知遺伝子の同定および機能解析

高木 祐輔

【背景と目的】

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路は、Raf、MEK、ERK の三種のキナーゼで構成されるシグナル伝達経路である。この経路は主に増殖因子により活性化され、細胞増殖や分化、生存などに関連する遺伝子の発現を制御する。一方で、ERK の上流因子である Ras、Raf、MEK の活性化型変異や増殖因子受容体の遺伝子増幅は、ERK 経路を異常に活性化し、発癌を誘発することが広く知られている。当研究室ではこれまで活性化型 MEK 変異体に着目して研究を行ってきた。MEK のミスセンス変異は、孤発性癌および先天性 Ras/MAPK 症候群で多数発見されているが、興味深いことに、両疾患で見出される点変異は全く重複しない。当研究室では各疾患由来の MEK 変異体の生化学特性を解析し、由来する疾患ごとに活性強度および活性持続時間が異なることを見出した。また、孤発性癌由来の MEK 変異体のみが悪性形質転換を惹起することを明らかにした。さらに、各疾患由来の活性化型 MEK 変異体を導入した細胞を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、それぞれ各疾患に特徴的な遺伝子発現変化を引き起こすことを明らかにした。

ERK 経路の異常活性化が癌病態と密接に関連することは明らかであるが、それらを媒介する分子機構は十分解明されていない。癌では ERK 経路の異常が高頻度で観察されることから、ERK 経路に関連する遺伝子を解明することで、癌の治療・診断への発展が期待できる。そこで本研究では、MEK 変異体の解析で得られた結果を基に、新規癌関連遺伝子を同定することを着想した。まず、先行研究の遺伝子発現解析の結果を用いて、癌由来の MEK 変異体で特異的に発現亢進する遺伝子をスクリーニングした。これらの遺伝子の中には、細胞増殖や癌転移に関連する既知の癌関連遺伝子に加えて、機能未知の遺伝子が複数含まれていた。得られた機能未知の遺伝子については、MEK 阻害剤で細胞を処理した場合にその発現が低下するか検討を行い、最終的に ERK 経路依存的に発現亢進する遺伝子であることを確認した。本研究では、その中でも特に発現変動が著しい機能未知遺伝子を EIG1 (ERK-inducible gene 1) と命名し、その分子機能および癌病態との関連を解明することを目的とした。

【結果】

1. EIG1 は、ERK 経路の活性化により発現誘導される

先天性 Ras/MAPK 症候群由来の MEK 変異体 (MEK1^{F53S}) または孤発性癌由来の MEK 変異体 (MEK1^{K57N}) を安定発現する HEK293 細胞を用いて qPCR およびウエスタンブロットを行った。その結果、EIG1 は、MEK1^{K57N} 特異的に強く発現誘導されることが明らかとなった。次に、ERK 経路の異常活性化を引き起こす種々の癌遺伝子 (B-raf^{V600E}, N-Ras^{G12V}) を安定発現する HEK293 細胞を樹立し、それらの細胞における EIG1 の発現を解析した。その結果、EIG1 は、MEK1 のみならず B-raf や N-Ras の活性型変異によっても発現誘導されることが明らかとなった。また、この発現誘導は、MEK 阻害剤の処理により抑制されたことから ERK 経路依存的事であることが示された。

ERK 経路の異常活性化が高頻度で認められる膵癌、肺癌、大腸癌のヒト臨床組織サンプルを用いて免疫組織染色を行った。その結果、いずれの組織においても EIG1 は正常部と比較して癌部での高発現が観察された。また、膵臓の連続切片を用いて染色を行い、EIG1 はリン酸化 ERK が強く検出される細胞において特に高発現していることを明らかにした。以上の結果から、EIG1 は、ERK 経路が異常活性化している多くの癌において発現していることが明らかとなり、癌の病態形成に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

EIG1 遺伝子の発現制御機構を解明するためにルシフェラーゼレポーターアッセイによる EIG1 遺伝子のプロモーター解析を行った。EIG1 遺伝子のプロモーター領域を同定し、その活性制御を担う転写因子を探索した結果、ERK の基質として知られる転写因子 ELK1 がその活性化に関与していることが明らかとなった。

2. EIG1 は、細胞増殖および運動能を抑制する

EIG1 は、ERK 経路の異常活性化を引き起こす種々の癌遺伝子により発現誘導されることから、癌病態と関連している可能性が考えられる。そこで、EIG1 が細胞増殖や細胞運動といった癌形質に与える影響を検証するために、EIG1 を安定発現する HEK293 細胞および U2OS 細胞を樹立し、in vitro での細胞増殖アッセイおよび細胞遊走アッセイを行った。その結果、EIG1 安定発現細胞ではコントロール細胞と比較して増殖能および運動能が抑制されていることが明らかとなった。

3. EIG1 結合タンパク質の同定

EIG1 の分子機能を解明するため、EIG1 と特異的に結合するタンパク質の同定を試みた。質量分析による共沈タンパク質の解析および酵母ツーハイブリッドによる結合タンパク質のスク

リーニングを行った結果、PP2A 複合体、Arp2/3 複合体の構成因子など複数の候補分子を同定することに成功した。

4. EIG1 は、PP2A 複合体の形成量を増加させる

EIG1 の結合因子の候補として同定された PP2A 複合体について、EIG1 との結合を解析した。まず、共免疫沈降実験により、両タンパク質が結合することを確認した。次に、大腸菌より精製したリコンビナントタンパク質を用いて GST-pull down assay を行い、EIG1 が PP2A の B サブユニットと直接結合することを明らかにした。興味深い事に、EIG1 を安定発現した細胞において、PP2A 複合体の形成量の増加が観察された。

5. EIG1 は、Arp2/3 複合体の構成因子のリン酸化を減弱させ、ラッフル膜の形成を抑制する

EIG1 結合因子の候補として同定された Arp2/3 複合体の構成因子についても、EIG1 との結合を解析した。まず、共免疫沈降実験により、両タンパク質が結合することを確認した。次に、大腸菌より精製したリコンビナントタンパク質を用いて、GST-pull down assay を行い、両タンパク質が直接結合することを明らかにした。EIG1 は、PP2A の B サブユニットと Arp2/3 複合体の構成因子のどちらとも結合することから、これらが三者複合体を形成している可能性を考えた。共免疫沈降実験を行った結果、予想通り、これらのタンパク質が三者複合体を形成することが明らかとなった。さらに、PP2A の B サブユニットと Arp2/3 複合体の構成因子の結合が、EIG1 の発現依存的に亢進することを見出した。また、EIG1 を安定発現した U2OS 細胞では Arp2/3 複合体の構成因子のリン酸化の減弱が観察された。このことから、EIG1 が PP2A の B サブユニットと Arp2/3 複合体の構成因子をつなぐアダプターとなり、Arp2/3 複合体の構成因子を積極的に脱リン酸化することで、その機能を抑制している可能性が考えられた。Arp2/3 複合体の構成因子は、特定の Thr 残基がリン酸化されることで活性化し、ラッフル膜の形成を促進することが報告されている。実際に、EIG1 を安定発現した U2OS 細胞を解析し、ラッフル膜の形成が有意に抑制されていることを確認した。

【まとめ】

本研究で同定された **EIG1** は、**Ras^{G12V}**、**BRaf^{V600E}**、**MEK1^{K57N}** といった癌遺伝子によりで **ERK** 経路が異常活性化されることで発現誘導される遺伝子であり、さらに、**ERK** 経路の異常活性化を有する一部の癌組織や癌細胞株においても発現亢進が認められた。機能解析の結果、**EIG1** は、(1) **ERK** 経路の活性化時に転写因子 **ELK1** を介して発現誘導されること、(2) **PP2A** の **B** サブユニットおよび **Arp2/3** 複合体の構成因子と三者複合体を形成すること、(3) **Arp2/3** 複合体の構成因子のリン酸とラッフル膜の形成を抑制すること、(4) 細胞増殖および細胞運動を抑制することが明らかとなった。

本研究により **EIG1** が、**PP2A** 複合体や **Arp2/3** 複合体の新規制御因子であることが明らかとなった。また、**EIG1** は、細胞増殖能や運動能を負に制御することから、癌抑制的な機能を有する遺伝子であることが示された。