

博士論文

チロシンキナーゼ型受容体の Ser/Thr リン酸化  
制御機構とその生理機能の解析

2013 年度

富山大学大学院 医学薬学教育部 生命薬科学専攻

がん細胞生物学的研究室

周 越

# 目次

## 要旨

序章	1
----	---

## 第1章 p38 を介した Eps15 のリン酸化制御機構

1.1 節 序論	8
1.2 節 実験方法	9
1.3 節 実験結果・考察	13

## 第2章 EGFR の Thr リン酸化による Tyr 自己リン酸化の抑制機構

2.1 節 序論	24
2.2 節 実験方法	25
2.3 節 実験結果・考察	27

## 第3章 TNF- $\alpha$ を介した EphA2 のリン酸化制御機構

3.1 節 序論	37
3.2 節 実験方法	38
3.3 節 実験結果・考察	42

総括	59
----	----

謝辞	63
----	----

参考文献	64
------	----

## 要旨

チロシンキナーゼ型受容体 (receptor tyrosine kinase; RTK) は 1 回膜貫通型の受容体であり、細胞外にリガンドが結合することで細胞内のチロシンキナーゼが活性化され、生存シグナルや増殖シグナルを伝える。がん細胞において、しばしば RTK の過剰発現や変異が認められ、異常な増殖やアポトーシス抑制に繋がることが明らかとなっており、近年、RTK を標的とした中和抗体やチロシンキナーゼ阻害剤の開発が進んでいる。我々の研究室では、がん組織で慢性的に炎症反応が誘発されている点に着目し、炎症シグナルを介したがんの悪性化機構の解明を目指して研究を進めている。これまでに、炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) が RTK の一つである epidermal growth factor receptor (EGFR) の Thr-669・Ser-1046/7 リン酸化を誘導することを明らかにしてきた (Nishimura et al., Mol. Cell. Biol., 2009)。これらのリン酸化はリガンドに依存せず、EGFR のチロシンキナーゼ活性にも依存しない全く新しいシグナルであり、そのリン酸化制御機構と生理機能の解析は EGFR の機能を理解するうえで重要だと考えられる。

EGFR の Ser-1046/7 リン酸化は p38 が制御し、EGFR のエンドサイトーシス誘導に関与していることを明らかにしているが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。EGFR のエンドサイトーシスは数多くのアダプター分子が制御しているため、本研究では TNF- $\alpha$  によるアダプター分子の制御を検討することで、TNF- $\alpha$  を介した EGFR のエンドサイトーシス機構の解明を試みた。その結果、Ser-1046/7 リン酸化と同様に p38 がアダプター分子の一つである EGFR pathway substrate 15 (Eps15) のリン酸化制御に関わることを見出し、Eps15 と EGFR のエンドサイトーシスとの関連について検討した (第 1 章)。一方、EGFR の Thr-669 リン酸化は ERK が直接制御することを明らかにしてきたが、その機能についてはほとんどわかっていなかった。そこで、Thr-669 リン酸化が EGFR の活性化に及ぼす影響について検討し、Thr-669 リン酸化の生理機能の解明を目指した (第 2 章)。

上記の研究により、炎症シグナルが EGFR を制御することが明らかになったが、EGFR 以外の RTK にも Ser/Thr 残基が多数存在していることから、それらの残基が TNF- $\alpha$  によって制御される可能性が考えられた。そこで、乳がんや神経膠腫などで過剰発現が報告されている EPH receptor A2 (EphA2) に注目し、TNF- $\alpha$  を介した EphA2 のリン酸化制御機構とその細胞浸潤能・運動能における役割について解析した (第 3 章)。

## 第1章 p38 を介した Eps15 のリン酸化制御機構

Eps15 は EGFR を含め、さまざまな受容体のエンドサイトーシスに関わるアダプター分子であり、EGFR の場合には、モノユビキチン化を受けた活性型 EGFR、およびエンドサイトーシスを誘導する他のアダプター分子と結合する足場タンパク質として機能する。HeLa 細胞に TNF- $\alpha$  を作用させて得られた細胞抽出液を用いてリン酸化を検出する Phos-tag 電気泳動を行ったところ、Eps15 のシフトアップバンド、つまり Eps15 のリン酸化バンドが確認できた。そこで、質量分析計を用いてリン酸化部位の同定を試みた結果、Ser-796 がリン酸化されることがわかった。キナーゼ阻害剤や siRNA を用いてこのリン酸化の制御機構を検討したところ、興味深いことに EGFR の Ser-1046/7 リン酸化と同様に p38 が Ser-796 をリン酸化していることがわかった。次に、EGFR のエンドサイトーシスにおける p38 を介した Ser-796 リン酸化の役割を調べるために、Eps15 およびその関連タンパク質のノックダウンを行ったが、TNF- $\alpha$  による EGFR のエンドサイトーシスの抑制は認められず、Eps15 が EGFR のエンドサイトーシスに関与する結果が得られなかった。しかしながら、EGFR のエンドサイトーシスに必須なアダプター分子 AP-2 が Ser-796 の N 末端側の Pro-768 付近に結合すること、また、モノユビキチン化された EGFR と結合する Ubiquitin interacting motif が Ser-796 の C 末端側に存在していることから、EGFR やアダプター分子との結合において Eps15 が足場タンパクとして機能するには Ser-796 リン酸化に伴う構造変化が必要である可能性が考えられる。今後、p38 を介した Eps15 Ser-796 リン酸化がエンドサイトーシスにどのように関わっているかを詳細に解析する必要がある。

## 第2章 EGFR の Thr リン酸化による Tyr 自己リン酸化の抑制機構

EGFR を過剰発現しているヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 を用いて、Tyr のリン酸化と Thr のリン酸化の関係について検討した。この細胞株では、EGFR の過剰発現に伴い Tyr 自己リン酸化が恒常的に誘導されている。そこにリガンドを作用させ、ERK の活性化を誘導したところ、予想通り Thr-669 がリン酸化された。この時、驚くべきことに、一連の Tyr 残基の脱リン酸化が認められた。Thr-669 は EGFR の膜近傍ドメインに位置しており、EGFR のホモ二量体形成に関わることが報告されている (Jura et al., Cell, 2009)。二量体形成時には、2 つの受容体はそれぞれリガンドを受け取る側の受容体 (アクチベーター) と、アクチベーターによって活性化される受容体 (レシーバー) として非対称にホモ二量体化し、それぞれ異なる機能を持つ。そこで、アクチベーターまたは

レシーバーとしてのみ機能する変異体を作製し、HEK293 細胞に導入し検討を行ったところ、レシーバー側の Thr-669 のリン酸化が Tyr の自己リン酸化抑制に必須であることを見出した。以上のことから、ERK を介するレシーバー側の Thr-669 のリン酸化は、二量体の立体構造変化により EGFR の活性化抑制を誘導する負のフィードバック機構であることがわかった。

### 第 3 章 TNF- $\alpha$ を介した EphA2 のリン酸化制御機構

EphA2 は細胞接着に関わる RTK の一つであるが、腫瘍組織において過剰発現とそのリガンドの発現低下が認められており、キナーゼ非依存的な役割に注目が集まっている。近年、Miao らは神経膠腫細胞株において Akt を介した EphA2 Ser-897 のリン酸化が、がん細胞の浸潤能・運動能の亢進に関与することを報告している (Cancer Cell, 2009)。そこで、我々は炎症シグナルによって EphA2 のリン酸化が制御される可能性について検討した。TNF- $\alpha$  を HeLa 細胞に作用したところ、EphA2 Tyr リン酸化ではなく、Ser-897 リン酸化が強く誘導された。このリン酸化は PI3K 阻害剤 LY294002 では阻害されず、MEK-ERK 阻害剤 U0126 またはその下流のキナーゼ ribosomal S6 kinase (RSK) 阻害剤 BI-D1870 で阻害された。がん転移を誘導することが知られている RSK には 4 つのアイソフォーム (RSK1、RSK2、RSK3 および RSK4) があるが、このうち siRNA を用いて RSK1 と RSK2 をノックダウンした細胞において Ser-897 リン酸化が完全に阻害された。次に、もともと EphA2 の発現が低い HEK293 細胞に EphA2 と RSK1 を過剰発現させ、RSK1 による EphA2 Ser-897 リン酸化誘導を検討した。野生型の EphA2 を単独で導入したところ、Tyr リン酸化が認められたが、Ser-897 リン酸化は認められなかった。そこに RSK1 を共発現させたところ、Ser-897 リン酸化が強く誘導され、また、キナーゼ活性のない EphA2 の導入時にも、野生型と同程度の Ser-897 リン酸化が誘導された。逆に、共発現させる RSK1 をキナーゼ活性のない変異体に置き換えたところ、Ser-897 リン酸化が消失した。以上の結果から、Ser-897 リン酸化は EphA2 のチロシンキナーゼ活性に依存せずに、活性化した RSK から誘導されることがわかった。そこで、RSK が直接 EphA2 Ser-897 をリン酸化するかどうかを調べるために、組み換えタンパク質を用いて in vitro kinase assay を行ったところ、RSK1 および RSK2 が Ser-897 を直接リン酸化することがわかった。RSK を介した Ser リン酸化シグナルは HeLa 細胞のみならず、ヒト神経膠腫細胞株やヒト肺がん細胞株などでも同様に認められ、さらに RSK の活性化を誘導する EGF などの刺激でも認められた。したがって、EphA2 Ser-897 リン酸化は RSK1 および

RSK2によって制御されることが明らかになった。

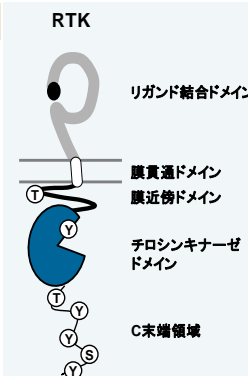
次に、RSKを介したSer-897リン酸化の機能を調べるために、RSKおよびEphA2 Ser-897が恒常的にリン酸化を受けているヒト乳がん細胞株MDA-MB-231を用いて、その浸潤能・運動能について検討した。まず、invasion assayにて浸潤能を評価したところ、RSK阻害剤BI-D1870を作用させたMDA-MB-231細胞では、浸潤能の低下が認められた。次に、wound healing assayにて運動能を評価した。剥離48時間後の細胞を観察したところ、コントロール細胞では遊走が認められたが、RSK阻害剤BI-D1870を作用させた細胞では遊走が認められず、著しい運動能の低下が認められた。また、EphA2、またはRSK1とRSK2をsiRNAを用いてノックダウンした時も同様の効果が認められた。剥離48時間後に遊走したMDA-MB-231細胞に対して免疫蛍光染色を行ったところ、運動の進行方向に向かって形成する仮足の一種であるラメリポディアにEphA2およびSer-897のリン酸化が局在することがわかった。一方、RSK阻害剤BI-D1870を作用させたのちに剥離し、48時間後に剥離部位の境界に位置する細胞に対して免疫蛍光染色を行ったところ、EphA2 Ser-897リン酸化の抑制だけではなく、ラメリポディアの消失とそれに伴うEphA2の局在変化が認められた。以上のことから、RSK1およびRSK2を介するEphA2 Ser-897リン酸化は細胞の浸潤能・運動能を制御すると考えられた。

以上の結果より、炎症シグナルはRTKのSer/Thrリン酸化を制御し、がんの悪性化に重要な役割を果たすことが示唆された。RTKはチロシンキナーゼであるため先行研究のほとんどはTyrリン酸化にしか着目しておらず、Ser/Thrリン酸化に関する情報は極めて少ない。本研究ではEGFRとEphA2のSer/Thrリン酸化の重要性を示したが、他のRTKのSer/Thr残基についても同様に炎症シグナルの制御を受ける可能性があるため、炎症シグナルを介した網羅的なRTKのリン酸化プロファイルの取得とその詳細な分子機構の解明および機能解析が必須であると考えられる。これらの情報はがんの複雑なシグナルの全体像を明らかにするうえで重要であり、新たな分子標的治療戦略の構築に貢献することが期待される。

## 序章

チロシンキナーゼ型受容体 (receptor tyrosine kinase; RTK) は細胞膜に局在する 1 回膜貫通型のチロシンキナーゼであり、ヒトでは 58 種類存在する。細胞増殖や生存、分化、代謝、運動を制御し、組織や器官の発達、生理応答、造血、免疫応答など多岐にわたる生命現象を調節するため、細胞内シグナルの中心的な役割を担っている<sup>[1-4]</sup>。RTK は共通した構造を取っており、リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、膜近傍ドメイン、チロシンキナーゼドメイン、C 末端領域から構成されている (図 1-1)。リガンドが RTK のリガンド結合ドメインに結合することで細胞外の構造変化が誘導されることによってホモ、またはヘテロ二量体化、もしくは多量体化する。その結果、チロシンキナーゼ活性が誘導され、C 末端領域のチロシン残基の自己リン酸化が誘導される。リン酸化されることによって様々なアダプタータンパク質を介して、下流の分子のリン酸化を誘導し、シグナルを伝える。正常細胞では RTK のシグナルは秩序を保って制御されるが、がん細胞などでは無秩序に RTK のチロシンキナーゼ活性が誘導され、細胞内や細胞間のシグナル伝達に混乱をきたすことが知られている<sup>[5-8]</sup>。

PhosphoSitePlus <sup>®</sup>				from Cell Signaling			
	pSer	pThr	pTyr		pSer	pThr	pTyr
EGFR	25	13	16	EphA1	5	4	3
HER2	18	12	12	EphA2	14	10	11
HER3	12	3	14	EphA3	2	3	8
HER4	2	4	20	EphA4	3	4	5
LMR1	17	3	5	EphA5	7	5	5
LMR2	22	7	5	EphA6	2	1	5
LMR3	8	1	3	EphA7	1	3	7
SuRTK106	2	2	3	EphA8	2	3	5
CKK4/PTK7	3	1	2	EphA10	1	0	1
RYK	2	5	0	EphB1	8	4	9
RON	2	0	9	EphB2	5	7	13
MET	13	9	14	EphB3	3	3	9
MER	5	1	6	EphB4	9	5	8
AXL	6	3	12	EphB6	2	0	8
TYRO3/SKY	7	0	5	FGFR1	11	2	13
ROR1	1	0	5	FGFR2	10	5	11
ROR2	8	1	8	FGFR3	6	2	9
TRKA	0	0	7	FGFR4	7	0	3
TRKB	3	2	7	RET	6	1	17
TRKC	4	0	7	FLT1	7	0	12
MUSK	2	0	6	FLT4 (VEGFR3)	7	1	11
DDR1	3	2	10	KDR (VEGFR2)	11	2	9
DDR2	7	0	7	CSFR/FMS	6	2	11
IRR	2	2	3	FLT3	4	2	15
INSR	12	3	9	KIT	10	2	13
IGF-1R	9	2	9	PDGFR $\alpha$	17	2	18
ALK	2	6	13	PDGFR $\beta$	7	1	20
LTK	1	0	3	TIE1	0	2	7
ROS	3	3	12	TIE2	1	0	9



細胞内ドメイン内の  
リン酸化部位数

Ser : 375

Thr : 162

S+T : 537

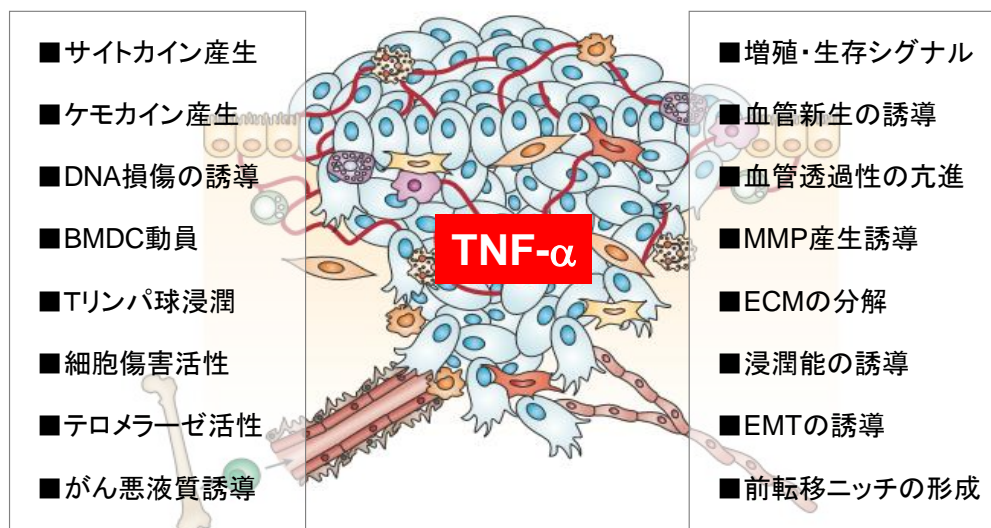
Tyr : 507

図1-1 RTKの細胞内ドメイン内のリン酸化部位数とRTKの構造

PhosphoSitePlusに登録されているヒトRTKの細胞内ドメイン内のSer、Thr、Tyrリン酸化部位数を示しており、右下にヒトRTK58種類のリン酸化部位数の合計を示した。右上には典型的なRTKの構造を示した。

RTK の中で最も研究が進んでいる分子は、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) である。この分子は細胞増殖や生存に関わることが知られているが、がん細胞ではその過剰発現や遺伝子変異に伴うチロシンキナーゼ活性化が高頻度起きており、これによりがん細胞の異常な増殖や抗アポトーシスが誘導されることがわかってきた。そのため、EGFR をターゲットとした分子標的治療が進んでいる<sup>[9-10]</sup>。例えば非小細胞肺癌の場合、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 gefitinib が開発され、2002 年に世界に先駆け、日本で認可され、臨床応用されている<sup>[11-14]</sup>。

RTK の研究はチロシンキナーゼ活性制御を中心に行われてきたが、近年、興味深いことにチロシン残基ではなく、Ser/Thr 残基のリン酸化によってチロシンキナーゼ非依存的な新しい RTK の機能があることがわかってきた。質量分析計の性能や測定技術の発展により、RTK のリン酸化部位が多数同定されている。PhosphoSitePlus データベースに登録されているヒト RTK58 種類の細胞内ドメインに存在するリン酸化部位数を合計すると、チロシンは 507 か所、Ser は 375 か所、Thr は 162 か所同定されている (図 1-1) <sup>[15]</sup>。Ser と Thr を合計すると 537 か所となり、チロシンのリン酸化部位数よりも多いことがわかる。これまでの研究はチロシン残基の解析を中心に行われてきたが、Ser/Thr 残基のリン酸化制御機構とそ



**図1-2 腫瘍内における炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ の役割**

間質細胞、またはがん細胞自身からTNF- $\alpha$ が分泌され、腫瘍内は慢性的に炎症反応が誘発されている。TNF- $\alpha$ はサイトカインやケモカインの産生、DNA損傷の誘導、骨髓由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cell) の動員、Tリンパ球の浸潤、細胞障害活性、テロメラーゼ活性、がん悪液質誘導、増殖・生存シグナル誘導、血管新生誘導、血管透過性の亢進、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生誘導、細胞外基質 (ECM) の分解、浸潤能の誘導、上皮間葉転換 (EMT) の誘導、前転移ニッチの形成に関わり、がんの悪性化、浸潤、転移を誘導する。



の生理機能の解明が RTK の全貌解明に重要であり、がん分子標的治療への基礎的な情報提供が期待される。

一方、我々の研究室では炎症シグナルによるがんの悪性化に注目し、研究を行ってきた。腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ) は、もともと抗腫瘍活性の本体として同定されたが、近年の研究によりがんの悪性化促進因子として中心的な役割を果たすことが明らかになってきた (図 1-2) <sup>[16-17]</sup>。腫瘍組織では間質細胞やがん細胞自身から TNF- $\alpha$  が産生されており、慢性炎症が誘発されている。TNF- $\alpha$  はがん細胞の増殖・生存に関わるだけでなく、血管新生の誘導や細胞外基質の分解を誘導することでがんの浸潤や転移にも関わることを報告されている。また、上皮性のがん細胞が転移するとき、上皮細胞は極性を失い、間葉系細胞の性質を獲得することで運動能が亢進する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) と呼

ばれる現象が起きている。Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が EMT の誘導因子であるが、TNF- $\alpha$  が EMT を促進させる因子であることが 2010 年に報告されている<sup>[18]</sup>。このように TNF- $\alpha$  は抗腫瘍作用ではなく、むしろ悪性化誘導作用を持つことがわかってきた。

TNF- $\alpha$  は炎症シグナルで中心的な役割を果たす mitogen-activated protein kinase kinase (MAP3K) の TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1) にシグナルを伝える<sup>[19]</sup>。ノックアウトマウスを用いた解析によって、TAK1 は T 細胞や B 細胞の分化、マクロファージからのサイトカイン産生、血管新生、破骨細胞の分化などの生体反応に重要であることが示唆されている。がんにおいても TAK1 は重要な役割を果たしており、我々の研究室ではこれまでにマウス大腸がん細胞 colon 26 の肺転移を TAK1 が促進させることや TRAIL によって誘導されるアポトーシスを TAK1 が抑制することなどを報告してきた<sup>[20-22]</sup>。TAK1 は下流の転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) と mitogen-activated protein kinase (MAPK) にシグナルを伝えることも明らかにしている (図 1-3) <sup>[19]</sup>。

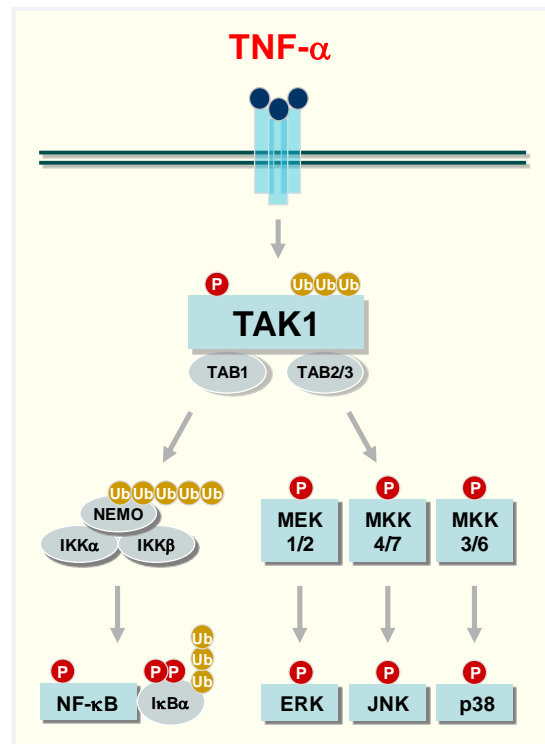


図1-3 炎症シグナルの制御機構

炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ はTAK1の活性化を促す。活性化TAK1は転写因子NF- $\kappa$ BとMAPKのERK、JNK、p38にシグナルを伝える。

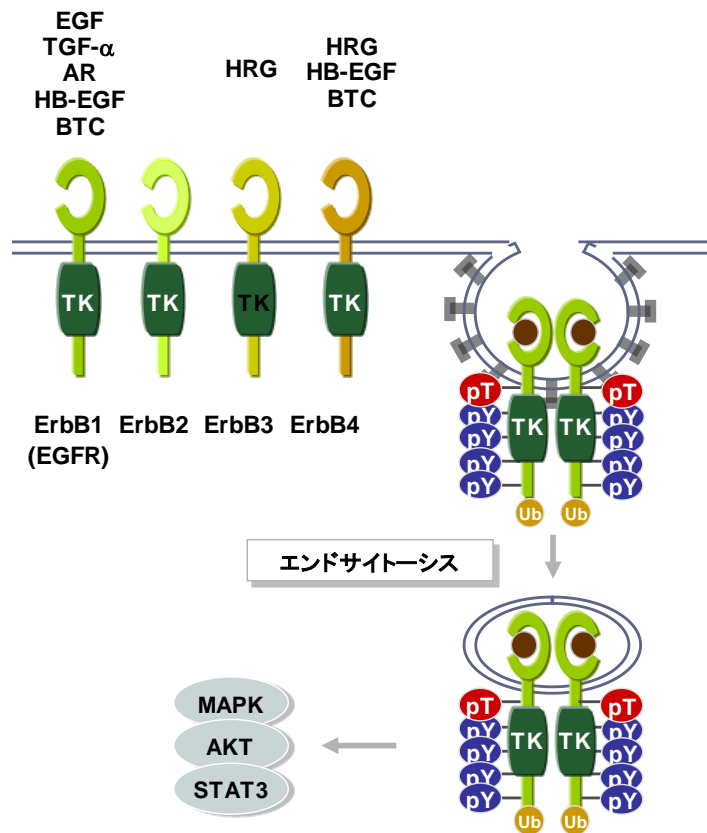


図1-4 リガンドを介したErbBファミリーの制御機構

ErbBファミリーはErbB1 (EGFR)、ErbB2、ErbB3、ErbB4で構成されており、それぞれのリガンドを受容体の上に示した。ErbB2にはリガンドはないが、恒常的にダイマーを形成しやすく、チロシンキナーゼが活性化しやすい構造を取っている。ErbB3はチロシンキナーゼ活性がなく、それはEGFRやErbB2のチロシンキナーゼドメインと比べると活性に必須なアミノ酸が置換されているためだと考えられている。リガンドがEGFRに結合すると細胞外ドメインの構造変化が誘導され、ErbBファミリーはホモ、またはヘテロダイマーを形成することで、チロシンキナーゼ活性が誘導され、C末端領域に存在するチロシン残基の自己リン酸化が誘導される。その結果、下流にMAPKシグナル、AKTシグナル、STAT3シグナルを送る。また、活性化EGFRはモノユビキチン化されることで、アダプター分子が認識し、他の分子をリクルートすることで、エンドサイトーシスが誘導される。最終的にはリソソームに運ばれ、分解される。

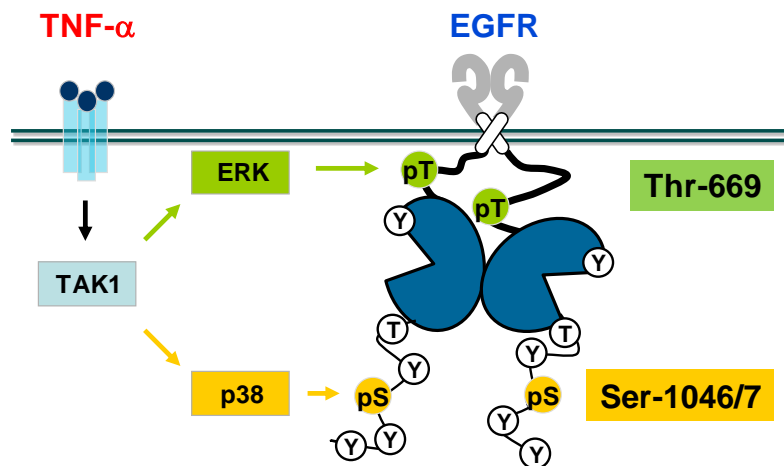
ことが知られている<sup>[26-27]</sup>。例えば、乳がんでは ErbB2 と ErbB3 のヘテロ二量体が ErbB ファミリーの二量体の中で最もシグナル伝達強度が高いことが報告されている<sup>[28]</sup>。ErbB は二量体形成によってチロシンキナーゼ活性が誘導され、C 末端領域の自己リン酸化が誘導されることで下流の MAPK 経路、Akt 経路、STAT3 経路にシグナルを伝える。EGFR のホモ二量体の場合、EGFR の活性化により Tyr-1068 にアダプター分子 Grb2 が結合する。Grb2 は

TAK1 ががんの悪性を誘導することから、TAK1 によって制御される分子の探索を行ったところ、意外なことに EGFR が同定された。EGFR が属している ErbB ファミリーは EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 で構成されており、細胞の分化や増殖を制御している (図 1-4) <sup>[23-25]</sup>。その構造は RTK の基本構造と同様であるが、ErbB3 はチロシンキナーゼ活性を持たないことがわかっている。EGFR のリガンドは EGF や heparin binding-EGF ( HB-EGF )、TGF- $\alpha$ 、amphiregulin など、ErbB3 のリガンドは heregulin (HRG)、ErbB4 のリガンドは HRG、HB-EGF などが知られているが、ErbB2 にはリガンドが存在しない。ErbB はリガンドの結合によりホモまたはヘテロ二量体化されるが、リガンドの種類や二量体の構成因子の違いにより活性の強さが異なる

Ras グアニンヌクレオチド交換因子 Sos と結合し、活性化させることで Ras の活性化を誘導する。Ras→MAP3K の Raf→mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K; MKK) の MAPK-ERK kinase (MEK) →MAPK の extracellular-regulated kinase (ERK) の順に MAPK カスケードを活性化させる。MAPK は Ser/Thr プロテインキナーゼであり、MAP3K→MAP2K→MAPK の順にシグナルを伝える<sup>[29-30]</sup>。MAPK には ERK、p38、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の3つの経路があり、p38 は MKK3/6、JNK は MKK4/7 によってそれぞれ制御される。活性化 EGFR は主に ERK にシグナルを伝え、p38 や JNK へのシグナルは弱いことが知られている。ERK は細胞増殖や生存、分化に関わるが、p38 や JNK は主に炎症性サイトカインや放射線、浸透圧ストレス、熱ショックなどのストレスによって活性化され、細胞増殖や生存、分化だけでなく、アポトーシスやサイトカイン産生にも関わる事が報告されている<sup>[31]</sup>。

我々はこれまでに炎症シグナルが EGFR チロシンキナーゼ活性に依存せずに TAK1 を介して EGFR Ser/Thr リン酸化とそのエンドサイトーシスが誘導されることを見出している。

(図 1-5)<sup>[32-33]</sup>。炎症シグナルは TAK1 を介し、p38 と ERK の活性を誘導する。活性化 p38 は EGFR の C 末端領域に位置する Ser-1046/7 残



**図1-5 炎症シグナルを介したEGFR Ser/Thrリン酸化制御機構**  
炎症性サイトカインTNF-αはTAK1の活性化を介し、MAPKのp38とERKを活性化させる。p38はEGFRのC末端領域に存在するSer-1046/7のリン酸化を、ERKはEGFRの膜近傍ドメインに存在するThr-669のリン酸化を誘導する。この反応はEGFRのチロシンキナーゼ活性に依存しない。

基をリン酸化させる。この経路によって EGFR のエンドサイトーシスが誘導される。リガンドを介した EGFR のエンドサイトーシスの場合、活性化 EGFR は最終的にリソソームで分解され、EGFR を介したシグナルが終結する<sup>[23-25]</sup>。しかし、炎症性シグナルを介した EGFR のエンドサイトーシスの場合、EGFR はリソソームに運ばれず、細胞膜上にリサイクルされる<sup>[32-33]</sup>。このように両シグナルでは EGFR 運命は異なることから、そのエンドサイトーシス機構には違いが生じていることが考えている。一方、炎症シグナルによって活性化した ERK は EGFR の膜近傍ドメインに位置する Thr-669 残基をリン酸化させる。リガンドによ

って誘導される Thr-669 リン酸化は EGFR のチロシンキナーゼ活性の抑制に関わることが知られている<sup>[34-35]</sup>。

また、RTK には Ser/Thr リン酸化部位が多数存在していることから、EGFR だけではなく、他の RTK の Ser/Thr リン酸化も炎症シグナルによって制御される可能性が考えられた。そこで、RTK の中で最大のファミリーの Eph ファミリーに属する EPH receptor A2 (EphA2) に

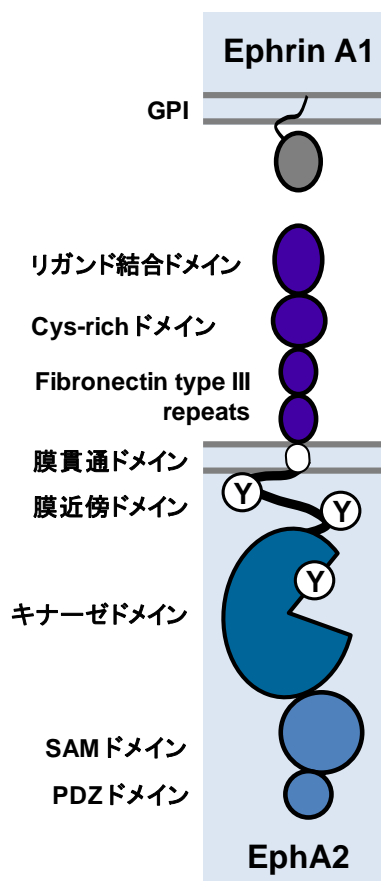


図1-6 EphA2とそのリガンド Ephrin A1の構造

EphA2は細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインで構成されている。細胞外ドメインはリガンド結合ドメイン、システインリッチドメイン、2つのフィブロネクチンタイプIIIリピートで構成されている。細胞内ドメインは膜近傍ドメイン、チロシンキナーゼドメイン、SAM(sterile  $\alpha$  motif)ドメイン、PDZドメインで構成されている。リガンドのEphrin A1はGPIアンカー型リガンドであり、GPIによって細胞膜上につなぎとめられている。

ついて注目した。

EphA2 は細胞間接着に関わる RTK の一つである<sup>[36-40]</sup>。その構造は RTK の基本構造と同様であり、細胞外ドメインにはリガンド結合ドメイン、システインリッチドメイン、フィブロネクチンタイプ III リピートを2つ有する(図 1-6)。C 末端領域には sterile  $\alpha$  motif (SAM) ドメイン、PDZ (post synaptic density protein (PSD95), *Drosophila* disc large tumor suppressor (Dlg1), zonula occludens-1 protein (ZO-1)) ドメインが存在する。そのリガンド Ephrin A1 は GPI アンカー型のリガンドであり、細胞膜に結合している。そのため、EphA2 は隣の細胞上に発現している Ephrin A1 と結合し、二量体または多量体を形成し、チロシンキナーゼドメインの活性化および C 末端領域のチロシン残基の自己リン酸化が誘導される(図 1-7)。受容体側から forward シグナルとして FAK や Rho、Src にシグナルを伝える。一方でリガンド側から reverse シグナルとして Fyn にシグナルを伝える。正常な細胞において、EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介してシグナルが伝わることで細胞間接着が制御され、細胞の上皮性が維持される。近年、EphA2 が乳がんやグリオーマをはじめ様々な上皮組織由来のがん、その中でも特に悪性度の高いがん組織で高発現していることが報告されており、その上、EphA2 の発現量とがんの進行、悪性化との間に相関関係があることも分かってきた<sup>[41-42]</sup>。また、興味深いことに、EphA2 が過剰に発現しているがん組織において、そのリガンドである Ephrin A1 の発現低下が認められる。このことから、リガンドに結合していない EphA2

ががんの悪性を誘導することが示唆される。2009年、Miaoらは非常に重要な報告をしている<sup>[43]</sup>。EGFRなどのRTKによってAktの活性化が誘導されるが、このAktがEphA2の

チロシンキナーゼ非依存的にSer-897リン酸化を誘導し、このリン酸化ががん細胞の遊走や浸潤を亢進させることを見出している(図1-8)<sup>[34]</sup>。Aktは細胞運動を調節する因子であることが知られており、細胞の遊走能を亢進させるため、この経路はがんの悪性を理解するうえで重要な報告だと言える。

これまでに我々は炎症シグナルを介したEGFR Ser/Thrリン酸化機構について研究を行ってきた。p38を介したEGFR Ser-1046/7リン酸化がEGFRのエンドサイトーシスに

関わることを明らかにしてきたが、その詳細な分子機構については不明な点が残されていた。そこで、第1章ではEGFRのエンドサイトーシスに関わるアダプター分子Eps15に着目し、p38を介したEps15の制御機構と生理機能について検討を行った。また、ERKを介したEGFR Thr-669リン酸化の機能については不明であったため、第2章ではその生理機能について検討を行った。第3章では炎症シグナルによるEphA2 Ser/Thrリン酸化制御機構とその機能解析を行った。

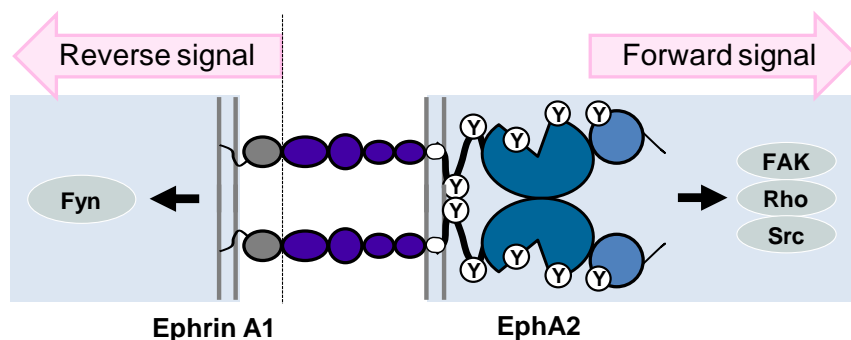


図1-7 リガンドEphrin A1を介した EphA2のシグナル伝達

EphA2はリガンドEphrin A1と結合することで二量体または多量体を形成し、チロシンキナーゼドメインのリン酸化が誘導され、下流シグナルのFAKやRho、Srcなどの活性化を誘導する。また、リガンド側からReverse signalとしてFynなどの活性化を誘導する。

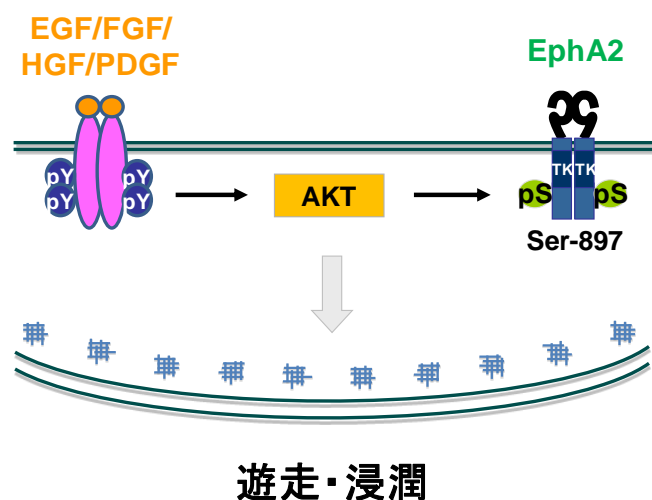


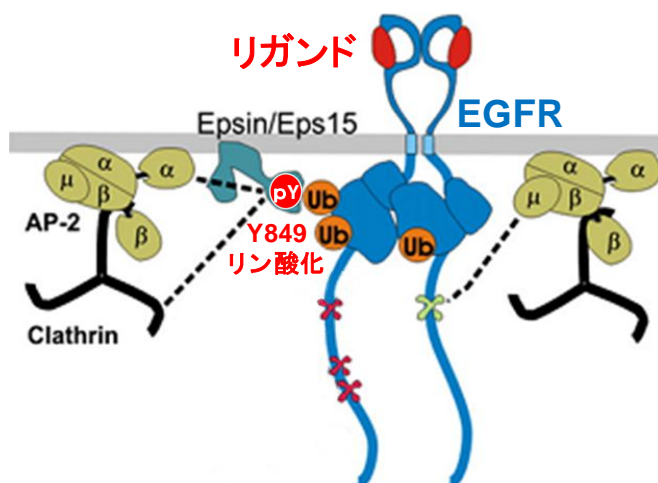
図1-8 リガンド依存的なEphA2 Ser-897リン酸化

成長因子EGFやFGF、HGF、PDGFが受容体と結合することでチロシンキナーゼ活性が誘導され、Aktの活性化が誘導される。活性化Aktは直接EphA2 Ser-897をリン酸化する。この経路はがん細胞の遊走能、浸潤能の亢進を促す。



## 第1章 p38 を介した Eps15 のリン酸化制御機構

### 1.1 節 序論



**図2-1 リガンドによるEGFRエンドサイトーシスの初期段階**  
リガンドが結合し、活性化したEGFRはモノユビキチン修飾を受け、それをEps15やEpsin 1が認識する。この時、活性化EGFRはEps15 Tyr-849をリン酸化する。また、Eps15にはClathrinと結合したAP-2が結合する。この複合体が形成されることでChathrinは小胞を形成し、EGFRのエンドサイトーシスを誘導する。

の初期段階ではクラスリン被覆小胞が形成されるが、その形成に必須な clathrin heavy chain は adaptor protein complex 2 (AP-2)を介して Eps15 や Epsin 1 と結合することが知られている。これらの複合体が形成されることで被覆小胞が形成され、EGFR のエンドサイトーシスが誘導される (図 2-1) <sup>[47]</sup>。

これまでに我々はTNF- $\alpha$ を介したEGFRのエンドサイトーシスがp38を介したSer-1046/7に依存することを報告してきたが、その詳しい分子機構はまだ解明されていない。したがって、本研究ではEGFRのエンドサイトーシスに関わるアダプター分子Eps15に注目してTNF- $\alpha$ を介したEGFRのエンドサイトーシスの詳細な制御機構の解明を目指した。

Eps15 は N 末端側にエンドサイトーシスと小胞輸送に関与することが知られている Eps15-homology (EH)ドメインを3つ有し、中心に coiled-coil ドメイン、C 末端側に UIM を2つ持つタンパク質である (図 2-3A) <sup>[48-49]</sup>。AP-2 は Eps15 のアミノ酸 666-737 に結合することが知られており、この領域には DPF モチーフが存在することが知られている<sup>[50-53]</sup>。また、EGFR に結合することで MAPK を活性化させるアダプタータンパク質 Grb2 が Pro-768 付近に結合することも報告されている<sup>[54]</sup>。したがって、Eps15 は EGFR とアダプター分子の

EGFR のエンドサイトーシスには様々なアダプター分子が関与していることが知られている<sup>[44-46]</sup>。リガンドによって活性化されたEGFR はリン酸化修飾だけではなく、EGFR の Tyr-1045 のリン酸化によってリクルートされるユビキチンE3 リガーゼ Cblによってモノユビキチン修飾も受ける<sup>[38]</sup>。そのモノユビキチンを ubiquitin interacting motif (UIM)を有するアダプター分子 EGFR pathway substrate 15 (Eps15) や Epsin 1 が認識する。また、エンドサイトーシ

足場タンパクとして機能し、エンドサイトーシスの誘導において重要な役割を担うことが考えられる。Eps15 が制御するエンドサイトーシスは EGFR だけではなく、RTK の Met、鉄イオン輸送に関わるトランスフェリン、細胞接着に関わるインテグリン $\beta$ 1 受容体など、さまざまな受容体のエンドサイトーシスに関与する<sup>[54-56]</sup>。また、細胞へのウイルスの侵入にも Eps15 が関わっている<sup>[57-59]</sup>。エンドサイトーシスは大まかに分けると Clathrin を介するエンドサイトーシス (Clathrin mediated endocytosis; CME) と Clathrin を介さないエンドサイトーシス (Clathrin-independent endocytosis) があり、Eps15 は両方への関与が報告されているが、主に CME への関与が強いとされており、実際に上に記載した受容体のエンドサイトーシスやウイルスの侵入も典型的な CME 機構を介している。また、以前我々が報告している炎症シグナルを介した EGFR のエンドサイトーシスも CME 機構を介するため、Eps15 がこの経路に関与することが強く示唆される<sup>[33]</sup>。

Eps15 はもともと EGFR の基質として同定されており、活性型 EGFR は Eps15 Tyr-849 をリン酸化し、EGFR のエンドサイトーシスを部分的に制御することが報告されている<sup>[51]</sup>。しかし、炎症シグナルによる Eps15 の制御については報告がない。そこで、我々は炎症シグナルを介した EGFR エンドサイトーシスへの Eps15 の関与について検討を行ったところ、Eps15 の新たなリン酸化部位の同定に成功し、その制御機構について解析した。

## 1.2 節 実験方法

### 1.2-1 抗体および試薬

抗 phospho-Eps15 (Ser-796) 抗体はヒト Eps15 合成リン酸化ペプチド NH<sub>2</sub>-RSINKLD[pS]DPFKLN-COOH を用いて免疫したウサギの血清から精製した。抗 phospho-p38 (Thr-180/Tyr-182)、phospho-JNK (Thr-183/Tyr-185)、phospho-ERK (Thr-202/Tyr-204)、phospho-EGFR (Thr-669、Ser-1046/7、Tyr-1068) 抗体は Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA)、抗 Eps15、p38、ERK1、EGFR、TAK1、Epsin1、Green Fluorescent Protein (GFP)、Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)、 $\alpha$ -Tubulin 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA)、抗 Eps15R 抗体は Abcam 社 (Cambridge, UK)、抗 EGFR モノクローナル抗体 (LA-1) は Millipore 社 (Billerica, MA, USA) からそれぞれ購入した。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合型ウサギ抗マウス IgG 抗体、Cy3 ラベル型ヤギ抗マウス IgG 抗体はそれぞれ Dako (Glostrup, Denmark) と GE healthcare 社 (Little Chalfont, UK) から購入した。組み換え

ヒト TNF- $\alpha$ 、EGF、IL-1 $\beta$ は R&D systems 社 (Minneapolis, MN, USA)、組み換え活性型ヒト GST-p38 $\alpha$ は Carna Biosciences 社 (神戸、日本) からそれぞれ購入した。シスプラチン、Phos-tag リガンド、Lys-C は Wako Pure Chemical 社 (大阪、日本) から購入した。Trypsin は Promega 社 (Madison, WI, USA) から購入した。SB203580、SP600125、U0126、PD153035 は Merck Biosciences 社 (Darmstadt, Germany) から購入した。それぞれの化合物は Me<sub>2</sub>SO に溶解させた。

#### 1.2-2 細胞培養

HeLa 細胞と HEK293 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (high-glucose condition) (Life Technologies Corporation, CA, USA) + 10% fetal calf serum、100 units/ml penicillin (明治製菓、東京、日本)、100  $\mu$ g/ml streptomycin (明治製菓、東京、日本) を用いて 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> において培養した。A549 細胞は RPMI 1640 medium (Life Technologies Corporation) + 10% fetal calf serum、100 units/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin を用いて 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> において培養した。Eps15/Eps15R を安定的にノックダウンした HeLa 細胞 (15/R) と Epsin1/Eps15/Eps15R を安定的にノックダウンした HeLa 細胞 (3KD) は Dr. Pier Paolo Di Fiore (IFOM、Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Milan, Italy) より供与を受けた<sup>[61]</sup>。

#### 1.2-3 nanoLC-MS/MS 解析

安定同位体ラベルした HeLa 細胞に Lysis buffer (20mM HEPES/NaOH (pH 7.4)、0.25 M sucrose、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、0.05% NP-40、phosphatase inhibitor mixrure 1、2、phosphatase inhibitor mixrure (Sigma-Aldrich 社、USA)) を加え、ソニケーション後、上清に solubilization buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 9.0)、8 M urea、4% octylglycoside) を加えた。DTT による還元処理、iodoacetamide によるアルキル化処理の後、Lys-C と Trypsin による消化を行った。消化後のペプチドを脱塩し、HAMMOC 法にてリン酸化ペプチドの濃縮を行い、nanoLC-MS/MS 解析後、データベース検索を行った。

#### 1.2-4 プラスミド DNA 導入

TAK1 発現プラスミド DNA と TAB1 発現プラスミド DNA は過去の論文に記載してある<sup>[62-63]</sup>。GFP-Eps15 発現プラスミド DNA は Dr. Alexandre Benmerah (INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France) より供与を受けた<sup>[64-65]</sup>。HeLa 細胞に対して Lipofectamine reagent (Life Technologies Corporation) を用いてトランスフェクションを行い、24 時間後に細胞の刺激を



行った。

#### 1.2-5 RNA 干渉

Small interfering RNAs (siRNAs) は北海道システムサイエンス社（北海道、日本）または Life Technologies Corporation より購入した。ターゲット配列は以下の通りである：UGGCUUAUCUUACACUGGA (TAK1)、AGUAGUUCAGGACUACUUCUUGCUG (Eps15-1)、GCCCAGCUCUCUCUGACACAGUUAU (Eps15-2)、UCAUGGACCCUUGCUGACGUCUUC AC (Epsin1)、TCACACAGGGTTCCTGACAGAATAT (ERK2)、GCAUUACAACCAGACAGU UGAUAAU (p38 $\alpha$ )、CGUACGCGGAUACUUCGA (firefly luciferase GL2)。HeLa 細胞に対して Lipofectamine reagent を用いて 20-100 nM siRNA を導入し、72 時間後に細胞の刺激を行った。

#### 1.2-6 細胞抽出液の調整

全細胞抽出液は Whole cell extracts (WCE) buffer (25 mM HEPES pH7.7、0.3 M NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM EDTA、0.1 % Triton X-100、20 mM  $\beta$ -glycerophosphate、1 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM dithiothreitol (DTT)、10  $\mu$ g/ml aprotinin、10  $\mu$ g/ml leupeptin) を用いて調製した。細胞を回収し、PBS で洗浄を行った後、WCE buffer を加えた。ボルテックスした後、氷上で 10 分静置した。その後、4  $^{\circ}$ C、14,000 rpm において 10 分間遠心を行い、上清を全細胞抽出液として回収した。

#### 1.2-7 ウェスタンブロット法

全細胞抽出液を等量の 2 $\times$ SDS-PAGE sample buffer (25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5% glycerol、1% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)、0.05% Bromophenol Blue) と混合し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間熱処理をした。サンプルを SDS-PAGE にて電気泳動でタンパク質を分離し、Immobilon-P (Millipore) へ転写し、メンブレンを 4 $^{\circ}$ C でブロックエース (DS ファーマバイオメディカル、大阪、日本) 処理を行った。その後、メンブレンを一次抗体と反応させ、引き続き、0.1% Tween20 を含む PBS で洗浄し、二次抗体 (Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG、HRP conjugated anti-goat IgG、HRP conjugated anti-mouse IgG (Dako)) を加え、反応させた。同様に洗浄させた後、ECL (GE Healthcare) を用いて処理し、X 線フィルム (富士フィルム、東京、日本) に感光した。なお、抗体の希釈には Can get signal (TOYOBO、大阪、日本) または 0.1% Tween20 を含む PBS を用いた。

#### 1.2-8 免疫沈降法

WCE buffer を用いて調製した全細胞抽出液は等量の Dilution buffer (20 mM HEPES pH7.7、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA、0.05 % Triton X-100、20 mM β-glycerophosphate、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 mM PMSF、1 mM DTT、10 μg/ml aprotinin、10 μg/ml leupeptin) を加えて希釈した。4℃、14,000 rpm において 10 分間遠心した後、回収した上清に対して終濃度 1 μg/ml の抗体を添加し、ローテーターを用いて、4℃において 1.5 時間攪拌した。その後、Dynabeads Protein G (Life Technologies Corporation) を添加し、ローテーターを用いて、4℃において 1.5 時間攪拌した。攪拌後、wash buffer (WCE buffer と Dilution buffer の等量混合液) を用いて、3 回洗浄し、50 μl の 1XSDS-PAGE sample buffer (2XSDS-PAGE sample buffer と wash buffer の等量混合液) を用いて目的タンパクの溶出を行った。

#### 1.2-9 Zn<sup>2+</sup>-Phos-tag SDS PAGE

RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.15 M NaCl、0.25% sodium deoxycholate、1.0% NP-40、1.0 mM EDTA、20 mM β-glycerophosphate、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 mM PMSF、1 mM DTT、10 μg/ml aprotinin、10 μg/ml leupeptin) を用いて全細胞抽出液を調製した。抽出液は半量の SDS-PAGE sample buffer (195 mM Tris-HCl (pH 6.8)、3.0% SDS、15% 2-mercaptoethanol、30% glycerol、0.10% bromphenol blue) と混合し、95℃で 5 分間熱処理をした。Phos-tag リガンドと Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> が加わったアクリルアミドゲルの組成は以下の通りである：4.84% acrylamide、0.16% bis-acrylamide、357 mM bis-Tris、50 μM Phos-tag ligand、0.2 mM zinc nitrate、0.15% APS、TEMED (分離ゲル)、3.87% acrylamide、0.13% bis-acrylamide、357 mM bis-Tris、0.25% APS、TEMED (濃縮ゲル)。泳動バッファーは 100 mM Tris、100 mM MOPS、0.10% SDS、5.0 mM sodium bisulfite を含む。泳動後、ゲルは 25 mM Tris、192 mM glycine、10% MeOH、1.0 mM EDTA を含んだバッファーで 20 分 2 回洗浄し、一度 EDTA を含まないバッファーで洗浄の後、Immobilon-P (Millipore) へ転写し、ウェスタンブロットと同様の操作を行った。

#### 1.2-10 In vitro kinase assay

HEK293 細胞より免疫沈降した Eps15 と組み換え活性型ヒト GST-p38αを 30 °C、30 分間、30μl の 20 mM HEPES (pH 7.6)、20 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM ATP、2 mM DTT、20 mM β-glycerophosphate、0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> を含むバッファーの中で反応させた。反応停止時に 30μL の 2×SDS-PAGE sample buffer (25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5% glycerol、1% SDS、0.05% Bromophenol Blue) と混合し、95℃で 5 分間熱処理をした。

### 1.2-11 Mutagenesis

Eps15 S796A または S796D 点変異体は PrimeSTAR (タカラバイオ社、滋賀、日本) を用いて、GFP-Eps15 発現プラスミド DNA をテンプレートに作製した。プライマーの配列は以下の通りである。S796A forward: 5'-TCAACAAATTGGATGCTCCTGATCCCTTT-3', reverse: 5'-AAAGGGATCAGGAGCATCCAATTTGTTGA-3', S796D forward: 5'-TCAACAAATTGGATGATCCTGATCCCTTTA-3', reverse: 5'-TAAAGGGATCAGGATCATCCAATTTGTTGA。

### 1.2-12 免疫蛍光染色

カバーガラス (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に播種した細胞を 20 分間 2% paraformaldehyde (Muto pure chemicals, 東京、日本) を用いて固定し、その後 5 分間 0.5% TritonX-100 (Wako Pure Chemical Industries) を用いて透過させた。洗浄後、それぞれ抗 EGFR モノクローナル抗体存在下で 2 時間、Cy3 ラベル型ヤギ抗マウス IgG 抗体存在下で 1 時間反応させた。洗浄後、DAPI を含む SlowFade Gold Antifade Reagent (Life Technologies Corporation) で封入し、LSM700 共焦点レーザスキャン顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, Germany) にて観察を行った。

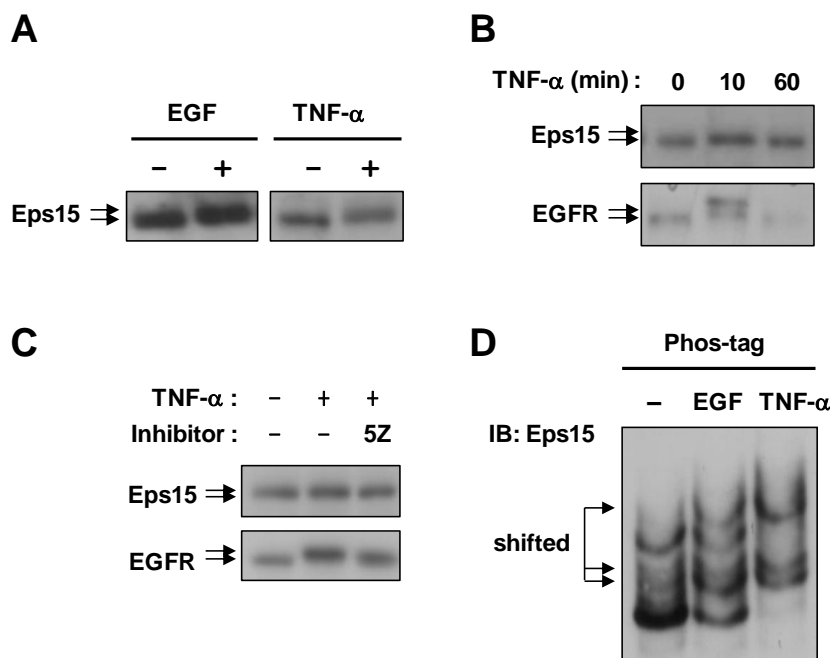
### 1.2-13 FACS 解析

細胞刺激後、2% paraformaldehyde を用いて 20 分間固定し、洗浄後、それぞれ抗 EGFR モノクローナル抗体存在下で 2 時間、FITC 結合型ウサギ抗マウス IgG 抗体存在下で 1 時間反応させた。解析は FACS Calibur system (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いた。

## 1.3 節 実験結果・考察

### 1.3.1 TNF- $\alpha$ または EGF 刺激による Eps15 の翻訳後修飾

HeLa 細胞に対して炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  刺激または EGFR リガンド EGF 刺激を行い、細胞抽出液を取得し、電気泳動を行ったところ、両方の刺激によって Eps15 のバンドシフトが認められた (図 2-2A)。バンドシフトは翻訳後修飾の指標になり、このことからリガンドの EGF だけではなく、炎症シグナルも Eps15 を制御することがわかった。次に TNF- $\alpha$  による Eps15 の翻訳後修飾の持続時間を調べるために、TNF- $\alpha$  の作用時間を変化させた。バンドシフトは TNF- $\alpha$  刺激 10 分で誘導され、60 分後には消失することが確認でき、このタイ



**図2-2 TNF-α、リガンドを介したEps15リン酸化**

(A) HeLa細胞に10 ng/mL EGFまたは20 ng/mL TNF-αを10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗Eps15抗体を用いたIBを行った。(B) HeLa細胞に20 ng/mL TNF-αを0、10、60分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗Eps15抗体、抗EGFR抗体を用いたIBを行った。(C) HeLa細胞に300 nM TAK1阻害剤5Z-7-oxozeanol(5Z)を30分処理した後、20 ng/mL TNF-αを10分間作用させ、細胞抽出液を調製し、抗Eps15抗体、抗EGFR抗体を用いたIBを行った。(D) HeLa細胞に10 ng/mL EGFまたは20 ng/mL TNF-αを10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、Phos-tag gelを用いて電気泳動を行い、抗Eps15抗体を用いたIBを行った。

る  $\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag gel 電気泳動を行った。Phos-tag はリン酸化を補足する分子であり、異なるリン酸化状態のタンパク質を分離することができる<sup>[66-68]</sup>。EGF 刺激と同様に TNF-α刺激でバンドのシフトアップが認められ、Eps15 のリン酸化が TNF-αによって誘導されていることが明らかになった (図 2-2D)。この時、EGF 刺激時のバンドパターンと TNF-α刺激時のバンドパターンが異なることから、両者によって誘導されたリン酸化部位が異なること、またバンドは複数本認められたことから、リン酸化される部位は一つではなく、複数あることが示唆された。以上の結果により、リガンドのみならず、炎症性サイトカインによって Eps15 のリン酸化が誘導されることがわかった。

### 1.3.2 TNF-αによる Eps15 Ser-796 のリン酸化

Eps15 はその名前の通り、EGFR 経路に関わる分子であり、EGFR の基質として同定されている。活性型 EGFR によって Tyr-849 のリン酸化が誘導され、このリン酸化が部分的に

ムコースは EGFR のバンドシフトと同様であった (図 2-2B)。また、このバンドシフトは炎症キナーゼ TAK1 の阻害剤 5Z-7-oxozeanol (5Z) を前処理することで抑制された (図 2-2C)。これらのことから翻訳後修飾はリン酸化であることが示唆されたため、バンドシフトがリン酸化に依存するものかどうか調べるために、リン酸化を検出する

EGFR のエンドサイトーシスに関わることが報告されている<sup>[60]</sup>。図 2-2 で認められた Eps15 のリン酸化部位が Tyr-849 であるかどうか、質量分析計を用いて検討を行った。HeLa 細胞に対して TNF- $\alpha$  を刺激した後、細胞抽出液を取得し、トリプシンで消化させ、リン酸化ペプチドを特異的に濃縮し、nanoLC-MS/MS にて解析したところ、Ser-796 リン酸化を含むリン酸化ペプチド LD[pS]PDPFK が検出された (図 2-3A-C)。そこで、抗 Ser-796 リン酸化抗体を作製し、HeLa 細胞の抽出液を用いてウエスタンブロットを行ったところ、TNF- $\alpha$  を作用させたサンプルでのみバンドが検出された (図 2-3D endo)。また、HeLa 細胞に GFP-Eps15 発現プラスミド DNA を導入し、Eps15 を過剰発現させた細胞の抽出液においても TNF- $\alpha$  刺激でリン酸化バンドが認められた (図 2-3D GFP)。さらに、TAK1 とその活性化に必須なアダプター分子 TAB1 を過剰発現させた場合においても Eps15 のリン酸化バンドが認められた (図 2-3E)。次に、抗リン酸化抗体の特異性の検証を行うためにリン酸化ペプチド、または非リン酸化ペプチド存在下でイムノブロットを行ったところ、非リン酸化ペプチド存在下ではリン酸化バンドは認められたが、リン酸化ペプチド存在下でリン酸化バンドの消失が確認でき (図 2-3F)、また、siRNA を用いて Eps15 をノックダウンするとリン酸化バンドは認められなかったため (図 2-3G)、抗リン酸化抗体が Eps15 Ser-796 を特異的に検出することが確認できた。以上のことより、TNF- $\alpha$  を介して Eps15 Ser-796 リン酸化が誘導されることが明らかになった。図 2-2D のバンドパターンから TNF- $\alpha$  によって誘導されるリン酸化部位は一つでないと考えられるが、今回の検討では Ser-796 を含んだリン酸化バンドのみが検出された。今後、他のリン酸化部位についても同定する必要があると考えられる。また、過去の報告においてリガンド刺激時には Eps15 Tyr-849 リン酸化が誘導されることが明らかになっているが、このリン酸化を含むペプチドが検出されなかったことから、TNF- $\alpha$  は Tyr-849 リン酸化を誘導しない可能性が考えられた。

### 1.3.3 様々な刺激を介した Eps15 Ser-796 のリン酸化

Eps15 Ser-796 リン酸化の制御機構を調べるために、HeLa 細胞に対し TNF- $\alpha$  をそれぞれ 0、1、2、3、4、5、10、20、60 分作用させ、ウエスタンブロットを行った。Eps15 リン酸化は 3 分から始まり、10 分でピーク、60 分で消失した (図 2-4A)。また、このタイムコースは EGFR Ser-1046/7 とそのリン酸化を誘導する p38 リン酸化パターンとほぼ一致した。このことから、Eps15 リン酸化は EGFR Ser-1046/7 と同様に p38 を介することが示唆された。そこで、p38 のリン酸化を誘導することが知られている様々な刺激物を HeLa 細胞に作用させた。EGF または高浸透圧ストレス (0.3M NaCl) によって、p38 リン酸化および Eps15 リン酸化

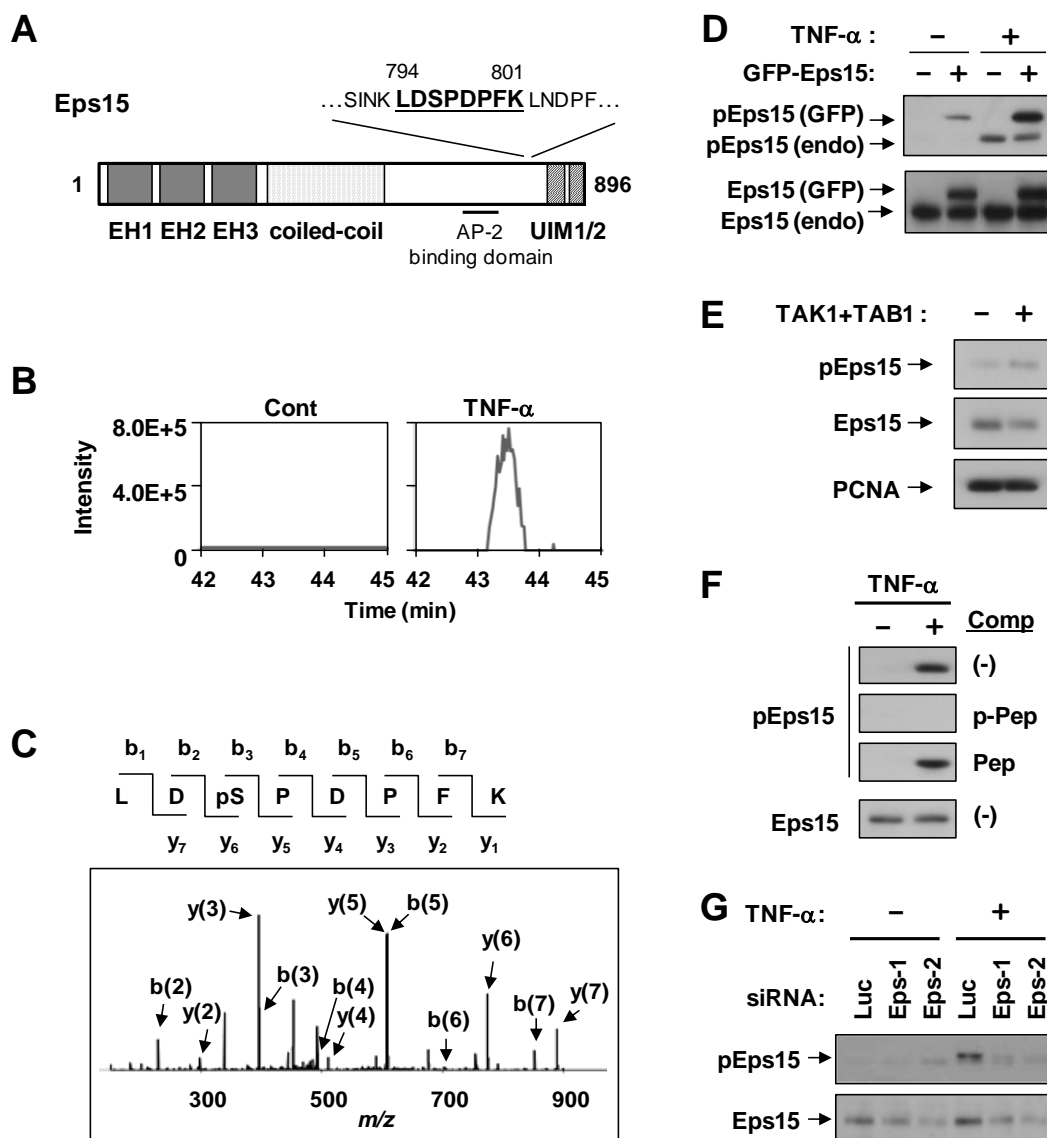


図2-3 TNF- $\alpha$ 介したEps15リン酸化部位同定

(A) Eps15の構造を示した。上に示したアミノ酸配列は同定されたリン酸化ペプチドの配列である。EH, Eps15-homology domain; UIM, ubiquitin interacting motif. (B, C) 安定同位体ラベルしたHeLa細胞に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、トリプシンによるタンパク質消化、リン酸化ペプチド濃縮を行い、nanoLC-MS/MSにて解析を行い、データベース検索した。同定されたリン酸化ペプチドの抽出イオンクロマトグラムは(B)に示し、MS/MSスペクトルは(C)に示した。(D) HeLa細胞に対し、GFP-Eps15発現プラスミドDNAを導入し、24時間後に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗Eps15 Ser-796リン酸化抗体(抗pEps15抗体)、抗Eps15抗体を用いてIBを行った。(D) HeLa細胞に対し、ヒトTAK1発現プラスミドDNAとヒトTAB1発現プラスミドDNAを導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗PCNA抗体を用いたIBを行った。(F) HeLa細胞に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させた後、細胞抽出液を調製した。抗pEps15抗体、抗Eps15抗体を用いてIBを行った。抗pEps15抗体を用いたIB時に、予め抗体とpSer-796 Eps15リン酸化ペプチド(RSINKLD[pS]PDPFKLN)、または非リン酸化ペプチド(RSINKLDpSPDPFKLN)を30分作用させたのちにメンブレンと反応させた。(G) HeLa細胞にEps15に対するsiRNAを導入し、Eps15をノックダウンさせ、72時間後に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗Eps15 Ser-796リン酸化抗体(抗pEps15抗体)、抗Eps15抗体を用いてIBを行った。

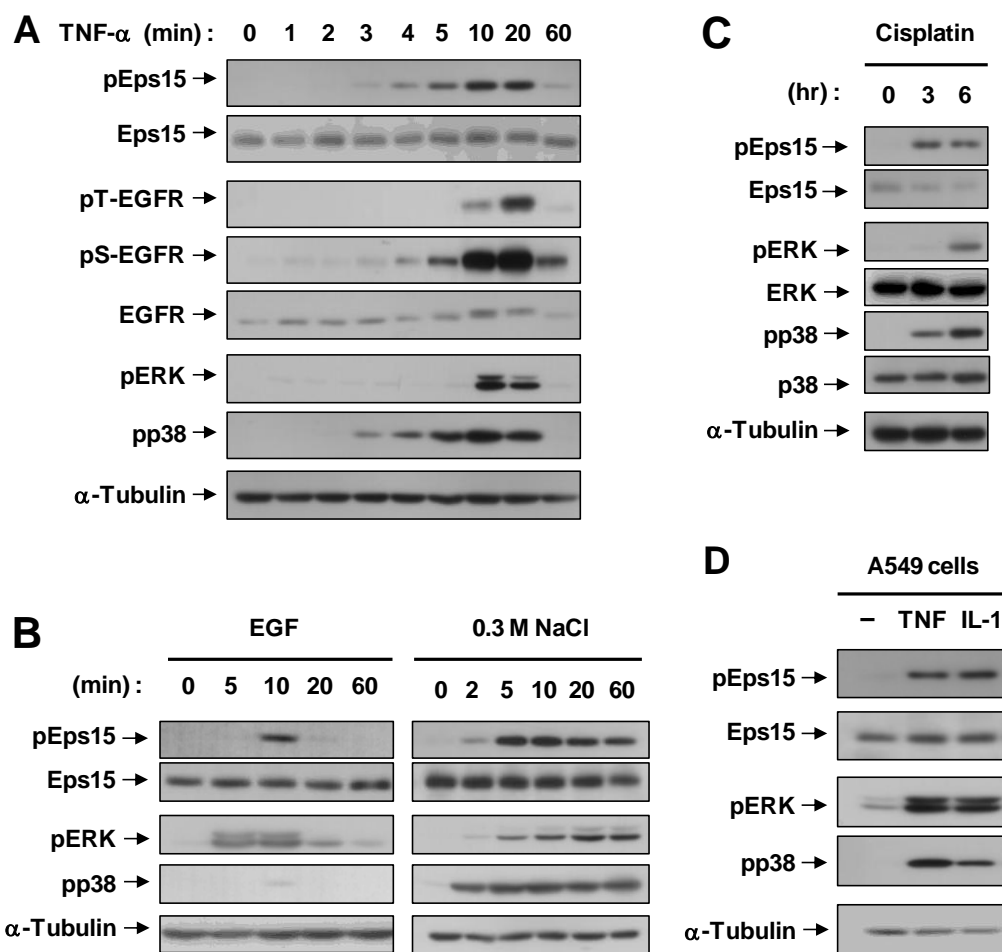


図2-4 様々な刺激を介したEps15 Ser-796リン酸化

(A) HeLa細胞に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を0、1、2、3、4、5、10、20、60分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pERK抗体、抗pp38抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(B) HeLa細胞に10 ng/mL EGFまたは0.3 M NaClを0、2、5、10、20、60分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗pERK抗体、抗pp38抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(C) HeLa細胞に0.1 mMシスプラチン0、3、6時間作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗pERK抗体、抗ERK抗体、抗pp38抗体、抗p38抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(D) A549細胞に20 ng/mL TNF- $\alpha$ または10 ng/mL IL-1 $\beta$ を10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗pERK抗体、抗pp38抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。

の誘導が認められた (図 2-4B)。また、DNA 損傷を促すシスプラチンも p38 リン酸化および Eps15 リン酸化を誘導した (図 2-4C)。さらに、ヒト肺線がん細胞株 A549 に対して TNF- $\alpha$  と同じファミリーに属する炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ を作用させたところ、Eps15 リン酸化が認められたことから (図 2-4D)、炎症シグナルを介した Eps15 リン酸化は広く認められるシグナルであることがわかった。以上の結果により、p38 が Eps15 Ser-796 リン酸化を誘導することが示唆された。

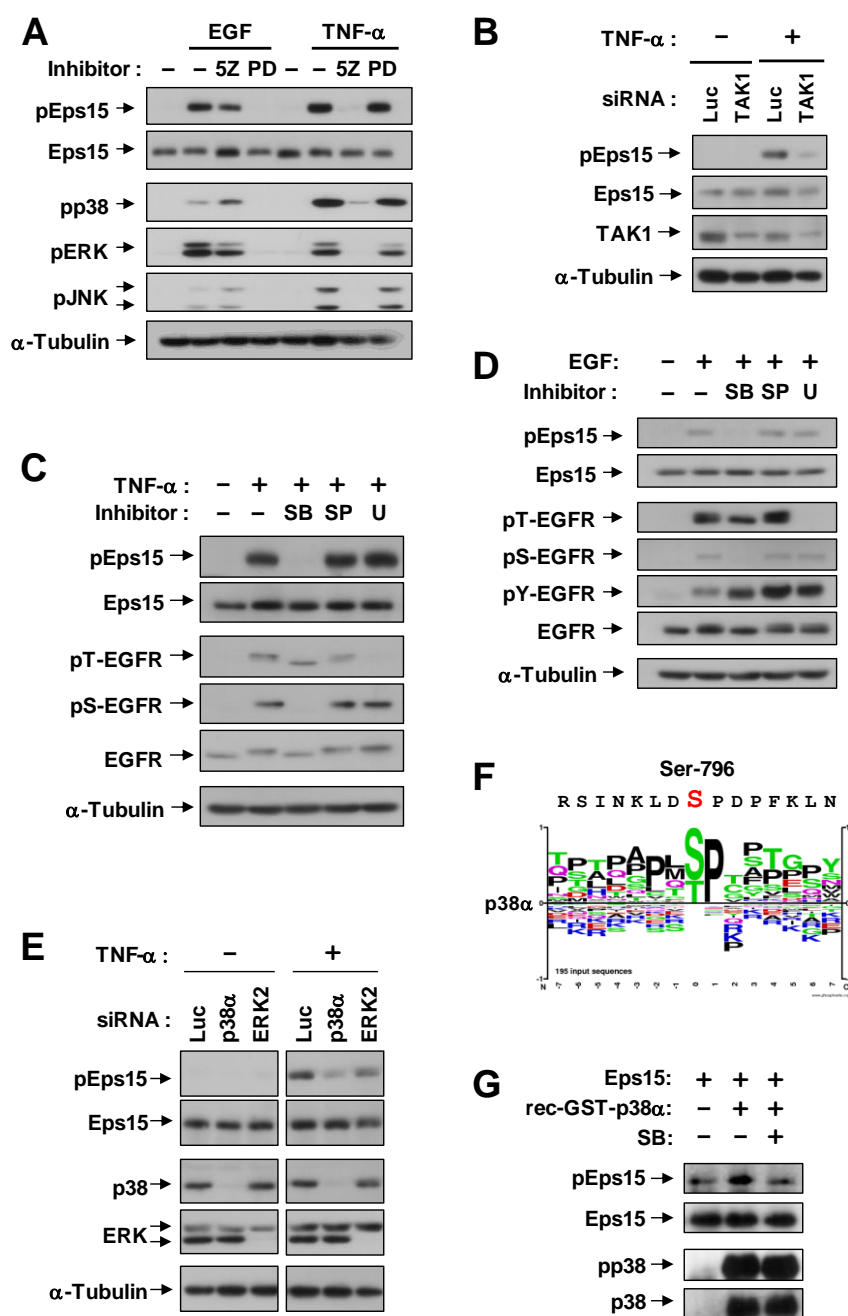
#### 1.3.4 p38 を介した Eps15 Ser-796 のリン酸化

Eps15 のリン酸化制御機構を調べるために、HeLa 細胞に対して TAK1 阻害剤 5Z、または EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) PD153035 (PD) を前処理した後に TNF- $\alpha$  または EGF 刺激を行った。EGF 刺激の場合には TAK1 阻害剤 5Z ではなく EGFR-TKI PD の処理によって、一方で TNF- $\alpha$  刺激の場合には EGFR-TKI PD ではなく TAK1 阻害剤 5Z によって MAPK および Eps15 リン酸化が抑制された (図 2-5A)。また、siRNA を用いて TAK1 をノックダウンしたところ、TNF- $\alpha$  を介した Eps15 リン酸化は抑制された (図 2-5B)。次に、MAPK に対する阻害剤を前処理した。TNF- $\alpha$  刺激においても EGF 刺激においても p38 阻害剤 SB203580 (SB) で Eps15 リン酸化は阻害され、JNK 阻害剤 SP600125 (SP)、MEK-ERK 阻害剤 U0126 (U) では阻害されなかった (図 2-5C-D)。また、ERK2 ではなく、p38 $\alpha$  のノックダウンによって、Eps15 リン酸化が阻害された (図 2-5E)。p38 のコンセンサス配列は pSer/Thr-Pro であり<sup>[69]</sup>、Eps15 のリン酸化も pSer-Pro であることから p38 が直接 Eps15 のリン酸化を触媒することが示唆された (図 2-5F)。そこで p38 が直接 Eps15 をリン酸化するかどうか調べるために、HEK293 細胞から Eps15 を免疫沈降にて取得し、大腸菌で精製した組み換えキナーゼの活性型 GST-p38 $\alpha$  と試験管内で反応させた。Eps15 リン酸化は p38 $\alpha$  との反応で誘導され、p38 阻害剤 SB の前処理によって誘導が阻害された (図 2-5G)。以上のことから、Eps15 Ser-796 は p38 によって直接リン酸化されることが明らかになった。

#### 1.3.5 EGFR のエンドサイトーシスへの Eps15 の関与

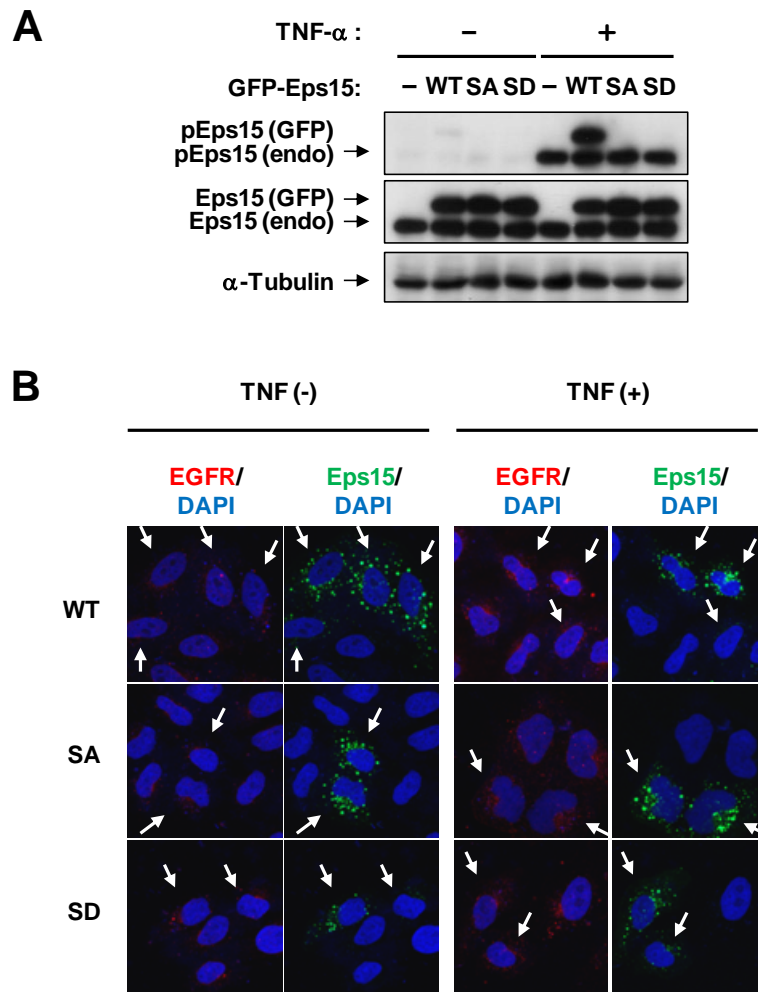
TNF- $\alpha$  を介した EGFR の Ser-1046/7 リン酸化およびそのエンドサイトーシスは p38 に依存していることをこれまでに明らかにしている<sup>[32-33]</sup>。また、Eps15 Ser-796 リン酸化も p38 に依存している。これらのことから Eps15 Ser-796 は TNF- $\alpha$  を介した EGFR のエンドサイトーシスに関わることが示唆された。そこで、HeLa 細胞に野生型 GFP-Eps15 (WT)、または Ser-796 を Ala に置換した非リン酸化変異体 GFP-Eps15 (SA)、Ser-796 を Asp に置換したリン酸化模倣変異体 (SD) を導入し、TNF- $\alpha$  を介した EGFR のエンドサイトーシスが誘導されるかどうか検討した。まず、ウェスタンブロットにより GFP-Eps15 の導入を確認した。いずれの変異体も同程度導入されていることが確認でき、さらに TNF- $\alpha$  刺激によって WT でのみ Ser-796 リン酸化の誘導が確認できた (図 2-6A)。次に導入細胞を免疫蛍光染色し、共焦点レーザ顕微鏡にて EGFR のエンドサイトーシスを観察した (図 2-6B)。GFP-Eps15 を導入していない細胞 (矢印で示されていない細胞) においても、導入した細胞 (矢印で示された細胞) においても、TNF- $\alpha$  無刺激時には EGFR のエンドサイトーシスが認められなかった。





**図2-5 p38介したEps15 Ser-796リン酸化**

(A) HeLa細胞に300 nM TAK1阻害剤5Zまたは1  $\mu$ M EGFRチロシンキナーゼ阻害剤PD153035(PD)を30分間前処理し、10 ng/mL EGFまたは20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗pp38抗体、抗pERK抗体、抗pJNK抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(B) HeLa細胞にTAK1に対するsiRNAを用いてTAK1をノックダウンさせ、72時間後に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗TAK1抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(C、D) HeLa細胞に10  $\mu$ M p38阻害剤SB203580(SB)、10  $\mu$ M JNK阻害剤SP600125(SP)、5  $\mu$ M ERK経路の阻害剤U0126(U)を30分間前処理し、20 ng/mL TNF- $\alpha$ (C)または10 ng/mL EGF(D)を10分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(E) HeLa細胞にp38 $\alpha$ またはERK2に対するsiRNAを用いてそれぞれp38 $\alpha$ 、ERK2をノックダウンさせ、72時間後に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗p38抗体、抗ERK抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(F) p38 $\alpha$ の基質シーケンスロゴとEps15 Ser-796周辺のアミノ酸配列を示した。(G)免疫沈降によりHEK293細胞から内在性Eps15を取得し、大腸菌から精製したヒト活性型組み換えp38 $\alpha$ タンパク質と30 $^{\circ}$ Cにて30分間反応させた。p38阻害剤SBは予めキナーゼと30分間反応させた後にEps15と反応させた。反応後、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗pp38抗体、抗p38抗体を用いたIBを行った。



**図2-6 TNF- $\alpha$ 介したEGFRエンドサイトーシスとEps15 Ser-796リン酸化の関与**

(A) HeLa細胞に対し、GFP-Eps15発現プラスミドDNA(WT)、またはSer-796残基をAlaに置換した変異体(SA)、Ser-796残基をAspに置換した変異体(SD)を導入し、24時間後に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pEps15抗体、抗Eps15抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いてIBを行った。(B) (A)と同じ条件の細胞に対し、固定、透過の後、抗EGFR抗体を用いて免疫蛍光染色した。GFP-Eps15導入細胞を矢印で示した。

TNF- $\alpha$ 刺激時、非導入細胞では、核周辺にEGFRの局在が認められたことからEGFRのエンドサイトーシスが観察された。WT導入細胞について検討を行ったところ、非導入細胞と同様にエンドサイトーシスが認められ、またSA、SD導入細胞においてもエンドサイトーシスが認められ、現在までのところEps15 Ser-796リン酸化がEGFRのエンドサイトーシスに關与するデータは得られなかった。

次に、Eps15のノックダウンを行い、炎症シグナルを介したEGFRのエンドサイトーシスへのEps15の關与について検討した。

siRNAを用いてEps15、Eps15関連タンパク質であるEpsin1を一過的にノックダウンし(図2-6C)、フローサイトメーターを

用いて細胞表面上に存在するEGFRの発現量を検出した(図2-6D)。EGFRがエンドサイトーシスすると、細胞表面上に発現するEGFRが減少するため、ピークが左側にシフトする。実際にコントロール細胞であるsiLuc群ではTNF- $\alpha$ 未刺激時のピーク(緑)と比べ、TNF- $\alpha$ 刺激時のピーク(水色)は左側にシフトしており、EGFRのエンドサイトーシス誘導が検出できた。次に、Eps15、Epsin1単独ノックダウン時の結果を見ると、いずれも緑のピークが

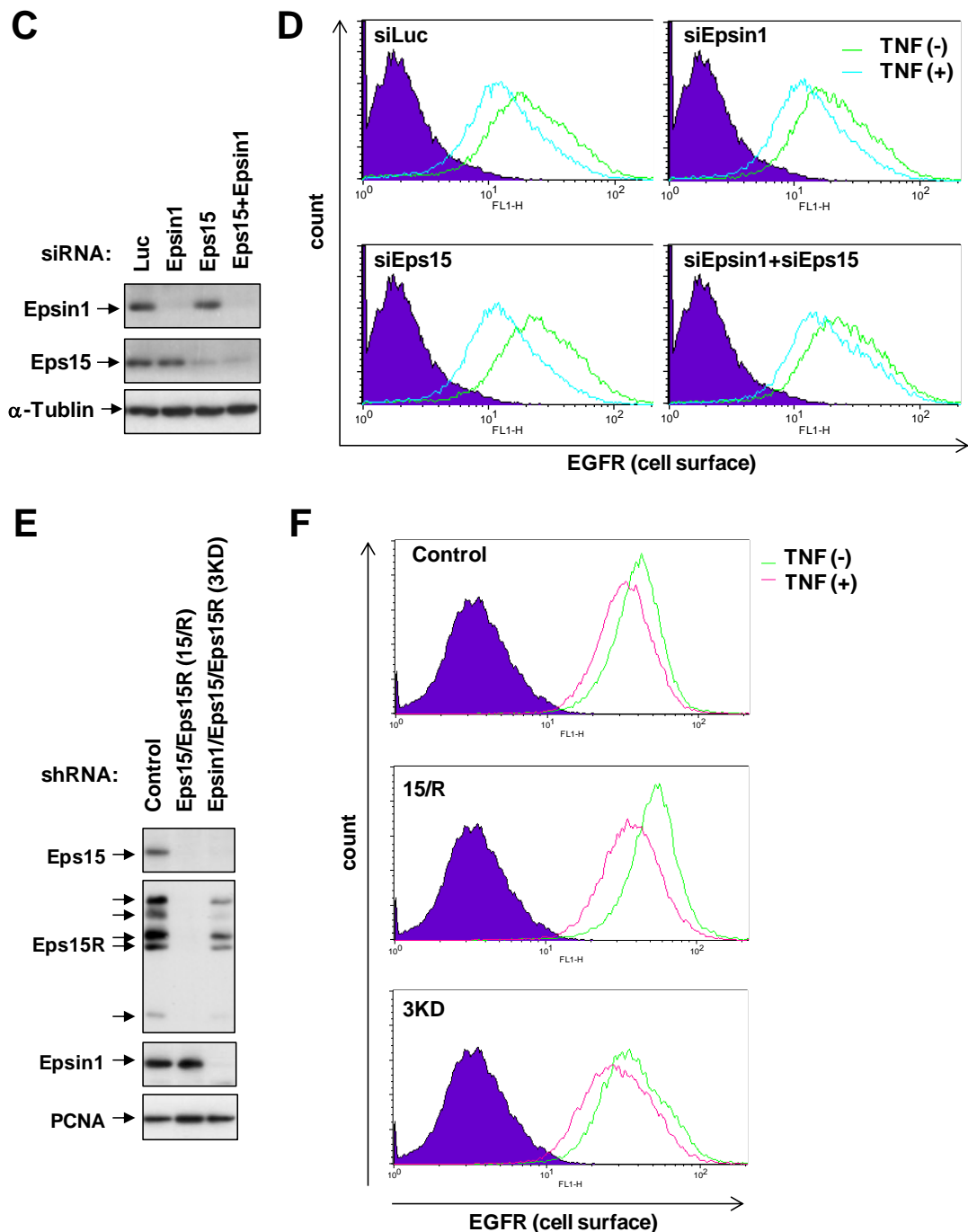


図2-6 TNF- $\alpha$ 介したEGFRエンドサイトーシスとEps15 Ser-796リン酸化の関与(続き)

(C) HeLa細胞にEpsin 1、またはEps15、または両遺伝子を同時にsiRNAを用いてノックダウンさせ、72時間後に細胞抽出液を調製し、抗Epsin 1抗体、抗Eps15抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いてIBを行った。(D) (C)と同じ条件の細胞に対し、抗EGFR抗体を用いて細胞表面に存在するEGFRを染色し、FACS解析を行った。緑はTNF- $\alpha$ 刺激なしの場合、水色は刺激を10分行った際の細胞表面上に存在するEGFRを示している。(E) Eps15/Eps15R安定ノックダウンHeLa細胞(15/R)、Epsin1/Eps15/Eps15R安定ノックダウンHeLa細胞(3KD)から細胞抽出液を調製し、抗Eps15抗体、抗Eps15R抗体、抗Epsin 1抗体、抗PCNA抗体を用いてIBを行った。(F) (E)と同じ条件の細胞に対し、抗EGFR抗体を用いて細胞表面に存在するEGFRを染色し、FACS解析を行った。緑はTNF- $\alpha$ 刺激なしの場合、ピンク色は刺激を10分行った際の細胞表面上に存在するEGFRを示している。

水色のピークと比べ左側にシフトすることがわかり、EGFR のエンドサイトーシス阻害が確認されなかった。Eps15 と Epsin1 はお互いの機能を補い合っていることが考えられるため、Eps15 と Epsin1 のダブルノックダウンを行ったところ、コントロール細胞と同様に EGFR のエンドサイトーシスが認められた。また、Eps15、Eps15 の関連タンパク質である Eps15R、Epsin1 を安定的にノックダウンした Eps15/Eps15R (15/R)細胞、Epsin1/Eps15/Eps15R (3KD) 細胞を用いて、同様にフローサイトメーターで細胞表面上に存在する EGFR の発現量を検出した (図 2-6F)。これらの細胞における Eps15、Eps15R、Epsin1 のノックダウン効率は図 2-6E に示した。いずれの細胞においても図 2-6D の結果と同様に、TNF- $\alpha$ 刺激による EGFR のエンドサイトーシスが認められた。これらの結果から、Eps15 およびその関連タンパク質 Eps15R、Epsin1 は TNF- $\alpha$ を介した EGFR のエンドサイトーシスへの関与は低いことがわかった。2012 年、Pazzi らは Eps15 ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞を用いてリガンドによる EGFR のエンドサイトーシスを検討している<sup>[70]</sup>。Eps15 ノックアウトマウス由来のマウス胎児線維芽細胞において、リガンドを介した EGFR のエンドサイトーシスが正常に起こることを報告している。さらに近年、p38 を介した EGFR のエンドサイトーシスにおけるアダプター分子の制御について報告されており、この報告においても Eps15 とエンドサイトーシスの関与が認められなかった<sup>[71]</sup>。これらの結果により、リガンド、TNF- $\alpha$ 、いずれを作用させた場合でも EGFR のエンドサイトーシスへの Eps15 の関与が低いことが考えられる。

EGFR リガンド刺激時、Eps15 に AP-2 や Grb2 が結合することが知られており、Eps15 はアダプター分子と EGFR の足場タンパク質として機能している。Eps15 Ser-796 リン酸化部位はアダプター分子の結合部位と EGFR の結合部位の間に存在するため、Eps15 Ser-796 リン酸化によるタンパク構造変化は複合体の安定性に関わる可能性があり、更なる検討が必要である。また、Eps15 は EGFR 以外の受容体のエンドサイトーシスにも関与している。p38 は AMPA 受容体や Platelet-activating factor (PAF) 受容体、 $\mu$ オピオイド受容体などのエンドサイトーシスの誘導を制御する<sup>[72-74]</sup>。Ser-796 リン酸化は p38 の制御を受けるため、これらの受容体のエンドサイトーシスにおける Eps15、そしてその Ser-796 リン酸化の関与についても検討する必要がある。さらに、近年、エンドサイトーシス以外にも Eps15 はオートファジーの誘導時に認められる gap junction の分解に関わる分子 connexin 43 に結合し、オートファジーを誘導すること、また、ノックアウトマウスを用いた解析により Eps15 が B 細胞の分化に関与することが報告されている<sup>[70, 75-76]</sup>。Eps15 Ser-796 リン酸化がこれらの機能に関与するかどうか調べていく必要がある。

今回、我々は p38 が Eps15 Ser-796 をリン酸化することを見出したが、その機能について

は明らかにすることができなかった。このリン酸化部位は Eps15 の機能を知る上で重要な情報であることが考えられることから、今後の検討が期待される。

## 第2章 EGFR の Thr リン酸化による Tyr 自己リン酸化の抑制機構

### 2.1 節 序論

我々はこれまでに炎症シグナルによって活性化された ERK が EGFR の Thr-669 リン酸化を誘導することを報告している<sup>[32]</sup>。しかし、その機能については明らかになっていなかった。そこで、ERK を介した EGFR の Thr リン酸化の生理機能について検討を行った。

2009 年、2つのグループがリガンド結合時の EGFR の X 線結晶構造解析を行い、ダイマー形成時の細胞内ドメインの構造を明らかにした(図 3-1)<sup>[77-78]</sup>。ダイマー化している受容体はリガンドが結合する側の受容体(以下、アクチベーターと呼ぶ)と、その活性を受け取る側の受容体(以下、レシーバーと呼ぶ)の2種類で構成されており、それぞれが別の役割を果たすことが示唆されている。リガンドが EGFR に結合すると、EGFR の構造変化が起こり、EGFR の片方がアクチベーターとして、もう片方がレシーバーとして非対称にダ

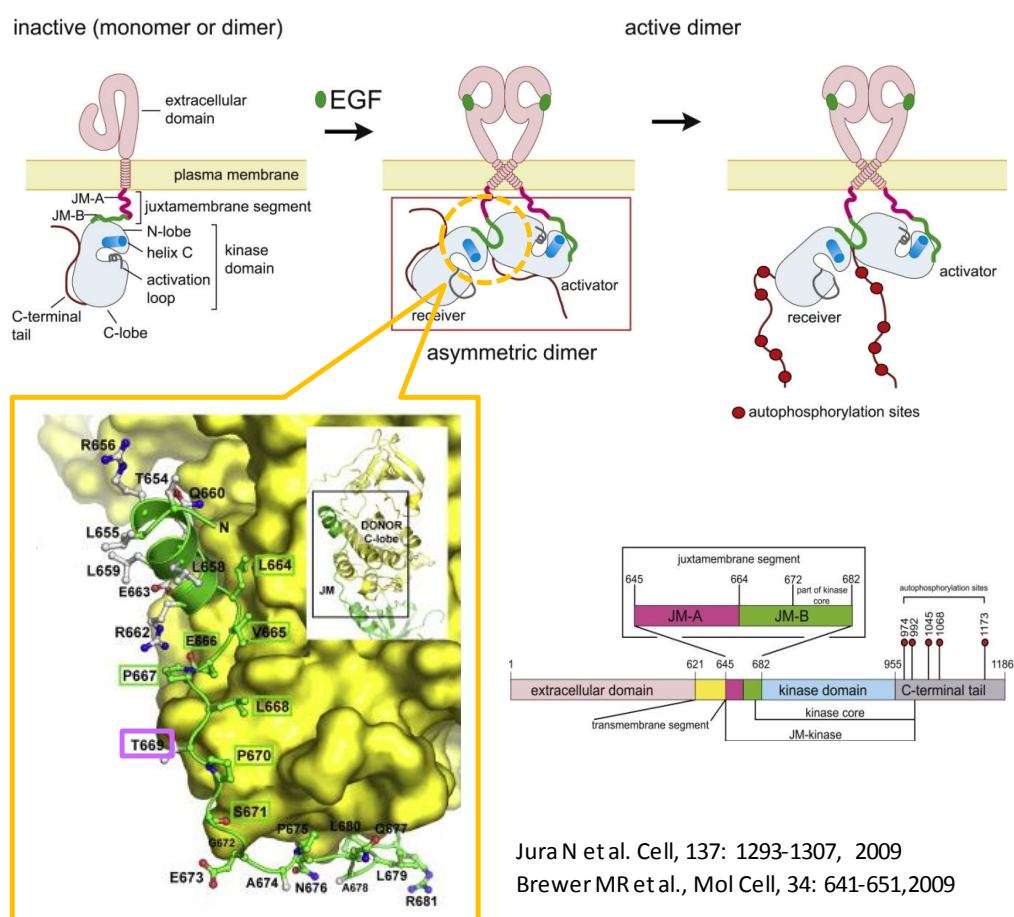


図3-1 非対称性EGFRホモダイマー構造

EGFRにリガンドが結合すると、非対称性ダイマーを形成して、C末端領域のチロシン自己リン酸化が誘導される。非対称性ダイマーにおいて、レシーバー側のThr-669を含む膜近傍ドメインはアクチベーター側のチロシンキナーゼと結合し、チロシンキナーゼドメインの構造を安定化させる。

イマー形成される。チロシンキナーゼドメインは N-lobe と C-lobe で構成されており、二つの lobe の間のくぼみに ATP が結合することで活性化状態になる。ダイマー形成時、レシーバー側の膜近傍ドメインはアクチベーター側のチロシンキナーゼドメインの C-lobe とファンデルワールス力によって結合する。この結合により EGFR のダイマーは安定化し、EGFR が活性化状態になる。このようにレシーバー側の膜近傍ドメインの構造は EGFR の活性化に非常に重要であると分かった。また、彼らは膜近傍ドメインに存在する Thr-669 に注目し、Thr-669 残基を非リン酸化体にするために Ala に置換させた変異体 (TA)、またはリン酸化模倣体にするために Asp に置換させた変異体 (TD) を導入した組み換え型 EGFR を細胞に導入させたところ、TA では野生型と同様にチロシンのリン酸化が誘導されたが、TD ではチロシンのリン酸化の誘導が阻害されていた。このことから、Thr-669 のリン酸化は EGFR の構造の不安定性を誘導することで EGFR チロシンリン酸化の阻害に寄与することが証明された。Thr-669 リン酸化は 1990 年代から EGFR 活性化の抑制に関わると報告されていたが<sup>[34-35]</sup>、その機構は長い間不明であり、この論文はその謎をひも解く重要な研究だと言える<sup>[77-78]</sup>。

しかしながら、上記の研究はプラスミド DNA による過剰発現系での証明であり、生理的な条件においても同様のことが起こるかどうか不明であった。また、非対称性ダイマーのどちら側の Thr-669 が重要であるかについてもわかっていない。そこで、本研究では EGFR の過剰発現とそれに伴う恒常的な EGFR チロシンリン酸化が誘導されているヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 細胞を用いて、ERK を介した Thr-669 リン酸化が恒常的な EGFR チロシンリン酸化に及ぼす影響について検討した。

## 2.2 節 実験方法

### 2.2-1 抗体および試薬

抗 phospho-p38 (Thr-180/Tyr-182)、phospho-JNK (Thr-183/Tyr-185)、phospho-ERK (Thr-202/Tyr-204)、phospho-EGFR (Thr-669, Ser-1046/7, Tyr-845, Tyr-974, Tyr-992, Tyr-1045, Tyr-1068, Tyr-1173)、phospho-MET (Tyr-1234/5)、phospho-ErbB3 (Tyr-1289) 抗体は Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA)、p38、ERK1、JNK、EGFR、ErbB3、Actin、 $\alpha$ -Tubulin 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA)、抗 EGFR モノクローナル抗体 (LA-1) は Millipore 社 (Billerica, MA, USA)、Fluorescein isothiocyanate (FITC)

結合型ウサギ抗マウス IgG 抗体 Dako (Glostrup, Denmark) からそれぞれ購入した。組み換えヒト TNF- $\alpha$ 、EGF、heregulin (HRG) は R&D systems 社 (Minneapolis, MN, USA)、HGF は Pepro Tech (Rocky Hill, NJ, USA) からそれぞれ購入した。SB203580、U0126、PD153035 は Merck Biosciences 社 (Darmstadt, Germany)、Gefitinib は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) TPA は Wako Pure Chemical 社 (大阪, 日本) からそれぞれ購入した。それぞれの化合物は Me<sub>2</sub>SO に溶解させた。

#### 2.2-2 細胞培養

HEK293 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (high-glucose condition) (Life Technologies Corporation, CA, USA) + 10% fetal calf serum、100 units/ml penicillin (明治製菓、東京、日本)、100  $\mu$ g/ml streptomycin (明治製菓、東京、日本) を用いて、MDA-MB-468 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (high-glucose condition) + 2 mM L-glutamine (Life Technologies Corporation)、10% fetal calf serum、100 units/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin を用いて、PC-9 細胞は RPMI 1640 medium (Life Technologies Corporation) + 2 mM L-glutamine、10% fetal calf serum、100 units/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin を用いて 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> において培養した。

#### 2.2-3 プラスミド DNA 導入

ヒト EGFR プラスミド DNA は過去の論文に記載してある<sup>[32]</sup>。ヒト ErbB3 cDNA は HeLa 細胞から RT-PCR によって増幅し、pcDNA3.1 ベクターに組み込んだ。変異体は Quick-Change site-directed mutagenesis kit (Agilent, La Jolla, CA, USA)、または PrimeSTAR HS Polyymerase (Takara-Bio、滋賀、日本) を用いて作製した。プライマーの配列は主論文 2 を参照。HEK293 細胞に対して Lipofectamine 2000 (Life Technologies Corporation, CA, USA) を用いてトランスフェクションを行った。安定発現株は G418 (Wako Pure Chemical 社) を用いてセクションし、G418 を含む培地で培養した。

#### 2.2-4 細胞抽出液の調整

1.2-6 に準ずる。

#### 2.2-5 ウェスタンブロット法

1.2-7 に準ずる。



## 2.2-6 FACS 解析

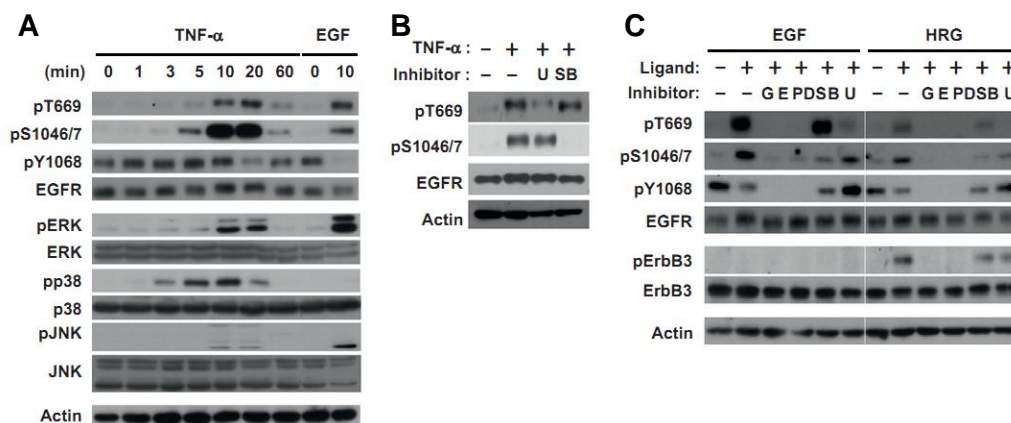
1.2-13 に準ずる。

## 2.3 節 実験結果・考察

### 2.3.1 MDA-MB-468 細胞における EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化

本研究ではヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 細胞を用いた。この細胞では EGFR の過剰発現が認められ、恒常的な EGFR のチロシンのリン酸化が誘導されている。まず、この細胞において以前報告しているように<sup>[32]</sup>、TNF- $\alpha$ を介する EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化が誘導されるかどうか、また、そのリン酸化がそれぞれ p38、ERK によって制御されるかどうかについてキナーゼ阻害剤を用いて検討した。その結果、HeLa 細胞と同じタイムコースで Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化が認められ (図 3-2A)、また、Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化がそれぞれ p38 阻害剤 SB、ERK 経路の阻害剤 U で阻害されたことから (図 3-2B)、過去に示した HeLa 細胞と同様に制御されることがわかった。

次に、EGFR リガンド EGF を MDA-MB-468 細胞に作用させ、リガンドによる EGFR のシグナル伝達について検討した (図 3-2A)。EGF を作用させたところ、ERK の強いリン酸化



**図3-2 MDA-MB-468細胞におけるEGFR Ser/Thrリン酸化制御**

(A) MDA-MB-468細胞に対し、20 ng/mL TNF- $\alpha$ または10 ng/mL EGFをそれぞれ図に示す時間作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pERK抗体、抗ERK抗体、抗pp38抗体、抗p38抗体、抗pJNK抗体、抗JNK抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。(B) MDA-MB-468細胞に対し、5  $\mu$ M ERK経路の阻害剤Uまたは10  $\mu$ M p38阻害剤SBを30分間前処理し、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。(C) MDA-MB-468細胞に対し、10  $\mu$ M EGFR-TKI gefitinib (GE)または10  $\mu$ M EGFR-TKI PD153035 (PD)、10  $\mu$ M p38阻害剤SB、5  $\mu$ M ERK経路の阻害剤Uを30分間前処理し、10 ng/mL EGFまたは10 ng/mL HRGを10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pErbB3抗体、抗ErbB3抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。

が誘導され、それに伴う Thr-669 リン酸化が検出された。しかし、p38 のリン酸化誘導は TNF- $\alpha$ 作用時と比べると弱く、Ser-1046/7 リン酸化誘導も弱いことが確認できた。この細胞には ErbB3 の発現も認められることから、ErbB3 リガンドである HRG を作用させた場合においても EGFR リガンドと同様のシグナル伝達起きるかどうか検討した結果、EGFR リガンド作用時と同様に、EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化と ErbB3 チロシンリン酸化が認められた (図 3-2C)。次に、HRG によって誘導される Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化の制御機構を調べるために、キナーゼ阻害剤を前処理したところ、p38 阻害剤 SB によって Ser-1046/7 リン酸化が、ERK 経路の阻害剤 U によって Thr-669 リン酸化が阻害された (図 3-2C)。このことから、HRG によって誘導される EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化も EGFR リガンド作用時と同様にそれぞれ p38 と ERK を介していることがわかった。さらに HRG 刺激において、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 gefitinib (GE) の前処理によって Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化両方が阻害されたため、ErbB3 は EGFR とダイマーを形成することで下流にシグナルを送ることがわかった。

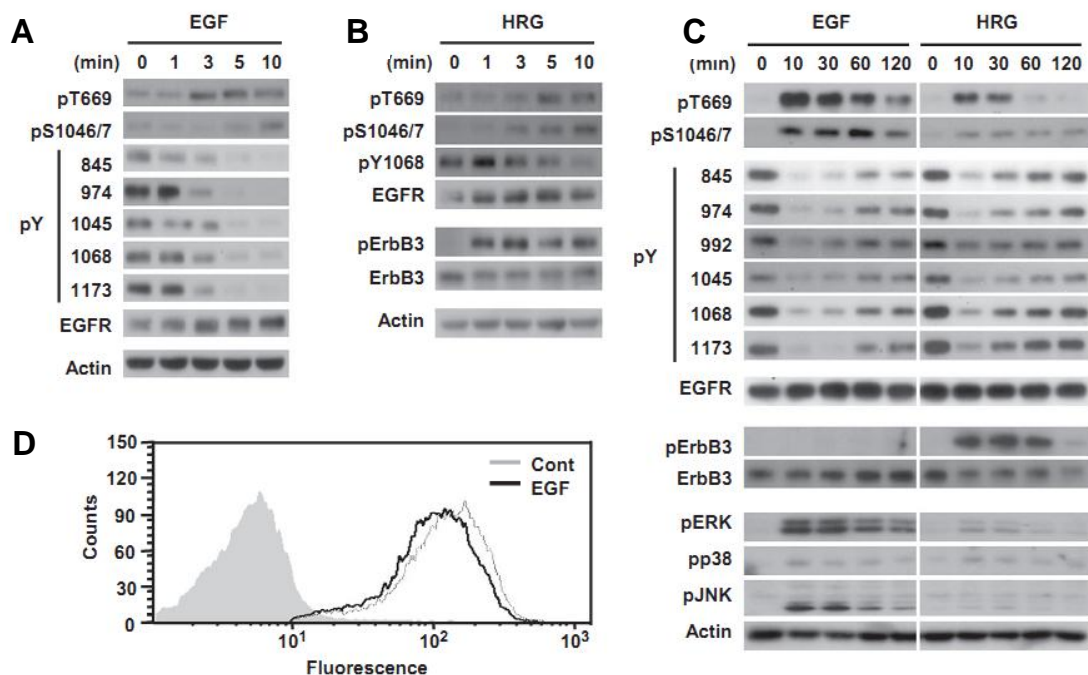
以上のことから、MDA-MB-468 細胞では HeLa 細胞と同様に p38、ERK から EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化がそれぞれ誘導されることが確認できた。

### 2.3.2 EGFR リガンドを介した EGFR のチロシンのリン酸化抑制

図 3-2A、C により、MDA-MB-468 細胞では EGFR Tyr-1068 リン酸化がリガンドに依存せずに恒常的に強く誘導され、このリン酸化が EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 GE によって阻害されることが確認できた。興味深いことに、TNF- $\alpha$ 刺激、EGF 刺激、HRG 刺激のいずれにおいても EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化の誘導により、EGFR Tyr-1068 リン酸化抑制が認められた。このチロシンリン酸化抑制が Tyr-1068 残基特異的であるかどうか調べるため、845、974、1045、1175 番目のチロシン残基についても検討を行った。EGF を 1 分から 10 分まで MDA-MB-468 細胞に刺激したところ、Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化は誘導されるのに対し、この 5 つの恒常的なチロシンリン酸化は全て刺激 3 分から抑制され、5 分では完全に消失した (図 3-3A)。HRG 刺激の場合でも同様に、ErbB3 チロシンリン酸化誘導に伴い、EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化誘導と Tyr-1068 リン酸化抑制が認められた (図 3-3B)。また、EGF、HGF を長時間作用させたときのチロシンリン酸化について検討を行った。興味深いことに、HeLa 細胞とは異なり、MDA-MB-468 細胞では EGF を 120 分作用させても EGFR の分解が認められなかった。HRG の長時間刺激において EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化が減弱しており、この時、一連のチロシンリン酸化抑制も解除された (図 3-3C)。

以上のことから、恒常的に EGFR チロシンリン酸化が誘導されている MDA-MB-468 細胞では EGFR Ser-1046/7・Thr-669 リン酸化とチロシンリン酸化は逆相関関係にあることがわかった。

リガンド刺激時、活性化した EGFR は下流の MAPK を活性化させることが知られている。EGF 刺激によって一連のチロシンリン酸化が抑制されているのにも関わらず、下流の ERK、p38、JNK のリン酸化が確認された (図 3-3C)。また、リガンド刺激時、EGFR はエンドサイトーシスすることが知られているが、EGF を 10 分間作用させた時の細胞膜表面に存在する EGFR の発現量を調べたところ、その減少が認められ、つまり、エンドサイトーシスが誘導されることがわかった (図 3-3D)。以上のことから、EGFR チロシンリン酸化は抑制されるが、EGFR の活性は逆に誘導されていることが明らかになった。このことから、

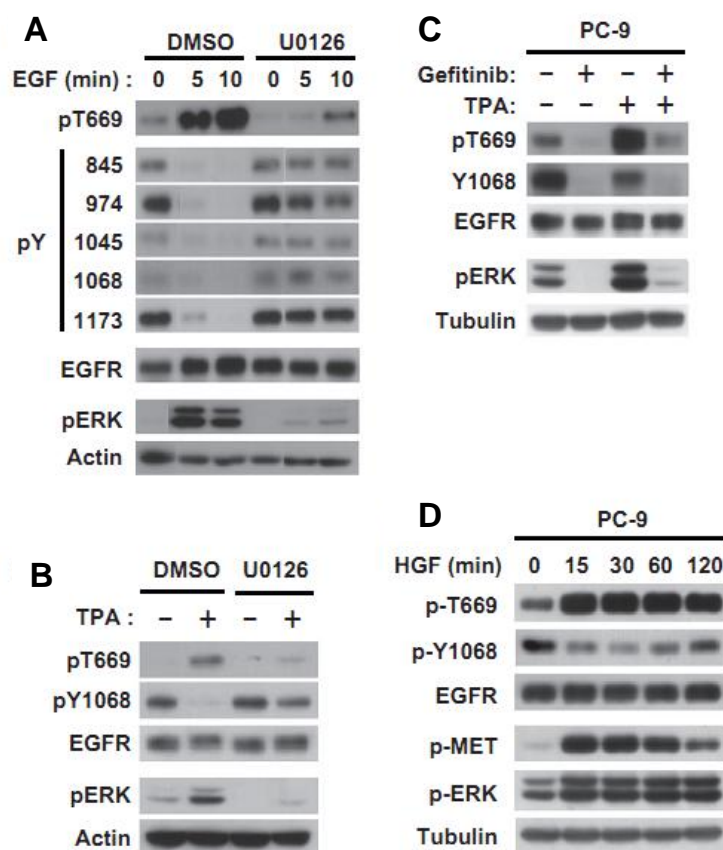


**図3-3 MDA-MB-468細胞におけるEGFR Ser/Thrリン酸化とチロシンリン酸化の逆相関**

(A) MDA-MB-468細胞に対し、10 ng/mL EGFをそれぞれ図に示す時間作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗pTyr-845 EGFR抗体、抗pTyr-974 EGFR抗体、抗pTyr-1045 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗pTyr-1173 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗β-Actin抗体を用いたIBを行った。(B) MDA-MB-468細胞に対し、10 ng/mL HRGをそれぞれ図に示す時間作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗pTyr-845 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pErbB3抗体、抗ErbB3抗体、抗β-Actin抗体を用いたIBを行った。(C) MDA-MB-468細胞に対し、10 ng/mL EGFまたは10 ng/mL HRGをそれぞれ図に示す時間作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗pTyr-845 EGFR抗体、抗pTyr-974 EGFR抗体、抗pTyr-992 EGFR抗体、抗pTyr-1045 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗pTyr-1173 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pErbB3抗体、抗ErbB3抗体、抗pERK抗体、抗pp38抗体、抗pJNK抗体、抗β-Actin抗体を用いたIBを行った。(D) MDA-MB-468細胞に10 ng/mL EGFを10分作用させた後、細胞を固定し、細胞表面上に存在するEGFRに対して抗EGFR抗体を用いて染色し、FACS解析を行った。

MDA-MB-468 細胞のように EGFR チロシンリン酸化が EGFR の活性化の指標となりえない場合があることが考えられる。

### 2.3.3 ERK のリン酸化による EGFR のチロシンのリン酸化抑制



**図3-4 ERKによるEGFRチロシンリン酸化抑制**

(A) MDA-MB-468細胞に5  $\mu$ M ERK経路の阻害剤Uを30分間前処理した後、10 ng/mL EGFをそれぞれ図に示す時間作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pTyr-845 EGFR抗体、抗pTyr-974 EGFR抗体、抗pTyr-1045 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗pTyr-1173 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pERK抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。(B) MDA-MB-468細胞に5  $\mu$ M ERK経路の阻害剤Uを30分間前処理した後、100 ng/mL TPAを10分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pERK抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。(C) PC-9細胞に対し、1  $\mu$ M EGFR-TKI Gefitinibを30分間前処理した後、100 ng/mL TPAを10分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pERK抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。(D) PC-9細胞に対し、HGFを10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pMET抗体、抗pERK抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。

図3-2Cにより、ERK経路の阻害剤Uを前処理後にEGF刺激、HRG刺激を行った際に、EGFR Tyr-1068リン酸化抑制が解除されたことから、ERKのリン酸化がTyr-1068リン酸化抑制に関与することが示唆された。そこで、ERKの関与を調べるために、ERK経路の阻害剤Uを前処理の後EGF刺激を行ったところ、Thr-669リン酸化誘導の阻害に伴い、一連のチロシンリン酸化抑制が解除された(図3-4A)。また、PKCを介してERKの活性化を誘導するTPAをMDA-MB-468細胞に作用させたところ、EGFの場合と同様にERKのリン酸化に伴うThr-669リン酸化誘導阻害とチロシンリン酸化抑制の解除が観察できた(図3-4B)。

さらに、ヒト肺がん細胞株

PC-9 細胞を用いて同様の現象が起こるかどうか検討した。PC-9 細胞は EGFR に活性化変異が認められており、恒常的にチロシンキナーゼ活性が誘導され、それに伴う ERK の恒常的な活性化が誘導されている。PC-9 細胞では恒常的な EGFR Thr-669 リン酸化、Tyr-1068 リン酸化、ERK リン酸化が認められており、そこに EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 gefitinib を作用させることでこれらのリン酸化が全て阻害された。このことから、PC-9 細胞では EGFR のチロシンキナーゼ活性化によって、恒常的な Tyr-1068 の自己リン酸化、下流の ERK のリン酸化、さらには ERK によって活性化される Thr-669 リン酸化が誘導されていることがわかった。この細胞に対して、TPA を作用させたところ、ERK の活性化が増強し、これに伴う Thr-669 リン酸化が確認できた。また、MDA-MB-468 細胞と同様に ERK と Thr-669 リン酸化に伴う恒常的な Tyr-1068 リン酸化抑制が確認できた。EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 gefitinib と TPA を同時に細胞に作用させると TPA による ERK のリン酸化増強、それに伴う Thr-669 リン酸化が認められるが、gefitinib によって恒常的なチロシンキナーゼ活性が阻害されるため、当然のことながら EGFR の Tyr-1068 のリン酸化は抑制され、gefitinib 単独の場合と同じ結果になることが確認できた。細胞増殖や生存に関わる RTK である MET が PC-9 細胞で発現しているが、そのリガンドである HGF を PC-9 細胞に作用させると、MET のチロシンキナーゼ活性を介して ERK の活性化が強く誘導され、それに伴う恒常的な EGFR Thr-669 リン酸化及び Tyr-1068 リン酸化の抑制が確認できた (図 3-4D)。

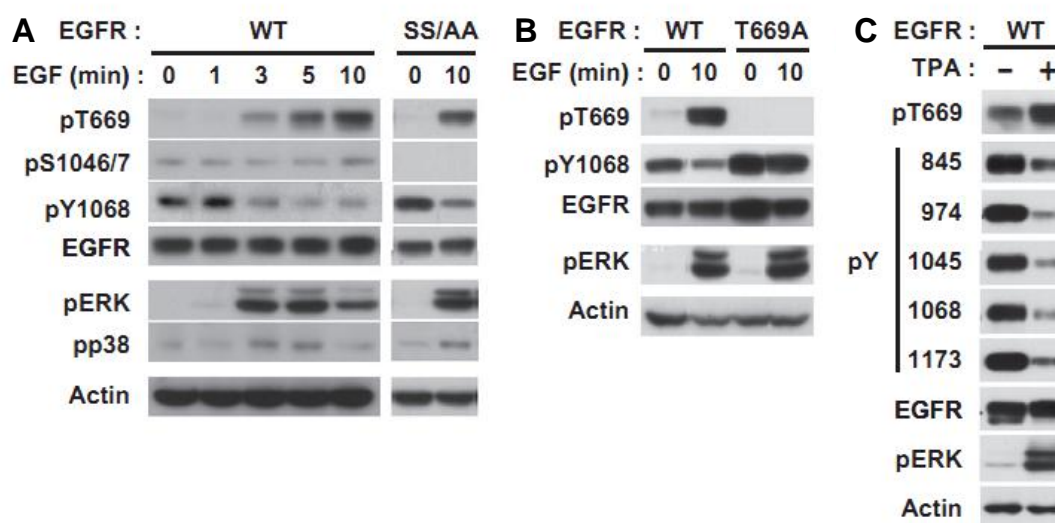
これらの結果により、ERK リン酸化は恒常的な EGFR チロシンリン酸化を抑制することがわかり、この経路に Thr-669 リン酸化が関与する可能性が示唆された。また、この機構は特定の細胞株、特定の変異にだけ認められる現象ではなく、恒常的な EGFR チロシンリン酸化が起きている細胞においては共通して起こる現象であることもわかった。

#### 2.3.4 Thr-669 リン酸化による EGFR チロシンリン酸化の抑制

図 3-4 により、ERK がチロシンリン酸化の抑制に重要であることがわかったため、Thr-669 リン酸化が EGFR チロシンリン酸化の抑制に関与することが強く示唆された。したがって、今度は Thr-669 リン酸化側から EGFR チロシンリン酸化の抑制について検討を行うために、HEK293 細胞に野生型 EGFR (WT) または Ser-1046/7 残基、Thr-669 残基を Ala に置換させた変異体 EGFR (SS/AA、TA) を遺伝子導入し、安定的にこれらの EGFR を発現した細胞株を樹立した。まず、WT 安定発現株では Tyr-1068 の恒常的なリン酸化が認められ、MDA-MB-468 細胞と同様に、EGF 刺激によって、ERK と Thr-669 リン酸化誘導、恒常的な Tyr-1068 リン酸化抑制が確認できた (図 3-5A)。また、この細胞株において EGF 刺激によ



る p38 リン酸化と Ser-1046/7 リン酸化誘導は非常に弱いことがわかった。次に、SS/AA 安定発現株では EGF 刺激で p38 リン酸化が認められるものの、Ser-1046/7 残基が Ala に置換されているため、Ser-1046/7 リン酸化は認められない (図 3-5A)。この細胞株では WT 安定発現株と同様に、EGF 刺激によって、恒常的な Tyr-1068 リン酸化抑制が確認できた (図 3-5A)。したがって、Ser-1046/7 リン酸化は恒常的な Tyr-1068 リン酸化抑制には関わらないことがわかった。最後に、TA 安定発現株では、EGF によって ERK のリン酸化が誘導されるが、Thr-669 残基が Ala に置換されているため、Thr-669 リン酸化は認められない (図 3-5B)。この細胞は無刺激時において WT 安定発現株と比べると恒常的な Tyr-1068 のリン酸化はより強く、また EGF 刺激において恒常的な Tyr-1068 リン酸化抑制が確認されなかったことから (図 3-5B)、Thr-669 リン酸化は恒常的な Tyr-1068 リン酸化を抑制することがわかった。また、WT 安定発現株に TPA を作用させると ERK の活性化に伴う Thr-669 リン酸化が誘導され、それに伴う一連の恒常的なチロシンリン酸化の抑制が確認できた (図 3-5C)。以上の結果により、Thr-669 リン酸化は直接チロシンの脱リン酸化を制御するフィードバック阻害作用を持つことが明らかとなった。

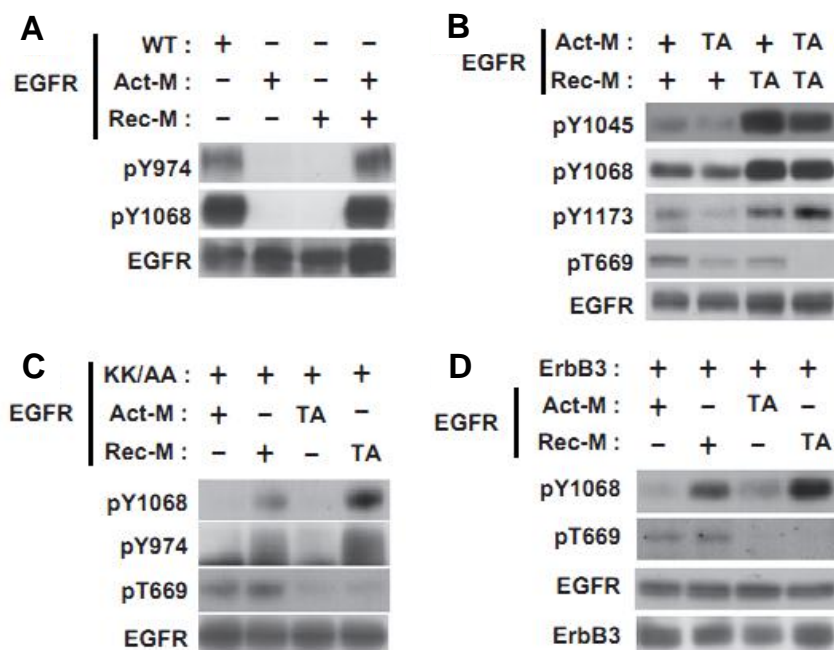


**図3-5 Thr-669リン酸化によるEGFRチロシンリン酸化抑制**

(A) HEK293細胞にEGFR発現プラスミドDNA (WT)またはSer-1046/7をAlaに置換した変異体 (SS/AA)を安定的に導入し、10 ng/mL EGFを図に示す時間細胞に作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pp38抗体、抗pERK抗体、抗β-Actin抗体を用いたIBを行った。(B) HEK293細胞にWTまたはThr-669をAlaに置換した変異体 (T669A)を安定的に導入し、10 ng/mL EGFを10分間細胞に作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pERK抗体、抗β-Actin抗体を用いたIBを行った。(C) HEK293細胞にWTを安定的に導入し、100 ng/mL TPAを10分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pTyr-845 EGFR抗体、抗pTyr-974 EGFR抗体、抗pTyr-1045 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗pTyr-1173 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗pERK抗体、抗β-Actin抗体を用いたIBを行った。

### 2.3.5 非対称性 EGFR ダイマーにおける Thr-669 リン酸化の役割

序論において EGFR の非対称性ダイマー構造においてレシーバー側の膜近傍ドメインが EGFR ダイマーの安定性に関わることに触れたが、チロシンの脱リン酸化制御にはレシーバー側の EGFR Thr-669 リン酸化に関わることが示唆されている。そこで、レシーバー側の EGFR Thr-669 リン酸化の重要性について証明するために、過去に報告されているアクチベーターとしてのみ機能する変異体 EGFR (I682Q;



**図3-6 非対称性ダイマーにおけるThr-669リン酸化の役割**

(A) HEK293細胞にWTまたはアクチベーターとしてのみ機能する変異体 (Act-M)、レシーバーとしてのみ機能する変異体 (Rec-M) を一過的に導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pTyr-974 EGFR抗体、pTyr-1068 EGFR抗体、抗EGFR抗体を用いたIBを行った。(B) HEK293細胞にそれぞれAct-M とRec-MのThr-669をAlaに置換させた変異体 (TA)とAct-M、Rec-Mを組み合わせて一過的に導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pTyr-1045 EGFR抗体、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗pTyr-1173 EGFR抗体、抗pThr-669 EGFR抗体、抗EGFR抗体を用いたIBを行った。(C) HEK293細胞にEGFRのキナーゼ活性を持たない変異体 (KK/AA)とAct-M、Rec-M、Act-M TA、Rec-M TAを組み合わせて一過的に導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗pTyr-973 EGFR抗体、抗pThr-669 EGFR抗体、抗EGFR抗体を用いたIBを行った。(D) HEK293細胞にErbB3発現プラスミドDNAとAct-M、Rec-M、Act-M TA、Rec-M TAを組み合わせて一過的に導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pTyr-1068 EGFR抗体、抗pThr-669 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗ErbB3抗体を用いたIBを行った。

Act-M)、レシーバーとしてのみ機能する変異体 EGFR (V924R; Rec-M) を発現するプラスミド DNA を作製し、HEK293 細胞に一過的に導入した (図 3-6A) <sup>[77]</sup>。確認ではあるが、WT 導入では EGFR チロシン自己リン酸化が誘導されていたが、Act-M のみ、Rec-M のみ導入した細胞ではチロシンキナーゼの活性化は起こらないため、チロシン自己リン酸化が認められなかった。また、Act-M と Rec-M を 1:1 で導入すると WT 導入時と同様にチロシン自己リン酸化が認められた。これらの結果から、それぞれの変異体がアクチベーター、レシーバーとしてのみ機能することが確認できた。そこで、アクチベーター、レシーバーの

どちらの Thr-669 のリン酸化がチロシンの脱リン酸化を制御するか検討を行うために、それぞれの変異体の Thr-669 を Ala に置換した変異体 EGFR (Act-M TA、Rec-M TA) を発現するプラスミド DNA を作製し、HEK293 細胞に一過的に導入した (図 3-6B)。Act-M と Rec-M を導入した細胞と比べ、Act-M TA と Rec-M または Act-M と Rec-M TA を導入した細胞では片方の Thr-669 残基が Ala に置換されているため、恒常的な Thr-669 リン酸化が弱く、Act-M TA と Rec-M TA を導入した細胞では両方の Thr-669 残基が Ala に置換されているため、恒常的な Thr-669 リン酸化が全く起きていないことが確認できた。この時、一連のチロシン自己リン酸化は Act-M TA と Rec-M 導入時には認められたものの、Act-M と Rec-M TA または Act-M TA と Rec-M TA 導入時には認められなかった。この結果から、やはりレシーバー側の Thr-669 リン酸化がチロシンの脱リン酸化を制御することが明らかになった。

これまでの研究においてアクチベーターはリガンドを受け取ることで EGFR ダイマーの活性化を誘導するが、その機能はチロシンキナーゼ活性に依存しないと報告されている<sup>[79]</sup>。そこで、次にキナーゼ活性を持たない変異体 EGFR (KK/AA) を HEK293 細胞に導入し、レシーバー側の Thr-669 リン酸化の重要性についてさらに検討した (図 3-6C)。KK/AA と Act-M を導入すると一連のチロシン自己リン酸化が認められず、KK/AA と Rec-M を導入するとチロシン自己リン酸化が認められたことから、KK/AA はアクチベーターとして機能することが確認できた。この時、KK/AA と Act-M TA を共に導入したところ、チロシン自己リン酸化は認められなかった。一方で、KK/AA と Rec-M TA を共に導入したところ、KK/AA と Rec-M を共に導入した場合と比べ、チロシン自己リン酸化がより強く認められ、これは図 3-6B の結果と同様の結果となった。したがって、キナーゼ活性を持たない EGFR と活性を持つ EGFR のダイマーにおいても、レシーバー側の Thr-669 リン酸化がチロシンリン酸化のフィードバック阻害に重要であることがわかった。また、図 3-3B において MDA-MB-468 細胞において、EGFR-ErbB3 ダイマーも ERK を介した EGFR Thr-669 リン酸化がチロシンリン酸化のフィードバック阻害に関わることを示した。そこで、EGFR-ErbB3 ダイマーにおいてもレシーバーとして機能する EGFR の Thr-669 リン酸化が EGFR チロシンリン酸化を抑制させるかどうか検討した。ErbB3 はアクチベーターとしてのみ機能することが知られている。実際に、ErbB3 と Act-M または Act-M TA 導入ではチロシン自己リン酸化が認められず、Rec-M または Rec-M TA 導入でチロシン自己リン酸化されたため、ErbB3 がアクチベーターとしてのみ機能することが確認できた (図 3-6D)。ErbB3 と Rec-M 導入時と比べ、ErbB3 と Rec-M TA 導入時の方がチロシン自己リン酸化が強く認められることが確認できた (図 3-6D)。したがって、EGFR ホモダイマーの場合だけでなく、EGFR-ErbB3 ヘテロダイマー



の場合においてもレシーバーとして機能する EGFR Thr-669 リン酸化が EGFR チロシンリン酸化を負に制御することが明らかになった。

最後に、レシーバー側 Thr-669 リン酸化がチロシンの脱リン酸化を制御する際に ERK の活性化を介することを証明するために、Act-M と Rec-M の導入後に TPA 処理し、ERK の活性化を誘導させた時のチロシンリン酸化を検討した (図 3-7)。Act-M と Rec-M 導入細胞に TPA を作用させると ERK リン酸化、Thr-669 リン酸化、チロシンリン酸化抑制が認められた。Act-M TA と Rec-M を共に導入し、TPA を作用させても同様の結果が得られたが、Act-M と Rec-M TA または Act-M TA と Rec-M TA を共に導入し、TPA を作用させた際にはチロシ

ンリン酸化は抑制されなかった。この結果により、ERK はアクチベーターとレシーバーの両方の Thr-669 リン酸化を誘導するが、レシーバーの Thr-669 リン酸化のみが EGFR チロシンキナーゼ活性のフィードバック阻害に関わることがわかった。

以上をまとめると、ERK は EGFR Thr-669 リン酸化を誘導するが、この時レシーバー側の Thr-669 リン酸化が EGFR のダイマーの不安定化を誘導することで、恒常的なチロシンリン酸化を負に制御することが明らかとなった。

臨床において、KRAS の活性化変異を持たず、かつ EGFR 過剰発現が認められる大腸がんの治療には抗 EGFR 中和抗体が使用される<sup>[80-81]</sup>。抗 EGFR 中和抗体は KRAS 活性化変異を持つ大腸がんには効果がないことが知られており、これは EGFR に依存せずに、KRAS に依存して細胞増殖が誘導されるためだと考えられる<sup>[82]</sup>。KRAS は ERK 活性化を誘導することが知られていることから、KRAS の活性化変異を持つ細胞では ERK を介した EGFR Thr-669 リン酸化が恒常的に誘導されており、その結果、EGFR のキナーゼ活性のフィードバック阻害が誘導されている可能性が考えられる。

また、近年、V600E 変異を持つ活性変異型 BRAF を有する大腸がんやメラノーマの治療薬として BRAF 阻害剤ベムラフェニブが臨床で使用されているが、その獲得耐性が問題となっている<sup>[83]</sup>。その機構として EGFR のフィードバック活性化が報告されている。恒常的

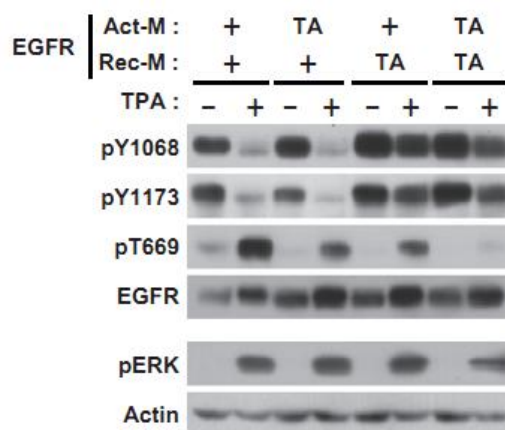


図3-7 非対称性ダイマーにおける ERK を介した Thr-669 リン酸化の役割

HEK293細胞にAct-M、Rec-M、Act-M TA、Rec-M TAを組み合わせて一過的に導入し、24時間後に100 ng/mL TPAを10分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗 pTyr-1068 EGFR抗体、抗 pTyr-1173 EGFR抗体、抗 pThr-669 EGFR抗体、抗 EGFR抗体、抗 pERK抗体、抗β-Actin抗体を用いたIBを行った。

な BRAF 活性によって ERK を介して細胞の生存、増殖が誘導されているが、同時に ERK によって EGFR のフィードバック阻害が誘導されていることが考えられる。しかし、BRAF 阻害剤の投与により、フィードバック阻害が解除されることで EGFR の活性化が誘導され、獲得耐性に繋がることが示唆される。

本研究では EGFR 過剰発現している MDA-MB-468 細胞を用いて ERK を介した EGFR Thr-669 リン酸化が EGFR チロシンリン酸化をフィードバック阻害することを明らかにした。今回、EGFR ホモダイマーまたは EGFR-ErbB3 ヘテロダイマーについて検討を行ったが、他の ErbB ファミリーにも Thr-669 残基に相当するリン酸化部位が存在しており、同様にフィードバックを受ける可能性がある。さらに、METをはじめ、様々な RTK において膜近傍ドメインに Ser/Thr リン酸化部位が存在しており、それらが RTK のチロシンキナーゼ活性を抑制していることが報告されている<sup>[84-85]</sup>。したがって、さまざまな RTK が非対称的なダイマー構造を取ること、さらにレシーバー側の膜近傍ドメインに存在する Ser/Thr リン酸化がキナーゼドメインの構造を不安定にさせることが示唆され、これらの現象は EGFR だけでなく、RTK に共通する可能性があるため、更なる検討が必要である。

本研究で明らかになった ERK を介したフィードバック阻害はがん治療で問題点となっている獲得耐性のメカニズム解明の一旦を担う重要な発見であり、獲得耐性の克服に向けた戦略の構築に繋がると考えられる。

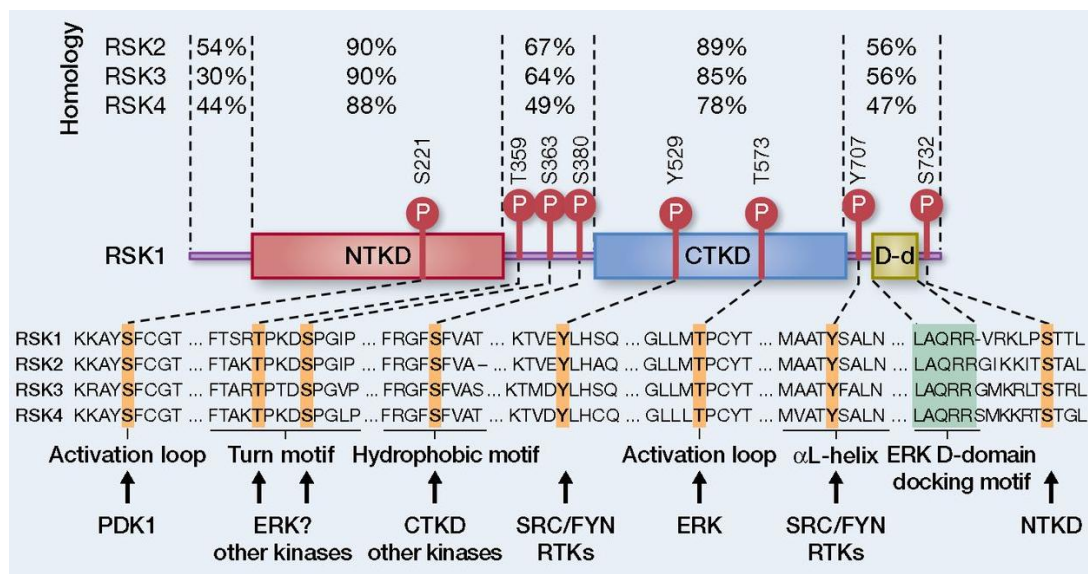
## 第3章 TNF- $\alpha$ を介した EphA2 のリン酸化制御機構

### 3.1 節 序論

EphA2 は正常細胞においてその発現は低く保たれているが、卵巣がん、乳がん、大腸がん、前立腺がん、メラノーマ、神経膠芽腫などで発現量が増加しており、その発現量は予後と負の相関を持つ<sup>[41, 42, 86-91]</sup>。また、非小細胞肺癌において、原発巣より転移巣での発現が非常に強いことも報告されている<sup>[92]</sup>。そのため、がんの分子標的治療において注目されており、例えば、抗 EphA2 モノクローナル抗体と化学療法剤を結合させた免疫複合体を用いて EphA2 の発現が高いがん細胞に特異的に化学療法剤を作用させる標的療法も考えられている<sup>[93]</sup>。

EphA2 はがん組織においてその過剰発現が認められるにも関わらず、興味深いことにリガンドの発現はむしろ低下しており、がん組織にはリガンドと結合していない EphA2 が多数存在していることから、チロシンキナーゼ活性に依存しない機能が注目されている。Miao らの報告によると、RTK によって活性化された Akt がチロシンキナーゼ非依存的に EphA2 Ser-897 リン酸化を誘導することがわかった (図 1-8) <sup>[43]</sup>。我々はこれまでに炎症シグナルが EGFR の Ser/Thr リン酸化を誘導していることを報告しているため、炎症シグナルが EphA2 の Ser/Thr リン酸化をも制御するのではないかと考えた。そこで、TNF- $\alpha$ によって EphA2 Ser-897 リン酸化が誘導されるかどうか検討した。

Ribosomal S6 kinase (RSK)には RSK1、RSK2、RSK3、RSK4 の4つアイソフォームが存在することが知られている (図 4-1) <sup>[95-100]</sup>。RSK1-4 はその相同性が非常に高く 73-80%にのぼる。構造として N 末端側と C 末端側に2つのキナーゼドメイン (NTKD、CTKD) を持ち、その間にリンカー部位が存在する。NTKD は calcium/calmodulin-dependent protein kinase ファミリーのキナーゼドメインと相同性を持ち、CTKD は Akt、RSK、PKA や PKC を含む AGC kinase ファミリーのキナーゼドメインと相同性が高い。N 末端側には D ドメイン配列と呼ばれる領域があり、この領域に ERK が結合することが知られている。RSK は ERK の下流に存在しており、RSK の D ドメイン配列に結合した ERK が活性化することで RSK Thr-573 をリン酸化し、その結果、CTKD が活性化する。まだ明らかになっていないが、ERK はリンカー領域に存在する Thr-359 や Ser-360 をリン酸化する可能性があり、その結果、phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1 (PDK1) がリクルートされ、PDK1 によって NTKD の活性化が誘導される。この一連の制御により、RSK は完全に活性化する。RSK は主に細胞質に局在することが知られているが、成長因子の刺激により一過的に細胞膜に運



Lara R et al. *Cancer Res*, 73:5301-5308, 2013

#### 図4-1 RSKの構造

RSKには1-4までのアイソフォームが存在し、それらのキナーゼドメインの相対性は非常に高い。RSKは2つのキナーゼドメインを持ち、その間にリンカー部位が存在する。また、N末端側にDドメイン配列が存在する。

ばれ、活性化の後、核移行することが知られている。その機能としては細胞増殖、生存、細胞周期の調節、タンパク質合成など、多岐にわたる。がん細胞において、RSK1 や RSK2 の過剰発現が認められ、細胞の遊走や浸潤、転移を制御し、がんの悪性化誘導に関わることが報告されている。

本研究では TNF- $\alpha$  を介して RSK が活性化されることで、EphA2 Ser-897 リン酸化が誘導されることがわかった。また、その機能として細胞運動を制御することを明らかにした。

### 3.2 節 実験方法

#### 3.2-1 抗体および試薬

抗 phospho-EphA2 (Ser-896, Tyr-588)、phospho-AKT (Ser-473)、phospho-RSK (Ser-380)、phospho-MAPKAPK2 (Thr-334)、phospho-ERK (Thr-202/Tyr-204)、phospho-EGFR (Thr-669, Ser-1046/7)、phospho-p65 (Ser-536) EphA2、Caspase-3、PARP 抗体は Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA)、抗 EphA2、EGFR、TAK1、TAB1、TAB2、RSK1、RSK2、Actin、 $\alpha$ -Tubulin 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA)、抗 EGFR モノクローナル抗体 (LA-1) は Millipore 社 (Billerica, MA, USA)、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合型ウサギ抗マウス IgG 抗体、は Dako (Glostrup, Denmark)、組み換えヒト EphrinA1 Fc

chimera、TNF- $\alpha$ 、EGF、IL-1 $\beta$ は R&D systems 社 (Minneapolis、MN、USA)、組み換え活性型ヒト GST-EphA2、GST-RSK1、GST-RSK2 は Carna Biosciences 社 (神戸、日本) からそれぞれ購入した。シスプラチン、Phos-tag リガンド、TPA は Wako Pure Chemical 社 (大阪、日本)、SB203580、U0126、LY294002 は Merck Chemicals 社 (Darmstadt、Germany)、MK-2206 は Active Biochemicals (Wan Chai、HongKong)、BI-D1870 は BioVision (Milpitas、CA、USA) からそれぞれ購入した。それぞれの化合物は Me<sub>2</sub>SO に溶解させた。

### 3.2-2 細胞培養

HeLa 細胞、HEK293 細胞、MDA-MB-231 細胞と Panc-1 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (high-glucose condition) (Life Technologies Corporation、CA、USA) +10% fetal calf serum、100 units/ml penicillin (明治製菓、東京、日本)、100  $\mu$ g/ml streptomycin (明治製菓、東京、日本) を用いて、A549 細胞は RPMI 1640 medium (Life Technologies Corporation) +10% fetal calf serum、100 units/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin を用いて、T98G 細胞は Eagle's MEM (ニッスイ、東京、日本)+10% fetal calf serum、2 mM L-glutamine (Life Technologies Corporation) を用いて 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> において培養した。

### 3.2-3 stable cell line の樹立

ヒト TAK1 またはホテルルシフェラーゼに対する shRNA を組み込んだ pSUPER.gfp+neo vector を安定的に導入した HeLa 細胞の樹立は過去の論文に記載してある<sup>[32]</sup>。また、EGFR-GFP 発現プラスミド DNA (過去の論文に記載済み<sup>[32]</sup>) を安定的に導入した HeLa 細胞は G418 で選別し、限外希釈法にてクローンを単離した。これらの細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (high-glucose condition) +10% fetal calf serum、100 units/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin、G418 (Wako Pure Chemical 社) を用いて 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> において培養した。

### 3.2-4 プラスミド DNA 導入

TAK1 発現プラスミド DNA、TAB1、TAB2 発現プラスミド DNA は過去の論文に記載してある<sup>[62-63]</sup>。EphA2 発現プラスミド DNA と EphA2 キナーゼデッド変異体発現プラスミド DNA は浜松医科大学医学部梶村春彦博士より供与を受けた<sup>[101-102]</sup>。RSK1 発現プラスミド DNA は慶應義塾大学大学院薬学研究科杉本芳一博士より供与を受けた<sup>[103]</sup>。HeLa 細胞、HEK293 細胞に対してそれぞれ Lipofectamine Reagent、Lipofectamine 2000 (Life Technologies

Corporation) を用いてトランスフェクションを行い、24 時間後に細胞の刺激を行った。

### 3.2-5 RNA 干渉

Small interfering RNAs (siRNAs) は Life Technologies Corporation より購入した。ターゲット配列は以下の通りである： UGGAGUCCAUCAAGAUGCAGCAGUA (EphA2)、CCAUGCU GGCAGGAUAUACUCCAUAU (RSK1)、GGGAGGAGAUUUGUUUACACGCUUA (RSK2)、TCACACAGGGTTCCTGACAGAATAT (ERK2)、UAAUGUACUGCGCGUGGAGAGGAA (Negative Control)。HeLa 細胞、MDA-MB-231 細胞に対してそれぞれ Lipofectamine Reagent、Lipofectamine LTX (Life Technologies Corporation) を用いて 20-100 nM siRNA を導入し、72 時間後に細胞の刺激を行った。

### 3.2-6 細胞抽出液の調整

1.2-6 に準ずる。

### 3.2-7 ウェスタンブロット法

1.2-7 に準ずる。

### 3.2-8 $\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag SDS PAGE

1.2-9 に準ずる。

### 3.2-9 In vitro kinase assay

組み換え活性型ヒト GST-EphA2 と組み換え活性型ヒト GST-RSK1 または組み換え活性型ヒト GST-RSK2 を 30 °C、30 分間、30 $\mu$ l の 20 mM HEPES (pH 7.6)、20 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.2 mM ATP、2 mM DTT、20 mM  $\beta$ -glycerophosphate、0.1 mM sodium orthovanadate を含むバッファーの中で反応させた。反応停止時に 30 $\mu$ l の 2 $\times$ SDS-PAGE sample buffer (25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5% glycerol、1% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)、0.05% Bromophenol Blue) と混合し、95°C で 5 分間熱処理をした。

### 3.2-10 Mutagenesis

EphA2 S897A 点変異体は PrimeSTAR (タカラバイオ社、滋賀、日本) を用いて、EphA2 発現プラスミド DNA をテンプレートに作製した。RSK1 恒常的活性化変異体 (Y702A)、キ

ナーゼデッド変異体 (K94R、K447R) は RSK1 発現プラスミド DNA をテンプレートに作製した。配列は以下の通りである。S897A forward: 5'-TATCCGGCTCCCCGCCACGAGCGGCTC G-3'、reverse: 5'-CGAGCCGCTCGTGGCGGGGAGCCGGATA-3'、Y702A forward: 5'-CCATGG CTGCCACGGCCTCCGCACTCAACA-3'、reverse: 5'-TGTTGAGTGCGGAGGCCGTGGCAGCC ATGG-3'、K94R forward: 5'-GGCACCTGTATGCTATGAGGGTGCTGAAGA-3'、reverse: 5'-TCT TCAGCACCCCTCATAGCATAACAGGTGCC、K447R forward: 5'-GGAGTATGCTGTCAGGGTCA TTGATAAGAG-3'、reverse: 5'-CTCTTATCAATGACCCTGACAGCATACTCC-3'。

### 3.2-11 免疫蛍光染色

カバーガラス (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) に播種した細胞を 20 分間 2% paraformaldehyde (Muto pure chemicals、東京、日本) を用いて固定し、その後 5 分間 0.5% TritonX-100 (Wako Pure Chemical 社) を用いて透過させた。洗浄後、それぞれ 1 次抗体存在下で 2 時間、2 次抗体存在下で 1 時間、Rhodamine Phalloidin (Life Technologies Corporation) 存在下で 30 分反応させた。洗浄後、DAPI を含む SlowFade Gold Antifade Reagent (Life Technologies Corporation) で封入し、LSM700 共焦点レーザスキャン顕微鏡 (Zeiss、Oberkochen、Germany) にて観察を行った。

### 3.2-12 Wound healing assay

ディッシュ上に培養した細胞に対し、ピペットチップで線状に剥離し、剥離面への細胞遊走を経時的に観察した。

### 3.2-12 Invasion assay

Nuclepore track-etched membrane (GE Healthcare UK Ltd、Buckinghamshire、England) をマニキュアで Transwell culture chamber (Corning Coster、Corning、NY、USA) に固定し、メンブレン下層に 1  $\mu$ g のフィブロネクチン、上層に 5  $\mu$ g のマトリゲルをコートした。チャンバーの上層には 0.1% BSA を含む培地に置換した細胞を、下層には 0.1% BSA を含む培地を加え、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> において培養した。培養後、フィルターをメタノールで固定し、ヘマトキシリン-エオシン染色し、メンブレン下層に移動した細胞の個数を計測した。

### 3.2-12 WST-1 assay

細胞を 96 well plate に播種し、接着した後、阻害剤添加を行い 48 時間培養した。WST-1

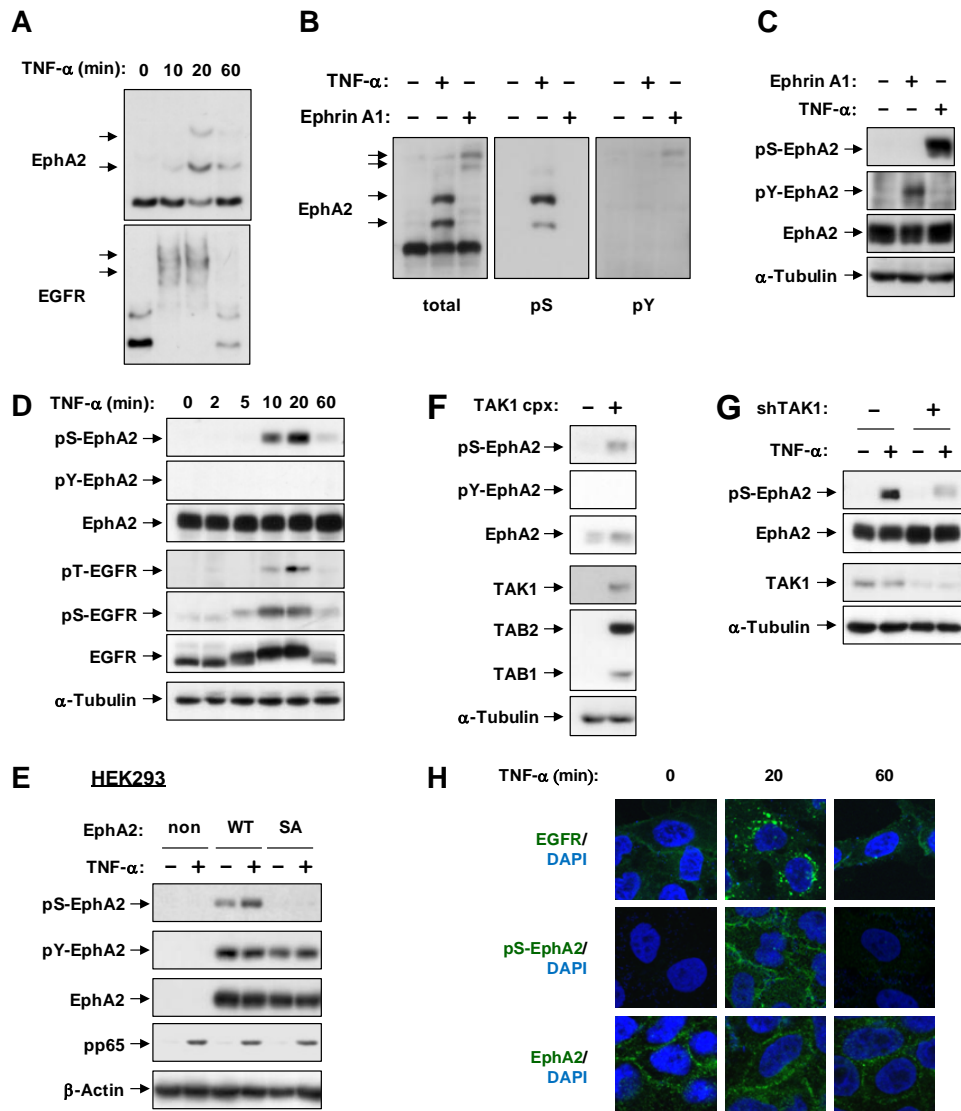
試薬（同仁化学研究所、熊本、日本）を加え、呈色反応を行い、プレートリーダーで吸光度を測定した。

### 3.3 節 実験結果・考察

#### 3.3.1 TNF- $\alpha$ による EphA2 Ser-897 リン酸化

炎症シグナルによって EphA2 のリン酸化が誘導されるかどうか検討するために、TNF- $\alpha$  を HeLa 細胞に作用させ、Phos-tag gel を用いて EphA2 バンドを検出した。TNF- $\alpha$ を20分作用させたところ、EphA2 のシフトバンド、つまりリン酸化バンドが確認できた（図4-2A）。このことから、EphA2 は炎症シグナルによってリン酸化が誘導されることがわかった。また、これまで報告してきた TNF- $\alpha$ を介した EGFR Ser/Thr リン酸化と比較すると、EGFR のシフトバンド、つまりリン酸化バンドは TNF- $\alpha$ を 10 分、20 分作用させた時に認められ、60 分作用させたときには完全にシフトバンドが消失したことから、EphA2 のリン酸化と EGFR Ser/Thr リン酸化のタイムコースは異なり、その制御機構が異なることが示唆された。次に、EphA2 のリン酸化がリガンドで誘導されるチロシンリン酸化であるかどうかについて検討した。Phos-tag を用いた結果、TNF- $\alpha$ によるシフトバンドとリガンド Ephrin A1 によるリン酸化バンドは異なる泳動度を持っていることがわかった（図 4-2 B）。したがって、TNF- $\alpha$  によるシフトバンドはチロシンリン酸化ではないことが示唆された。そこで、リガンドによって誘導される Tyr-588 とチロシンキナーゼ活性に依存しない Ser-897 に対する抗リン酸化抗体を用いて EphA2 のリン酸化バンドを検出した。リガンドの作用によって Tyr-588 のバンドが認められたが、TNF- $\alpha$ の作用では認められなかった。一方で、リガンドの作用によって Ser-897 のバンドは認められなかったが、TNF- $\alpha$ の作用でバンドが認められた（図 4-2B）。この結果はウエスタンブロットでも同様に認められたことから（図4-2C）、TNF- $\alpha$ は EphA2 Ser-897 リン酸化を誘導することがわかった。次に、TNF- $\alpha$ を異なる時間、HeLa 細胞に作用させ、EGFR のリン酸化と比較検討した（図4-2D）。EGFR Ser-1046/7 のリン酸化は 5 分から誘導され、それに伴い EGFR のバンドシフトが認められた。また、EGFR Thr-669 のリン酸化は 10 分から誘導された。さらにこれらのリン酸化は 60 分で減弱することが確認できた。一方で EphA2 の Ser-897 リン酸化は 10 分で誘導され、60 分で減弱した。いずれの時間においても Tyr-588 リン酸化は認められなかったため、EphA2 Ser-897 リン酸化はチロシンキナーゼに依存しないことが考えられた。次に、EphA2 の発現が低い HEK293 細胞に対し、





**図4-2 TNF-αを介したEphA2 Ser-897リン酸化**

(A) HeLa細胞に20 ng/mL TNF-αを10、20分、60分作用させた後、細胞抽出液を調製し、Phos-tag gelを用いて電気泳動を行い、抗EphA2抗体、抗EGFR抗体を用いたIBを行った。(B) HeLa細胞に20 ng/mL TNF-αまたは100 ng/mL Ephrin A1を10、20、60分作用させた後、細胞抽出液を調製し、Phos-tag gelを用いて電気泳動を行い、抗EphA2抗体、抗pSer-897 EphA2抗体、抗pTyr-588 EphA2抗体を用いたIBを行った。(C) HeLa細胞に20 ng/mL TNF-αまたは100 ng/mL Ephrin A1を20分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗pTyr-588 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗α-Tubulin抗体を用いてIBを行った。(D) HeLa細胞に20 ng/mL TNF-αを0、2、5、10、20、60分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗pTyr-588 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗EGFR抗体、抗α-Tubulin抗体を用いてIBを行った。(E) HEK293細胞にEphA2発現プラスミドDNA(WT)、Ser-897をAlaに置換した変異体(SA)を導入し、24時間後に20 ng/mL TNF-αを20分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗pTyr-588 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pp65抗体、抗α-Tubulin抗体を用いてIBを行った。(F) HeLa細胞に対し、ヒトTAK1発現プラスミドDNAとヒトTAB1発現プラスミドDNA、ヒトTAB2発現プラスミドDNAを導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗pTyr-588 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗TAK1抗体、抗TAB1抗体、抗TAB2抗体、抗α-Tubulin抗体を用いてIBを行った。(G) TAK1が安定的にノックダウンされているHeLa細胞に20 ng/mL TNF-αを20分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗TAK1抗体、抗α-Tubulin抗体を用いてIBを行った。(H) GFP-EGFR安定発現HeLa細胞に20 ng/mL TNF-αを20分間細胞に作用させた後、固定処理、透過処理を行い、共焦点レーザー顕微鏡にてGFP-EGFRの観察を行った。また、HeLa細胞に20 ng/mL TNF-αを20分間細胞に作用させた後、固定処理、透過処理を行い、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体を用いて免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

EphA2 を過剰発現させた (図4-2E)。野生型 EphA2 (WT) 導入時、EphA2 Tyr-588 リン酸化は誘導されており、EphA2 Ser-897 リン酸化もわずかに確認できた。そこに TNF- $\alpha$  を作用させたところ、Tyr-588 リン酸化には変化が認められなかったものの、Ser-897 リン酸化が誘導された。一方、Ser-897 を Ala に置換した変異体 EphA2 (SA) を導入した際には Tyr-588 リン酸化が誘導されるが、Ser-897 リン酸化は認められなかった。第 2 章では EGFR Thr-669 リン酸化がチロシンリン酸化の抑制に関わることを報告したが、チロシンリン酸化が WT と SA で差がないため、EphA2 Ser-897 リン酸化は EphA2 Tyr-588 のリン酸化抑制作用を持たないことがわかった。

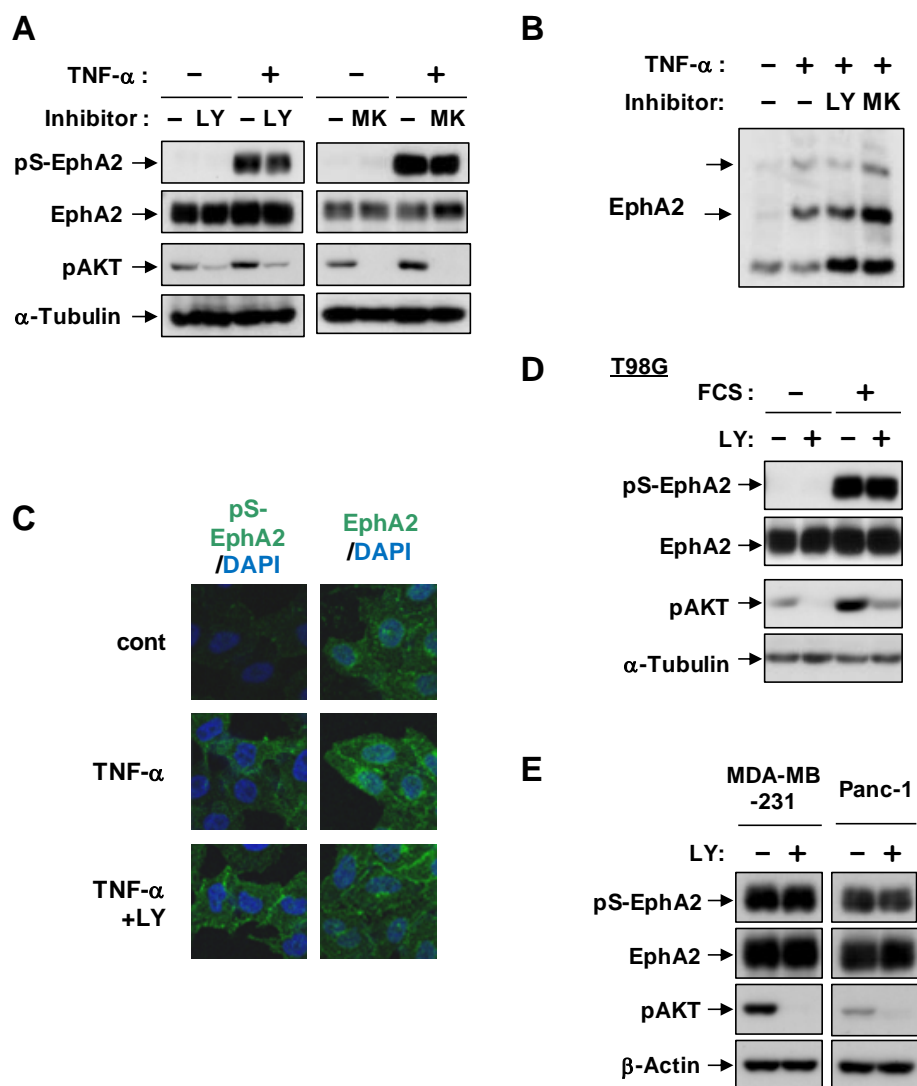
TNF- $\alpha$  を介した EphA2 Ser-897 リン酸化が炎症シグナルにおいて中心的な役割を果たす TAK1 に依存して誘導されるかどうか調べるために、TAK1 とその活性調節に関わる TAB1/2 を HeLa 細胞に過剰発現させた。TAK1 複合体の導入により、EphA2 Tyr-588 ではなく、Ser-897 リン酸化が確認された (図4-2F)。また、TAK1 が恒常的にノックダウンされている shTAK1 安定導入 HeLa 細胞に TNF- $\alpha$  を作用させると、コントロール細胞株と比べて Ser-897 リン酸化誘導が弱いことがわかった (図4-2G)。以上のことから、EphA2 Ser-897 リン酸化は TAK1 に依存することがわかった。

次に、EphA2 とその Ser-897 リン酸化の局在について観察し、EGFR の局在と比較した (図4-2H)。EGFR の場合、p38 を介した Ser-1046/7 リン酸化に伴い、EGFR のエンドサイトーシスが認められ、実際に TNF- $\alpha$  を 20 分 HeLa 細胞に作用させたところ、細胞膜上に局在していた EGFR は細胞内に局在し、ドット状に認められたことから、EGFR のエンドサイトーシスが確認できた。また、60 分で EGFR が細胞膜上にリサイクルされたことも観察された。一方、EphA2 の場合、いずれの時間においても細胞膜上に局在し、20 分で Ser-897 リン酸化が認められたが、このリン酸化 EphA2 も細胞膜上に局在することがわかった。以上のことから、EGFR とは異なり、TNF- $\alpha$  を介した EphA2 Ser-897 リン酸化は EphA2 のエンドサイトーシスに関わらないことがわかった。

以上の結果をまとめると、TNF- $\alpha$  は EphA2 のチロシンではなく、Ser-897 リン酸化を誘導することがわかった。

### 3.3.2 Akt に依存しない EphA2 Ser-897 リン酸化

以前の報告により、EphA2 Ser-897 リン酸化は様々な RTK から誘導された Akt によって直接制御されることがわかっている。そこで、炎症シグナルにおいても同様に Akt を介して EphA2 Ser-897 リン酸化が誘導されるかどうか検討を行った。HeLa 細胞に対し、PI3K 阻害



**図4-3 Aktを介さないEphA2 Ser-897リン酸化**

(A) HeLa細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LY294002 (LY)または10  $\mu$ M Akt阻害剤MK-2206 (MK)を30分間前処理させた後、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pAkt抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(B) HeLa細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LYまたは10  $\mu$ M Akt阻害剤MKを30分間前処理させた後、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させ、細胞抽出液を調製し、Phos-tag gelを用いて電気泳動を行い、抗EphA2抗体を用いたIBを行った。(C) HeLa細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LYを30分間前処理させた後、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させ、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。(D) T98G細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LYを30分間前処理させた後、10% FCSを20分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pAkt抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(E) MDA-MB-231細胞、またはPanc-1細胞に10  $\mu$ M LYを30分間処理させ、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pAkt抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。

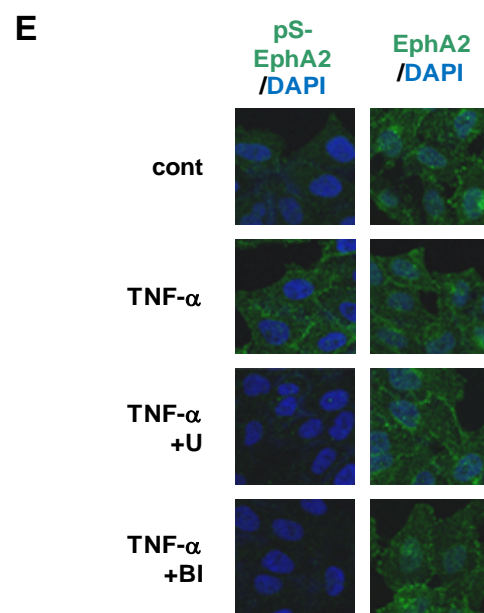
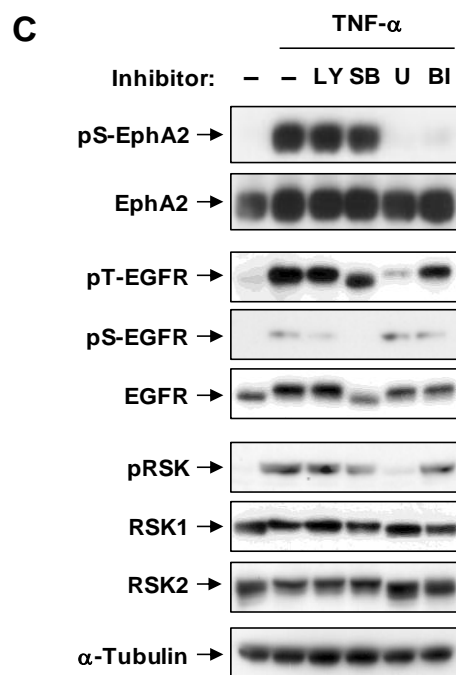
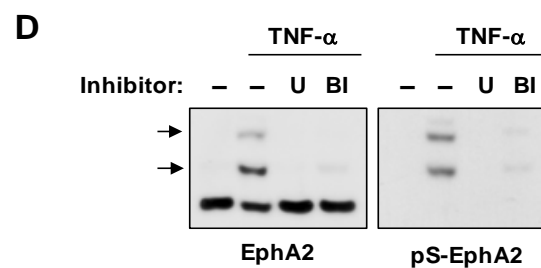
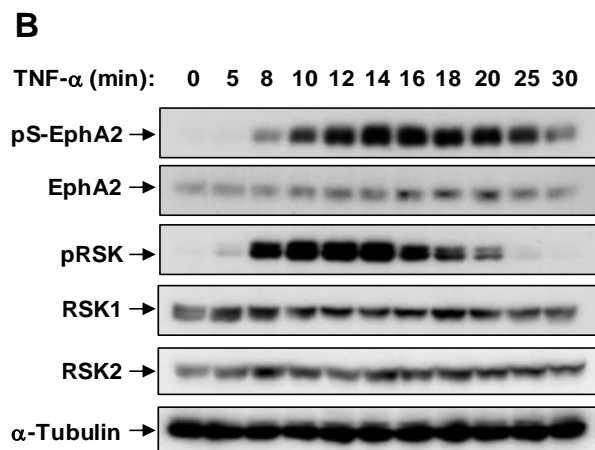
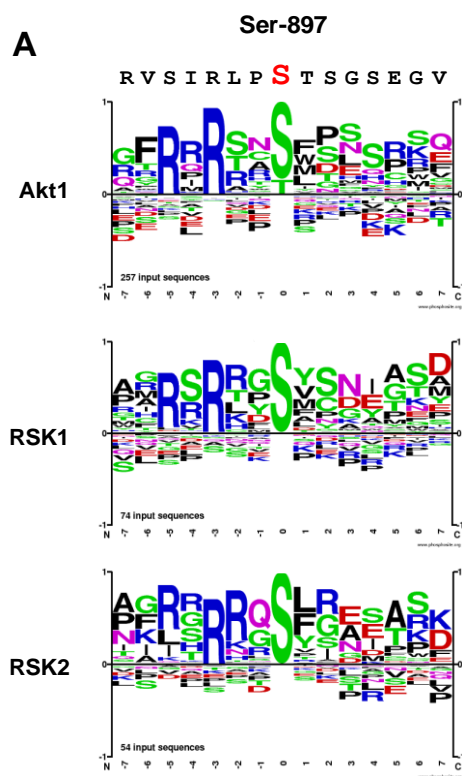
剤 LY294002 (LY) を前処理した後、TNF- $\alpha$ を 20 分間作用させたところ、TNF- $\alpha$ によって誘導された Ser-897 リン酸化は阻害されなかった (図4-3A)。また、Akt 阻害剤 MK-2206 (MK) の前処理時にも同様の結果が得られた (図4-3A)。さらに Phos-tag gel を用いて検討したところ、PI3K 阻害剤 LY と Akt 阻害剤 MK の前処理の場合にも EphA2 シフトバンドが認められた (図4-3B)。次に EphA2 および Ser-897 リン酸化 EphA2 の細胞内局在を観察したところ、PI3K 阻害剤 LY 前処理時の局在も阻害剤を前処理しない際と同様であった (図4-3C)。以上の結果により、TNF- $\alpha$ によって誘導される EphA2 Ser-897 リン酸化は Akt によって制御されないことがわかった。

Miao らはグリオーマ細胞株に対して、血清刺激により Akt の活性化を誘導することで Akt が EphA2 Ser-897 をリン酸化することを証明している<sup>[43]</sup>。そこで、我々も同様にグリオーマ細胞株 T98G に対して血清刺激を行った。血清を添加すると Akt リン酸化、EphA2 Ser-897 リン酸化が共に確認できた。PI3K 阻害剤 LY を前処理したところ、血清添加によって誘導された EphA2 Ser-897 リン酸化は阻害剤を前処理しない場合と同様に強く誘導された (図4-3D)。したがって、グリオーマ細胞株でも同様に EphA2 Ser-897 リン酸化は Akt によって制御されないことがわかった。また、恒常的に EphA2 Ser-897 リン酸化が誘導されているヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 とヒト膵がん細胞株 Panc-1 に対して PI3K 阻害剤 LY を前処理しても EphA2 Ser-897 リン酸化の阻害は認められなかった (図4-3E)。以上の結果から、EphA2 Ser-897 リン酸化は Akt を介さないことがわかり、さらに TNF- $\alpha$ によって誘導された EphA2 Ser-897 リン酸化だけでなく、恒常的に EphA2 Ser-897 リン酸化が誘導されている場合や血清を添加した場合でも同様であることがわかった。

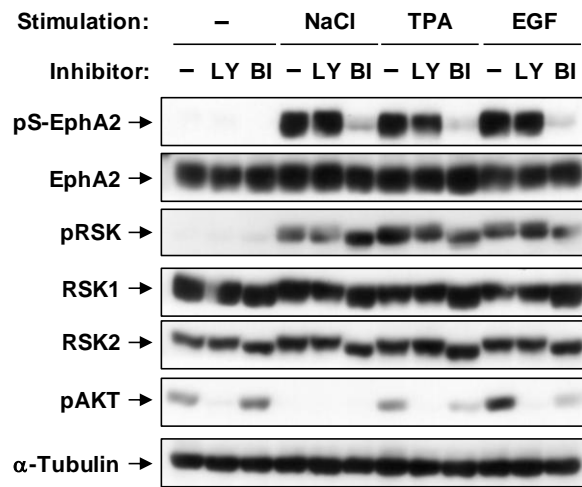
### 3.3.3 ERK-RSK 阻害による EphA2 Ser-897 リン酸化阻害

Miao らは抗 Akt 基質リン酸化抗体を用いて実験を行っていた<sup>[43]</sup>。この抗体は RXX[pS/T] を認識する抗体である。EphA2 の 894-897 領域のアミノ酸は RLPS であるため、抗 Akt 基質リン酸化抗体で認識される。そのため、彼らは Akt が EphA Ser-897 リン酸化を誘導することを報告した。しかしながら、Akt、RSK、PKA や PKC を含む AGC ファミリーキナーゼの基質は一様に RXX[pS/T]のコンセンサス配列を有している<sup>[95]</sup>。そこで、PhosphoSitePlus データベース上で AGC ファミリーキナーゼの基質シーケンスロゴを検索したところ、EphA2 Ser-897 周囲の配列と RSK1/2 の基質シーケンスロゴが似ていることがわかった (図4-4A) <sup>[15]</sup>。

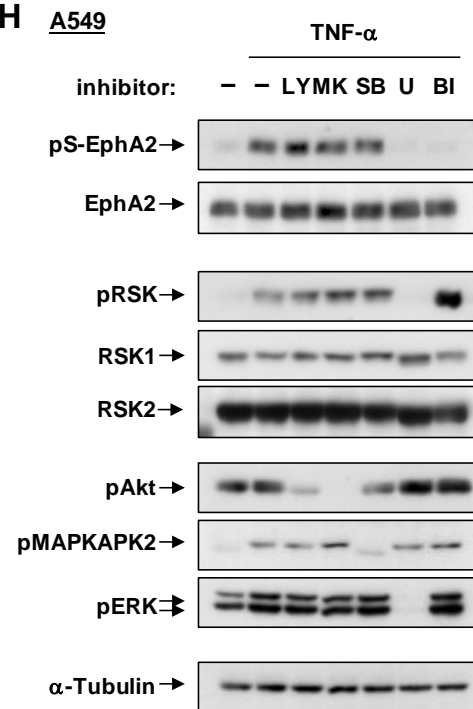
そこで、TNF- $\alpha$ によって RSK のリン酸化が誘導されるかどうか検討を行った。TNF- $\alpha$ 刺



**F**



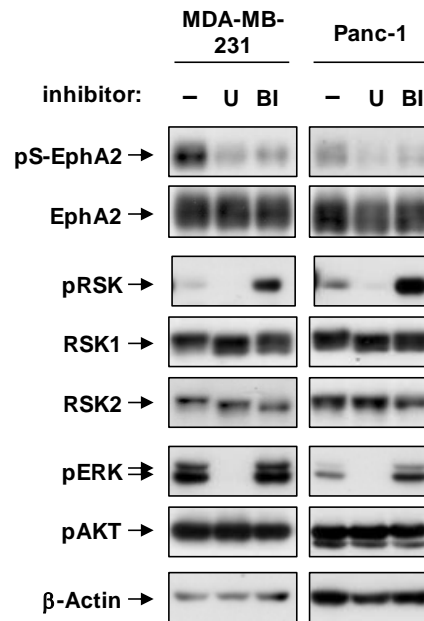
**H**



**G**



**I**



激によって EphA2 Ser-897 リン酸化が 8 分から認められるが、RSK リン酸化は 5 分から誘導されており、8 分で強く誘導されることから、RSK が EphA2 Ser-897 リン酸化を誘導することが示唆された (図4-4B)。そこで、キナーゼ阻害剤を用いて EphA2 Ser-897 リン酸化の責任キナーゼの同定を行った (図4-4C)。EGFR Ser-1046/7 リン酸化は p38 が調節しているため p38 阻害剤 SB を作用させることで EGFR Ser-1046/7 リン酸化阻害が確認できた。この時、EphA2 Ser-897 リン酸化阻害は認められなかった。また、EGFR Thr-669 リン酸化は ERK が調節しているため、ERK 経路の阻害剤 U を作用させることで EGFR Thr-669 リン酸化阻害が確認できた。この時、EphA2 Ser-897 リン酸化阻害も認められた。RSK は ERK の下流に存在するキナーゼであるため、この結果から RSK が EphA2 Ser-897 リン酸化を調節することが強く示唆された。RSK 阻害剤 BI-D1870 (BI) を作用させたところ、過去の報告通り、EGFR Ser-1046/7 リン酸化と EGFR Thr-669 リン酸化は阻害されなかったが、EphA2 Ser-897 リン酸化が完全に阻害されることがわかった。また、Phos-tag gel を用いた検討においても ERK 経路の阻害剤 U、RSK 阻害剤 BI によって、シフトバンドが消失し (図4-4D)、さらに免疫染色においても ERK 経路の阻害剤 U、RSK 阻害剤 BI によって、EphA2 Ser-897 リン酸化阻害が認められた (図4-4E)。これらの結果により、EGFR の Ser/Thr リン酸化の場合と

#### 図4-4 RSKを介したEphA2 Ser-897リン酸化 (47、48ページ)

(A) Akt、RSK1、RSK2の基質シークエンスロゴを示した。(B) HeLa細胞に20 ng/mL TNF- $\alpha$ を0、5、8、10、12、14、16、18、20、25、30分作用させた後、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(C) HeLa細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LY、または10  $\mu$ M p38阻害剤SB、10  $\mu$ M ERK経路の阻害剤U、10  $\mu$ M RSK阻害剤BI-D1870 (BI)を30分間前処理させた後、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pThr-669 EGFR抗体、抗pSer-1046/7 EGFR抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(D) HeLa細胞に10  $\mu$ M ERK経路の阻害剤Uまたは10  $\mu$ M RSK阻害剤BIを30分間前処理させた後、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させ、細胞抽出液を調製し、Phos-tag gelを用いて電気泳動を行い、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体を用いたIBを行った。(E) HeLa細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LYを30分間前処理させた後、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させ、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。(F) HeLa細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LYまたは10  $\mu$ M RSK阻害剤BIを30分間前処理させた後、0.3 M NaCl、または、100 ng/mL TPA、10 ng/mL EGFをそれぞれ20分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗pAkt抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(G) T98G細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LY、または5  $\mu$ M ERK経路の阻害剤U、10  $\mu$ M RSK阻害剤BIを30分間前処理させた後、20 ng/mL TNF- $\alpha$ または10% FCSを20分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗pAkt抗体、抗pERK抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(H) A549細胞に10  $\mu$ M PI3K阻害剤LY、または10  $\mu$ M Akt阻害剤MK、10  $\mu$ M p38阻害剤SB、5  $\mu$ M ERK経路の阻害剤U、10  $\mu$ M RSK阻害剤BIを30分間前処理させた後、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させ、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗pAkt抗体、抗pMAPKAPK2抗体、抗pERK抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いたIBを行った。(I) MDA-MB-231細胞とPanc-1細胞に5  $\mu$ M ERK経路の阻害剤U、10  $\mu$ M RSK阻害剤BIを30分間処理させ、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗pAkt抗体、抗pERK抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いたIBを行った。

は異なり、EphA2 Ser-897 リン酸化は RSK を介することがわかった。

次に、HeLa 細胞に対して、ERK、RSK の活性化を誘導することが知られている高浸透圧ストレス、TPA 刺激、EGF 刺激を行い、これらの場合においても同様に RSK によって EphA2 Ser-897 リン酸化が制御されるかどうか検討した。いずれの刺激においても EphA2 Ser-897 リン酸化は認められ、このリン酸化は PI3K 阻害剤 LY では阻害されず、RSK 阻害剤 BI によって阻害された(図4-4F)。また、グリオーマ細胞株 T98G において、血清刺激または TNF- $\alpha$  によって誘導された EphA2 Ser-897 リン酸化も ERK 経路の阻害剤 U、RSK 阻害剤 BI によって阻害された(図4-4G)。さらに、ヒト肺がん細胞株 A549 においても同様に TNF- $\alpha$  による EphA2 Ser-897 リン酸化誘導が ERK 経路の阻害剤 U、RSK 阻害剤 BI によって阻害された(図4-4H)。最後に、恒常的に EphA2 Ser-897 リン酸化が誘導されているヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 とヒト膵がん細胞株 Panc-1 に対して ERK 経路の阻害剤 U、RSK 阻害剤 BI を作用させたところ、同様に EphA2 Ser-897 リン酸化抑制が認められた(図4-4I)。以上の結果により、EphA2 Ser-897 リン酸化は RSK によって制御され、これは特定の刺激や細胞における反応ではなく、多くのシグナルに共通した反応であることがわかった。

### 3.3.4 RSK1、RSK2 を介した EphA2 Ser-897 リン酸化

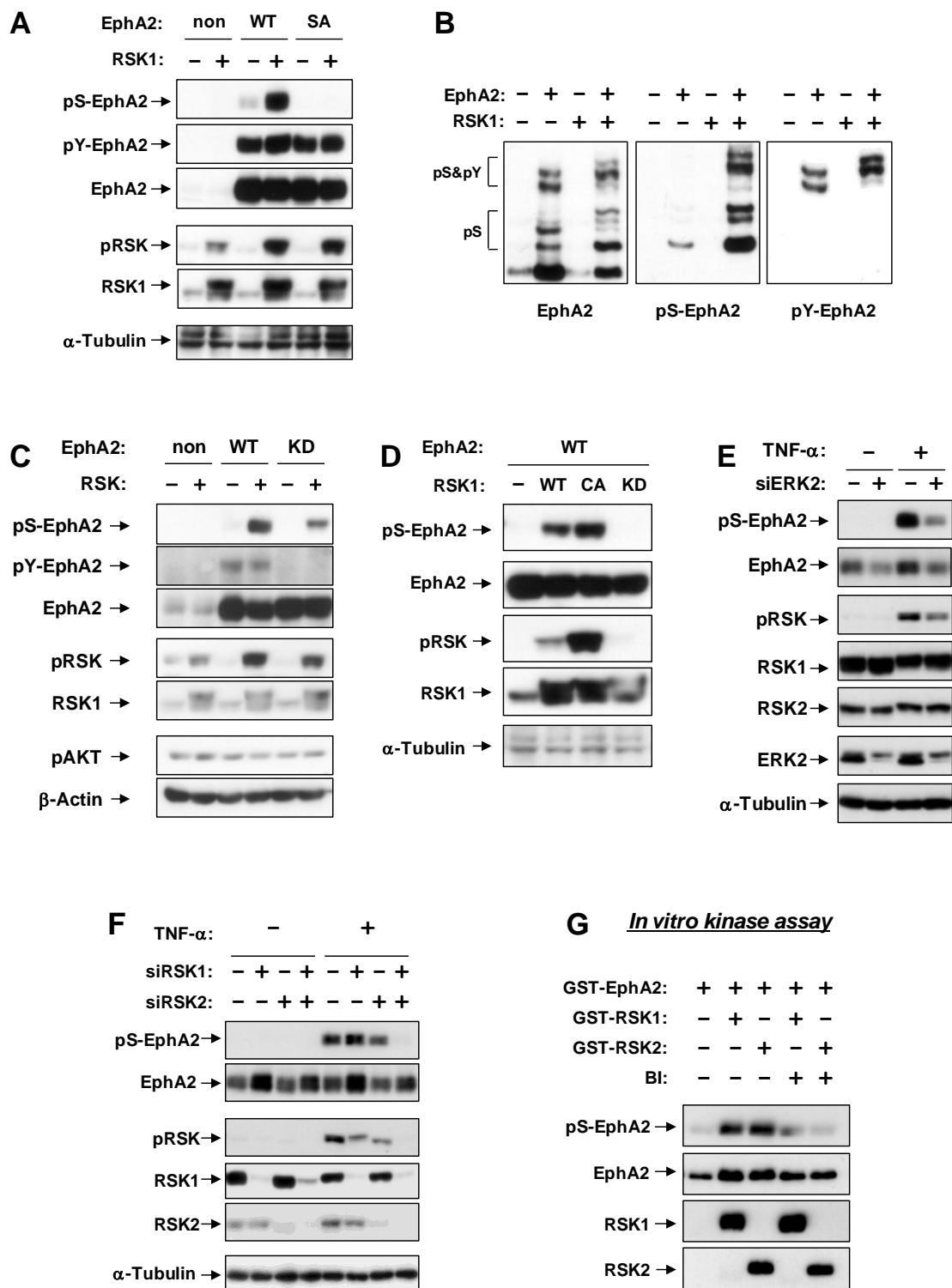
RSK を介する EphA2 Ser-897 リン酸化を分子生物学的に検討するために HEK293 細胞に対し、EphA2、RSK1 を過剰発現させた(図4-5A)。EphA2 を発現させたところ、EphA2 Ser-897

#### 図4-5 RSK1、RSK2を介したEphA2 Ser-897リン酸化 (51ページ)

(A) HEK293細胞にEphA2発現プラスミドDNA(WT)、またはSer-897をAlaに置換した変異体(SA)と RSK1発現プラスミドDNAを導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗pTyr-588 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いてIBを行った。(B) HEK293細胞にEphA2発現プラスミドDNAとRSK1発現プラスミドDNAを導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、Phos-tag gelを用いて電気泳動を行い、抗pSer-897 EphA2抗体、抗pTyr-588 EphA2抗体、抗EphA2抗体を用いてIBを行った。(C) HEK293細胞にEphA2発現プラスミドDNAまたはキナーゼデッド変異体(KD)とRSK1発現プラスミドDNAを導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗pTyr-588 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いてIBを行った。(D) HEK293細胞にEphA2発現プラスミドDNA(WT)とRSK1発現プラスミドDNA(RSK1-WT)、または恒常的活性化変異体(RSK1-CA)、キナーゼデッド変異体(RSK1-KD)を導入し、24時間後に細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いてIBを行った。(E) HeLa細胞にERK2に対するsiRNAを用いてERK2をノックダウンさせ、72時間後に、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させた、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗ERK抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いてIBを行った。(F) HeLa細胞にRSK1とRSK2に対するsiRNAを用いてRSK1とRSK2をノックダウンさせ、72時間後に、20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させた、細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗 $\alpha$ -Tubulin抗体を用いてIBを行った。(G) 大腸菌から精製したヒト活性型組み換えEphA2と組み換えRSK1またはRSK2タンパク質を30℃にて30分間反応させた。RSK阻害剤BIは予めキナーゼと30分間反応させた後にEphA2と反応させた。反応後、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体を用いてIBを行った。



リン酸化はわずかに認められるのに対し、RSK1 を共発現させたところ、非常に強い EphA2 Ser-897 リン酸化が認められた。この時、EphA2 Tyr-588 リン酸化は EphA2 の単独導入時においても RSK1 の共発現時においても認められており、両サンプル間において差がないことが確認できた。また、Phos-tag gel を用いて EphA2 と RSK1 過剰発現時のシフトバンドの状



態を確認した（図4-5B）。EphA2 単独導入時と比べ、EphA2 と RSK1 を共に導入した場合にはシフトバンドが全体的にさらに上側に位置することが確認できた。抗 EphA2 Ser-897 リン酸化抗体と抗 EphA2 Tyr-588 リン酸化抗体を用いて、EphA2 と RSK1 を共発現させたときの Ser-897 リン酸化 EphA2 のバンドと Tyr-588 リン酸化 EphA2 のバンドの区別を試みた。その結果、Tyr-588 リン酸化 EphA2 は上部に認められる数本のバンドであり、興味深いことに、Ser-897 リン酸化 EphA2 は全てのバンドであることがわかった。したがって、上部に認められる EphA2 バンドは Tyr-588 と Ser-897 の両方のリン酸化を受けているバンドであることがわかり、Tyr-588 リン酸化と Ser-897 リン酸化は同じ分子中で共存することが明らかとなった。そこで EphA2 のチロシンキナーゼ活性が EphA2 Ser-897 リン酸化に及ぼす影響について調べるために、キナーゼ活性を持たない EphA2 変異体（KD）を HEK293 細胞に導入した（図4-5C）。KD はキナーゼ活性を持たないことから EphA2 Tyr-588 リン酸化は誘導されないことが確認できた。RSK1 を共発現させたところ、EphA2 Ser-897 リン酸化は、野生型 EphA2（WT）を導入した場合と強度は異なるものの認められたことから、EphA2 のキナーゼ活性は EphA2 Ser-897 リン酸化を調節しないことがわかった。Miao らは EphA2 のチロシンリン酸化が誘導されている場合、Akt の活性が阻害され、Ser-897 リン酸化が誘導されない、つまり、Ser-897 リン酸化とチロシンリン酸化を同時に受けないと報告している<sup>[43]</sup>。第2章においても報告しているが、EGFR が過剰発現している MDA-MB-231 細胞では、恒常的な EGFR チロシンリン酸化が認められており、EGFR の発現が正常な細胞とは反応が異なっていることがわかった。今回の場合も同様に EphA2 を過剰発現させているがために、図 4-5B のように Tyr-588 リン酸化と Ser-897 リン酸化が同じ分子に存在する可能性が考えられる。また、リガンド刺激によって EphA2 の細胞局在の変化や EphA2 自体の構造変化が考えられ、そのために Ser-897 リン酸化を受けることができないことも可能性の一つである。今後、リガンドによって EphA2 のチロシンキナーゼ活性を誘導した場合の Ser-897 リン酸化状態について検討する必要がある。しかしながら、図4-5C により EphA2 チロシンキナーゼ活性が Ser-897 リン酸化を抑制しないことが強く示唆される。

今度は逆に RSK1 恒常的活性化変異体（RSK1-CA）またはキナーゼデッド変異体（RSK1-KD）を用いて RSK1 の活性が EphA2 Ser-897 リン酸化に必要であることを検証した。野生型 RSK1（RSK1-WT）と比べ、RSK1-CA では RSK リン酸化が強く誘導され、EphA2 Ser-897 リン酸化の増強が認められた。一方で、RSK1-KD では RSK のリン酸化は認められず、EphA2 Ser-897 リン酸化が完全に認められないことがわかった（図4-5D）。以上のことから、活性化 RSK1 が EphA2 Ser-897 リン酸化を誘導することが明らかになった。

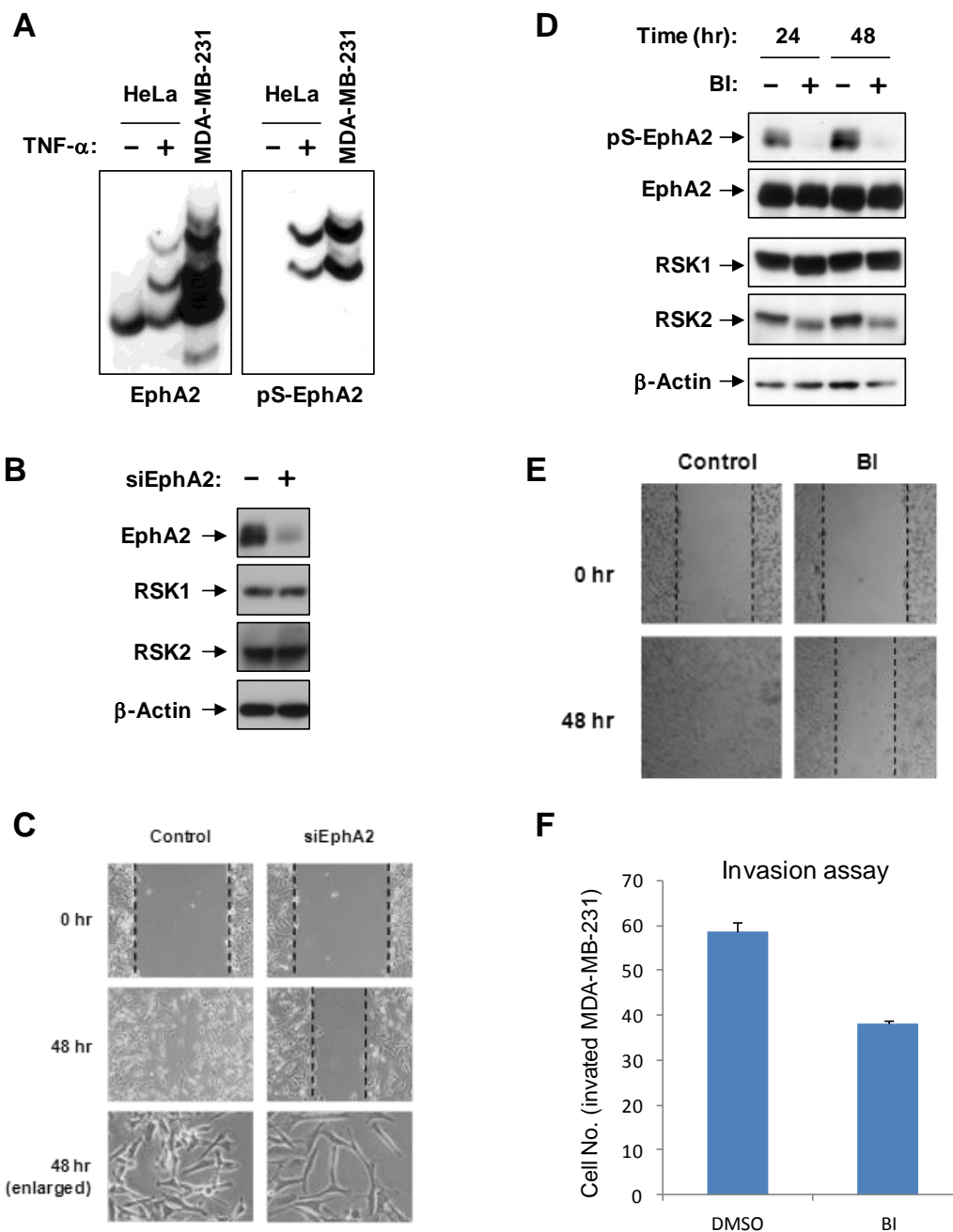
これまでの結果より、RSK が直接 EphA2 Ser-897 リン酸化を触媒することが示唆された。そこで、siRNA を用いてノックダウン実験を行った。まず、RSK 上流の ERK2 をノックダウンしたところ、TNF- $\alpha$ によって誘導された EphA2 Ser-897 リン酸化は抑制された(図4-5E)。次に、RSK1、RSK2 のノックダウンを行った。TNF- $\alpha$ によって誘導された EphA2 Ser-897 リン酸化は RSK1、RSK2 単独のノックダウンでは抑制されなかったものの、RSK1 と RSK2 を同時にノックダウンすることで抑制された(図4-5F)。以上のことから RSK1、RSK2 が共に EphA2 Ser-897 をリン酸化することが示唆された。また、RSK は活性化時に細胞膜付近まで運ばれることが知られている<sup>[104]</sup>。Ser-897 リン酸化 EphA2 の細胞内局在も細胞膜であったため、RSK が EphA2 Ser-897 リン酸化を直接誘導する可能性が高い。そこで組み換え EphA2、RSK1、RSK2 を用いて in vitro kinase assay を行った。EphA2 と RSK1 または EphA2 と RSK2 を反応させると Ser-897 リン酸化バンドが検出され、RSK 阻害剤 BI を前処理した場合にはバンドが検出されなかった(図4-5G)。したがって、RSK1、RSK2 が直接 EphA2 Ser-897 をリン酸化することがわかった。

以上の結果をまとめると、EphA2 Ser-897 リン酸化は ERK を介した RSK1、RSK2 によって誘導されることが明らかになった。RSK1、RSK2 はがんの浸潤や転移に関わることが報告されている<sup>[95-100]</sup>。EphA2 Ser-897 リン酸化も同様に報告されているため<sup>[43]</sup>、RSK と EphA2 Ser-897 リン酸化がリンクしていることは非常に重要な発見だと言える。

図4-5F において、RSK1 も RSK2 も EphA2 Ser-897 のリン酸化を直接誘導するにもかかわらず、RSK1 のノックダウンにより EphA2 の発現が誘導され、RSK2 のノックダウンによりその発現低下が認められた。この二分子間の相同性は非常に高く、キナーゼドインの相同性は 90%にのぼることから、2つの分子の機能はほぼ同じだと考えられてきた<sup>[95]</sup>。しかし、EphA2 の発現に関しては RSK1 と RSK2 で逆の機能を持つことが考えられ、これは非常に興味深い点である。RSK が EphA2 のタンパク質発現量を制御する報告はないため、この制御機構を明らかにしていく必要があり、これは RSK1 と RSK2 の機能の違いを示す重要な発見だと言える。

### 3.3.5 RSK-EphA2 Ser-897 リン酸化を介した細胞遊走、浸潤

Miao らは Akt を介した EphA2 Ser-897 リン酸化がグリオーマ細胞の遊走や浸潤に関わることを報告している<sup>[43]</sup>。そこで我々が同定した RSK を介した EphA2 Ser-897 リン酸化が細胞の遊走や浸潤に対する効果について MDA-MB-231 細胞を用いて検討を行った。この細胞は KRAS、BRAF 変異のため、RSK が恒常的に活性化状態になっており、ERK 経路の阻害



**図4-6 RSK-EphA2 Ser-897リン酸化を介した細胞遊走、浸潤**

(A) HeLa細胞に対し20 ng/mL TNF- $\alpha$ を20分作用させた細胞抽出液とMDA-MB-231細胞の細胞抽出液のタンパク濃度を測定し、等濃度になるよう調節した後、Phos-tag gelを用いて電気泳動を行い、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体を用いてIBを行った。(B) MDA-MB-231細胞にEphA2に対するsiRNAを用いてEphA2をノックダウンさせ、72時間後に細胞抽出液を調製し、抗EphA2抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いてIBを行った。(C) (B)の条件でwound healing assayを行った。剥離48時間後に光学顕微鏡にて観察した。(D) MDA-MB-231細胞に10  $\mu$ M RSK阻害剤BIをそれぞれ24時間、48時間作用させた後に細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗 $\beta$ -Actin抗体を用いてIBを行った。(E) (D)の条件でwound healing assayを行った。剥離48時間後に光学顕微鏡にて観察した。(F) (D)の条件でinvasion assayを行った。チャンバーに細胞を入れて24時間後に評価を行った。

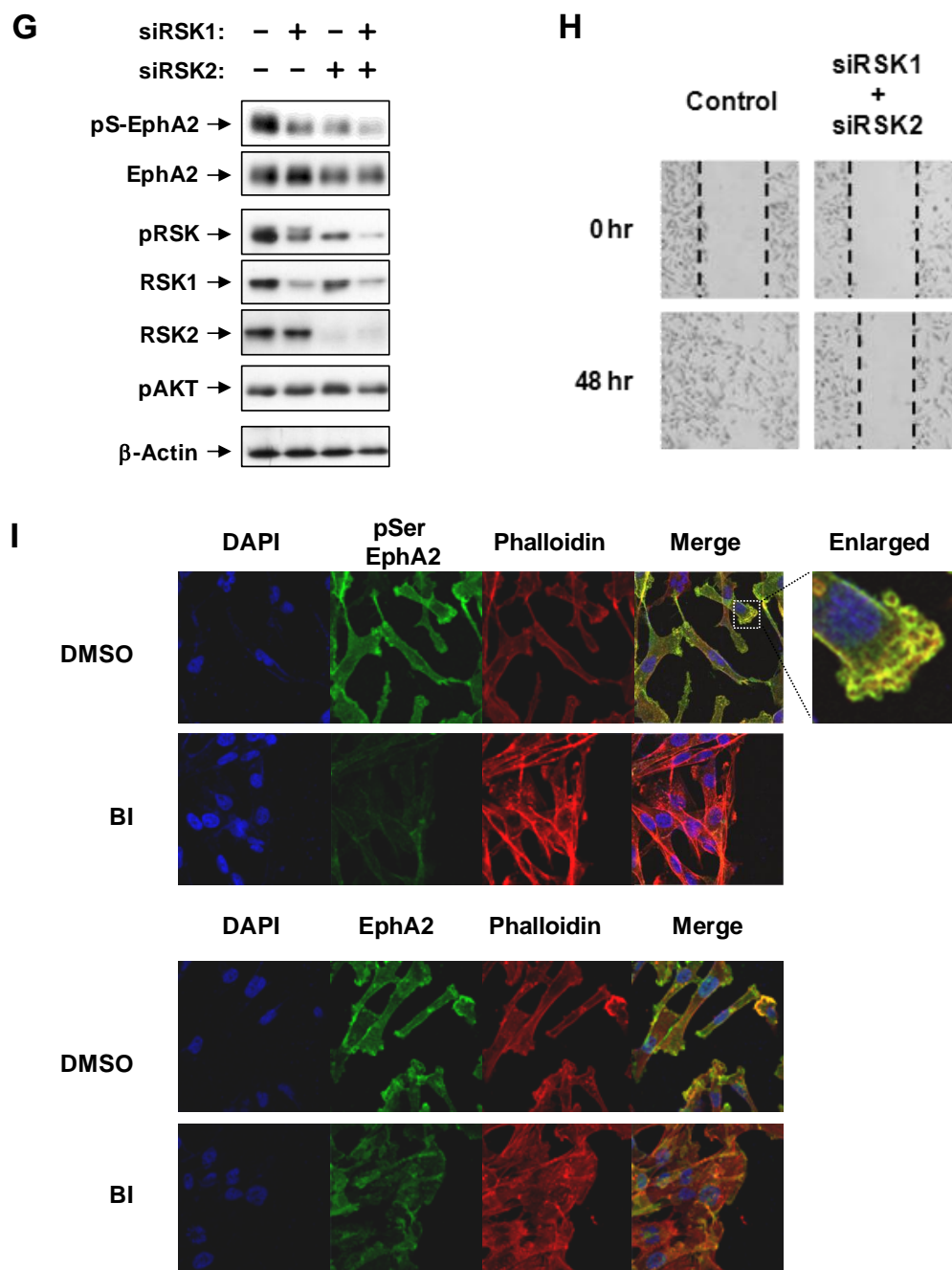


図4-6 RSK-EphA2 Ser-897リン酸化を介した細胞遊走、浸潤(続き)

(G) MDA-MB-231細胞にRSK1とRSK2に対するsiRNAを用いてRSK1とRSK2をノックダウンさせ、72時間後に細胞抽出液を調製し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体、抗pRSK抗体、抗RSK1抗体、抗RSK2抗体、抗pAkt抗体、抗β-Actin抗体を用いてIBを行った。(H) (G)の条件でwound healing assayを行った。剥離48時間後に光学顕微鏡にて観察した。(I) (E)の条件で剥離48時間後の剥離部位の境界に存在する細胞に対し、抗pSer-897 EphA2抗体、抗EphA2抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

剤 U、RSK 阻害剤 BI を処理させることで EphA2 Ser-897 リン酸化の抑制が認められた (図 4-3E、図 4-4I)。Phos-tag gel を用いた検討において、HeLa 細胞の場合とは異なり、EphA2 の過剰発現と TNF- $\alpha$  刺激を行わない状態での恒常的な EphA2 Ser-897 リン酸化が認められる (図 4-6A)。まず、この細胞において EphA2 が細胞遊走に関わるかどうか検討するために、EphA2 をノックダウンした後 (図 4-6B)、wound healing assay を行い、光学顕微鏡で観察した (図 4-6C)。剥離 48 時間後、コントロール細胞では剥離部位が明確に分からないほど細胞が遊走しているが、EphA2 をノックダウン細胞では遊走能が低下し、剥離部位が少ししか埋まっていないことがわかった。また、剥離部位の境界に存在する細胞を拡大すると、コントロール細胞では細胞が活発に運動するときの指標となるラメリポディアと呼ばれる突起構造が形成されているが、EphA2 をノックダウン細胞ではラメリポディアの消失が認められる。したがって、EphA2 は MDA-MB-231 細胞においてその遊走能を制御することがわかった。

次に RSK 阻害剤 BI を MDA-MB-231 細胞に作用させ、wound healing assay と invasion assay を行い、RSK 阻害時の細胞の遊走能、浸潤能を評価した。RSK 阻害剤 BI を 24 時間、48 時間作用させたところ、EphA2 Ser-897 リン酸化抑制は認められた (図 4-6D)。この時、RSK 阻害剤 BI による細胞毒性や細胞のアポトーシスは認められなかった (data not shown)。Wound healing assay において剥離 48 時間後に観察したところ、コントロール細胞と比べ、RSK 阻害剤 BI 作用細胞では遊走能の低下が認められた (図 4-6E)。また、invasion assay において、RSK 阻害剤 BI を添加し、24 時間後に浸潤した細胞数を測定したところ、RSK 阻害による浸潤能の低下も認められた (図 4-6F)。さらに、RSK1、RSK2 のノックダウンを行い、wound healing assay にて遊走能を評価した。RSK1、RSK2 のノックダウンにより EphA2 Ser-897 リン酸化抑制が認められ (図 4-6G)、wound healing assay において遊走能の低下も認められた (図 4-6H)。以上の結果から、RSK を介した EphA2 Ser-897 リン酸化が細胞の遊走能、浸潤能を亢進することが考えられた。

また、RSK 阻害時の細胞の遊走能を評価した際 (図 4-6D-E)、剥離後 48 時間において剥離部位の境界に存在する細胞を免疫蛍光染色したところ (図 4-6H)、コントロール細胞ではラメリポディアや細胞膜上に EphA2 や Ser-897 リン酸化 EphA2 が局在していることがわかった。一方で、RSK 阻害剤 BI を作用させた細胞では、Ser-897 リン酸化 EphA2 が認められず、EphA2 も細胞膜上ではなく、細胞質全体に広がることがわかった。また、興味深いことに Phalloidin の染色像を観察したところ、RSK 阻害剤 BI を作用させた細胞ではラメリポディアの消失が認められた。以上のことから EphA2 Ser-897 リン酸化はラメリポディアに局

在することで細胞の運動を制御していることがわかった。

以上の結果をまとめると、RSK1、RSK2 によって誘導された EphA2 Ser-897 リン酸化はラメリポディアに局在することで細胞の遊走能、浸潤能を亢進させる可能性が非常に高い。今後、HEK293 細胞に EphA2 と RSK1 を共に導入した状態や MDA-MB-231 細胞で EphA2 をノックダウンさせたのちに EphA2 WT または SA を導入した状態での細胞遊走能、浸潤能を検討し、RSK を介した EphA2 Ser-897 リン酸化が細胞運動を調節する直接的な結果を示す必要がある。

これまで、神経膠芽腫において EphA2 の高発現が予後不良と相関することが示されてきている<sup>[92, 105]</sup>。近年、グリオーマ幹細胞においてチロシンキナーゼに依存しない EphA2 は自己複製能の維持に必要であり、発がん誘導を促進することが示された<sup>[105]</sup>。また、EphA2 Ser-897 リン酸化がグリオーマ幹細胞の転移・浸潤を制御することも報告されている<sup>[106]</sup>。がん幹細胞は治療抵抗性を持っており、がんの再発にも関与することが知られているため、がん幹細胞の根治療法を開発することががんの再発や転移の克服につながると期待されている。乳がんの中で最も予後が悪いと言われているトリプルネガティブ乳癌では、RSK の過剰発現や恒常的な活性化が高頻度で起きているが、そこに RSK 阻害剤を作用させることで乳がん幹細胞の自己複製能の維持が破綻することが報告されており、RSK が乳がん幹細胞の有用な治療ターゲットになりうることを示されている<sup>[107-108]</sup>。このように、がん幹細胞では EphA2 と RSK が共に高発現しているため、今回、我々が同定した RSK を介した EphA2 Ser-897 リン酸化経路は、がん細胞だけでなく、がん幹細胞においても重要な役割を果たしていることが考えられる。

ところで、最近の報告で EphA2 が膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) の基質であることが明らかになった<sup>[109]</sup>。チロシンキナーゼ非依存的に MT1-MMP によって切断され活性型となった EphA2 はがん細胞の浸潤・転移を亢進させることが示され、また、浸潤性乳がん患者において、切断型 EphA2 の高発現と MT1-MMP の高発現が認められた<sup>[109]</sup>。この切断型 EphA2 には Ser-897 残基が含まれているため、MT1-MMP による EphA2 の切断と RSK を介した EphA2 Ser-897 リン酸化が相乗的にがんの悪性を誘導することが示唆される。また、我々はヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞において RSK 阻害剤を添加することにより切断型 EphA2 の発現低下を確認している (未公開データ)。そのため、MT1-MMP を介したチロシンキナーゼ非依存的な EphA2 の切断にも RSK が関与する可能性があり、今後、これらの分子の相互関係を明らかにし、EphA2 Ser-897 リン酸化の重要性について検討していく必要がある。

これまで RSK と EphA2 Ser-897 リン酸化はそれぞれがんの遊走や浸潤、転移に関わることが報告されていたが、その分子間の相互作用については知られていなかった。この新しい経路はがんの複雑なシグナルを明らかにするうえで重要な発見であるとともに、がん細胞とがん幹細胞の両方において遊走能や自己複製能の維持といった極めて重要な機能を有している。したがって、本研究は新たながんの治療戦略の構築につながることを期待される。



## 総括

第1章ではTNF- $\alpha$ -p38によって制御されるEGFRエンドサイトーシスの詳細な分子メカニズムの解明を目指し、リガンドを介したEGFRエンドサイトーシスに関わるEps15に着目した。その結果、p38がEps15 Ser-796リン酸化を直接制御することを発見した(図5-1)。TNF- $\alpha$ 刺激の場合、p38がEGFRのエンドサイトーシスに必要であるが、Eps15 Ser-796リン酸化もp38が誘導しているため、Eps15 Ser-796リン酸化はTNF- $\alpha$ を介したEGFRのエンドサイトーシスに関わることが示唆される。しかしながら、その関与を示す結果が得られなかったため、EGFRだけでなく、他の受容体のエンドサイトーシスとの関与も含めた機能解析が必要である。

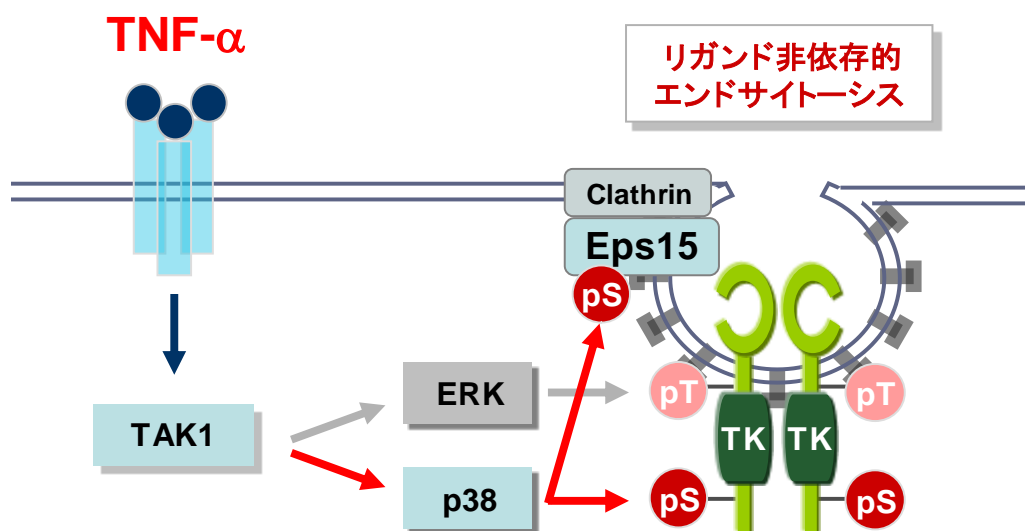


図5-1 p38を介したEps15 Ser796リン酸化

これまでp38はEGFR Ser-1046/7リン酸化を誘導し、EGFRのエンドサイトーシスに関わることを報告してきたが、そのエンドサイトーシスにはp38を介したEps15 Ser-796のリン酸化が関与する可能性がある。

第2章ではTNF- $\alpha$ -ERKを介したEGFR Thr-669リン酸化の機能解析を行った。非対称性EGFRホモダイマーまたはEGFR-ErbB3ヘテロダイマーにおいて、ERKを介したレシーバー側のThr-669リン酸化はチロシンキナーゼドメインの構造的不安定化を誘導することでチロシンの脱リン酸化を促し、フィードバック阻害作用を持つことを発見した(図5-2)。この経路はがん分子標的薬の獲得耐性を考える上で重要な発見であり、獲得耐性への克服に向けた戦略の構築に繋がると考えられる。

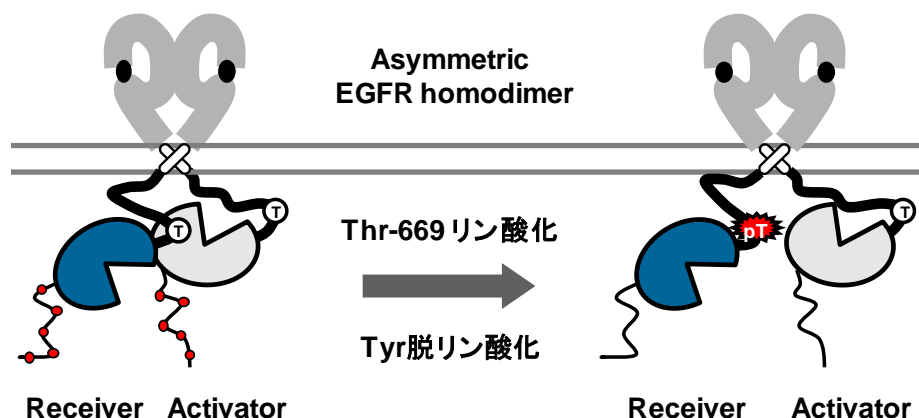


図5-2 ERKを介したEGFR Thr-669リン酸化によるチロシン自己リン酸化抑制

ERKを介してレシーバー側のThr-669リン酸化が誘導されることで、チロシンキナーゼが不安定化し、その結果、EGFRの恒常的なチロシンリン酸化が抑制される。このフィードバック阻害機構はがん治療で問題となっている獲得耐性に関与すると考えられる。

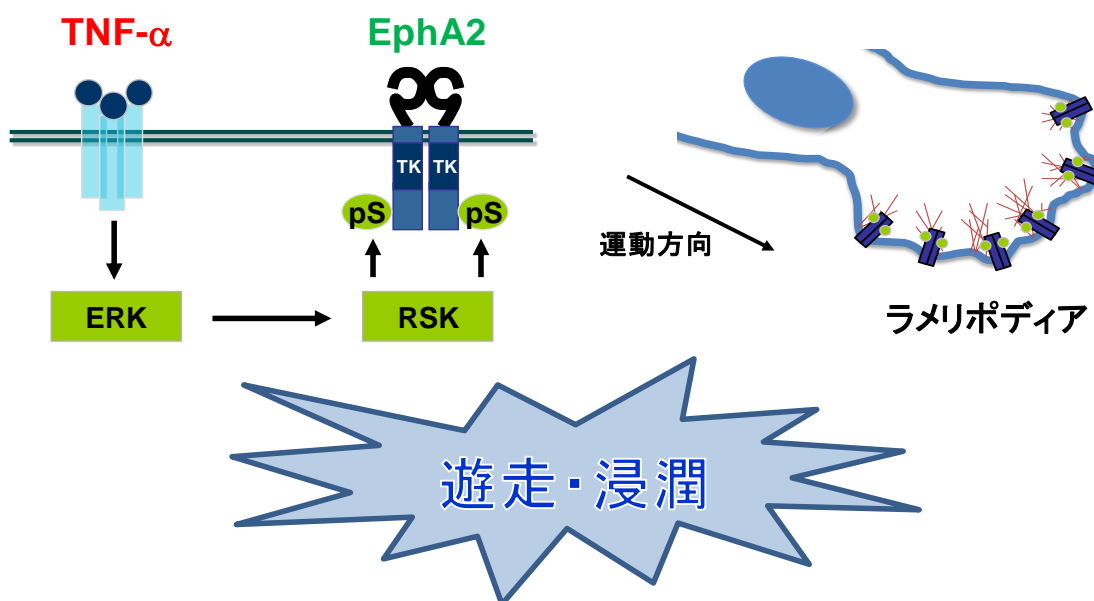


図5-3 RSKを介したEphA2 Ser-897リン酸化による細胞遊走能、浸潤能の亢進

炎症シグナルを介してEphA2 Ser-897リン酸化が誘導されるが、その責任キナーゼがRSK1、RSK2であることを発見した。また、乳がん細胞株MDA-MB-231ではSer897リン酸化型EphA2がラメリポディアに局在することで細胞の遊走能や浸潤能を亢進させることが示唆された。

第3章ではTNF-αによるEphA2の制御機構について検討した。TNF-αによってEphA2 Ser897リン酸化が誘導され、その責任キナーゼがRSK1、RSK2であることを発見した(図5-3)。また、RSKを介したEphA2 Ser897リン酸化は細胞運動に関わっており、乳がん細胞

株 MDA-MB-231 では Ser897 リン酸化型 EphA2 がラメリポディアに局在することで細胞の遊走能や浸潤能を亢進させることが示唆された。RSK も EphA2 Ser897 リン酸化もそれぞれ、がんの遊走や浸潤に関わることが報告されているが、この 2 つの分子間の相互作用を明らかにしたことから、この新たなシグナル経路はがんの悪性化の一端を担う非常に重要な発見であると考えられ、がん分子標的治療において有用な情報を提供できたと考えられる。

今回の解析は EGFR と EphA2 のリン酸化部位の中でも抗リン酸化抗体が入手可能な部位にのみ注目した。EGFR と EphA2 には多数の Ser/Thr リン酸化部位が同定されていることから、他の Ser/Thr リン酸化部位も炎症シグナルによって制御される可能性がある。また、EGFR Thr-669 と Ser-1046 に相当する残基が ErbB2 にも保存されており、実際に TNF- $\alpha$  を作用させたとき、ErbB2 のみならず、ErbB3 のバンドシフトも認められた（未発表データ）。これらのバンドシフトは EGFR-TKI では抑制されず、p38 阻害剤や ERK 経路の阻害剤で抑制が認められた。このことから EGFR だけでなく、ErbB ファミリー全体が炎症シグナルによってチロシンキナーゼ非依存的に調節されていることが強く示唆される。さらに、Eph ファミリーに属する EphA1 には EphA2 Ser-897 に相当する残基 Ser-906 が存在している。意外なことに Phos-tag gel を用いた検討において、TNF- $\alpha$  刺激時に EphA1 のシフトバンドが認められるにもかかわらず、このシフトバンドは ERK 経路の阻害剤 U や RSK 阻害剤 BI によって制御されなかった（未発表データ）。このように、EGFR を含む ErbB ファミリーや EphA2 を含む Eph ファミリーにおいて解析が必要な Ser/Thr リン酸化部位がたくさん残されており、更なる検討が必要である。

また、EGFR と EphA2 では、興味深いことにそれぞれの場合では Ser/Thr リン酸化の責任キナーゼが異なることから、RTK の Ser/Thr リン酸化を調節するシグナル経路には多様性があることが考えられる。したがって、炎症シグナルによって制御を受けないキナーゼを介する RTK Ser/Thr リン酸化が存在することも十分考えられ、個々のキナーゼによる RTK の制御を検討する必要もある。

これまで、RTK はチロシンキナーゼであるがゆえに先行研究のほとんどはチロシン残基のリン酸化にしか注目しておらず、Ser/Thr リン酸化に関する情報はまだ少ない。近年、少しずつ研究が進んでおり、例えば、PKC を介した MET の膜近傍領域に存在する Ser-985 リン酸化がリガンドによって誘導された MET チロシンキナーゼ活性の抑制に関わることが報告されている<sup>[85]</sup>。また、fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) では、Ser-777 が ERK を、Ser-789 が RSK2 を介してそれぞれリン酸化され、FGFR1 チロシンキナーゼ活性のフィードバック阻害に関わることが報告されている<sup>[110-111]</sup>。また、興味深いことに Ser-789 リン酸化

は Ser-777 と独立して FGFR1 のユビキチン化とそのエンドサイトーシスおよび分解を誘導し、FGFR1 シグナルの持続性を制御することも報告されている。このように RTK の Ser/Thr リン酸化は見落とされてきたリン酸化部位であり、驚くべきことにその機能はこれまで知られてきた機能とは全く異なることから、RTK の機能を理解するうえでそれらの制御を明らかにすることは非常に重要であると言える。また、本研究により炎症シグナルは RTK の Ser/Thr リン酸化を制御し、がんの悪性化誘導に関わることが示唆された。がんの複雑なシグナルの全体像を明らかにするうえで、炎症シグナルを介した網羅的な RTK のリン酸化プロファイルの取得とその詳細な分子機構の解明ならびに機能解析が必要である。これらの情報は新たな分子標的治療戦略の構築に貢献することが期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部がん細胞生物学的研究室 櫻井宏明教授に心より厚く御礼申し上げます。また、数々のご助言を賜りました同大学大学院医学薬学研究部がん細胞生物学的研究室 佐久間勉准教授、河崎優希助教に感謝致します。

本研究の一部は本学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野の所属時に行った研究である。本学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 濟木育夫教授には数々のご指導、ご助言を賜り、深く感謝申し上げます。また、多大なるご助言を賜りました本学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 早川芳弘准教授、横山悟助教、本学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 小泉桂一准教授に感謝致します。

Eps15 のリン酸化部位同定は京都大学大学院薬学研究科 石濱泰教授、杉山直幸准教授との共同研究で行いました。Phos-tag gel は広島大学大学院医歯薬保健学研究院 木下英司准教授からご助言を頂きました。また、IFOM、Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare、Milan、Italy Dr. Pier Paolo Di Fiore、INSERM U1016、Institut Cochin、Paris、France Dr. Alexandre Benmerah、浜松医科大学医学部 相村春彦教授、慶應義塾大学大学院薬学研究科 杉本芳一教授には大変貴重な研究材料を供与して頂きました。心から深謝致します。

本研究の遂行にあたり、田中智大氏、崎村綾香氏、山田直樹氏、西村美紀氏、申明淑博士、佐藤佳奈絵氏、河西美保氏、加藤真一郎氏、鈴木俊輔博士をはじめ、本学大学院医学薬学研究部がん細胞生物学的研究室と本学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野の皆様には深く感謝の意を表します。

## 參考論文

- [ 1 ] Lemmon MA, Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141:1117-1134,2010
- [ 2 ] Hubbard SR, Miller WT: Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19:117-123,2007
- [ 3 ] Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225,2000
- [ 4 ] Hunter T: Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* 21:140-146,2009
- [ 5 ] Bennisroune A, Gardin A, Aunis D, Cremel G, Hubert P: Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 50:23-38,2004
- [ 6 ] Takeuchi K, Ito F: Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull* 34:1774-1780,2011
- [ 7 ] Roskoski R Jr: The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 79:34-74,2014
- [ 8 ] Easty DJ, Gray SG, O'Byrne KJ, O'Donnell D, Bennett DC: Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 24:446-461,2011
- [ 9 ] Reungwetwattana T, Dy GK: Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer. *J Carcinog* 12:22,2013
- [ 10 ] Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI: ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117:2051-2058,2007
- [ 11 ] Hynes NE, MacDonald G: ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 21:177-184,2009
- [ 12 ] Bublil EM, Yarden Y: The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* 19:124-134,2007
- [ 13 ] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-2139,2004
- [ 14 ] Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497-1500,2004

- [ 15] Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M: PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res* 40:D261-D270,2012
- [ 16] Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP, et al.: Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 312:724-9,1984
- [ 17] Chu WM: Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* 328:222-225,2013
- [ 18] Wu Y, Zhou BP: TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 102:639-644,2010
- [ 19] Sakurai H: Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 33:522-530,2012
- [ 20] Choo MK, Sakurai H, Koizumi K, Saiki I: TAK1-mediated stress signaling pathways are essential for TNF-alpha-promoted pulmonary metastasis of murine colon cancer cells. *Int J Cancer* 118:2758-2764,2006
- [ 21] Choo MK, Sakurai H, Koizumi K, Saiki I: Stimulation of cultured colon 26 cells with TNF-alpha promotes lung metastasis through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Lett* 230:47-56,2005
- [ 22] Choo MK, Kawasaki N, Singhirunnusorn P, Koizumi K, Sato S, Akira S, Saiki I, Sakurai H: Blockade of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 activity enhances TRAIL-induced apoptosis through activation of a caspase cascade. *Mol Cancer Ther* 5:2970-2976,2006
- [ 23] Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284:31-53,2003
- [ 24] Lemmon MA: Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res* 315:638-648,2009
- [ 25] Schneider MR, Wolf E: The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* 218:460-466,2009
- [ 26] Citri A, Yarden Y: EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:505-516,2006
- [ 27] Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, Riese DJ 2nd: Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther* 122:1-8,2009

- [ 28] Baselga J, Swain SM: Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9:463-475,2009
- [ 29] Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-869,2001
- [ 30] Tanoue T, Nishida E: Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 15:455-462,2003
- [ 31] Zhang Y, Dong C: Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 64:2771-2789,2007
- [ 32] Nishimura M, Shin MS, Singhirunnusorn P, Suzuki S, Kawanishi M, Koizumi K, Saiki I, Sakurai H: TAK1-mediated serine/threonine phosphorylation of epidermal growth factor receptor via p38/extracellular signal-regulated kinase: NF- $\kappa$ B-independent survival pathways in tumor necrosis factor  $\alpha$  signaling. *Mol Cell Biol* 29:5529-5539,2009
- [ 33] Singhirunnusorn P, Ueno Y, Matsuo M, Suzuki S, Saiki I, Sakurai H: Transient suppression of ligand-mediated activation of epidermal growth factor receptor by tumor necrosis factor- $\alpha$  through the TAK1-p38 signaling pathway. *J Biol Chem* 282:12698-12706,2007
- [ 34] Heisermann GJ, Wiley HS, Walsh BJ, Ingraham HA, Fiol CJ, Gill GN: Mutational removal of the Thr669 and Ser671 phosphorylation sites alters substrate specificity and ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 265:12820-12827,1990
- [ 35] Welsh JB, Gill GN, Rosenfeld MG, Wells A: A negative feedback loop attenuates EGF-induced morphological changes. *J Cell Biol* 114:533-543,1991
- [ 36] Janes PW, Nievergall E, Lackmann M: Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin Cell Dev Biol* 23:43-50,2012
- [ 37] Merlos-Suarez A, Batlle E: Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 20:194-200,2008
- [ 38] Wykosky J, Debinski W: The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol Cancer Res* 6:1795-1806,2008
- [ 39] Pasquale EB: Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer* 10:165-180,2010
- [ 40] Boyd AW, Bartlett PF, Lackmann M: Therapeutic targeting of EPH receptors and their ligands. *Nat Rev Drug Discov* 13:39-62,2013



- [ 41] Miao H, Wang B: EphA receptor signaling--complexity and emerging themes. *Semin Cell Dev Biol* 23:16-25,2012
- [ 42] Biao-xue R, Xi-guang C, Shuan-ying Y, Wei L, Zong-juan M: EphA2-dependent molecular targeting therapy for malignant tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 11:1082-1097,2011
- [ 43] Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cutter J, Basilion JP, Sedor J, Wu J, Danielpour D, Sloan AE, Cohen ML, Wang B: EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* 16:9-20,2009
- [ 44] Wiley HS, Burke PM: Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* 2:12-18,2001
- [ 45] Acconcia F, Sigismund S, Polo S: Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res* 315:1610-1618,2009
- [ 46] Haglund K, Dikic I: The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J Cell Sci* 125:265-275,2012
- [ 47] Sorkin A, Goh LK: Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* 314:3093-3106,2008
- [ 48] van Bergen En Henegouwen PM: Eps15: a multifunctional adaptor protein regulating intracellular trafficking. *Cell Commun Signal* 7:24,2009
- [ 49] Salcini AE, Chen H, Iannolo G, De Camilli P, Di Fiore PP: Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15. *Int J Biochem Cell Biol* 31:805-809,1999
- [ 50] Iannolo G, Salcini AE, Gaidarov I, Goodman OB Jr, Baulida J, Carpenter G, Pelicci PG, Di Fiore PP, Keen JH: Mapping of the molecular determinants involved in the interaction between eps15 and AP-2. *Cancer Res* 57:240-245,1997
- [ 51] Benmerah A, Lamaze C, Begue B, Schmid SL, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N: AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 140:1055-1062,1998
- [ 52] Benmerah A, Begue B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N: The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J Biol Chem* 271:12111-12116,1996
- [ 53] Chi S, Cao H, Chen J, McNiven MA: Eps15 mediates vesicle trafficking from the trans-Golgi network via an interaction with the clathrin adaptor AP-1. *Mol Biol Cell*

19:3564-3575,2008

- [ 54] Parachoniak CA, Park M: Distinct recruitment of Eps15 via Its coiled-coil domain is required for efficient down-regulation of the met receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 284:8382-8394,2009
- [ 55] Carbone R, Fre S, Iannolo G, Belleudi F, Mancini P, Pelicci PG, Torrisi MR, Di Fiore PP: eps15 and eps15R are essential components of the endocytic pathway. *Cancer Res* 57:5498-5504,1997
- [ 56] Teckchandani A, Mulkearns EE, Randolph TW, Toida N, Cooper JA: The clathrin adaptor Dab2 recruits EH domain scaffold proteins to regulate integrin beta1 endocytosis. *Mol Biol Cell* 23:2905-2916,2012
- [ 57] Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF: Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* 158:1119-1131,2002
- [ 58] Querbes W, Benmerah A, Tosoni D, Di Fiore PP, Atwood WJ: A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway. *J Virol* 78:250-256,2004
- [ 59] Hussain KM, Leong KL, Ng MM, Chu JJ: The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71. *J Biol Chem* 286:309-321,2011
- [ 60] Confalonieri S, Salcini AE, Puri C, Tacchetti C, Di Fiore PP: Tyrosine phosphorylation of Eps15 is required for ligand-regulated, but not constitutive, endocytosis. *J Cell Biol* 150:905-912,2000
- [ 61] Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP, Polo S: Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2760-2765,2005
- [ 62] Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, Sugita T: Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 274:10641-10648,1999
- [ 63] Sakurai H, Shigemori N, Hasegawa K, Sugita T: TGF-beta-activated kinase 1 stimulates NF-kappa B activation by an NF-kappa B-inducing kinase-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 243:545-549,1998
- [ 64] Poupon V, Polo S, Vecchi M, Martin G, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N, Di Fiore PP,

- Benmerah A: Differential nucleocytoplasmic trafficking between the related endocytic proteins Eps15 and Eps15R. *J Biol Chem* 277:8941-8948,2002
- [ 65] Benmerah A, Gagnon J, Begue B, Megarbane B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N: The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *J Cell Biol* 131:1831-1838,1995
- [ 66] Kinoshita E, Takahashi M, Takeda H, Shiro M, Koike T: Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans.* 2004 Apr 21;(8):1189-93. Epub 2004 Mar 22.,2004
- [ 67] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E: Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* 11:319-323,2011
- [ 68] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T: Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions. *Proteomics* 12:192-202,2012
- [ 69] Roux PP, 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
- [ 70] Pozzi B, Amodio S, Lucano C, Sciullo A, Ronzoni S, Castelletti D, Adler T, Treise I, Betsholtz IH, Rathkolb B, Busch DH, Wolf E, Fuchs H, Gailus-Durner V, de Angelis MH, Betsholtz C, Casola S, Di Fiore PP, Offenhauser N: The endocytic adaptor Eps15 controls marginal zone B cell numbers. *PLoS One* 7:e50818,2012
- [ 71] Grandal MV, Grovdal LM, Henriksen L, Andersen MH, Holst MR, Madhus IH, van Deurs B: Differential roles of Grb2 and AP-2 in p38 MAPK- and EGF-induced EGFR internalization. *Traffic* 13:576-585,2012
- [ 72] Takeda K, Ichijo H: Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7:1099-1111,2002
- [ 73] Mace G, Miaczynska M, Zerial M, Nebreda AR: Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis. *EMBO J* 24:3235-3246,2005
- [ 74] McLaughlin NJ, Banerjee A, Kelher MR, Gamboni-Robertson F, Hamiel C, Sheppard FR, Moore EE, Silliman CC: Platelet-activating factor-induced clathrin-mediated endocytosis requires beta-arrestin-1 recruitment and activation of the p38 MAPK signalosome at the plasma membrane for actin bundle formation. *J Immunol* 176:7039-7050,2006
- [ 75] Girao H, Catarino S, Pereira P: Eps15 interacts with ubiquitinated Cx43 and mediates its

- internalization. *Exp Cell Res* 315:3587-3597,2009
- [ 76] Catarino S, Ramalho JS, Marques C, Pereira P, Girao H: Ubiquitin-mediated internalization of connexin43 is independent of the canonical endocytic tyrosine-sorting signal. *Biochem J* 437:255-267,2011
  - [ 77] Red Brewer M, Choi SH, Alvarado D, Moravcevic K, Pozzi A, Lemmon MA, Carpenter G: The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell* 34:641-651,2009
  - [ 78] Jura N, Endres NF, Engel K, Deindl S, Das R, Lamers MH, Wemmer DE, Zhang X, Kuriyan J: Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* 137:1293-1307,2009
  - [ 79] Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J: An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125:1137-1149,2006
  - [ 80] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-345,2004
  - [ 81] Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbiicki R, Langer C, Moore MJ: Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357:2040-2048,2007
  - [ 82] Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD: Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:1626-1634,2008
  - [ 83] Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, Beijersbergen RL, Bardelli A, Bernards R: Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483:100-103,2012
  - [ 84] Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM: Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* 269:1815-1820,1994
  - [ 85] Nakayama M, Sakai K, Yamashita A, Nakamura T, Suzuki Y, Matsumoto K: Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes.

Cytokine 62:446-452,2013

- [ 86] Landen CN, Kinch MS, Sood AK: EphA2 as a target for ovarian cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 9:1179-1187,2005
- [ 87] Ireton RC, Chen J: EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 5:149-157,2005
- [ 88] Herath NI, Boyd AW: The role of Eph receptors and ephrin ligands in colorectal cancer. *Int J Cancer* 126:2003-2011,2010
- [ 89] Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE: Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene* 22:3070-3075,2003
- [ 90] Walker-Daniels J, Hess AR, Hendrix MJ, Kinch MS: Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells. *Am J Pathol* 162:1037-1042,2003
- [ 91] Kinch MS, Moore MB, Harpole DH Jr: Predictive value of the EphA2 receptor tyrosine kinase in lung cancer recurrence and survival. *Clin Cancer Res* 9:613-618,2003
- [ 92] Zhang S, Zhang D, Sun B: Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett* 254:157-164,2007
- [ 93] Lee JW, Han HD, Shahzad MM, Kim SW, Mangala LS, Nick AM, Lu C, Langley RR, Schmandt R, Kim HS, Mao S, Gooya J, Fazenbaker C, Jackson D, Tice DA, Landen CN, Coleman RL, Sood AK: EphA2 immunoconjugate as molecularly targeted chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101:1193-1205,2009
- [ 94] Beauchamp A, Debinski W: Ephs and ephrins in cancer: ephrin-A1 signalling. *Semin Cell Dev Biol* 23:109-115,2012
- [ 95] Lara R, Seckl MJ, Pardo OE: The p90 RSK family members: common functions and isoform specificity. *Cancer Res* 73:5301-5308,2013
- [ 96] Anjum R, Blenis J: The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:747-758,2008
- [ 97] Shimamura A, Ballif BA, Richards SA, Blenis J: Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol* 10:127-135,2000
- [ 98] Frodin M, Antal TL, Dummmler BA, Jensen CJ, Deak M, Gammeltoft S, Biondi RM: A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J* 21:5396-5407,2002
- [ 99] Hauge C, Frodin M: RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci*

119:3021-3023,2006

- [100] Sulzmaier FJ, Ramos JW: RSK isoforms in cancer cell invasion and metastasis. *Cancer Res* 73:6099-6105,2013
- [101] Wang Yj, Ota S, Kataoka H, Kanamori M, Li Zy, Band H, Tanaka M, Sugimura H: Negative regulation of EphA2 receptor by Cbl. *Biochem Biophys Res Commun* 296:214-220,2002
- [102] Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura H: Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J* 23:1075-1088,2004
- [103] Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Sugimoto Y: Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Mol Cancer Ther* 6:2092-2102,2007
- [104] Richards SA, Dreisbach VC, Murphy LO, Blenis J: Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1. *Mol Cell Biol* 21:7470-7480,2001
- [105] Binda E, Visioli A, Giani F, Lamorte G, Copetti M, Pitter KL, Huse JT, Cajola L, Zanetti N, DiMeco F, De Filippis L, Mangiola A, Maira G, Anile C, De Bonis P, Reynolds BA, Pasquale EB, Vescovi AL: The EphA2 receptor drives self-renewal and tumorigenicity in stem-like tumor-propagating cells from human glioblastomas. *Cancer Cell* 22:765-780,2012
- [106] Miao H, Gale NW, Guo H, Qian J, Petty A, Kaspar J, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos G, Hambardzumyan D, Lathia JD, Rich JN, Lee J, Wang B.: EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2013.590.,2014
- [107] Stratford AL, Reipas K, Hu K, Fotovati A, Brough R, Frankum J, Takhar M, Watson P, Ashworth A, Lord CJ, Lasham A, Print CG, Dunn SE: Targeting p90 ribosomal S6 kinase eliminates tumor-initiating cells by inactivating Y-box binding protein-1 in triple-negative breast cancers. *Stem Cells* 30:1338-1348,2012
- [108] Dhillon J, Astanehe A, Lee C, Fotovati A, Hu K, Dunn SE: The expression of activated Y-box binding protein-1 serine 102 mediates trastuzumab resistance in breast cancer cells by increasing CD44+ cells. *Oncogene* 29:6294-6300,2010
- [109] Sugiyama N, Gucciardo E, Tatti O, Varjosalo M, Hyytiainen M, Gstaiger M, Lehti K: EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion. *J Cell Biol* 201:467-484,2013

- [110] Zakrzewska M, Haugsten EM, Nadratowska-Wesolowska B, Oppelt A, Hausott B, Jin Y, Otlewski J, Wesche J, Wiedlocha A: ERK-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor receptor 1 on Ser777 inhibits signaling. *Sci Signal* 6:ra11,2013
- [111] Nadratowska-Wesolowska B, Haugsten EM, Zakrzewska M, Jakimowicz P, Zhen Y, Pajdzik D, Wesche J, Wiedlocha A.: RSK2 regulates endocytosis of FGF receptor 1 by phosphorylation on serine 789 *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2013.425.,2013

## 公表論文

### (主論文)

1. Zhou Y., Tanaka T., Sugiyama N., Yokoyama S., Kawasaki Y., Sakuma T., Ishihama Y., Saiki I. and Sakurai H.: p38-Mediated phosphorylation of Eps15 endocytic adaptor protein. FEBS letters, 588: 131-137, 2014.
2. Sato K., Shin MS., Sakimura A., Zhou Y., Tanaka T., Kawanishi M., Kawasaki Y., Yokoyama S., Koizumi K., Saiki I. and Sakurai, H.: Inverse correlation between Thr-669 and constitutive tyrosine phosphorylation in the asymmetric epidermal growth factor receptor dimer conformation. Cancer Sci., 104: 1315-1322, 2013.
3. Zhou Y., Yamada N., Tanaka T., Kawasaki Y., Sakuma T. and Sakurai H.: RSK-EphA2 signaling pathway that regulates cancer cell motility and invasion. (manuscript in preparation)

### (関連論文)

1. Suzuki S., Zhou Y., Refaat A., Takasaki I., Koizumi K., Yamaoka S., Tabuchi Y., Saiki I. and Sakurai H.: Human T cell lymphotropic virus 1 manipulates interferon regulatory signals by controlling the TAK1-IRF3 and IRF4 pathways. J. Biol. Chem., 285: 4441-4446, 2010
2. Refaat A., Zhou Y., Suzuki S., Takasaki I., Koizumi K., Yamaoka S., Tabuchi Y., Saiki I. and Sakurai H.: Distinct roles of transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1)-c-Rel and interferon regulatory factor 4 (IRF4) pathways in human T cell lymphotropic virus 1-transformed T helper 17 cells producing interleukin-9. J. Biol. Chem., 286: 21092-21099, 2011