

氏 名	しゅう えつ 周 越
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	富医薬博甲第 138 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 21 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教 育 部 名	富山大学大学院医学薬学教育部 薬学領域 博士課程 生命薬科学専攻
学位論文題目	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
論文審査委員	
（主査）	教 授 櫻井 宏明 （指導教員）
（副査）	教 授 大熊 芳明
（副査）	教 授 今中 常雄

論文内容の要旨

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- α (TNF- α) がRTKの一つである epidermal growth factor receptor (EGFR) の Thr-669 と Ser-1046/7 の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- α によるアダプター分子の制御を検討することで、TNF- α 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リン酸化がEGFRの活性化に及ぼす影響について検

討し、Thr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- α によって制御される可能性が考えられた。そこで、がんにおいて発現が高いRTKXに注目し、TNF- α を介したRTKXのリン酸化制御機構について解析した（第3章）。

第1章 p38を介したEps15のリン酸化制御機構（論文1）

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- α 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- α 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が足場タンパク質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（論文2）

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という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 RTKXのSer/Thrリン酸化抑制機構

論文受理後に公開

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RTKX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。

公表論文

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 EGFR dimer conformation. Cancer Sci., 104: 1315-1322, 2013.
3. 論文受理後に公開

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

チロシンキナーゼ型受容体 (RTK) は 1 回膜貫通型の受容体であり、細胞内のチロシンキナーゼを介して生存シグナルや増殖シグナルを伝える。近年、がん分子標的治療薬として RTK チロシンキナーゼ阻害剤の開発が進んでいる。我々は、TNF- α が EGFR の Thr-669 と Ser-1046/7 のリン酸化を誘導することを明らかにしてきた。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 リン酸化は p38 が制御し、EGFR のエンドサイトーシスに関与していることを明らかにしているが、その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アダプター分子が制御しているため、本研究では TNF- α によるアダプター分子の制御を検討した。一方、機能のわかっていなかった Thr リン酸化について、EGFR の活性化に及ぼす影響について検討した。さらに、EGFR 以外の RTK にも Ser/Thr 残基が多数存在していることから、それらの残基が炎症シグナルによって制御される可能性を検証するため、TNF- α を介した RTKX のリン酸化制御機構について解析した。

1. p38 を介した Eps15 のリン酸化制御機構

EGFR などの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る Eps15 のリン酸化制御を検討した。HeLa 細胞を TNF- α 刺激することによって Eps15 の Ser-796 がリン酸化されることがわかった。そのリン酸化の制御機構を検討したところ、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 および関連タンパク質のノックダ

ウンを行ったが、TNF- α による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が、p38 を介した Eps15 Ser-796 リン酸化という新しいシグナル経路を発見し、今後その機能解析が重要であると考えられた。

2. EGFR の Thr リン酸化による Tyr 自己リン酸化の抑制機構

ERFR を過剰発現しているヒト乳がん細胞株を用いて、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、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から、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。

3. TNF- α を介した RTKX のリン酸化制御機構

論文受理後に公開

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。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。

これらの研究成果はすでに国際的な学術誌に公表していること、また面接等による学位論文審査の結果、提出した論文内容が博士（薬学）の学位を授けるに値すると判断した。