

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22117003

研究課題名(和文)SUMO化及びO-GlcNAc化によるMAPキナーゼ経路の活性制御機構と疾患

研究課題名(英文)Regulation of MAPK pathways by protein sumoylation and O-GlcNAcylation and its dysregulation in human diseases

研究代表者

武川 睦寛(Takekawa, Mitsuhiro)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30322332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 137,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞には、増殖に作用するERK経路とストレス応答に関与するp38/JNK経路という、複数のMAPK経路が存在する。これらMAPK経路の制御異常が、癌や自己免疫疾患等の病因・病態に深く関与することが知られている。しかし、その活性制御機構や疾患における異常に関しては未だ不明な点が多い。本研究において我々は、1) ERK経路の活性制御にSUMO化やO-GlcNAc化等の翻訳後修飾が関与することを見出した。2) 新規ERK基質分子MCRIP1を同定し、この分子が上皮間葉転換の制御に寄与することを示した。3) p38/JNK活性の周期的な振動現象が免疫応答の制御に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In human cells, a wide array of extracellular stimuli generates intracellular signals that converge on a limited number of protein kinase cascades, commonly referred to as mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. MAPK cascades, which consist of a three-tiered core of protein kinases, are the major signaling systems that dictate cell fate decisions such as survival, proliferation, and apoptosis. There are at least three subfamilies of MAPKs, named p38, JNK, and ERK. Perturbation of these cellular signaling systems is involved in a variety of life-threatening diseases. Therefore, these signaling systems are of clinical importance. In this study, we identified: 1) The ERK pathway is regulated at least in part by protein sumoylation and O-GlcNAcylation; 2) MCRIP1, a novel ERK substrate, regulates epithelial-mesenchymal transition; 3) Oscillation of the p38/JNK activities in cells is critical for the regulation of the immune response.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 翻訳後修飾 MAPキナーゼ SUMO 上皮間葉転換 癌 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

ヒト細胞内には、主に増殖因子によって活性化され、細胞増殖や生存に作用する ERK 経路と、様々な環境ストレス刺激に応答して活性化され、細胞死 (アポトーシス) や炎症を惹起するストレス応答 MAP キナーゼ (p38 及び JNK) 経路という、複数の MAP キナーゼ・カスケードが存在する。細胞運命 (生か死か) を決定して生体の恒常性維持を担うこれら MAPK 経路の制御異常が、癌や自己免疫疾患などの発症に深く関与することが明らかにされている。しかしながら、MAPK 経路の活性調節機構や疾患における制御異常の詳細には、未だ不明な点が数多く残されており、その解明は癌を始めとする難治性疾患の病因、病態の理解、および新規治療法開発の観点からも必要不可欠である。

我々は、これまでに特定のストレス刺激によって形成される「ストレス顆粒」と呼ばれる細胞内構造体が、p38/JNK 経路を失活させてアポトーシス抑制に作用する事を見出した。最近、顆粒形成にストレス依存的な蛋白質の O-GlcNAc 化が重要である事が示され注目を集めている。また我々は、ERK 経路の活性制御機構に関しても研究を行い、ERK 経路のシグナル伝達分子が細胞内で SUMO 化され、ERK 活性が抑制されていることを見出した。

本研究においては、申請者自身が見出したこれらの知見を基に、翻訳後修飾による MAPK 経路の活性調節機構および、疾患発症との関連について解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、細胞増殖と死の制御に重要な MAPK カスケードの活性制御機構を、翻訳後修飾によるシグナル伝達分子の機能制御という観点から分子レベルで解明すべく、解析を行った。また、MAPK シグナルの制御異常と疾患発症・病態形成との関連についても検証を行った。

3. 研究の方法

MAPK 経路の活性制御に関わる新規分子とその翻訳後修飾、さらには、MAPK によってリン酸化される新たな基質分子を同定するため、遺伝子クローニング、qPCR、全ゲノム発現アレイ、ウエスタンブロット、アフィニティゲル電気泳動、酵母 3-ハイブリッドなど、様々な分子生物学的・生化学的解析を実施した。また、得られた分子の生理機能を解明するため、細胞生物学的解析および、マウスを用いた個体レベルでの解析を行った。

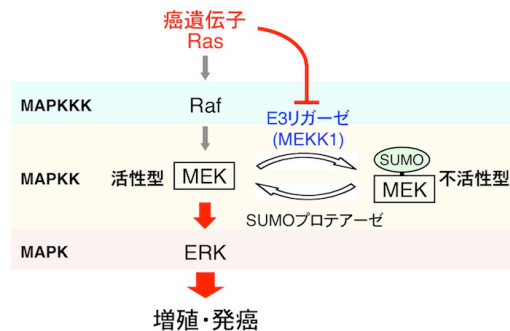
さらに、シグナル伝達制御の基本原理解や、シグナル伝達分子の構造-機能連関を解明するため、数理科学、構造生物学、プロテオミクスなど多彩な分野の研究者と共同研究を推進した。

4. 研究成果

1) SUMO 化による ERK 経路の活性制御と癌に

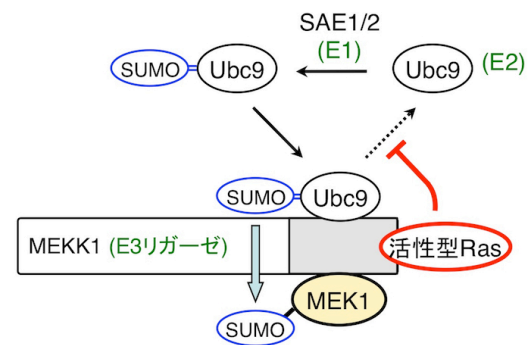
おけるその破綻

ERK 経路の新たな活性調節機構として MEK が細胞内で SUMO 化されること、さらに SUMO 化が MEK の機能を阻害して、ERK 経路の過剰な活性化を防ぎ、発癌阻止に作用することを見出した。また、癌遺伝子 Ras が、MEK の SUMO 化を抑制する機能を持つことを見出し、実際に Ras に変異を有するヒト癌細胞において MEK の SUMO 化が消失していることを確認した。即ち、癌遺伝子 Ras は、Raf を活性化すると同時に、SUMO 化による MEK の不活性化を阻止する、という二重の機構によって ERK 経路を強力に活性化し、発癌を導くことを示した。



MEK-SUMO化によるERK経路の活性抑制と癌遺伝子Rasによるその解除

また、Ras による MEK-SUMO 化阻害機構に関しても解析を行い、MAPKKK の一種である MEKK1 が、MEK の SUMO 化を担う E3 リガーゼとしても機能すること、さらに癌遺伝子 Ras が MEKK1 の SUMO-E3 リガーゼ活性を阻害することを明らかにした (*Nature Cell Biol.* 2011)。これらの成果は *Science Signaling* 誌の Editor's choice 欄で紹介されると共に、Faculty of 1000 の must read paper にも選ばれた。

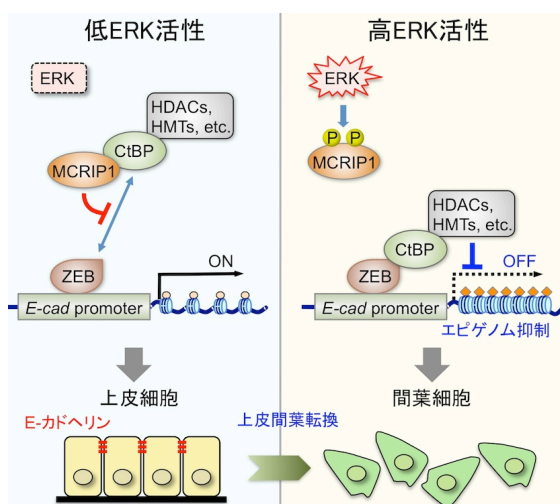


癌遺伝子RasによるMEK-SUMO化の阻害

2) 新規 ERK 基質分子 MCRIP1 による上皮間葉転換 (EMT) の制御

ERK によってリン酸化される基質分子を、ヒト cDNA 発現ライブラリーから網羅的に探索する新たなスクリーニング法を開発して、機能未知の新規遺伝子 (MCRIP1 と命名) を同定することに成功した。さらに、MCRIP1 の機能解析を行い、MCRIP1 が、CtBP (転写抑制共役因

子) と直接結合することで、CtBPの転写抑制作用を解除する作用を持つこと、またその結果、CtBPの標的遺伝子であるE-カドヘリン(上皮マーカー分子)の発現が保持されて上皮細胞としての性質が保たれていることを見出した。一方、ERKによってMCRIP1がリン酸化されると、CtBPがMCRIP1から解離してプロモーター上に結合出来る様になり、周囲のヒストン修飾を変化させて、E-カドヘリンの発現抑制とEMTを惹起することを明らかにした。また我々は、ERK経路が異常に活性化している多くの癌細胞において、MCRIP1が恒常的にリン酸化されており、その結果MCRIP1がCtBPと結合する能力を失ってEMTが起こり易い状態(即ち、癌細胞の浸潤・転移が起きやすい状態)になっていることを示した(*Molecular Cell*, 2015)。この成果は、「発癌シグナル(ERK経路)による、癌抑制遺伝子(E-カドヘリン)のジーン・サイレンシング」という新たな概念を提示するものであり、発表後すぐにFaculty of 1000のvery good paperに選出された。



3) ストレス顆粒(SG)の形成機構と疾患における形成異常の解明

SGは、小胞体(ER)ストレスなどによって形成される細胞内構造体であり、ストレス応答MAPK経路を阻害して細胞死を抑制する作用を有している。市川班と共同して、細胞のSG形成機構の解析に数理シミュレーションを導入し、RNA結合蛋白質TIA1の多量体化と細胞内輸送が、SG形成の基本原則であることを解明した(*PLoS Comp. Biol.* in press)。

4) MAPKシグナルを生細胞内で可視化するFRETプローブの開発と、p38活性の振動(オシレーション)現象の発見

代表的な3つのMAPK経路(ERK、p38、JNK)の活性化を生細胞内においてリアルタイムで可視化する3種類のFRETプローブを開発することに成功した(*Science Signaling*, 2012)。また、このプローブを用いて、炎症と免疫応答の制御に中心的な役割を担うp38の活性化を単一細胞レベルで連続的に可視

化する実験系を確立し、サイトカインなどによるp38活性化動態を解析した。その結果、p38の活性化は振動しており、活性化と不活性化が周期的に繰り返されていることを見出した。さらに、p38活性の振動現象が、免疫応答の制御に重要であることを見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計17件)

① Ichikawa K, Kubota Y, Nakamura T, Weng JS, Tomida T, Saito H and Takekawa M. MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-mesenchymal transition by regulating the co-repressor CtBP. *Molecular Cell* 58: 35-46 (2015) 査読有

② Ohshima D, Matsuzaki-Arimoto K, Tomida T, Takekawa M and Ichikawa K. Spatio-temporal dynamics and mechanisms of stress granule assembly. *PLoS Comp. Biol.*, in press 査読有

③ Sato Y, Goto E, Shibata Y, Kubota Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Inoue J, Takekawa M, Tokunaga F, Fukai S. Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 22: 222-229 (2015) 査読有

④ Tomida T. Visualization of the spatial and temporal dynamics of MAPK signaling using fluorescence imaging techniques. *J Physiological Sci.* 65, 37-49 (2015). 査読有

⑤ 武川睦寛 ストレス応答MAPK経路およびp53による中心体複製の制御 *生化学* 86巻 666-670 (2014). 査読有

⑥ 松崎(有本)京子, 武川睦寛, 斎藤春雄 細胞質内ストレス顆粒の形成と細胞生存への寄与 *放射線生物学* 49巻3号 248-262 (2014). 査読無

⑦ Nakamura T, Saito H and Takekawa M. SAPK pathways and p53 cooperatively regulate PLK4 activity and centrosome integrity under stress. *Nature Commun.* 4:1775 doi: 10.1038/ncomms2752 (2013). 査読有

⑧ 久保田祐二, 武川睦寛 p38とそのカスケード *Clinical Neuroscience* 特集「神経系のMAPキナーゼ」31巻 657-660 (2013). 査読無

⑨ 久保田祐二, 武川睦寛 Ras/MAPK症候群および孤発性癌で認められるMEK遺伝子変異体の異常活性化機構と疾患発症メカニズ

ムの解明生物物理化学 57 巻 s21(2013). 査読無

⑩ Tomida, T., Oda, S., Takekawa, M., Iino, Y., Saito, H. The temporal pattern of stimulation determines the extent and duration of MAPK activation in a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Science Signaling*. 5: ra76 (2012). 査読有

⑪ 中村貴紀, 武川睦寛 JNK/p38-API 経路とストレス反応系 日本臨床増刊号「分子標的薬：がんから他疾患までの治療をめざして」70 巻 218-224 (2012). 査読無

⑫ 中村貴紀, 武川睦寛: 細胞内シグナル伝達と分子標的薬剤の作用機構 *Medical Science Digest* 38, 14-17 (2012). 査読無

⑬ Kubota Y, O'Grady P, Saito H and Takekawa M. Oncogenic Ras abrogates MEK SUMOylation that suppresses the ERK pathway and cell transformation. *Nature Cell Biology* 13, 282-291 (2011). 査読有

⑭ Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kojima K, Kishikawa T, Shibata C, Takekawa M. Yoshida H, Omata M, and Koike K. Receptor for activated protein kinase C: Requirement for efficient microRNA function and reduced expression in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* 6, e24359 (2011) 査読有

⑮ 武川睦寛, 久保田裕二: がん遺伝子産物 Ras は MEK の SUMO 化による ERK 経路の不活性化を阻止し発がんを導くライフサイエンス新着論文レビュー (オンラインジャーナル) (2011). 査読無
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/2360>

⑯ 武川睦寛: ストレス顆粒によるストレス応答シグナルの制御と癌 実験医学増刊 29, 125-131 (2011). 査読無

⑰ Takekawa M., Kubota Y, Nakamura T and Ichikawa K. Regulation of stress-activated MAP kinase pathways during cell fate decisions. *Nag. J. Med. Sci.* 73, 1-14 (2010). 査読有

[学会発表] (計 69 件)

① Takekawa, M. MCRIP1, a novel ERK substrate, mediates ERK-induced epigenetic gene silencing during epithelial-to-mesenchymal transition. 2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Tokyo, Japan, Jan. 23-24, (2015).

② 武川睦寛 癌およびRas/MAPK症候群におけるMEK変異体の異常活性化機構と抗癌剤抵抗

性 第37回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、横浜、11月25-27日、2014年

③ Takekawa, M. MCRIP1, a novel ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-to-mesenchymal transition. 第73回日本癌学会総会(ワークショップ). Yokohama, Japan, Sep. 25-27, (2014).

④ 武川睦寛 癌およびRas/MAPK症候群におけるMEK変異体の異常活性化機構と抗癌剤抵抗性 日本薬学会134年会(シンポジウム)、熊本、3月27-30日、2014年

⑤ 武川睦寛 ストレス応答MAPキナーゼ経路の制御機構と疾患におけるその破綻「ストレス応答制御に基づく次世代型健康寿命化学の研究拠点形成」シンポジウム、東京、3月15日、2014年

⑥ Takekawa, M. MCRIP1, a novel substrate of ERK, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-to-mesenchymal transition. The 20th East Asia Symposium. Tokyo, Japan, Nov. 6-8, (2013).

⑦ 武川睦寛 新規ERK基質分子MCRIP1による上皮間葉転換の制御 第86回日本生化学会大会(シンポジウム)、横浜、9月10-12日、2013年

⑧ 武川睦寛 新規ERK基質分子MCRIP1によるERK依存的ジーンサイレンシングと上皮間葉転換の制御 第69回日本細胞生物学会大会(シンポジウム)、名古屋、6月19-21日、2013年

⑨ Takekawa, M. Regulation of human MAPK pathways and its failure in cancer. 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Tokyo, Japan, Feb. 1-2, (2013).

⑩ 武川 睦寛 MAPキナーゼシグナルによる細胞運命決定機構と癌におけるその破綻、第67回病態生化学セミナー、島根、11月30日、2012年

⑪ Takekawa, M. A novel role of the stress-responsive MAPK pathways in preventing centrosome amplification and its failure in cancer. 第71回日本癌学会学術総会 (Symposium), Sapporo, Sep. 19-21, (2012).

⑫ 武川 睦寛 MAPキナーゼ情報伝達経路による細胞運命決定機構と癌におけるその破綻、第5回Symphony、東京、9月1-2日、2012年

⑬ 武川 睦寛 MAPキナーゼ・シグナル伝達システムの活性制御機構と癌におけるその破綻

第63回日本電気泳動学会総会（シンポジウム）、那覇、8月21日、2012年

⑭ Takekawa, M. Regulation of cell-fate decisions by MAPK signaling pathways and its failure in cancer. Nagoya University GCOE program: Cancer science seminar. Nagoya, Japan, Jul. 10 (2012).

⑮ Takekawa, M. Regulation of cell-fate decisions by MAP kinase signaling pathways and its failure in cancer. 39th IMSUT Founding Commemorative Symposium. Tokyo, Japan, Jun. 1 (2012).

⑯ Takekawa, M. A novel role of the stress-responsive MAP kinase pathways in regulation of the numeral integrity of centrosomes. MBSJ2011（第34回日本分子生物学会年会）ワークショップ, Yokohama, Japan, Dec. 13-16, (2011).

⑰ Takekawa, M. Regulation of ERK signaling and cell transformation by protein SUMOylation. 第70回日本癌学会学術総会 Symposia, Nagoya, Japan, Oct. 3-5 (2011).

⑱ 富田太一郎、斎藤春雄 線虫の環境応答行動における情報伝達の可視化～MAPK リン酸化シグナルのライブイメージング 第82回日本動物学会シンポジウム、旭川、9月21日、2011年

⑲ 武川睦寛、蛋白質 SUMO 化による ERK MAP キナーゼ経路と発癌の制御、平成 22 年度文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、東京、2月9日、2011年

⑳ 武川睦寛、ストレス顆粒形成におよび SUMO 化による細胞生死の制御と癌、第 19 回日本 Cell Death 学会学術集会シンポジウム、名古屋、7月31日、2010年

㉑ 武川睦寛、ストレス顆粒形成および SUMO 化による MAP キナーゼ経路の制御と癌、群馬大学生体調節研究所・名古屋大学環境医学研究所第7回合同シンポジウム、名古屋、11月19日、2010年

㉒ 武川睦寛、蛋白質 SUMO 化による MAPK シグナルと発癌の制御、BMB2010（第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会）ワークショップ、神戸、12月8日、2010年

〔図書〕（計3件）

① Takekawa M., and Kubota Y. Mitogen-activated protein kinase signaling and cancer. “*Protein Modifications in Pathogenic*

Dysregulation of Signaling” (Springer), (2015) in press

② Ohshima D, Arimoto-Matsuzaki K, Tomida T, Takekawa M, and Ichikawa K. Stochastic Simulation of Stress Granules. “*Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling*” (Springer), (2015) in press

③ 久保田祐二、中亮介、武川睦寛：ユビキチンおよびユビキチン様タンパク質による MAP キナーゼ経路の制御 実験医学 30, 72-79 (2012).

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSM/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武川 睦寛 (TAKEKAWA MUTSUHIRO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30322332

(2) 研究分担者

富田 太一郎 (TOMIDA TAICHIRO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70396886

(3) 連携研究者