

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月10日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300329

研究課題名（和文） 癌抑制遺伝子産物 Mig-6 の新規機能とその制御機構の解明

研究課題名（英文） Novel functions and regulatory mechanisms of tumor suppressor Mig-6

研究代表者

北川 雅敏（KITAGAWA MASATOSHI）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

研究成果の概要（和文）：

Mig-6はEGF受容体と結合しEGFシグナル伝達を阻害する蛋白質とされ、そのノックアウトマウスでは上皮系の癌が多発する。さらに数種のヒト癌で変異が報告されており、癌抑制遺伝子と考えられている。しかしながらMig-6のEGF受容体阻害のメカニズムとMig-6のリン酸化等の翻訳後修飾を介した制御機構については未知である。本研究では、Mig-6のリン酸化を解析した結果Chk1がMig-6キナーゼである事を見出した。さらにEGF刺激によりMig-6がリン酸化され、それはChk1のノックダウンにより抑制された。また、EGF刺激によりChk1のS280のリン酸化はPI3K/Akt/S6Kの経路で起こる事がわかった。質量分析により、Mig-6のChk1による主なリン酸化部位はSer251である事、S251A変異体はEGFRの活性化を抑制する事を見出した。さらにEGFRの活性化と細胞増殖能はChk1のノックダウンにより抑制され、それはMig-6のノックダウンで回復した。以上よりChk1はMig-6のS251をリン酸化してMig-6活性を抑制する、このようにChk1はEGFシグナリングの正の制御因子として機能する事は、Chk1の新機能である。

研究成果の概要（英文）：

Mig-6 acts as an inhibitor of EGF signaling *via* binding with the EGF receptor (EGFR). Downregulated expression of the *Mig-6* gene is observed in breast carcinomas, in which it correlates with reduced overall survival. *Mig-6*-deficient mice show hyperactivation of endogenous EGFR and develop spontaneous tumors in various organs. Therefore, Mig-6 is an important tumor suppressor. However, its post-translational modifications and regulatory mechanisms have not been elucidated. Here, we investigated the phosphorylation of human Mig-6 and found that Chk1 phosphorylated Mig-6 *in vivo* as well as *in vitro*. Moreover, EGF stimulation promoted phosphorylation of Mig-6 without DNA damage and the phosphorylation was inhibited by depletion of Chk1. EGF also increased Ser280-phosphorylated Chk1, a cytoplasmic-tethering form, via PI3K pathway. Mass spectrometric analyses suggested that Ser 251 of Mig-6 was a major phosphorylation site by Chk1 *in vitro* and *in vivo*. Substitution of Ser 251 to alanine increased inhibitory activity of Mig-6 against EGFR activation. Moreover, EGF-dependent activation of EGFR and cell growth were inhibited by Chk1-depletion, and were rescued by co-depletion of Mig-6. Our results suggest that Chk1 phosphorylates Mig-6 on Ser 251, resulting in the inhibition of Mig-6, and that Chk1 acts a positive regulator of EGF signaling. This is a novel function of Chk1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：リン酸化、シグナル伝達、細胞増殖

### 1. 研究開始当初の背景

上皮増殖因子 (EGF:Epidermal Growth Factor)は古典的な増殖因子の一つで、その受容体である EGFR(EGF-receptor)は細胞内にチロシンキナーゼドメインをもつ RTKs(Receptor tyrosin kinases)に属する。Mig-6はEGF受容体と結合しEGFシグナル伝達を阻害する蛋白質とされ、そのノックアウトマウスでは上皮系の癌が多発する。さらに数種の人癌で変異が報告されており、癌抑制遺伝子と考えられている。しかしながらMig-6のEGF受容体阻害のメカニズムとMig-6のリン酸化等の翻訳後修飾を介した制御機構については未知である。

### 2. 研究の目的

本研究では分子生物学的手法、生化学的手法を用いて、Mig-6の翻訳後修飾とその責任酵素を同定し、EGFシグナル伝達における機能を明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

キナーゼアッセイ、キナーゼ阻害剤、免疫沈降、ウエスタンブロット、リン酸化抗体、細胞増殖アッセイ、質量分析等を駆使して、目的分子(Mig-6、EGFR、MAPK等)の翻訳後修飾とEGFシグナル伝達における機能と制御機構を解析する。

### 4. 研究成果

- ① 多種のキナーゼ阻害剤を用いた実験で、Mig-6のリン酸化がChk1阻害剤によって阻害されることを見出した。
- ② EGF刺激によりMig-6のリン酸化が亢進する事
- ③ *in vitro*でChk1がMig-6をリン酸化する事
- ④ Chk1のsiRNA導入によりEGF刺激依存的なMig-6のリン酸化が抑制される事。
- ⑤ 質量分析を用いた解析で、Mig-6のリン酸化部位を解析し、特にSer251、Ser301が*in vivo*でリン酸化されている事。
- ⑥ *in vitro*でMig-6のSer251、S301がChk1によりリン酸化される事。
- ⑦ 質量分析を用いた解析で、EGF刺激によりChk1のSer280のリン酸化亢進が見られる。
- ⑧ Chk1のsiRNA導入によりEGF刺激依存的なMig-6-S251のリン酸化が抑制される事
- ⑨ Chk1のsiRNA導入によりEGFシグナル伝達(EGFR活性化、MAPK活性化)が抑制される事
- ⑩ Chk1のS280のリン酸化はPI3K/Akt/S6Kの

経路で起こる事

以上の成果をまとめて、EMBO Jに、Chk1 phosphorylates the tumor suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling. とし て報告した。

### 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 18 件)

1. Egawa, K., Kitagawa, K., Inoue K., Takayama, M., Takayama, C., Saitoh, S., Kishino, T., Kitagawa, M., Fukuda, A: Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med.* 4, 163ra157,1-10, 2012.
2. Suzuki, S., Ohashi, N. and Kitagawa, M.: Roles of the Skp2/p27 axis in the progression of chronic nephropathy. *Cell Mol Life Sci* 10.1007/s00018-012-1232-x in press.
3. Liu, N., Matsumoto M., Kitagawa K., Kotake Y., Suzuki S., Shirasawa S., Nakayama K.I., Nakanishi M., Niida H., Kitagawa M.: Chk1 phosphorylates the tumor suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling. *EMBO J.* 31:2365-2377, 2012.
4. Kitagawa, M., Kotake, Y. and Ohhata, T.: Long noncoding RNA involved in cancer development and cell fate determination. *Curr. Drug Targets* 13:1616-1621, 2012.
5. Kitagawa, K. and Kitagawa, M.: The SCF ubiquitin ligases involved in hematopoietic lineage. *Curr. Drug Targets* 13:1641-1648, 2012.
6. Niida, H. and Kitagawa, M.: Regulation of DNA replication licensing. *Curr. Drug Target* 13:1588-1592, 2012.
7. Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa A., Ohashi, N., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H., Liu, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Yamamoto, T. and Kitagawa, M.: The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice is canceled by p27<sup>Kip1</sup> deficiency in Skp2<sup>-/-</sup> p27<sup>-/-</sup> mice. *PLoS ONE*, 7: e31249, 2012.
8. Fukasawa, H., Fujigaki Y., Yamamoto, T., Hishida, A. and Kitagawa, M.: Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway and Organ Fibrosis. *Current*

- Medicinal Chemistry* (review article) 19 893-900, 2012.
9. Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa A., Ohashi, N., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H., Hishida, A., Yamamoto, T. and Kitagawa M.: Up-regulation of Cks1 and Skp2 with TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B signaling in chronic progressive nephropathy. *Genes Cells*. 16: 1110-1120, 2011.
  10. Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M. and Xiong, Y. (\*co-corresponding authors): Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene. *Oncogene* 30:1956-1962, 2011.
  11. Nakajima, K., Inagawa, M., Uchida, C., Okada, K., Kojima, M., Kubota, K., Noda, M., Ogawa S., Shirato, H., Sato M., Suzuki-Migishima, R., Hino, T., Kitagawa, M. and Takeuchi, T.: Coordinated regulation of differentiation and proliferation of embryonic cardiomyocytes by a Jumonji (Jarid2)-cyclin D1 pathway. *Development* 138:1771-1782, 2011.
  12. Uchida, S., Watanabe, N., Kudo, Y., Yoshioka, K., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Nakagama, H., Poon, R.Y.C., and \*Yamashita, K. (2011). SCF $\beta$ TrCP mediates stress-activated MAP kinase-induced Cdc25B degradation. *J. Cell Sci.* 124, 2816-2825.
  13. Kitagawa, K., Kotake, Y., Hiramatsu, Y., Liu, N., Suzuki, S., Nakamura, S., Kikuchi, A. and Kitagawa, M.: GSK3 regulates the expression of human and mouse c-Myb via different mechanisms. *Cell Div.* 5: 27, 2010.
  14. Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M. and Ueda, K.: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus- encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403: 194-197, 2010.
  15. Togawa, A., Sfakianos, J., Ishibe, S., Suzuki, S., Fujigaki, Y., Kitagawa, M., Mellman, I. and Cantley, L.G.: Hepatocyte Growth Factor stimulated cell scattering requires ERK and Cdc42-dependent Tight Junction Disassembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400: 271-277, 2010.
  16. Sakai, S., Ohoka, N., Onozaki, K., Kitagawa, M., Nakanishi, M. and Hayashi, H.: Dual mode of regulation of Cdc25A protein by TRB3. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 1112-1116, 2010.
  17. Fukasawa, H., Yamamoto, T., Fujigaki, Y., Misaki, T., Ohashi, N., Takayama, T., Suzuki, S., Mugiya, S., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Hayashi, H., Ozono, S.,

Kitagawa, M. and Hishida, A.: Reduction of transforming growth factor- $\beta$  type II receptor is caused by the enhanced ubiquitin-dependent degradation in human renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 127: 1517-1525, 2010.

18. Gao, Y., Gu, C., Li, S., Tokuyama, T., Yokota, N., Nakayama, K.I., Kitagawa, M. and Namba, H.: p27 modulates tropism of mesenchymal stem cells toward brain tumors. *Exp. Ther. Med.* 1: 695-699, 2010.

[学会発表] (計 4 件)

1. 北川雅敏、劉寧: Chk1 phosphorylates the tumor suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling. 第 45 回日本発生物学会、第 64 回日本細胞生物学会合同年会、平成 24 年 5 月 31 日、神戸
2. 北川雅敏: 長鎖ノンコーディング RNA ANRIL は *INK4* locus の転写抑制を介し細胞増殖に関与する。日本細胞生物学会平成 23 年 6 月 27 日、札幌
3. 北川雅敏: Chk1 の新機能、日本生化学会、日本生化学会、平成 23 年 9 月 22 日 横浜
4. 北川雅敏: Phosphorylation-mediated regulation of the tumor suppressor Mig-6. 日本癌学会 平成 23 年 10 月 4 日 名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 2 件)

名称: 癌の転移性及び浸潤能の検査方法  
発明者: 北川雅敏、高芸、北川恭子  
権利者: 浜松医科大学  
種類: 特許  
番号: 4887505 号  
取得年月日: 平成 23 年 12 月 22 日  
国内外の別: 国内

名称: 癌治療用組成物  
発明者: 北川雅敏、高芸、北川恭子  
権利者: 浜松医科大学  
種類: 特許  
番号: 4967137 号  
取得年月日: 平成 24 年 4 月 13 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

[http://www.hama-med.ac.jp/uni\\_education\\_igakubu\\_igaku\\_seika1.html](http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seika1.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北川 雅敏 (KITAGAWA MASATOSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

### (2) 研究分担者

松本 雅記 (MATSUMOTO MASAKI)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60380531

### (3) 連携研究者

なし