

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 6 月 4 日現在

機関番号：12601
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23890077
 研究課題名（和文）MEKのSUMO化によるERK経路の制御機構と発癌における異常の解明
 研究課題名（英文）Regulation of the ERK-MAPK cascade and cell-transformation by MEK sumoylation
 研究代表者
 久保田 裕二（Kubota Yuji）
 東京大学・医科学研究所・助教
 研究者番号：70614973

研究成果の概要（和文）：ERK経路（Raf-MEK-ERK）は増殖や分化のみならず、癌をはじめとする様々な疾患に深く関与する。我々は最近、MEKがSUMO化修飾を受ける事を新たに見出した。そこで、本研究ではその生理的意義と疾患への関与を検証した。その結果、SUMO化されたMEKはキナーゼ活性が著しく低下していた事から、MEKのSUMO化はERK経路を負に制御している事が明らかとなった。また、癌遺伝子RasはMEKのSUMO化を阻害する事を見出した。従ってRasは、Rafの活性化のみならずMEKの脱SUMO化を行う事で、ERK経路の異常活性化と発癌を強く惹起している事が示された。

研究成果の概要（英文）：We found MEK sumoylation strongly attenuated its kinase activity and inhibited the ERK pathway by disrupting the specific docking interaction between MEK and ERK. Interestingly, the Ras oncogene inhibited MEK sumoylation, and forced enhancement of MEK sumoylation suppressed Ras-induced cell transformation. These data indicates that the ablation of MEK sumoylation by the specific oncogene contributes to carcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：癌、ERK、SUMO、MAPK

1. 研究開始当初の背景

ERK-MAPキナーゼ経路 (Raf-MEK-ERK) は、様々な増殖刺激により活性化され、細胞増殖や分化などを制御すると共に、その制御異常が癌を始めとする疾患に深く関与する重要なシグナル伝達システムである。申請者らは最近、ERK経路の新規活性制御機構として、この経路のMAPKKであるMEK1及びMEK2が、細胞内でSUMO (small ubiquitin-like modifier) 化される事を見出した。SUMO化は、ユビキチン様分子であるSUMOが、SUMO活性化酵素 (E1)、SUMO結合酵素 (E2)、SUMOリガーゼ (E3) という3つの酵素の作用によりそのC末端のグリシン残基を介して標的蛋白質分子内のリジン残基にイソペプチド結合する翻訳後修飾であり、標的蛋白質の性質を様々に変化させる事が知られている。近年、細胞内シグナル伝達分子のSUMO化が細胞周期の制御、遺伝子の発現調節といった多彩な生命現象に関与することが明らかにされてきた。しかしながら、細胞の増殖・発癌制御において中心的な役割を担うERK-MAPK経路の活性制御に、こうしたSUMO修飾が関与する事はこれまで不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、MEKがSUMO化される事による機能変化とその生理的意義、並びに疾患への関与を解明すべく、検証を行った。また近年、孤発性癌や遺伝性癌、先天性疾患 (Ras/MAPK症候群) においてMEKの遺伝子変異が多数同定されている事に着目し、これらの変異体におけるSUMO化への影響を解析し、その発症メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

培養細胞に一過的あるいは恒常的にMEK蛋白質 (野生型あるいは変異体) を発現させ、各種検討に用いた。また、リコンビナント蛋白質としてMEKを大腸菌発現系より大量精製し、質量分析やキナーゼアッセイ、結合実験など生化学的解析に使用した。また、各種MEK変異体や癌遺伝子導入による効果を検討するため、MEK安定発現細胞株の増殖率、悪性形質転換効率を測定した。

4. 研究成果

哺乳類の細胞には4種類のSUMOアイソフォーム (SUMO1~SUMO4) が存在しており、各アイソフォームは異なる基質特異性を有する事が知られている。これらのSUMOアイソフォームと、HAタグを付加したMEK1またはMEK2とを共にHEK293細胞へと一過的導入し、ウェスタンブロット解析を行ったところ、MEK1およびMEK2はいずれもSUMO1特異的に翻訳後修飾を受ける事が分かった。また、組換えタンパク質を用いた *in vitro* でのSUMO化アッセイや、大腸菌内SUMO化再構成系においても、MEK1およびMEK2はSUMO1の選択的な修飾を受けた。更に興味深い事に、MEKのSUMO化の状態はその細胞内局在に依存して変化しており、ERK経路の活性化の起点となる細胞膜において特に強く検出された。

次に我々はMEKのSUMO化部位を同定するため、SUMO化MEKを大腸菌発現系より精製し、質量分析を行った。その結果、MEK1の104番目のリジン残基が選択的にSUMO化される事を見出した。さらに、MEK1の結晶構造から、このリジン残基はタンパク質の表面に露出しており、且つキナーゼドメインのNローブに局在している事がわかった。また、このMEK1分子内104番目のリジン残基は、MEK2における108番目のリジン残基と相同であり、両分子間でSUMO化部位が保存されている事を確認した。また興味深い事に、このリジン残基は脊椎動物のみならず線虫やショウジョウバエなどのMEKオルソログにも認められる事から、MEKのSUMO化修飾が種を越えて保存されている可能性が示唆された。

次にMEKのSUMO化の意義を解明するため、まず我々はSUMO化がERK経路の活性制御に影響を与えるか検討を行った。SUMO化されたMEK1を精製して *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、MEKのSUMO化はRafによるMEKのリン酸化には影響しないものの、MEKによるERKのリン酸化を著しく阻害する事が明らかとなった。更に、GSTプルダウンアッセイの結果、SUMO化されたMEKはERKと共沈せず、ERKに対する結合能をほぼ完全に消失している事が示された。以上の結果から、MEKのSUMO化はMEK-ERK間の特異的なドッキング相互作用を抑制する事で、MEKのキナーゼ活性を阻害している事が明らかになった。

次に我々は、MEK の SUMO 化が細胞においても ERK 経路の活性調節に寄与しているかどうかを検証するため、SUMO 化の起こらない MEK 点変異体を MEK1 ノックアウトマウスに由来するマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) に再導入した。こうした SUMO 化の起こらない MEK1 変異体を発現する細胞では、FGF の刺激による ERK のリン酸化が増強かつ遷延化した。また、同細胞では ERK 経路の標的タンパク質である cyclin D1 の発現が増強し、細胞増殖能も有意に亢進した。これらの結果から、MEK の SUMO 化は細胞において ERK 経路を負に制御し、増殖・分化など重要な細胞機能の調節に寄与することが明らかになった。

そこで更に、がん遺伝子を MEF に導入して軟寒天培地でのコロニー形成率 (悪性形質転換の指標) を測定したところ、SUMO 化の起こらない MEK1 変異体を発現する細胞では、活性型 ErbB2 や活性型 B-Raf などのがん遺伝子産物による悪性形質転換が有意に増強した。したがって、MEK の SUMO 化は ERK 経路の過剰な活性化を防ぎ、適切な増殖シグナル強度へと調節する事で発がんの抑制にも寄与している事が考えられた。

上記実験過程において、興味深い事に活性型 Ras 遺伝子を発現するヒト癌細胞株では、MEK-SUMO 化がほぼ完全に消失している事が分かった。そこで、近年開発された UFDS (Ubc9 fusion-directed SUMOylation) 法を用いて、細胞内 MEK を強制的に SUMO 化したところ、活性型 Ras による悪性形質転換が有意に抑制されたことから、Ras による SUMO 化阻害が Ras の発がん活性に寄与する事が示された。これらの結果から、がん遺伝子産物 Ras は Raf を活性化すると同時に、MEK の SUMO 化による不活性化を阻止するという二重の機構を介して、ERK 経路を強く且つ効率よく活性化して発がんを導く事が明らかになった (図 1)。

次に我々は、活性型 Ras が MEK の SUMO 化を阻害する分子機構を解明するため、まず MEK の SUMO 化を担う SUMO リガーゼの同定を試みた。SUMO リガーゼは SUMO 結合酵素 (Ubc9) および標的蛋白質 (MEK) の両者と結合し近接させる事で SUMO 化反応を促進する。そこで、Ubc9 と MEK の両分子に結合するタンパク

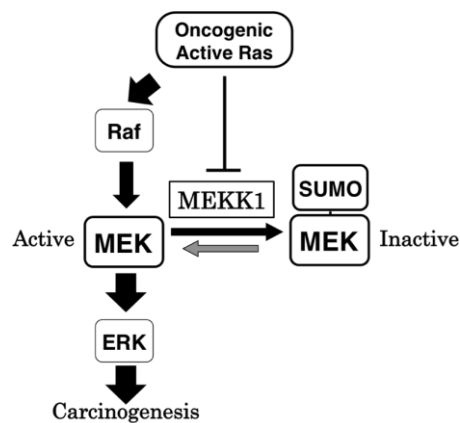


図1 MEKのSUMO化によるERK経路の負の活性制御、および癌遺伝子Rasによるその破綻 (モデル)

質を探索した結果、MAP キナーゼキナーゼキナーゼの一種である MEKK1 が得られた。実際に、細胞内 MEKK1 をノックダウンする事で MEK の SUMO 化が著しく抑制され、更に *in vitro* の SUMO 化反応系においても MEKK1 は MEK の SUMO 化を亢進させた。以上の結果から、MEKK1 は MEK に特異的な SUMO リガーゼとしても機能している事が明らかになった

興味深いことに、活性型 Ras は MEKK1 のキナーゼドメインに直接結合する事が知られている。そこで、活性型 Ras が MEKK1 と相互作用することで、ubc9-MEKK1-MEK 分子間結合にどのような影響を及ぼすか、共沈実験によって検証した。その結果、活性型 Ras は MEKK1 と Ubc9 との結合を著しく増強させる事が分かった。これらの知見から、活性型 Ras は Ubc9 と MEKK1 との結合を増強し両者の解離を阻害する事で SUMO 化サイクルを停止させ、MEK の SUMO 化修飾を抑制しているものと考えられた。

近年、孤発性癌や先天性疾患において多数の MEK 遺伝子変異が同定されている。そこで、本研究の知見を基に、新規に同定されたこれら MEK 遺伝子変異が、SUMO 化にどのような影響を及ぼすか検討した。In vivo、および *in vitro* 両面から各 MEK 変異体の SUMO 化を観察した結果、今回解析した複数の MEK 変異体において SUMO 化異常が観察された。今後は、これら MEK 変異体がどのような分子機構により SUMO 化異常を導くのか、そして MEK 活性の変化がどのようなプロセスを経て個体の重篤な疾患を惹起するのか、詳細な検討を行う予定である。

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1件)

- ① Yuji Kubota, Pauline O' Grady, Haruo Saito, and Mutsuhiro Takekawa
Oncogenic Ras abrogates MEK SUMOylation that suppresses the ERK pathway and cell transformation. *Nature Cell Biology*, 13: 282-291 (2011) (査読有り)

[学会発表] (計6件)

- ① 久保田 裕二、武川 睦寛
「癌および先天性Ras/MAPK症候群における変異型MEKの異常活性化メカニズムの解明」
平成24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」冬期シンポジウム
2013年01月30日 学術総合センター (東京都)

- ② 久保田 裕二、武川 睦寛
「Molecular basis of constitutively active MEK mutants in the congenital Ras/MAPK syndromes and sporadic cancers.」
第35回 日本分子生物学会年会
2012年12月14日 マリンメッセ福岡 (福岡県)

- ③ 久保田 裕二、武川 睦寛
「癌及び先天性Ras/MAPK症候群におけるMEK変異体の異常活性化機構の解明」
「新学術領域研究」修飾シグナル病 若手ワークショップ
2012年10月03日 ホテルあかね (神奈川県)

- ④ 久保田 裕二、武川 睦寛
「癌遺伝子Rasの新たな発癌機構 -蛋白質SUMO化による細胞増殖ERKシグナル制御と癌におけるその破綻-」
第49回 日本臨床分子医学会学術集会
2012年4月13日 みやこめっせ (京都府)

- ⑤ 久保田 裕二、武川 睦寛
「A novel activation mechanism of MEK1/2 mutants in the congenital Ras/MAPK

syndromes and sporadic cancers.」
第34回 日本分子生物学会年
2011年12月15日 (一般演題)
2011年12月16日 (ポスター発表)
横浜パシフィコ (神奈川県)

- ⑥ 久保田 裕二、武川 睦寛
「Negative regulation of the ERK pathway and cell transformation by MEK SUMOylation」
平成23年度 がん若手研究者ワークショップ
2011年8月31日 アートランドホテル蓼科 (長野県)

[図書] (計1件)

- ① 久保田 裕二、中 亮介、武川 睦寛
実験医学 増刊 シグナル伝達研究最前線
2012 (羊土社) 2012年発行
「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」
(p72-p79)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 裕二 (Kubota Yuji)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号: 70614973