

## がん抑制遺伝子産物 Mig-6 の増殖シグナル制御機構

北川 雅敏

### 1. はじめに

Mig-6 (mitogen-inducible gene-6)/Ralt/Errfi1/Gene33 は上皮増殖因子 (epidermal growth factor: EGF) ファミリー受容体と結合し、そのリガンド結合による活性化を抑制的に制御している。Mig-6 の欠損マウスでは皮膚がんの発生が亢進し、ヒトのがんで Mig-6 の発現抑制がみられることから、がん抑制遺伝子と考えられている。それでは正常な細胞はいかにして Mig-6 の抑制を解除して EGF の増殖シグナルを伝えるのであろうか。我々は、EGF 刺激によりホスファチジルイノシトール 3-リン酸キナーゼ (PI3K)/Akt 経路を介してチェックポイントキナーゼ Chk1 の Ser280 のリン酸化が亢進し、それを引き金に Chk1 が Mig-6 の Ser251 をリン酸化することを見いだした。Ser251 がリン酸化された Mig-6 はその EGF 受容体阻害活性が抑制される。それにより EGF 受容体の抑制が解除されて、EGF シグナル伝達の初期の活性化が促進されると考えられた。本稿では Mig-6 を含む EGF シグナル伝達の制御因子の機能と、EGF シグナル伝達の正の制御機構としての Chk1/Mig-6 経路に関して考察する。

### 2. EGF シグナル伝達経路の概略

EGF シグナル伝達経路は最も有名な増殖因子のシグナル伝達経路の一つである。EGF が EGF 受容体 (EGFR) に結合すると、EGFR ホモ二量体を形成し、細胞内のチロシンキナーゼドメインが活性化して自己リン酸化を起こす。このドメインのチロシンリン酸化を Grb2, PI3K 等の SH2 ドメインを持つ細胞内エフェクター分子が認識して結合し、前者は SOS を介して RAS/MAP キナーゼ経路へとシグナル伝達する<sup>1)</sup>。後者は PI3K/Akt 経路としてシグナル

を伝達する。また、詳細はほかに委ねるが、EGF 経路は多種の経路とクロストークしている。

EGFR は ERBB1/HER1 と呼ばれ、ERBB2/HER2, ERBB3/HER3, ERBB4/HER4 と ERBB ファミリーを形成している。EGFR (ERBB1/HER1) リガンドには EGF 以外に HB-EGF, TGF- $\alpha$ , epiregulin, amphiregulin,  $\beta$ -cellulin が知られている。ERBB2 はリガンドを持たずにホモ二量体で活性化、あるいは EGFR とのヘテロ二量体を形成してさらに強力な活性化状態を示す。ERBB2 の発現亢進や細胞外ドメインを欠失した p95<sup>ERBB2</sup> の発現は下流の RAS/MAP キナーゼ経路の恒常的活性化をもたらし、がん化の原因となる。ERBB3 のリガンドは neuregulin-1, 2 とされるが、チロシンキナーゼドメインを持たず、ヘテロ二量体としてシグナルを伝える。ERBB4 は HB-EGF, epiregulin, neuregulin-1-4,  $\beta$ -cellulin がリガンドとされる<sup>1)</sup>。

### 3. EGF シグナル伝達経路の制御因子

EGF シグナル伝達経路の制御因子としては Sprouty が有名である。Sprouty は Grb2 や RAS の GTP アーゼ活性、Raf1 キナーゼの抑制を行うことで EGF シグナル伝達を負に制御している。EGFR は E3 ユビキチンリガーゼである c-Cbl によってユビキチン修飾を受け、ユビキチン修飾依存的なエンドサイトーシスによってその機能を負に制御されている。Sprouty2 がリン酸化されると c-Cbl と結合して c-Cbl による EGFR のユビキチン修飾/エンドサイトーシスを阻害し、RAS/MAP キナーゼ経路を正に調節するという報告もある<sup>2)</sup>。

その他、特に EGFR の制御分子として、SNT-2/FRS2b/FRS3, SOCS3/4/5, LRIG1/Lig-1 等が報告されている<sup>1)</sup>。SNT-2 はミリスチル化により細胞膜にアンカーされるドッキングタンパク質で、ERK2 や EGFR と結合して EGF シグナリングを抑制的に制御している<sup>3)</sup>。SH2 ドメインを持つサイトカインシグナリングの阻害タンパク質 SOCS (suppressor of cytokine signaling) 3~5 は EGF 刺激に非依存的に EGFR と結合し、EGF 刺激によるシグナル伝達を抑制する<sup>4)</sup>。これは E3 ユビキチンリガーゼ c-Cbl を SOCS ボックスを介してリクルートすることにより EGFR のユビキチン依存的分解を亢進するためと考えられている。膜貫通

浜松医科大学医学部分子生物学講座 (〒431-3125 静岡県浜松市東区半田山 1-20-1)

**Function of tumor suppressor protein Mig-6 in growth signaling**

**Masatoshi Kitagawa** (Department of Molecular Biology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3125, Japan)

タンパク質である LRIG1/Lig-1 は細胞外領域にイムノグロブリン様ドメインを持ち、EGF 刺激により転写誘導される。LRIG1 はその細胞外ドメインを介して ERBB1~4 のすべてと結合する。EGF 刺激により発現亢進した LRIG1 は ERBB と結合し、c-Cbl を ERBB にリクルートして ERBB のユビキチン依存的分解を促進することで、EGF シグナリングのネガティブフィードバック機構として機能していると考えられる<sup>5)</sup>。

#### 4. Mig-6 の構造と機能および発現制御機構

ヒト *Mig-6/Errfi1* 遺伝子は 1 番染色体 p36 領域にあり、その遺伝子産物 Mig-6 タンパク質の構造を図 1 に示す。mRNA は全長の Mig-6 (Mig-6L) と選択的スプライシングによってアミノ酸 67~142 の領域が欠失した Mig-6S として転写される。N 末端から 1~38 に CRIB (Cdc42/Rac interacting and binding) ドメイン、148~158 に SH3 (Src homology3) ドメイン、246~253 に 14-3-3 結合ドメイン、264~424 に AH (Ack homology) ドメイン、323~372 に EGFR 結合ドメイン、C 末端の 452~456 に PDZ (binding site for PSD95/Dlg/ZO-1) ドメインを有する。これらを介して Cdc42, IκBα, 14-3-3, EGFR, c-Abl 等種々のタンパク質と結合するアダプタータンパク質である (図 1)。Mig-6 はリガンドである EGF と結合した EGFR の細胞内ドメインと結合する<sup>6)</sup>。Mig-6 タンパク質は分子量 49,909 で、すべての EGF 受容体ファミリー (ERBB1~4) と細胞内で結合し、その二量体形成を阻害し、チロシンキナーゼ活性を負に制御している<sup>6)</sup>。

DePinho のグループは、*Mig-6* のノックダウンにより

EGFR の活性化が亢進し、EGFR の安定性も上がり、EGF シグナリングが増強されることを示した<sup>7)</sup>。さらにこのメカニズムは、Mig-6 と結合した EGFR が前期エンドソームに取り込まれ、後期エンドソームに局在する SNARE 構成因子である STX8 と Mig-6 を介して結合し、EGFR の分解を誘導することで説明された。

*Mig-6* 遺伝子はさまざまなストレスによって転写誘導される immediate early response gene の一種と考えられる<sup>8)</sup>。低酸素状態で HIF-1α (hypoxia-inducible factor-1α) は ARNT (Ah-receptor nuclear translocator) とヘテロ二量体を形成して Mig-6 を転写誘導する。一方で Mig-6 は、EGF やインスリン等の増殖因子刺激で Ras-MAP キナーゼ経路を介して転写誘導され、EGF 受容体を抑制し、EGF シグナル伝達のネガティブフィードバックに関与している。この EGF による Mig-6 転写誘導はレチノイン酸により阻害される。

#### 5. がん抑制遺伝子としての Mig-6 の機能

上記の DePinho のグループは、膠芽腫において *Mig-6* 遺伝子の欠失変異が約 18% でみられること、同細胞株では 50% で Mig-6 の低発現があることを報告している<sup>7)</sup>。さらに膠芽腫細胞株を用い、*Mig-6* のノックダウンによりそのソフトアガーコロニー形成能が亢進することから、がん抑制遺伝子であるとしている<sup>7)</sup>。膠芽腫のほか、肝細胞がん、非小細胞肺がん、子宮内膜がん、甲状腺がん等で *Mig-6* の変異や発現低下がみられ、甲状腺がん等では Mig-6 の発現の高いものは予後がよいという結果も報告されている<sup>9)</sup>。

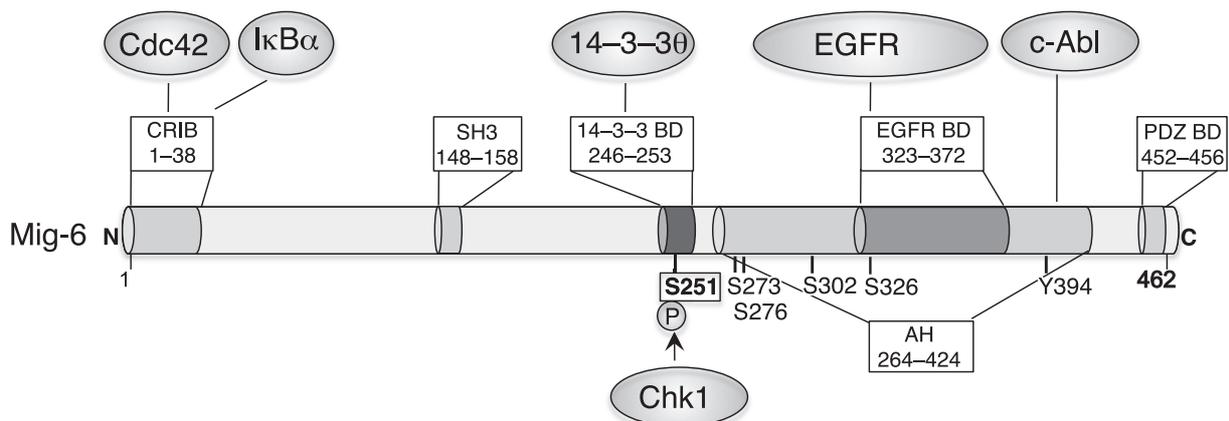


図 1 ヒト Mig-6 のリン酸化部位と結合タンパク質

ヒト Mig-6 は 462 アミノ酸からなり、N 末端から CRIB ドメイン、SH3 ドメイン、14-3-3 結合ドメイン (14-3-3BD)、AH ドメイン、その中に EGFR 結合ドメイン (EGFR BD)、C 末端に PDZ ドメイン (PDZ BD) がある。CRIB ドメインに Cdc42 や IκBα、14-3-3 結合ドメインに 14-3-30、EGFR 結合ドメインに EGFR および c-Abl が結合することが報告されている。図中の S (Ser), Y (Tyr) は細胞内でリン酸化されるアミノ酸を示す。Chk1 により S251 がリン酸化され、それにより 14-3-30 が結合してくる。

さらに Ferby らの報告によると, *Mig-6* ノックアウト (KO) マウスはほぼ正常に発生するが, 種々の臓器においてがん発生頻度が増加した<sup>10)</sup>. さらに皮膚がんを誘導すると非常に高頻度で皮膚がんを発症した. これは EGF シグナリングが暴走したため, EGFR 阻害剤のゲフィチニブ (gefitinib) は高い治療効果を示す. また *Mig-6* KO マウスとキナーゼドメインを欠く EGFR を持つマウスを交配させると, この高発がん性が抑制された. 以上より *Mig-6* は EGF シグナリングの抑制能を持つがん抑制遺伝子と考えられる.

## 6. *Mig-6* のアポトーシス抑制能

*Mig-6* が EGF シグナル伝達を抑制する機能を持つことに反して, *Mig-6* の発現亢進がみられるがん細胞が少なくない. このパラドックスは *Mig-6* のアポトーシス抑制能で説明される. *Mig-6* の過剰発現により細胞周期 (G1/S/G2/M) の分布に大きな変化はない. しかし *Mig-6* の過剰発現はサバイバル因子の一つとして考えられている PARP-1 (poly ADP ribosyl polymelase 1) の発現を亢進してアポトーシスの抑制に働く. つまり, ヒトのがんにおける *Mig-6* の高発現はがん細胞の生存に寄与していると考えられる<sup>11)</sup>.

Ferby のグループはごく最近, *Mig-6* KO マウスにおいて乳腺細胞のアポトーシスが抑制されており, 乳腺の形成不全が起こることを見いだした<sup>12)</sup>. 乳腺上皮細胞の初代培養において EGF を枯渇させるとカスパーゼが活性化するが, *Mig-6* KO ではこれが抑制された. このとき EGFR 阻害剤はアポトーシスを亢進させ, *c-Abl* 阻害剤や *c-Abl* のノックダウンによりアポトーシスは抑制された. このことは, EGF シグナリング抑制状態においては *c-Abl* を介したアポトーシス誘導が惹起されることを意味する. 最終的に彼らは, EGF 枯渇状態において *Mig-6* は EGFR から解離し, *c-Abl* と結合して活性化し, *p73* を介したアポトーシスを誘導することを示した. 一方で EGF 存在下では *c-Src* が活性化して *Mig-6* がチロシンリン酸化を受けることで, *Mig-6* による *c-Abl* の活性化は起きない. この *Mig-6* の新機能は上皮細胞の恒常性維持に関与していると考えられる.

## 7. *Mig-6* のその他の機能

Makkinje らは, *Mig-6* が N 末端の CRIB ドメインで GTP 結合型の Cdc42 と結合し, SAPK (stress-activated protein kinase) を活性化させることを報告している. 一方で Pante らは, *Mig-6* は肝細胞増殖因子 (HGF) 刺激による細胞運動を Cdc42 を阻害することで抑制することを示しており, *Mig-6* は Cdc42 に関して双方向の制御に関与しているよう

である.

白澤のグループは, *Mig-6* が NFκB シグナリングの正の制御に関与することを報告している. *Mig-6* が Ser38 と Glu39 の間で限定分解を受け, CRIB ドメインを含む N 末端側と C 末端側の二つにプロセッシングされる<sup>13)</sup>. NFκB の阻害因子である IκBα の NFκB 結合領域の 123~143 は Cdc42 の 166~186 と相同性が高く, この領域が *Mig-6* の CRIB ドメインを含む断片と結合する. これにより NFκB が競合的に IκBα から排除され, 活性化して, NFκB の標的遺伝子の転写を誘導する.

このように *Mig-6* はアダプタータンパク質として種々の機能を有しており, これらの機能のクロストークは興味深い.

## 8. チェックポイントキナーゼ Chk1 の新たな標的としての *Mig-6*

*Mig-6* の翻訳後修飾や活性制御機構は未知であった. 我々は *Mig-6* のリン酸化を中心とする翻訳後修飾を解析し, *Mig-6* の翻訳後修飾による機能制御とその EGF シグナル伝達経路における意義を明らかにすることを目指した.

まず, 種々のキナーゼ阻害剤で細胞を処理し, リン酸化タンパク質を検出する Phos-tag-biotin システムで *Mig-6* のリン酸化状態を解析した. その結果 Chk1 阻害剤のみで *Mig-6* のリン酸化が抑制された. また, Chk1 のノックダウンにより EGF 刺激で亢進した *Mig-6* のリン酸化が抑制されることも確認された. また, リコンビナントタンパク質を使った *in vitro* のアッセイで, *Mig-6* は Chk1 によりリン酸化された. 以上より Chk1 は *Mig-6* キナーゼであることがわかった. 質量分析を用いた詳細なリン酸化部位解析の結果, *Mig-6* の Ser251 および Ser302 が Chk1 によるリン酸化部位であり, さらに Y391 は EGFR によりチロシンリン酸化される部位であることが判明した. Ser251 のリン酸化部位を特異的に認識する抗体を作製して解析したところ, EGF 刺激で *Mig-6* の Ser251 がリン酸化され, Chk1 の低分子干渉 RNA (siRNA) によりそのリン酸化が抑制されることが確認された. Ser251 のリン酸化を Chk1 の siRNA で抑制すると, EGF 刺激による EGF 受容体の初期活性化 (自己リン酸化) とその下流の MAP キナーゼの活性化が抑制され, 細胞増殖が抑制された. このように, Chk1 による Ser251 のリン酸化は *Mig-6* の EGFR 活性阻害能の抑制を引き起こし, EGF シグナリングの初期活性化に寄与していることがわかった (図 2)<sup>14)</sup>.

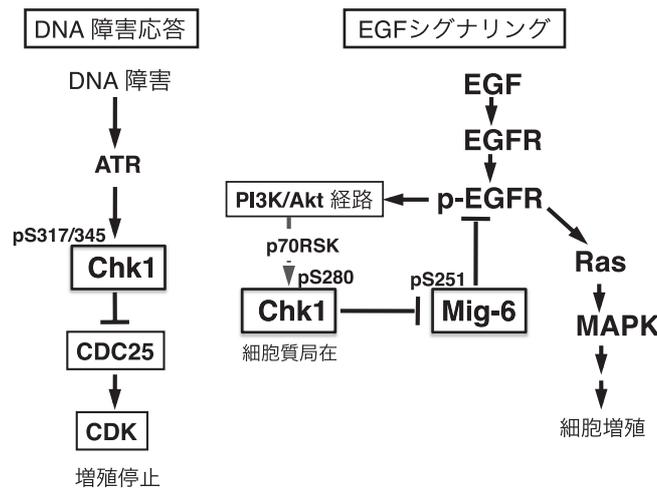


図2 Chk1の新たな標的 Mig-6 と EGF シグナル伝達制御

Chk1 は DNA 障害に応答した ATR キナーゼにより活性化するチェックポイントキナーゼで、CDK の活性化因子である CDC25 をリン酸化/分解に導き細胞周期停止に關与する。一方で Chk1 は EGF シグナル伝達にも關与する。EGF 刺激により PI3K/Akt/p70RSK 経路を介して Chk1 の S280 がリン酸化されると Chk1 の細胞内局在性が高まり、EGFR と結合している Mig-6 の S251 をリン酸化する。それにより Mig-6 の EGFR 阻害活性が抑制され EGF シグナリングの活性化を起こす。

## 9. Chk1/Mig-6 経路の全貌

Ser251 を含む領域は 14-3-3 結合配列を持つ (図1)。武田らは Chk1 の過剰発現により、マウス Mig-6 の Ser250 (ヒトの Ser251 に相当) のリン酸化を介して、14-3-3 $\alpha$  が Mig-6 に結合してくること、さらに Mig-6 のエンドソーム輸送と分解が阻害されることを報告している<sup>15)</sup>。これらの研究により、Chk1 が DNA 障害応答時のチェックポイントキナーゼとしての機能だけでなく、増殖シグナル伝達にも機能していることが明らかになった。

Chk1 による Mig-6 のリン酸化はどのように調節されているのであろうか？我々は EGF 刺激により PI3K および Akt の活性化と Chk1 の Ser280 のリン酸化が連動することを定量的質量分析で見いだした<sup>14)</sup>。また Akt の下流で働く p70RSK が Chk1 の Ser280 をリン酸化することが示唆された。Puc らは Chk1 の Ser280 のリン酸化が Chk1 の細胞質局在性に機能すると報告しており<sup>16)</sup>、それを考え合わせると p70RSK により Chk1 の Ser280 がリン酸化されると Chk1 は細胞質にとどまり、細胞質で EGFR と結合している Mig-6 の Ser251 をリン酸化すると考えられる。つまり EGF 刺激により EGF 受容体の初期活性化が起こり、PI3K/Akt 経路を介して活性化した p70RSK が Chk1 の Ser280 をリン酸化する。この Chk1 は Mig-6 の Ser251 をリン酸化することで Mig-6 の EGFR 抑制活性を解除し、

EGF 受容体の初期活性化が促進される (図2)<sup>14)</sup>。このように Chk1/Mig-6/EGFR 経路は EGF シグナル伝達の初期過程の進行に重要な機能を果たすと考えられる。また、この経路は EGFR だけでなく ERBB2 や ERBB3 の活性制御にも同様に關与していることが判明した<sup>14)</sup>。この場合はおそらく EGFR とのヘテロ二量体形成時の EGF シグナル伝達に關わっていると考えられる。

## 10. おわりに

Mig-6 が Chk1 の新たな基質であることが明らかになった。これまで Chk1 は DNA 障害時の応答として細胞周期停止等に関与するチェックポイントキナーゼとされてきたが、増殖シグナルの制御という新たな機能を持つことが判明した (図2)。DNA 障害による細胞周期停止後の細胞周期開始にこの EGF/Chk1/Mig-6 経路が關与している可能性があり、今後の詳細な解析が待たれる。

一方で、周知のように EGFR チロシンキナーゼはがんの分子標的として早期から注目を受けてきた。Mig-6 は EGFR の阻害因子でがん抑制機能を持ちながら、EGF 刺激により Chk1 がその解除スイッチとして作動する。Mig-6 が正常ながん細胞においては、Chk1 阻害剤は Mig-6 の機能を保護し、EGF シグナリングを抑制する新たな分子標的治療薬として有効であるかもしれない。

- 1) Citri, A. & Yarden, Y. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **7**, 505–516.
- 2) Wong, E.S., Fong, C.W., Lim, J., Yusoff, P., Low, B.C., Landon, W.Y., & Guy, G.R. (2002) *EMBO J.*, **21**, 4796–4808.
- 3) Huang, L., Watanabe, M., Chikamori, M., Kido, Y., Yamamoto, T., Shibuya, M., Gotoh, N., & Tsuchida, N. (2006) *Oncogene*, **25**, 6457–6466.
- 4) Nicholson, S.E., Metcalf, D., Sprigg, N.S., Columbus, R., Walker, F., Silva, A., Cary, D., Willson, T.A., Zhang, J.G., Hilton, D.J., Alexander, W.S., & Nicola, N.A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2328–2333.
- 5) Laederich, M.B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway, K.L. 3rd, & Sweeney, C. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 47050–47056.
- 6) Zhang, X., Pickin, K.A., Bose, R., Jura, N., Cole, P.A., & Kuriyan, J. (2007) *Nature*, **450**, 741–744.
- 7) Ying, H., Zheng, H., Scott, K., Wiedemeyer, R., Yan, H., Lim, C., Huang, J., Dhakal, S., Ivanova, E., Xiao, Y., Zhang, H., Hu, J., Stommel, J.M., Lee, M.A., Chen, A.J., Paik, J.H., Segatto, O., Brennan, C., Elferink, L.A., Wang, Y.A., Chin, L., & DePinho, R.A. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 6912–6917.
- 8) Makkinje, A., Quinn, D.A., Chen, A., Cadilla, C.L., Force, T., Bonventre, J.V., & Kyriakis, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 17838–17847.
- 9) Ruan, D.T., Warren, R.S., Moalem, J., Chung, K.W., Griffin, A.C., Shen, W., Duh, Q.Y., Nakakura, E., Donner, D.B., Khanafshar, E., Weng, J., Clark, O.H., & Kebebew, E. (2008) *Surgery*, **144**, 908–913.
- 10) Ferby, I., Reschke, M., Kudlacek, O., Knyazev, P., Pantè, G., Amann, K., Sommergruber, W., Kraut, N., Ullrich, A., Fässler, R., & Klein, R. (2006) *Nat. Med.*, **12**, 568–573.
- 11) Xu, J., Keeton, A.B., Wu, L., Franklin, J.L., Cao, X., & Messina, J.L. (2005) *Breast Cancer Res. Treat.*, **91**, 207–215.
- 12) Hopkins, S., Linderth, E., Hantschel, O., Suarez-Henriques, P., Pilia, G., Kendrick, H., Smalley, M.J., Superti-Furga, G., & Ferby, I. (2012) *Dev. Cell*, **23**, 547–559.
- 13) Tsunoda, T., Inokuchi, J., Baba, I., Okumura, K., Naito, S., Sasazuki, T., & Shirasawa, S. (2002) *Cancer Res.*, **62**, 5668–5671.
- 14) Liu, N., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Suzuki, S., Shirasawa, S., Nakayama, K.I., Nakanishi, M., Niida, H., & Kitagawa, M. (2012) *EMBO J.*, **31**, 2365–2377.
- 15) Takeda, K., Takata, T., Kawai, Y., Ishigaki, Y., & Kajinami, K. (2013) *Genes Cells*, **18**, 369–386.
- 16) Puc, J., Keniry, M., Li, H.S., Pandita, T.K., Choudhury, A.D., Memeo, L., Mansukhani, M., Murty, V.V., Gaciong, Z., Meek, S.E., Piwnicka-Worms, H., Hibshoosh, H., & Parsons, R. (2005) *Cancer Cell*, **7**, 193–204.

#### 著者寸描

##### ●北川雅敏 (きたがわ まさとし)

浜松医科大学医学部分子生物学講座教授。薬学博士。

■略歴 1960年横浜市に生る。87年東京大学大学院生命薬学専攻科博士課程修了。萬有製薬研究所を経て、97年九州大学生体防御医学研究所細胞学部門助教授、2000年より現職。

■研究テーマと抱負 増殖開始・停止、分化、アポトーシス、老化、DNA障害応答/修復等の細胞運命を左右する分子の機能とそれらの活性および発現の制御機構の研究とそれを通じた多様な生命現象の解明と医学的応用。ポスドク、院生募集中。

■ウェブサイト [http://www.hama-med.ac.jp/uni\\_education\\_igakubu\\_igaku\\_seikal.html](http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seikal.html)

■趣味 料理、食べ歩き、水族館巡り、海水魚飼育。