

## 細胞表面膜タンパク質 Ecm33 を介した MAP キナーゼシグナルの制御メカニズムの解明と *in vivo* Real-time MAP キナーゼシグナルモニタリングシステムの確立

高田 宏文

### The Cell Surface Protein Ecm33 Is Involved in Negative Feedback Regulation of MAP Kinase Signalling and Development of the *In Vivo* Real-time Monitoring of MAP Kinase Signalling

Hirofumi TAKADA

Laboratory of Molecular Pharmacogenomics, School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,  
3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

(Received April 28, 2011)

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are signal transduction mechanisms that regulate many cellular processes in eukaryotic organisms, from yeasts to mammals. Multiple MAPKs regulate eukaryotic gene expression in response to various extracellular stimuli through phosphorylation of transcription factors. We have been studying the Pmk1 MAPK, a homologue of the mammalian ERK/MAPK in fission yeast. The Pmk1 MAPK regulates cell integrity and cell morphology. We have previously demonstrated that Atf1, a transcription factor downstream of the stress-activated MAPK pathway, serves also as a target of the Pmk1 MAPK signaling in fission yeast. Here, we identified *ecm33*<sup>+</sup> gene, encoding a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored cell surface protein as a transcriptional target of Pmk1 and Atf1. The gene expression of *ecm33*<sup>+</sup> is regulated by two transcription factors Atf1 and Mbx1. We also developed an *in vivo* real-time monitoring system of Atf1 or Mbx1 transcriptional activity, which enables to monitor the activation of the Pmk1 MAPK pathway by various stimuli. Finally, we demonstrated that Ecm33 is involved in the negative regulation of the Pmk1 MAPK signaling through the control of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. The *ecm33* deleted cells displayed Ca<sup>2+</sup> sensitivity and increased phosphorylation levels of Pmk1 MAPK. In addition, the Ecm33 overproducing cells displayed phenotypes closely similar to those of the *pmk1* knockout cell. Collectively, Ecm33 plays a role in the negative feedback regulation of Pmk1 cell integrity signaling.

**Key words**—MAP kinase; signal transduction; real-time monitoring system; fission yeast; transcription factor; cell surface protein

#### 1. はじめに

MAP キナーゼ (MAPK) シグナルは高度に保存された細胞内シグナル伝達経路であり、高等生物における ERK MAPK は転写因子やプロテインキナーゼ、アポトーシス調節因子など多数の下流分子をリン酸化することにより細胞の増殖、分化、発生などの生命現象に重要な働きを有する。<sup>1)</sup> 近年、多

くのがん細胞において ERK MAPK 経路の機能異常亢進が報告されており、<sup>2)</sup> MAPK の活性化と抑制のメカニズムを分子レベルで明らかにすることは、がん化抑制のメカニズムを明らかにする上で極めて重要である。

現在までに Sugiura らは ERK MAPK の分裂酵母ホモログである Pmk1 MAPK、及びその制御因子を数多く同定し、Pmk1 MAPK が細胞増殖シグナルに重要な役割を果たしていることを報告している。<sup>3-8)</sup> 分裂酵母モデル生物はゲノムサイズが最も小さい真核生物であり、高等生物と類似した細胞内シグナル伝達経路を有するため、高等生物における複雑なメカニズムの解明や創薬研究において極めて優れたモデル生物である。

近年、筆者らはストレス応答 p38 MAPK の分裂

近畿大学大学院薬学研究科分子医療・ゲノム創薬学研究室 (〒577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1)

現所属: Cancer Research UK, London Research Institute, Lincoln's Inn Fields Laboratories, Cell Regulation Laboratory, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LY, UK

e-mail: hirofumi.takada@cancer.org.uk

本総説は、平成 22 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

酵母ホモログである Sty1 MAPK によってのみ制御されると報告されていた Atf1 という高度に保存された転写因子が, Pmk1 MAPK によってもリン酸化制御を受けることで, ストレス応答シグナルと細胞増殖 (cell integrity) シグナルを制御することを明らかにしてきた (Fig. 1).<sup>9)</sup> 本総説では, Pmk1/Atf1 シグナルによって遺伝子発現が制御される新規遺伝子として筆者らが同定した, glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー細胞表面膜タンパク質 Ecm33 の cell integrity シグナルにおける役割について紹介する.

## 2. MAPK シグナル依存的に遺伝子発現が制御される新規遺伝子 *ecm33*<sup>+</sup> の同定

分裂酵母において Pmk1 MAPK は転写因子 Atf1 をリン酸化制御することで, 細胞増殖 (cell integrity) シグナルを制御するが, 現在までに同定されている標的遺伝子は GPI アンカー合成酵素をコードする *its8*<sup>+</sup> のみである.<sup>9)</sup> 一方, 出芽酵母において, cell integrity シグナルに関与する Slt2/Mpk1 MAPK は, 転写因子 RLM1 を介して細胞壁合成に関与する遺伝子の発現を制御することが報告されている.<sup>10,11)</sup> そこで筆者らは, Slt2/RLM1 によって制御される遺伝子群の中から細胞壁ストレスによって遺伝子発現が誘導される遺伝子 Pst1 に着目し,<sup>11,12)</sup> Pst1 の分裂酵母ホモログをデータベース検索した. その結果, Pst1 の分裂酵母ホモログとして, GPI アンカー細胞表面膜タンパク質をコードする *ecm33*<sup>+</sup> を同定した. 現在までに, Ecm33 の詳細な生理機能については報告されていない. そこで,

*ecm33*<sup>+</sup> の遺伝子発現が Pmk1 MAPK シグナルによって制御されているのかどうかを検証する目的で, *ecm33*<sup>+</sup> 遺伝子の upstream 5'側の -500/-1 bp と不安定型 Luciferase R2.2 遺伝子を融合したレポーター構築 (*ecm33* P(0.5) (R2.2)) を作製し, *ecm33*<sup>+</sup> のプロモーター活性を調べた. 実験方法としては, (*ecm33* P(0.5) (R2.2)) を細胞内に導入することで, *ecm33*<sup>+</sup> の転写活性が上昇すると Luciferase の発現が誘導され, あらかじめ添加しておいた Luciferin が酸化・分解されることで発光する. この発光強度を測定することで, *ecm33*<sup>+</sup> のプロモーター活性を生細胞でリアルタイムに測定するというものである. この構築を用いて, Pmk1 MAPK 経路が活性化すると報告されている様々な刺激におけるプロモーター活性を正常細胞, *atf1* ノックアウト (KO) 細胞, *pmk1* KO 細胞と比較した.<sup>13)</sup> その結果, 正常細胞では各種刺激により *ecm33*<sup>+</sup> のプロモーター活性は顕著に上昇したのに対し, *atf1* KO 細胞及び *pmk1* KO 細胞ではいずれの刺激においても正常細胞と比較して顕著に低下していた [Fig. 2(B)]. これらの結果から, Ecm33 の遺伝子発現レベルは Pmk1/Atf1 シグナルによって制御されていることが示唆された.

次に筆者らは Ecm33 が Pmk1 MAPK や Atf1 と同様に cell integrity シグナルに関与するの否かを調べる目的で, *ecm33* KO 細胞が細胞壁構成成分である chitin の生合成を阻害する calcofluor に感受性を示すの否かを検証した. その結果, *ecm33* KO 細胞は *pmk1* KO 及び *atf1* KO 細胞と同様に cal-

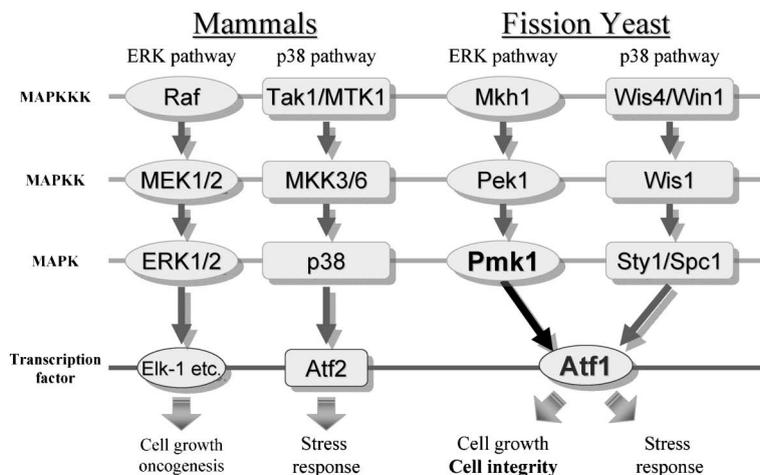


Fig. 1. Atf1 is a Novel Downstream Component of the Pmk1 MAPK Pathway

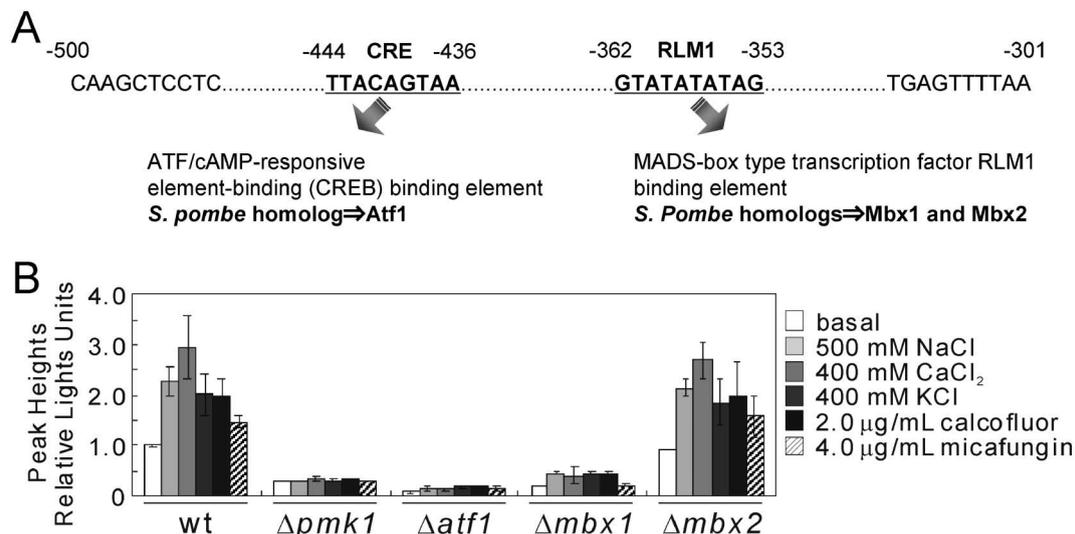


Fig. 2. Identification of CRE and RLM1 in the Promoter Region of the *ecm33*<sup>+</sup> Gene

(A) The sequences of the CRE-like motif (TTACAGTAA) and the RLM1-like motif (GTATATATAG) identified in the *ecm33*<sup>+</sup> promoter region. The numbers refer to the first and last nucleotides of the displayed sequences. (B) The Atf1 and Mbx1 transcription factor is involved in the *Ecm33* expression. The luciferase fusion plasmid *Ecm33* (P0.5R2.2) was transformed into various strains as indicated. Cells were either untreated (basal) or treated with various stimuli as indicated. The data were averaged from peak heights of three independent experiments, and each sample was analyzed in triplicate. Error bars, S.D.

cofluor に感受性を示すことが明らかとなった。これらの結果から *Ecm33* は、Pmk1 MAPK シグナル依存的に cell integrity を制御することが示唆された。

### 3. *ecm33*<sup>+</sup> の遺伝子発現は 2 つの転写因子 Atf1 及び Mbx1 によって制御される

次に筆者らは、*Ecm33* の遺伝子発現を制御する領域を同定するための詳細なプロモーターアッセイを行った結果、*Ecm33* の遺伝子発現には -500 ~ -300 bp の領域が重要であることが判明した。そこで、*ecm33*<sup>+</sup> の上流 5' 側の -500 ~ -300 bp の配列を TESS : Transcription Element Search System によりデータベース検索を行った。その結果、興味深いことに *ecm33*<sup>+</sup> の上流 5' 側 -444 ~ -436 bp に、ATF/cAMP-responsive element-binding (CREB) タンパク質の認識配列 (CRE) である TTACAGTAA<sup>14)</sup> が存在し、-362 ~ -353 bp に RLM1 認識配列である GTATATATAG<sup>15)</sup> が存在することが判明した [Fig. 2(A)]. CREB はヒトにおいて ATF4 と呼ばれ、CREB/ATF family に属する b-ZIP 型の転写因子である。<sup>16)</sup> すなわち CREB/ATF family に属する分裂酵母の転写因子 Atf1 は、CRE を認識することで、*Ecm33* の転写誘導を制御することが示唆される。また、出芽酵母における Slt2/Mpk1 MAPK の下流に位置する MADS-box 型転写因子 RLM1 は、高等生物における転写因子 MEF2 の出

芽酵母ホモログであり、cell integrity に関与する遺伝子群を制御している。<sup>15,17)</sup> そこで、分裂酵母における MADS-box 型転写因子である Mbx1 及び Mbx2 が、*ecm33*<sup>+</sup> のプロモーター活性に与える影響を調べた結果、*mbx1* KO 細胞において、*ecm33*<sup>+</sup> のプロモーター活性が顕著に低下していた [Fig. 2 (B)]. これらの結果から、転写因子 Atf1 及び Mbx1 は *ecm33*<sup>+</sup> のプロモーター領域に存在する CRE、及び RLM1 結合配列をそれぞれ認識することで、*Ecm33* の遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

### 4. *in vivo* real-time MAPK モニタリングシステムの確立

次に筆者らは前述のレポーターシステムを応用発展させ、CRE を 3 回繰り返した配列、及び RLM1 認識配列を 6 回繰り返した配列をそれぞれ Luciferase 遺伝子に融合させた構築を作製することで、生細胞でリアルタイムに Atf1 及び Mbx1 の転写活性を測定するシステムを確立できるのではないかと考えた。

まず正常細胞に 3 $\times$ CRE<sub>Ecm33</sub>::luc (R2.2) を形質転換した細胞を用いて、NaCl (500 mM) 刺激によって、このレポーター活性が上昇するか否かを検証した。その結果、3 $\times$ CRE<sub>Ecm33</sub>::luc (R2.2) 活性は、NaCl 添加後すぐに一過性の上昇が認められ、その

後、活性が一度低下した後、再び上昇が認められるという特徴的な波形が認められた [Fig. 3 (A) wt]. 一方, *atf1* KO 細胞では, NaCl 刺激による  $3\chi\text{CRE}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) 活性の上昇は全く認められなかった [Fig. 3 (A)  $\Delta\text{atf1}$ ]. さらに筆者らは, 転写因子 Atf1 の転写活性を制御する MAPK である Pmk1 MAPK と Sty1 MAPK が  $3\chi\text{CRE}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) レポーター活性に与える影響を検証した. その結果, *pmk1* KO 細胞においては, 正常細胞と比較して,  $3\chi\text{CRE}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) レポーター活性は, 顕著に低下していたが, NaCl 刺激時には, 微弱な反応が認められた (Fig. 3 (A)  $\Delta\text{pmk1}$ ). 一方, *sty1* KO 細胞においては,  $3\chi\text{CRE}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) レポーター活性はほとんど検出されなかった [Fig. 3 (A)  $\Delta\text{sty1}$ ]. これらの結果から,  $3\chi\text{CRE}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) レポーター活性は, Pmk1 MAPK 及び Sty1 MAPK に依存することが示唆された.

次に筆者らは, 正常細胞に  $6\chi\text{RLM}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) を形質転換した細胞を用いて, NaCl (500 mM) 刺激によるレポーター活性を測定した. その結果,  $6\chi\text{RLM}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) 活性は, 前述の  $3\chi\text{CRE}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) 活性同様, NaCl 添加により特徴的な波形が認められた [Fig. 3 (B) wt]. 一方, *mbx1* KO 細胞では, NaCl 刺激による  $6\chi\text{RLM}_{\text{ECM33}}::$

*luc* (R2.2) 活性の上昇はほとんど検出されなかった [Fig. 3 (B)  $\Delta\text{mbx1}$ ]. さらに筆者らは, Pmk1 MAPK 及び Sty1 MAPK が  $6\chi\text{RLM}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) レポーター活性に与える影響を検証した. その結果, *pmk1* KO 細胞における  $6\chi\text{RLM}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) レポーター活性の上昇は, ほとんど検出されなかったのに対し, *sty1* KO 細胞では NaCl 刺激後すぐに認められる 1 相目のピークが, 正常細胞と同様に検出された. [Fig. 3 (B)  $\Delta\text{pmk1}$ ,  $\Delta\text{sty1}$ ]. したがって, NaCl 刺激によって認められる 1 相目のピークは, Pmk1 MAPK 経路の活性化を正確に反映していると考えられる. 以上の結果から,  $\text{CRE}_{\text{ECM33}}$  レポーター活性, 及び  $\text{RLM}_{\text{ECM33}}$  レポーター活性を測定することで, Sty1 MAPK, 及び Pmk1 MAPK シグナルの活性を生細胞でリアルタイムに測定することができると思われる (Fig. 4).

### 5. Ecm33 は細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の調節に関与することで Pmk1 MAPK シグナルを抑制する

最後に筆者らは Pmk1 MAPK と Ecm33 との機能的な関係を調べる目的で, *ecm33* KO 細胞における Pmk1 MAPK のリン酸化レベルを測定した. その結果, *ecm33* KO 細胞では Pmk1 MAPK のリン酸化レベルが正常細胞と比較して顕著に上昇していた. このことから, Ecm33 は Pmk1 MAPK シグナルに対して抑制的に機能することが示唆された. そ

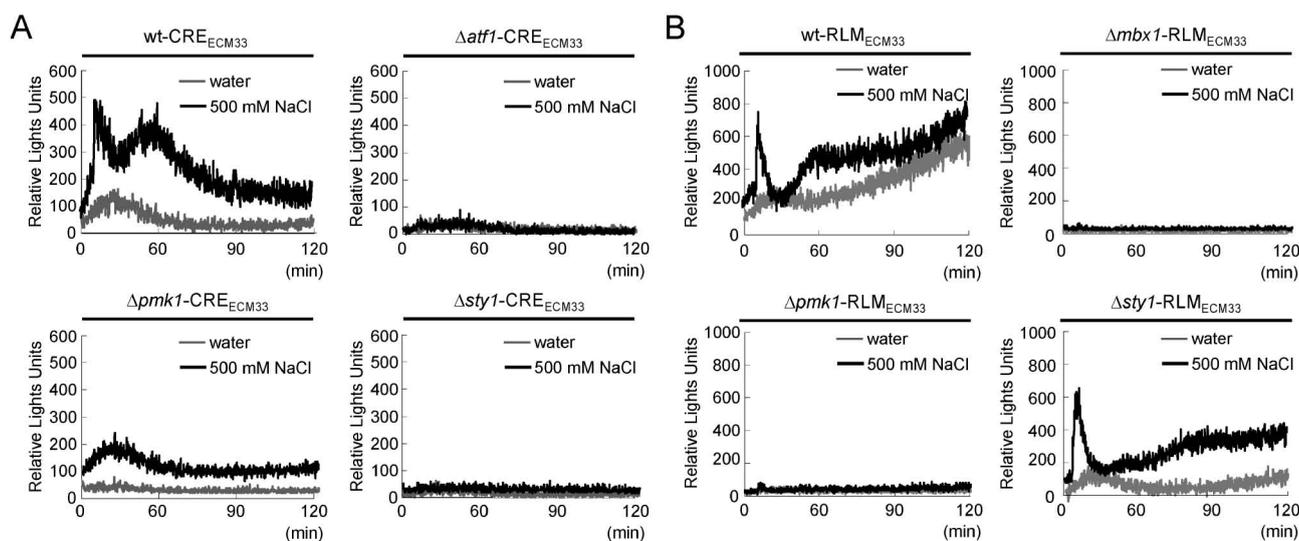


Fig. 3. Real-time Monitoring of Atf1 and Mbx1 Activity in Living Cells

(A) Live-cell monitoring of Atf1 activity. The cells as indicated harboring the multicopy plasmid [ $3\chi\text{CRE}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) reporter vector] were incubated with D-luciferin and treated with 500 mM NaCl. Using a luminometer, light emission levels expressed as relative light units were measured per minute for 2 h. The data shown are representative of multiple experiments. (B) Live-cell monitoring of Mbx1 activity. The cells as indicated were transformed with the multicopy plasmid [ $6\chi\text{RLM}_{\text{ECM33}}::\text{luc}$  (R2.2) reporter vector] and analyzed as described in (A).

ここで、どのようなメカニズムによって *Ecm33* は *Pmk1* MAPK を抑制するのかを明らかにするために、*ecm33* KO 細胞の示す表現型を解析した。その結果、*ecm33* KO 細胞では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が正常細胞と比較して顕著に上昇していることが明らかとなった。

以上の結果より、*Pmk1* MAPK 依存的に遺伝子発現が制御される *Ecm33* は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を負に制御することで *Pmk1* MAPK シグナルに対して抑制的に機能するというネガティブフィードバック制御機構の存在を証明することができた (Fig. 4).<sup>18)</sup>

## 6. おわりに

MAPK シグナルは抗がん薬創製において非常に魅力的なターゲットであり、最近では MAPKKK 阻害剤である *Sorafenib* が新たな抗がん活性を有する分子標的治療薬として注目を集めている。<sup>19-21)</sup> 筆者らは、*ecm33*<sup>+</sup> の遺伝子発現制御メカニズムの解析を通じて、MAPK の活性化を *in vivo* でリアルタイムに測定するシステムを確立した (Fig. 4)。このシステムでは MAPK シグナルのアウトプットを簡便に測定することができるため、MAPK シグナ

ル阻害化合物の特異的なスクリーニング及び MAPK シグナル阻害候補化合物の作用メカニズムの解明などに貢献することが期待される。分裂酵母において MAPK の活性化及び抑制因子として機能する遺伝子産物は高等生物においても同様に機能することが多く、本システムは抗がん薬創製において非常に有用なツールとなることが期待される。

**謝辞** 本研究は、近畿大学薬学部分子医療・ゲノム創薬学研究室において行われたものであり、終始懇切なご指導・ご鞭撻を賜りました近畿大学薬学部・杉浦麗子教授に心より感謝いたします。さらに、多大なご協力を頂きました近畿大学薬学部分子医療・ゲノム創薬学研究室の諸氏を始め、多くの共同研究者の方々に深く感謝いたします。なお、本研究の一部は日本学術振興会特別研究員奨励費によって行われたものであり、併せて感謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Herskowitz I., *Cell*, **80**, 187-197 (1995).
- 2) Downward J., *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 11-22 (2003).
- 3) Toda T., Dhut S., Superti F. G., Gotoh Y., Nishida E., Sugiura R., Kuno T., *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6752-6764 (1996).
- 4) Sugiura R., Toda T., Shuntoh H., Yanagida M., Kuno T., *EMBO J.*, **17**, 140-148 (1998).
- 5) Sugiura R., Toda T., Dhut S., Shuntoh H., Kuno T., *Nature*, **399**, 479-483 (1999).
- 6) Sugiura R., Kita A., Shimizu Y., Shuntoh H., Sio S. O., Kuno T., *Nature*, **424**, 961-965 (2003).
- 7) Ma Y., Kuno T., Kita A., Asayama Y., Sugiura R., *Mol. Biol. Cell*, **17**, 5028-5037 (2006).
- 8) Satoh R., Morita T., Takada H., Kita A., Ishiwata S., Doi A., Hagihara K., Taga A., Matsumura Y., Tohda H., Sugiura R., *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2473-2485 (2009).
- 9) Takada H., Nishimura M., Asayama Y., Manse Y., Ishiwata S., Kita A., Doi A., Nishida A., Kai N., Moriuchi S., Tohda H., Giga-Hama Y., Kuno T., Sugiura R., *Mol. Biol. Cell*, **18**, 4794-4802 (2007).
- 10) Jung U. S., Sobering A. K., Romeo M. J., Levin D. E., *Mol. Microbiol.*, **46**, 781-789

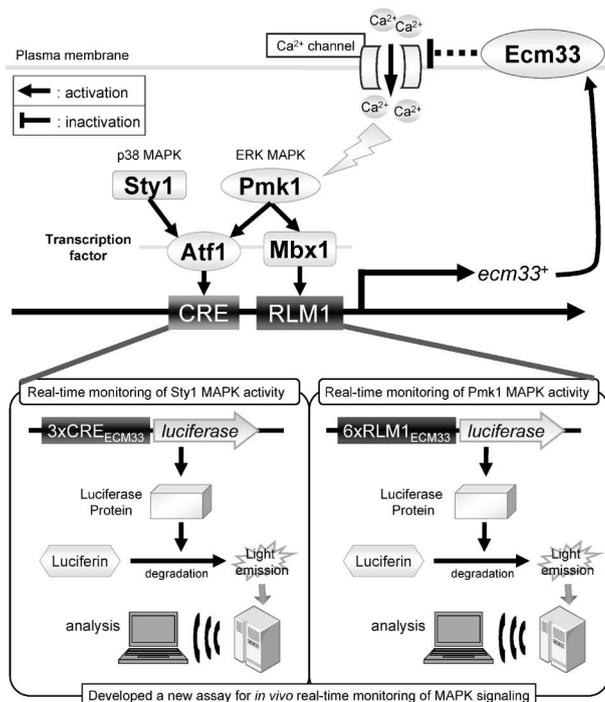


Fig. 4. A Model for the Dual Regulation of *ecm33*<sup>+</sup> Gene Expression and Negative Feedback Regulation of the *Pmk1* MAPK Signaling

- (2002).
- 11) Jung U. S., Levin D. E., *Mol. Microbiol.*, **34**, 1049–1057 (1999).
  - 12) Agarwal A. K., Rogers P. D., Baerson S. R., Jacob M. R., Barker K. S., Cleary J. D., Walker L. A., Nagle D. G., Clark A. M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 34998–35015 (2003).
  - 13) Madrid M., Soto T., Khong H. K., Franco A., Vicente J., Perez P., Gacto M., Cansado J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 2033–2043 (2006).
  - 14) Montminy M. R., Sevarino K. A., Wagner J. A., Mandel G., Goodman R. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6682–6686 (1986).
  - 15) Dodou E., Treisman R., *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1848–1859 (1997).
  - 16) Hai T. W., Liu F., Coukos W. J., Green M. R., *Genes Dev.*, **3**, 2083–2090 (1989).
  - 17) Watanabe Y., Takaesu G., Hagiwara M., Irie K., Matsumoto K., *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2615–2623 (1997).
  - 18) Takada H., Nishida, A., Domae M., Kita, A., Yamano Y., Uchida A., Ishiwata S., Fang Y., Zhou X., Masuko T., Kinoshita M., Kakehi K., Sugiura R., *Mol. Biol. Cell*, **21**, 674–685 (2010).
  - 19) Adjei A. A., Hidalgo M., *J. Clin. Oncol.*, **23**, 5386–5403 (2005).
  - 20) Lyons J. F., Wilhelm S., Hibner B., Bollag G., *Endocr. Relat. Cancer*, **8**, 219–225 (2001).
  - 21) Wilhelm S., Carter C., Lynch M., Lowinger T., Dumas J., Smith R. A., Schwartz B., Simantov R., Kelley S., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 835–844 (2006).