

総説

がん進展における 核内チロシンリン酸化シグナルの役割

幸龍三郎*, 中山祐治

京都薬科大学 生化学分野

がんは、個体内で細胞が無秩序に増殖し、組織や臓器機能を破綻させ死に至らせる病である。近年、がん細胞の仕組みが解析され、それを標的とする分子標的薬が臨床応用されている。しかしながら、一部のがん種では著しい治療効果が得られているのに対し、奏効率が低いがん種も存在するなど、未だにがん根治には至っていない。細胞のがん化やがん悪性化は、細胞内シグナル伝達の破綻が一因となって引き起こされる。がん化をもたらすがん遺伝子の多くが、変異が導入されたチロシンリン酸化酵素遺伝子であることから、特にチロシンリン酸化シグナルの破綻が重要と考えられている。細胞膜や膜直下におけるチロシンリン酸化酵素の機能はよく解析されている。一方、一部のチロシンリン酸化酵素は細胞の核内にも存在するが、その機能解析はあまり進んでいない。本総説では、核内におけるチロシンリン酸化シグナルの機能を概説するとともに、がん進展における役割について論じたい。

キーワード：がん, 核内チロシンリン酸化, 転写, エピゲノム, TGF- β シグナル

受付日：2021年3月11日, 受理日：2021年3月30日

1. はじめに

がんは、日本における死亡原因第一位の疾患である。2人に1人は生涯のうちにがんに罹患するといわれ、がんで死亡する確率は男性で4人に1人、女性で6人に1人である。その発症には、遺伝的要因や、食の欧米化などの環境要因が関わっている。また、多くのがんは加齢に伴って罹患率が上昇することから、加齢関連疾患の一つとされている。超高齢社会に突入している日本を始めとした国々では、さらなるがん

患者数の増加が見込まれている。そのため、「がんは不治の病」という認識が薄れ始めている現代においても、新規治療法の開発は喫緊の課題である。

がんは、無秩序に増殖を続ける細胞の出現によって生じる。通常、組織内の細胞は、秩序だった増殖制御機構の下に増殖することで必要な細胞数を維持し、組織恒常性を保っている。様々な要因による、遺伝子への多段階的な変異の蓄積は、増殖シグナルの活性化や増殖抑制機構の破綻をもたらすことで、細胞の過剰増殖を誘導し、がんを発症させる。このがん化機構の中で重要なのが、細胞内シグナル伝達の異常である。細胞の振る舞いや運命は、様々な刺激に応じた分子間での情報伝達、すなわちシグナル伝達に

*連絡先：
〒607-8414 京都府京都市山科区御陵四丁野町1
京都薬科大学 生化学分野

よって制御されている。シグナル伝達を担う分子への変異は、機能制御の破綻をもたらし、過剰な増殖を誘導する。そのため、がん細胞で異常に活性化したシグナル伝達分子を標的とする分子標的薬が開発され臨床で使用されるようになった。しかし、適切な標的分子が明らかになっていないがん種が存在するなど、分子標的薬が全ての患者で一律に効果を発揮するわけではない。そのため、がん化やがん進展機序の解明と標的分子の同定が必要である。

本稿では、がん進展に重要なチロシンリン酸化シグナルの中でも、細胞核内におけるシグナル伝達に焦点を当てて概説する。

2. がんにおけるチロシンリン酸化シグナル

タンパク質の翻訳後修飾の一つであるリン酸化は、シグナル伝達方法の代表例である。細胞のがん化やがん悪性化には、特に、チロシン残基のリン酸化を介したチロシンリン酸化シグナリングが重要である。チロシンリン酸化反応は、1979年に Tony Hunter らによって初めて発見された¹⁾。その後、様々なチロシンリン酸化酵素(キナーゼ)とチロシン脱リン酸化酵素(チロシンホスファターゼ)が発見され、そのシグナル伝達における役割が明らかとなった。ヒトにおいて、チロシンキナーゼは90種類、チロシンホスファターゼは107種類存在しており²⁾、基質分子のリン酸化レベルを絶えず調節することにより、基質分子の機能を調節する。チロシンキナーゼは受容体型と非受容体型に大別される。受容体型チロシンキナーゼ(Receptor tyrosine kinase: RTK)は1回膜貫通型の膜タンパク質で、細胞外のリガンドと結合して活性化し、細胞内にシグナルを伝達する酵素である。上皮成長因子受容体EGFRやインスリン受容体が代表例である。非受容体型チロシンキナーゼ(Non-

receptor tyrosine kinase: NRTK)は膜貫通領域を持たず、主に細胞膜近傍に存在し、受容体や接着因子からのシグナルの伝達役として機能する。後述のAblファミリーキナーゼやSrc型チロシンキナーゼ(SFKs)が代表例である。

正常細胞においてチロシンキナーゼは、刺激に応じた適切な制御のもとでリン酸化シグナルを伝える。その一方、がん細胞では遺伝子の変異や増幅によって逸脱した活性化を示し、過剰なリン酸化シグナル伝達をもたらす。例えば、肺がんの多くを占める非小細胞肺癌において、全体の患者の23%、特にアジア人では約40%の患者でEGFR遺伝子に変異が検出されており、約5%の患者でEGFR遺伝子が増幅している³⁾。EGFR遺伝子の変異は触媒活性をもつキナーゼドメイン内で頻繁に生じており、変異に伴う一部のアミノ酸配列の欠損やミスセンス変異によってリガンド非依存的にEGFRは活性化する⁴⁾。恒常的に活性化したEGFRは、チロシンリン酸化シグナルを介してがん細胞の過剰増殖やアポトーシスの阻害、血管新生をもたらす。このような、がんにおけるEGFRの機能の解明から、EGFRは肺がん治療の分子標的として注目され、その活性を抑制するチロシンキナーゼ阻害薬(Tyrosine kinase inhibitor: TKI)が開発された。本邦では2002年7月に承認された肺がん治療薬ゲフィチニブを始めとして、EGFR-TKIに対する治療抵抗性の克服を目指したアファチニブやオシメルチニブなどがすでに臨床応用されている。EGFRだけでなく、他のRTKの異常活性化もがん進展をもたらすことが明らかとなり、様々なTKIが開発された。さらに、いくつかのチロシンキナーゼを同時に阻害することで奏効率を上げるマルチキナーゼ阻害剤も使用されている。このように、チロシンキナーゼを標的とした抗がん剤は、がん治療戦略の大きな柱となっており、どのような機序でチロシンキナーゼが、がん化やがん進展に関わるのか

解析が進められている。

3. 非受容体型チロシンキナーゼの局在

RTK は細胞膜を起点としたチロシンリン酸化シグナルを誘起する。一方, NRTK は細胞膜近傍で機能することが知られていたが, 様々なオルガネラにおいてシグナル伝達を誘導することも明らかになってきた (図 1)。

Abl ファミリーキナーゼは c-Abl と Arg によって構成される NRTK である。c-Abl はプロリンに富むアミノ酸配列に結合する SH3 ドメインと, リン酸化チロシンに結合する SH2 ドメインを有する (図 2)。これらのドメインを介して, シグナル上流の分子および基質分子に結合し, シグナルを伝達する。SH2 ドメインがキナーゼドメイン内の C ロープに結合するとともに, c-Abl のアミノ末端側に修飾されたミリスチン酸が C ロープの疎水性ポケットに結合すること

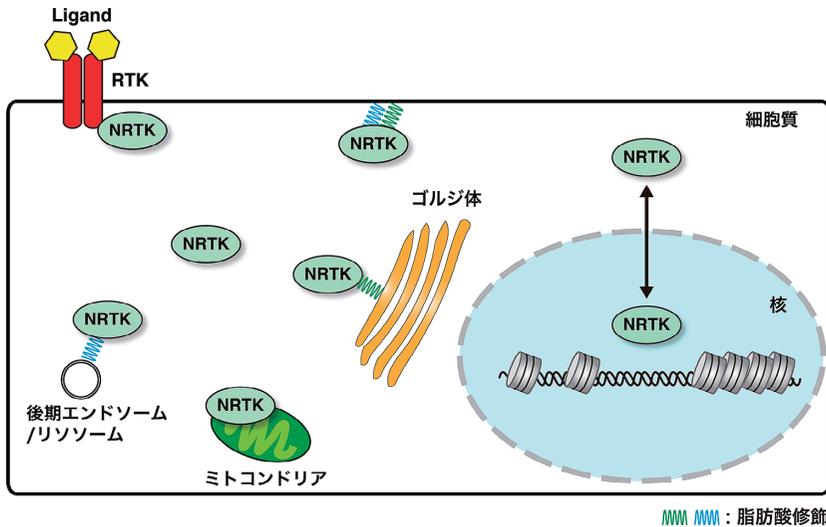


図 1 様々なオルガネラで機能するチロシンキナーゼ
RTK: Receptor tyrosine kinase, NRTK: Non-receptor tyrosine kinase.

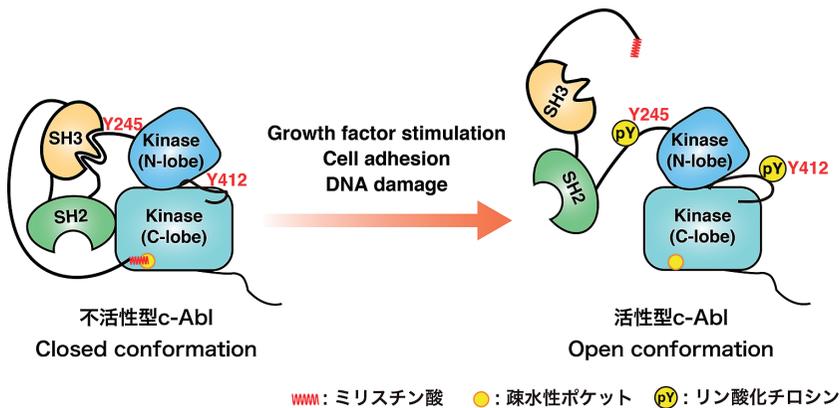


図 2 c-Abl チロシンキナーゼの活性化機構のモデル図

とで, c-Abl は閉じた構造を取り不活性化する⁵⁾. c-Abl は様々な増殖因子刺激⁵⁾や細胞接着⁶⁾, DNA 損傷⁷⁾などによって活性化する. 活性化するには, SH2 ドメインとキナーゼドメイン間の 245 番目のチロシン残基と, キナーゼドメイン内の活性化ループに存在する 412 番目のチロシン残基がリン酸化され開いた構造を取る(図 2). また, c-Abl は核内移行シグナル (NLS) と核外搬出シグナル (NES) を有し, 細胞質と核内をシャトリングしながら機能する. 細胞質において c-Abl は, 正常細胞の増殖や遊走に関わるだけでなく, 細胞のがん化や転移・浸潤をもたらすことが知られている. c-Abl の NLS は, 735 番目のスレオニン残基がリン酸化されると 14-3-3 タンパク質と結合してマスクされた状態となり, その結果, c-Abl の多くは細胞質に留まる⁸⁾. DNA 損傷や酸化ストレスが生じると, 活性化した JNK キナーゼが 14-3-3 をリン酸化して c-Abl との相互作用を弱め, NLS が露出した c-Abl は核内へ移行する. 核内において c-Abl は, DNA 損傷応答として細胞死を引き起こす⁹⁾. c-Abl をコードする *ABL1* 遺伝子と, *BCR* 遺伝子の転座によって生じた *BCR-ABL1* は, 慢性骨髄性白血病 (CML) のドライバー遺伝子である. 転座によって Abl のアミノ末端は一部欠損しており, *BCR-Abl* 融合タンパク質ではミリスチン酸修飾を受けない. そのため, *BCR-Abl* は恒常的に活性化しており, 過剰な増殖をもたらすことで CML を発症させる. *BCR-Abl* の阻害薬であるイマチニブは, CML 患者の生存率の劇的な改善や完治をもたらすことが報告されており, がんの分子標的薬の成功例として挙げられる.

SFKs は Src, Lyn, Fyn, Yes, Blk, Fgr, Hck, Lck の 8 種類の NRTK によって構成される. Src, Lyn, Fyn, Yes は様々な種類の細胞に発現しており, Blk, Fgr, Hck, Lck は特に血球系細胞に発現している. c-Abl 同様, SFKs もまた

SH3 ドメインおよび SH2 ドメインを有する. アミノ末端側に存在する SH4 ドメインは脂質修飾を受けており, 膜への係留に必要である. SFKs は, この脂質修飾を介して主に細胞膜に局在するが, エンドソームなどのオルガネラ膜にも係留されチロシンリン酸化シグナルを伝達することが報告されている. 筆者らは, ミリスチン酸とパルミチン酸修飾を受ける Lyn や c-Yes は, タンパク質翻訳後, まずゴルジ体膜に係留され, その後, 細胞膜へと輸送されることを見出した¹⁰⁾. ミリスチン酸修飾のみ受ける c-Src は後期エンドソームやリソソーム膜に局在し, 細胞膜との間を往来する¹¹⁾. 一方, 1 箇所のミリスチン酸修飾と, 2 箇所のパルミチン酸修飾を受ける Fyn は細胞膜に局在する¹²⁾. このことから, SH4 ドメインの脂質修飾の違いが, SFKs の異なるオルガネラへのターゲティングに必要であることが明らかとなった. ミトコンドリアにも c-Src が局在することが報告されており, c-Src は呼吸鎖複合体 I の構成因子 NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 (NDUFV2) および複合体 II の構成因子 succinate dehydrogenase A (SDHA) をリン酸化することで, 酸化リ酸化を支持する¹³⁾. また, SFKs は核内にも局在し, DNA 損傷応答や細胞周期進行に関わることが知られている¹⁴⁾. 筆者らは, Lyn の核移行には, その活性や脂質修飾の状態が寄与することを見出している¹⁵⁾. このように, NRTK は細胞内の様々な場所でチロシンリン酸化シグナリングを担うことで機能する.

4. 核内チロシンリン酸化シグナルの役割

前項で解説したように, チロシンキナーゼは細胞の核内にも存在しており, 核内に特化した機能が推定されるが十分には明らかにされてい

ない。チロシンホスファターゼもまた、核内に存在し機能することが報告されている。例えば、SHP2 ホスファターゼは *parafibromin* を脱リン酸化することで、核内の β -catenin との結合を増強し Wnt シグナルを亢進する¹⁶⁾。筆者らは核内のチロシンキナーゼの役割を解析するために、転写・エピゲノム制御と、ホスホプロテオーム解析を基に見出した TGF- β シグナル制御に着目して解析を行った。

4.1 核内チロシンリン酸化シグナルによる転写・エピゲノム制御

細胞外刺激に応答して生じたシグナルは細胞質を経て核内に伝達され、転写因子複合体に干渉し遺伝子の発現を変動させることで、細胞の振る舞いや分化など細胞運命を決定する。このような転写調節は、DNA に直接結合する転写因子だけでなく、その活性を調節する転写共役因子や、エピゲノムの代表格であるヒストン修飾の状態が複雑に変動することによって進行する。ヒストンは、リンカーヒストンであるヒストン H1 と、コアヒストンである H2A, H2B, H3, H4 の 5 種類によって構成され¹⁷⁾、ヌクレオソーム構造はコアヒストン 8 量体に DNA が巻きついた状態で構築されている。ヒストンに多く含まれる塩基性アミノ酸は正電荷を、一方、DNA のリン酸基は負電荷を帯びているため、静電的相互作用によってヒストンと DNA は安定的に結合する。ヌクレオソームは規則正しく連なり、コンパクトなクロマチン構造を形成して核内に収納されている。ヌクレオソーム間でヒストンと結合していない DNA 領域（オープンクロマチン領域）に比べると、ヒストンに結合した DNA 領域には転写因子複合体がアクセスしづらい状態となっているため、DNA へのヒストンの結合は基本的に転写抑制的である。転写が活性化する際には、パイオニア転写因子によるヌクレオソーム除去や、クロマチンリモ

デリング因子によるヌクレオソームの移動などにより、オープンクロマチン領域が露出する¹⁸⁾。また、コアヒストンのアミノ末端はヒストンテールと呼ばれ、アセチル化やメチル化、ユビキチン化など様々な翻訳後修飾を受けることによって、DNA との相互作用が変動する¹⁹⁾。例えば、ヒストンのアセチル化は、ヒストンの正電荷を中和し DNA との静電的相互作用を低下させることでクロマチン構造の脱凝縮をもたらす。転写因子が結合しやすい状態へと変化させる。筆者らは、核内におけるチロシンリン酸化シグナルが、転写調節やエピゲノム調節に関与しているのか解析を行った (図 3)。

まず、核内における c-Abl チロシンキナーゼの役割に着目した。DNA 損傷によって c-Abl は核内に移行することから、核内 c-Abl が DNA 損傷における遺伝子の発現制御にどのように関わっているか解析した。c-Abl は DNA 損傷下で、抑制性の核内転写因子 JunB をリン酸化して機能を抑制し、細胞周期停止因子 p21 (*CDKN1A*) の発現を促進することを見いだした²⁰⁾。すなわち、DNA 損傷により核内に移行した c-Abl は、核内分子のチロシンリン酸化を介して DNA 損傷に対する適切な転写応答に関わっていると考えられる。

また、興味深いことに、野生型の c-Abl よりも、NLS を付加した c-Abl を細胞に発現させた際に、クロマチン構造の大きな変化が観察された²¹⁾。したがって、c-Abl は核内においてクロマチン構造を制御し得ることが示唆された。クロマチンの構造は、ヒストン修飾の状態によって変化するため、ヒストン修飾への核内 c-Abl の寄与を解析した。核内 c-Abl は、活性化エンハンサー領域のマーカーで転写活性化の指標であるヒストン H4 の 16 番目のリジン残基のアセチル化 (H4K16Ac) を抑制し、また、転写抑制性のヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K9me3) を亢進した。この際、核内 c-Abl

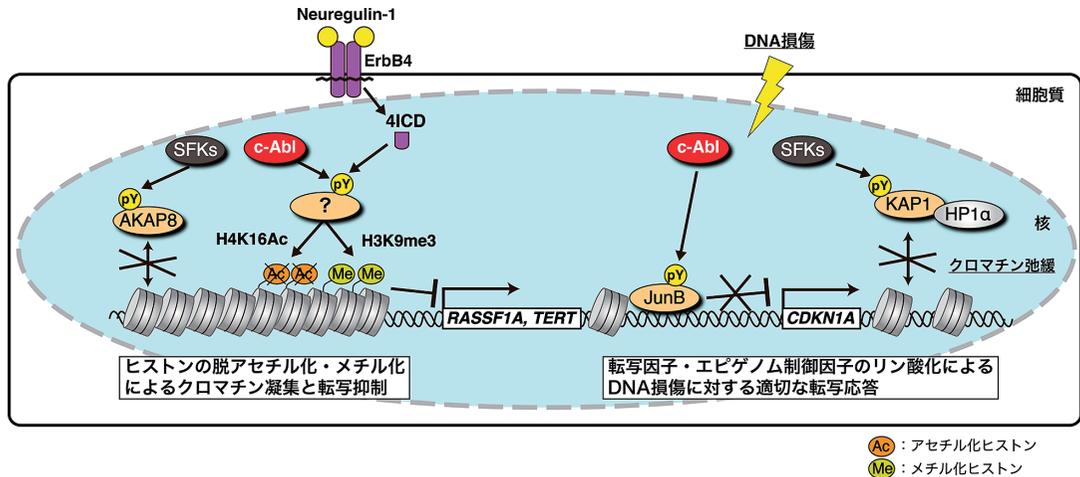


図3 核内チロシンリン酸化シグナルによる転写・エピゲノム制御因子の機能調節
SFKs: Src-family kinases.

は、がん抑制遺伝子である *RASSF1A* 発現を抑制した。さらに核内 c-Abl は、DNA 損傷によるクロマチンの構造変化や H4K16Ac の抑制にも重要であった。このことから、核内における c-Abl は、ヒストン修飾をグローバルなレベルで転写抑制性の状態へと誘導し、クロマチンの構造変化を引き起こす機能を持つことが明らかとなった。

核内の SFKs もまた、増殖因子刺激に応じたクロマチンの構造変化に必要であることを見出した²²⁾。核内 SFKs によるクロマチン構造の調節機構を明らかにするために、SFKs の一つである Lyn キナーゼに NLS を付加した NLS-Lyn を用いたホスホプロテオーム解析によって、核内 SFKs の基質探索を行った。その結果、様々な転写因子やクロマチン結合分子がチロシンリン酸化を受けることが分かった。その中でも、クロマチンや核マトリクスに結合する A-kinase Anchoring Protein 8 (AKAP8/AKAP95) の SFKs によるチロシンリン酸化が、クロマチンの構造変化に関わることが明らかになった²³⁾。更に、転写抑制性のクロマチン状態であるヘテロクロマチンを維持する KRAB-associated Protein 1

(KAP1/TIF1β/TRIM28) が SFKs によりリン酸化を受けると、KAP1 および、その結合分子であるヘテロクロマチン構成因子 Heterochromatin protein 1α (HP1α) がクロマチンから脱離し、クロマチンが弛緩することを見出した²⁴⁾。さらに、KAP1 のチロシンリン酸化は、DNA 損傷応答の際に生じるクロマチンの弛緩を介した p21 の発現誘導²⁵⁾ に必要であることを見出した。したがって、SFKs はクロマチン制御因子のチロシンリン酸化を介して DNA 損傷応答に必要であることが示された。

EGFR ファミリーは、EGFR, HER2, ErbB3, ErbB4 によって構成される。このうち ErbB4 は、Neuregulin-1 などのリガンド刺激に応じて、TNFα-converting enzyme (TACE) および γ-secretase によるタンパク質分解を受け、カルボキシ末端側の細胞内ドメイン (4ICD) を細胞質に遊離することが知られている。切断され遊離した 4ICD は核内へと移行し、転写制御に関わる。筆者らは、リガンド刺激により核内に移行した 4ICD が、H3K9me3 の亢進とともにがん細胞増殖に必要なテロメアの伸長を担う酵素 *TERT* の発現抑制を導くことを見出した²⁶⁾。す

なわち, ErbB4 による核内分子のチロシンリン酸化はがん細胞増殖を抑制する可能性があるとして唆された。

4.2 核内 c-Abl キナーゼによる TGF- β シグナル制御

先述の通り, 核内の c-Abl チロシンキナーゼは転写・エピゲノム制御に関わることが分かった。核内の c-Abl によるチロシンリン酸化シグナルがさらに別の機能も持つのではないかと考え, 核内 c-Abl の基質分子の解析を通し, その機能を探索した。NLS を付加した c-Abl を用いてホスホプロテオーム解析を行ったところ, 興味深いことに Transforming growth factor- β (TGF- β) シグナルに関わる分子が基質候補分子として多く検出された。

TGF- β シグナルは, TGF- β やアクチビンなど TGF- β スーパーファミリーと呼ばれる 33 種類のサイトカイン刺激によって誘導されるシグナル伝達経路である²⁷⁾。TGF- β II 型受容体型キナーゼ (TBRII) は TGF- β 刺激によって活性化し, TGF- β I 型受容体 (TBRI) をリン酸化することで複合体を形成する。複合体形成により活性化した TBRI は, 主に, Smad2/3 などの Receptor-regulated SMAD (R-SMAD) をリン酸化することで, Common partner Smad (Co-Smad) である Smad4 との複合体形成を促進する。Smad2/3-Smad4 複合体は核内へ移行し, 転写複合体と協調しながら標的遺伝子の発現を調節する。個体発生において TGF- β シグナルは, 上皮細胞から間葉系細胞への変換 (上皮間葉転換, EMT) による原腸陥入の誘導や, 筋肉や神経, 血液などを構築する中胚葉の誘導に必要である²⁸⁾。また, 多岐にわたる恒常性維持機構としても働いており, 創傷治癒における線維芽細胞の増殖・活性化に必要なことや²⁹⁾, 炎症の誘導および収束に関わるヘルパー T 細胞のサブセット Th17 細胞および制御性 T 細胞の分化に必要なこと

などが知られている³⁰⁾。また, 正常上皮細胞では細胞死を誘導することや, p21 や p15 といった細胞周期停止因子の発現を誘導することで過剰な増殖を抑制することなどから, がん抑制シグナルとしても機能している³¹⁾。がん細胞は, この TGF- β シグナルによるがん抑制シグナルを回避することで生存する。大腸がんや膀胱がんでは, TBRI や Smad4 など TGF- β シグナル関連分子に機能欠失型の変異が検出されており, TGF- β シグナルによる細胞傷害活性は破綻している。また, 乳がん細胞や膠芽腫では, Smad と複合体を形成し増殖を抑制する転写因子の機能低下によって, 増殖抑制機構が破綻している一方で, EMT 誘導機能は保持されているため浸潤・転移が促進している。

線維芽細胞において, c-Abl は TGF- β 刺激によって活性化した PI3K-PAK2 経路を介して活性化する³²⁾。活性化した c-Abl は, Smad 非依存的な TGF- β シグナルを促進することで Early growth response factor 1 (Egr1) の発現増加をもたらす。コラーゲン産生など線維化の誘導プロセスに関わる³³⁾。プレオマイシン誘導性の肺線維化が, Abl 阻害剤のイマチニブ投与により抑制される³⁴⁾ ことは, c-Abl のこの機能により説明できる。

c-Abl は上皮がん細胞の浸潤・転移を促進することが報告されている³⁵⁾。そのため, c-Abl は上皮がん細胞の TGF- β シグナルを調節しがん悪性化に関わる可能性が考えられるが, 詳細な解析は行われていない。筆者らの, 子宮頸部上皮様がん細胞 HeLa S3 を用いたホスホプロテオーム解析では, 核内 c-Abl の基質候補分子として, Smad2/3 と結合することで TGF- β シグナルを制御する分子が検出された。そのため, 上皮がん細胞において, 核内 c-Abl による Smad 依存的な TGF- β シグナル制御機構が存在するのではないかと考え, 検証を行った (図 4)。

着目したのは, 核内に局在する TGF- β シグ

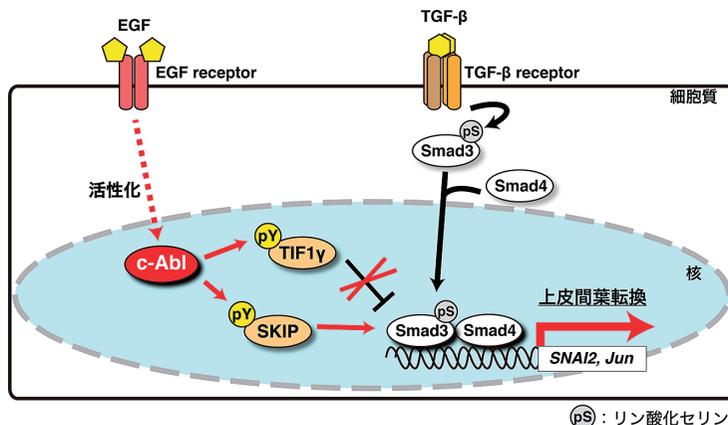


図4 EGFR シグナルの下流分子 c-Abl による TIF1γ および SKIP のチロシンリン酸化を介した TGF-β シグナルの活性化機構

ナル抑制因子 Transcriptional intermediary factor 1-γ (TIF1γ/TRIM33/Ectodermin) である。TIF1γ は、Smad2/3 に直接結合することで Smad2/3-Smad4 の複合体形成を阻害する³⁶⁾、あるいは E3 ユビキチンリガーゼとして Smad4 をモノユビキチン化することで Smad2/3-Smad4 複合体形成を阻害する³⁷⁾ などの機序を介して TGF-β シグナルを抑制する。TIF1γ は、TGF-β シグナル抑制を介して過剰な中胚葉誘導を抑制し外胚葉領域の拡大をもたらすことや³⁷⁾、その不活性化は TGF-β シグナルの過剰活性化により膀胱癌の発症を促進することが知られている³⁸⁾。

c-Abl による TIF1γ のリン酸化を解析したところ、c-Abl は TIF1γ と結合し、キナーゼ活性依存的に直接チロシンリン酸化することが分かった。c-Abl による TIF1γ のリン酸化サイトは 524 番目、610 番目、1048 番目のチロシン残基であった。次に、Smad2/3 との結合に対する TIF1γ のリン酸化の影響を、チロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した非チロシンリン酸化変異体と、グルタミン酸残基に置換した疑似チロシンリン酸化変異体を用いて解析した。TGF-β 存在下で、非リン酸化変異体は野生型に比べて Smad3 との結合が増強した一方で、疑似リン酸化変異体は結合が低下した。Abl 阻

害剤の処理や c-Abl のノックダウンは、TIF1γ と Smad3 の結合を増強させた。このことから、c-Abl による TIF1γ のチロシンリン酸化は Smad3 との結合を低下させることが分かった。TIF1γ の 524 番目、610 番目、1048 番目のチロシン残基をそれぞれグルタミン酸残基に置換した疑似チロシンリン酸化変異体は、それぞれわずかに Smad3 との結合が低下した。すなわち、どのチロシン残基のリン酸化も Smad3 との結合変化に関わる。TIF1γ と Smad3 との結合は 455 番目から 887 番目までの Middle region と呼ばれる領域が必要である³⁶⁾。そのため、524 番目あるいは 610 番目のリン酸化による負電荷の付加は、Smad3 との相互作用を弱めるのではないかと推測される。また、TIF1γ が Smad3 と結合し TGF-β シグナルを抑制する際には、TIF1γ のカルボキシ末端に存在する PHD/Bromo domain を介したクロマチン結合が関わると考えられている³⁹⁾。TIF1γ の PHD/Bromo domain の近傍に存在する 1048 番目のリン酸化は、クロマチンへの TIF1γ の結合を弱め、Smad3 との結合に影響を及ぼした可能性が考えられる。

次に、TGF-β シグナルによる、転写および EMT の制御に対し、TIF1γ のリン酸化がどのような影響を及ぼすのか解析した。Smad3 結合領

域を組み込んだレポータープラスミドを用いて Smad3 の転写活性を評価すると、疑似リン酸化変異体は Smad3 の転写活性を抑制しない一方で、野生型や非リン酸化変異体は Smad3 の転写活性を抑制した。また、非リン酸化変異体は、野生型に比べて、TGF- β 刺激による *SNAI2* や *Jun* の発現誘導を強く抑制し、細胞の紡錘形への形態変化、すなわち EMT も強く抑制した。c-Abl のノックダウンも TGF- β 刺激による *Jun* の発現誘導を抑制したことはこの結果を支持する。これらの結果から、c-Abl は TIF1 γ をリン酸化することで、Smad3 との結合を低下させ、TIF1 γ による TGF- β シグナルの抑制を解除することが明らかになった。

c-Abl は EGFR シグナルの下流で活性化することが知られており、EGF 刺激は TIF1 γ のリン酸化を増強した。そこで、EGFR シグナルが TGF- β シグナルとクロストークするのではないかと考え解析した。興味深いことに、TGF- β 刺激に加えて EGF 刺激を行うと、*SNAI2* の発現誘導が増強し EMT の誘導が亢進した。そして、この経路に c-Abl および TIF1 γ のリン酸化が関わることがわかった。このことから、EGFR シグナルは c-Abl の活性化による TIF1 γ の機能抑制を介して、TGF- β シグナルを過剰に活性化する役割を持つと考えられる⁴⁰⁾。

さらに、c-Abl は核内分子 SKI-interacting protein (SKIP) をチロシンリン酸化することで、Smad3 との結合を増強し TGF- β シグナルを活性化することも見出した⁴¹⁾。このように、細胞質と核内をシャトリングしながら機能する c-Abl は、核内分子のチロシンリン酸化を介して Smad 依存的な TGF- β シグナルを正に制御することが明らかになった。

5. おわりに

本稿では、細胞核内におけるチロシンリン酸化シグナルに着目して、著者らの研究を中心に解説した。

チロシンキナーゼは細胞膜直下に局在し機能することがよく知られている一方で、核内にも一部存在することから、核内ではどのような役割を果たしているのかという疑問の下に研究が進められた。c-Abl キナーゼや SFKs、ErbB4 キナーゼに着目して核内における機能を解析すると、エピゲノム調節を介してクロマチン構造や転写を調節する機能を持つことが分かった。核内 c-Abl はがん抑制遺伝子 *RASSF1A* の発現を抑制することから、c-Abl によるがん細胞増殖の促進に核内リン酸化シグナルが関わる可能性が考えられる。

DNA 損傷時において、核内チロシンリン酸化による転写制御への関与についても解析を行った。c-Abl は JunB をチロシンリン酸化し機能を抑制することで、そして SFKs は KAP1 をチロシンリン酸化しクロマチンを弛緩させることで、細胞周期停止に関わる遺伝子の発現を促進することが分かった。細胞のがん化には、DNA 損傷応答機構の破綻による変異の蓄積が関わる。見出した核内チロシンリン酸化シグナルは適切な DNA 損傷応答の寄与することから、がん抑制的であると考えられる。したがって、核内におけるチロシンリン酸化シグナルは、単純にがん進展をもたらすだけでなく、細胞の恒常性維持にも必要なシグナルであると考えられる。実際、転写・エピゲノムの調節は、細胞の分化過程や炎症応答など様々な場面で必要であり、恒常性維持における核内のチロシンリン酸化シグナルの役割も興味深い。

c-Abl の核内における基質探索では、シグナル伝達に関わる分子が候補に挙がってきた。そ

のため、核内 c-Abl による新たなシグナル伝達調節機構の存在が推測された。基質候補分子の多くが関与する TGF- β シグナルに着目し解析を進めたところ、c-Abl は転写共役因子 TIF1 γ や SKIP をチロシンリン酸化することで、過剰な TGF- β シグナルの活性化を導き EMT をもたらしことを見出した。がん細胞で活性化した c-Abl は転移・浸潤を促進する。そのため、c-Abl による Smad 依存的な TGF- β シグナルの促進は、上皮がん細胞の悪性化に帰結すると考えられる。また、BCR-Abl による TGF- β の分泌促進が、CML の進展をもたらすことが報告されており⁴²⁾、上皮がん細胞以外でも TGF- β と Abl のシグナルによるがん進展が予想されている。そのため、様々ながん細胞腫において、Abl を介した核内チロシンリン酸化がどのように働いているのかは興味深い。今後、核内チロシンリンシグナルを標的とした創薬開発が進むことで、新たながん治療戦略につながると期待される。

【謝辞】

筆者らの研究は、主に、千葉大学 大学院薬学研究院 分子細胞生物学研究室で行われたものであり、研究の遂行に当たり終始多くのご鞭撻を賜りました山口直人教授、山口憲孝准教授、福本泰典講師を始め、研究室のメンバーにこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、研究の一部は千葉大学 大学院医学研究院 長寿医学研究室（現システム疾患医学）で行われたものであり、眞鍋一郎教授、工藤藤美助教を始め研究室メンバーにも深く御礼申し上げます。

【利益相反】

本研究において利益相反はない。

【引用文献】

1) Walter Eckhart, Mary Anne Hutchinson, Tony Hunter. An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell*. **1979**, 18(4), 925–933.

2) Andres Alonso, Joanna Sasin, Nunzio Bottini, Ilan Friedberg, Iddo Friedberg, Andrei Osterman, Adam Godzik, Tony Hunter, Jack Dixon, Tomas Mustelin. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. **2004**, 117(6), 699–711.

3) The AACR Project GENIE Consortium. AACR project genie: Powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discov*. **2017**, 7(8), 818–831.

4) Sreenath V. Sharma, Jeffrey Settleman. ErbBs in lung cancer. *Exp. Cell Res*. **2009**, 315(4), 557–571.

5) Audrey Sirvent, Christine Benistant, Serge Roche. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol. Cell*. **2008**, 100(11), 617–631.

6) Jean M Lewis, Rajasekaran Baskaran, Salme Taagepera, Martin A Schwartz, Jean YJ Wang. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93(26), 15174–15179.

7) Jan Stetka, Jan Gursky, Julie Liñan Velasquez, Renata Mojzikova, Pavla Vyhldalova, Lucia Vrablova, Jiri Bartek, Vladimir Divoky. Role of DNA damage response in suppressing malignant progression of chronic myeloid leukemia and polycythemia vera: Impact of different oncogenes. *Cancers*. **2020**, 12(4), 903.

8) Kiyotsugu Yoshida. Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage. *Trends Mol. Med*. **2008**, 14(7), 305–313.

9) Kiyotsugu Yoshida, Tomoko Yamaguchi, Tohru Natsume, Donald Kufe, Yoshio Miki. JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol*. **2005**, 7(3), 278–285.

10) Kousuke Kasahara, Yuji Nakayama, Kikuko Ikeda, Yuka Fukushima, Daisuke Matsuda, Shinya Horimoto, Naoto Yamaguchi. Trafficking of Lyn through the golgi caveolin involves the charged residues on α E and α I helices in the kinase domain. *J. Cell Biol*. **2004**, 165(5), 641–652.

11) Kousuke Kasahara, Yuji Nakayama, Akio Kihara, Daisuke Matsuda, Kikuko Ikeda, Takahisa Kuga, Yasunori Fukumoto, Yasuyuki Igarashi, Naoto Yamaguchi. Rapid trafficking of c-Src, a non-palmitoylated Src-family kinase, between the plasma membrane and late endosomes/lysosomes. *Exp. Cell*

- Res.* **2007**, 313(12), 2651–2666.
- 12) Izumi Sato, Yuuki Obata, Kousuke Kasahara, Yuji Nakayama, Yasunori Fukumoto, Takahito Yamasaki, Kazunari K Yokoyama, Takashi Saito, Naoto Yamaguchi. Differential trafficking of Src, Lyn, Yes and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain. *J. Cell Sci.* **2009**, 122(7), 965–975.
 - 13) Masato Ogura, Junko Yamaki, Miwako K Homma, Yoshimi Homma. Mitochondrial c-Src regulates cell survival through phosphorylation of respiratory chain components. *Biochem. J.* **2012**, 447(2), 281–289.
 - 14) Kiyotsugu Yoshida, Ralph Weichselbaum, Surender Kharbanda, Donald Kufe. Role for Lyn tyrosine kinase as a regulator of stress-activated protein kinase activity in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20(15), 5370–5380.
 - 15) Kikuko Ikeda, Yuji Nakayama, Yuuki Togashi, Yuuki Obata, Takahisa Kuga, Kousuke Kasahara, Yasunori Fukumoto, Naoto Yamaguchi. Nuclear localization of Lyn tyrosine kinase mediated by inhibition of its kinase activity. *Exp. Cell Res.* **2008**, 314(18), 3392–3404.
 - 16) Atsushi Takahashi, Ryouhei Tsutsumi, Ippei Kikuchi, Chikashi Obuse, Yasuhiro Saito, Azadeh Seidi, Robert Karisch, Minerva Fernandez, Taewoo Cho, Naomi Ohnishi, Orit Rozenblatt-Rosen, Matthew Meyerson, Benjamin G Neel, Masanori Hatakeyama. SHP2 tyrosine phosphatase converts Parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver. *Mol. Cell.* **2011**, 43(1), 45–56.
 - 17) Sepideh Khorasanizadeh. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell.* **2004**, 116(2), 259–272.
 - 18) Erin E Swinstead, Ville Paakinaho, Diego M Presman, Gordon L Hager. Pioneer factors and ATP-dependent chromatin remodeling factors interact dynamically: A new perspective: Multiple transcription factors can effect chromatin pioneer functions through dynamic interactions with ATP-dependent chromatin remodeling factors. *Bioessays.* **2016**, 38(11), 1150–1157.
 - 19) Aaron D Goldberg, C David Allis, Emily Bernstein. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* **2007**, 128(4), 635–638.
 - 20) Noritaka Yamaguchi, Ryuzaburo Yuki, Sho Kubota, Kazumasa Aoyama, Takahisa Kuga, Yuuki Hashimoto, Takeshi Tomonaga, Naoto Yamaguchi. c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of JunB is required for Adriamycin-induced expression of p21. *Biochem. J.* **2015**, 471(1), 67–77.
 - 21) Kazumasa Aoyama, Yasunori Fukumoto, Kenichi Ishibashi, Sho Kubota, Takao Morinaga, Yasuyoshi Horiike, Ryuzaburo Yuki, Akinori Takahashi, Yuji Nakayama, Naoto Yamaguchi. Nuclear c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation induces chromatin structural changes through histone modifications that include H4K16 hypoacetylation. *Exp. Cell Res.* **2011**, 317(20), 2874–2903.
 - 22) Akinori Takahashi, Yuuki Obata, Yasunori Fukumoto, Yuji Nakayama, Kousuke Kasahara, Takahisa Kuga, Yukihiro Higashiyama, Takashi Saito, Kazunari K Yokoyama, Naoto Yamaguchi. Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. *Exp. Cell Res.* **2009**, 315(7), 1117–1141.
 - 23) Sho Kubota, Mariko Morii, Ryuzaburo Yuki, Noritaka Yamaguchi, Hiromi Yamaguchi, Kazumasa Aoyama, Takahisa Kuga, Takeshi Tomonaga, Naoto Yamaguchi. Role for tyrosine phosphorylation of A-kinase anchoring protein 8 (AKAP8) in its dissociation from chromatin and the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290(17), 10891–10904.
 - 24) Sho Kubota, Yasunori Fukumoto, Kazumasa Aoyama, Kenichi Ishibashi, Ryuzaburo Yuki, Takao Morinaga, Takuya Honda, Noritaka Yamaguchi, Takahisa Kuga, Takeshi Tomonaga, Naoto Yamaguchi. Phosphorylation of KRAB-associated protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and Heterochromatin Protein 1 α (HP1 α) with heterochromatin. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288(24), 17871–17883.
 - 25) Dong Hyun Lee, Aaron A Goodarzi, Guillaume O Adelmant, Yunfeng Pan, Penelope A Jeggo, Jarrod A Marto, Dipanjan Chowdhury. Phosphoproteomic analysis reveals that PP4 dephosphorylates KAP-1 impacting the DNA damage response. *EMBO J.* **2012**, 31(10), 2403–2415.
 - 26) Kenichi Ishibashi, Yasunori Fukumoto, Hitomi Hasegawa, Kohei Abe, Shoichi Kubota, Kazumasa Aoyama, Sho Kubota, Yuji Nakayama, Naoto Yamaguchi. Nuclear ErbB4 signaling through H3K9me3 that is antagonized by EGFR-activated c-Src. *J. Cell Sci.* **2012**, 126, 625–637.

- 27) Masato Morikawa, Rik Derynck, Kohei Miyazono. Roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, 8(5), 1–24.
- 28) Mary Y Wu, Caroline S Hill. TGF- β superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev. Cell.* **2009**, 16(3), 329–343.
- 29) Sergio Liarte, Ángel Bernabé-García, Francisco J Nicolás. Role of TGF- β in skin chronic wounds: a keratinocyte perspective. *Cells.* **2020**, 9(2), 306.
- 30) Robin D Hatton. TGF- β in Th17 cell development: The truth is out there. *Immunity.* **2011**, 34(3), 288–290.
- 31) David Padua, Joan Massagué. Roles of TGF β in metastasis. *Cell Res.* **2009**, 19(1), 89–102.
- 32) Mark C Wilkes, Edward B Leof. Transforming growth factor β activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and PAK2 in mesenchymal cultures. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281(38), 27846–27854.
- 33) Swati Bhattacharyya, Wataru Ishida, Minghua Wu, Mark Wilkes, Mori Yasuji, Monique Hinchcliff, Edward Leof, John Varga. A non-Smad mechanism of fibroblast activation by transforming growth factor- β via c-Abl and Egr-1: Selective modulation by imatinib mesylate. *Oncogene.* **2009**, 28(10), 1285–1297.
- 34) Craig E Daniels, Mark C Wilkes, Maryanne Edens, Ted J Kottom, Stephen J Murphy, Andrew H Limper, Edward B Leof. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- β and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* **2004**, 114(9), 1308–1316.
- 35) Sourik S Ganguly, Rina Plattner. Activation of abl family kinases in solid tumors. *Genes and Cancer.* **2012**, 3(5–6), 414–425.
- 36) Wei He, David C Dorn, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Malcolm AS Moore, Joan Massagué. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β Pathway. *Cell.* **2006**, 125(5), 929–941.
- 37) Sirio Dupont, Luca Zacchigna, Michelangelo Cordenosi, Sandra Soligo, Maddalena Adorno, Massimo Rugge, Stefano Piccolo. Germ-layer specification and control of cell growth by ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell.* **2005**, 121(1), 87–99.
- 38) David F Vincent, Kai Ping Yan, Isabelle Treilleux, Fabien Gay, Vanessa Arfi, Bastien Kaniewsky, Julien C Marie, Florian Lepinasse, Sylvie Martel, Sophie Goddard-Leon, Juan L Iovanna, Pierre Dubus, Stéphane Garcia, Alain Puisieux, Ruth Rimokh, Nabeel Bardeesy, Jean Yves Scoazec, Régine Losson, Laurent Bartholin. Inactivation of TIF1 γ cooperates with KrasG12D to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* **2009**, 5(7), 1–9.
- 39) Eleonora Agricola, Rebecca A Randall, Tessa Gaarenstroom, Sirio Dupont, Caroline S Hill. Recruitment of TIF1 γ to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol. Cell.* **2011**, 43(1), 85–96.
- 40) Ryuzaburo Yuki, Takashi Tatewaki, Noritaka Yamaguchi, Kazumasa Aoyama, Takuya Honda, Sho Kubota, Mariko Morii, Ichiro Manabe, Takahisa Kuga, Takeshi Tomonaga, Naoto Yamaguchi. Desuppression of TGF- β signaling via nuclear c-Abl-mediated phosphorylation of TIF1 γ /TRIM33 at Tyr-524, -610, and -1048. *Oncogene.* **2019**, 38(5), 637–655.
- 41) Kazumasa Kuki, Noritaka Yamaguchi, Shuto Iwasawa, Yuki Takakura, Kazumasa Aoyama, Ryuzaburo Yuki, Yuji Nakayama, Takahisa Kuga, Yuuki Hashimoto, Takeshi Tomonaga, Naoto Yamaguchi. Enhancement of TGF- β -induced Smad3 activity by c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of its coactivator SKI-interacting protein (SKIP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, 490(3), 1045–1051.
- 42) Kohei Miyazono. Tumour promoting functions of TGF- β in CML-initiating cells. *J. Biochem.* **2012**, 152(5), 383–385.

Role of nuclear tyrosine phosphorylation signaling in cancer progression

Ryuzaburo Yuki, Yuji Nakayama

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto Pharmaceutical University

Cancer cells uncontrollably proliferate in our bodies, leading to death via disruption of tissues and organ functions. Recently, molecular-targeted drugs have been developed and clinically used due to understanding the intracellular mechanisms. However, eradication of cancer cells has not yet been accomplished. Disruption of intracellular signaling is one of the causes of oncogenesis and cancer progression. Especially, the disruption of tyrosine phosphorylation signaling frequently plays a crucial roles in cancer malignancies, because many oncogenes are classified as tyrosine kinase genes having activating mutations. The function of tyrosine kinases at and near the plasma membrane has been well understood; however, that in the nucleus is largely unknown despite that small amounts of tyrosine kinases are located in the nucleus. In this review, we outline the function of tyrosine phosphorylation signaling in the nucleus, and discuss its contribution to cancer progression.

Keywords: cancer, nuclear tyrosine phosphorylation, transcription, epigenome, TGF- β signaling