

2018 (平成 30) 年度 博士学位論文

核内のチロシンキナーゼ ALK
Alternative Transcription Initiation (ALK^{ATI})
によるクロマチン構造制御メカニズムの解析

千葉大学大学院医学薬学府 先端医学薬学専攻

ゲノム創薬学講座 分子細胞生物学研究室

15JD0107 高倉 勇気

目次

序論・目的	2
結果	
1. ALK ^{WT} によるクロマチン構造変換	4
2. ヒストン修飾の誘導	5
3. A-kinase anchor protein 8 (AKAP8) のチロシンリン酸化	6
4. チロシンリン酸化による AKAP8 の核マトリクスから解離	7
5. がん抑制遺伝子 <i>RASSF1A</i> の発現抑制	8
総括・考察	9
材料	14
方法	15
参考文献	17
図表	23
主論文目録	33
学位論文審査	34
謝辞	35

序論・目的

全長の Anaplastic lymphoma kinase full length (ALK-FL) は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、キナーゼドメインを持つ受容体型チロシンキナーゼである [参考文献 1]。リガンドであるミッドカインやプレイオトロフィンが ALK-FL に結合することで、細胞質において PI3K-AKT 経路, Ras-MAPK 経路, Jak-STAT3 経路が活性化されることが知られている [参考文献 2, 3, 4]。正常組織において脳の発達に関与することが知られている [参考文献 5, 6, 7]。また、ALK 恒常的活性化型変異体である融合タンパク質が、肺がん及び未分化大細胞リンパ腫で発見され、ALK の活性化変異型ががん化に寄与していることが知られている [参考文献 8, 9, 10, 11]。代表的な融合タンパク質として、EML4-ALK 融合タンパク質が知られている [参考文献 8, 9, 10, 11, 12]。微小管会合タンパク質である EML4 遺伝子及びチロシンキナーゼタンパク質である ALK 遺伝子は 2 番染色体にコードされている。EML4 遺伝子及び ALK 遺伝子を挟む領域が逆位転座を形成することにより、EML4 遺伝子の WD ドメインをコードする領域が ALK 遺伝子のキナーゼ領域をコードする部分と融合することで形成される [参考文献 11, 12]。EML-ALK4 融合タンパク質は二量体を形成することでキナーゼ活性が恒常的に亢進している。また、この融合タンパク質は ALK-FL と同様に、上記の 3 つのシグナル経路を活性化することでがん化を促進することが知られている [参考文献 8, 9]。EML4-ALK は、肺がんの中でも特に多い非小細胞肺がん non-small-cell lung cancer (NSCLC) の 3~5% に存在する [参考文献 12]。最近、ALK の転写開始点が ALK-FL 異なり、キナーゼドメインのみを

持つ活性化型の ALK タンパク質がメラノーマで発見された。このキナーゼドメインのみを持つタンパク質を ALK Alternative Transcription Initiation (ALK^{ATI}) と呼び、上記の 3 つの経路が活性化することで、がん化に寄与していることが報告されている [参考文献 13]。ALK^{ATI} はイントロン 19 の後半から転写が開始され、この転写産物はキナーゼドメイン領域をコードする [参考文献 13]。さらにかん細胞においてイントロン 19 の近傍は異常なヒストン修飾を受けることで、転写誘導され ALK^{ATI} が発現する [参考文献 13] (図 2)。興味深いことに、ALK^{ATI} は細胞質のみならず核にも存在していることも報告されている [参考文献 13] (図 3)。しかし核内における ALK^{ATI} の機能解析は行われておらず、ALK^{ATI} の機能は分かっていない。そこで、本研究では、核内において ALK^{ATI} の機能の解析を目的として行った。

結果

1. ALK^{ATI}によるクロマチン構造変換

当研究室では、これまでに、細胞の DNA を propidium iodide (PI) によって染色すると、染色強度の濃淡によって、高密度のクロマチン構造と低密度のクロマチン構造を区別して、観察することができることを見出した [参考文献 14, 15, 16, 17]。さらに細胞の DNA 染色画像を顕微鏡にて撮影し、核を 4000~5000 個の均等なピクセル上に分割して個々のピクセルの染色強度のばらつき [標準偏差(SD)] からクロマチン凝集レベルを定量するピクセルイメージング法を用いた [参考文献 14, 15]。この方法では、高密度にクロマチンが凝縮していると、必ずクロマチン凝縮が低密度になる領域を生じることから、染色強度のばらつき (SD 値) が大きくなる (図 4)。このピクセルイメージング法を利用して、これまでに c-Abl や Lyn などのチロシンキナーゼが核内においてクロマチン構造変換を誘導していることを当研究室で報告してきた [参考文献 14, 16, 17]。

そこで、本研究では、核内にも局在する ALK^{ATI} もクロマチン構造を調節しているかどうかを調べた。ALK^{ATI} と、全長の受容体型 ALK (ALK-FL) をそれぞれ細胞に発現させて、ピクセルイメージング法によってクロマチンの凝縮レベルを解析した。その結果、ALK-FL と比較して、ALK^{ATI} を発現させた細胞では有意に SD 値が増加した (図 5 及び主論文<Fig. 1D>)。このことから、ALK^{ATI} はクロマチン凝縮を強く誘導することが示唆された。次に、細胞質よりも核内に局在した ALK^{ATI} が、クロマチン凝縮を強く誘導するのかどうかを検討するために、N 末端に核移行シグナル (NLS: nuclear localization signal) を付加した核

局在型の NLS-ALK^{ATI} を作製した (主論文 <Fig. 2A, 2B>)。NLS-ALK^{ATI} を発現させた細胞では、ALK^{ATI} と比較して、有意に SD 値が増加した (主論文 <Fig. 2C>)。この結果から、ALK^{ATI} が核内に局在すると、クロマチン凝縮を強く誘導することを示しており、ALK^{ATI} は核内においてクロマチン凝縮を誘導することが示唆された。次に、ALK^{ATI} によるクロマチン凝縮はキナーゼ活性依存性かどうか調べた。キナーゼ活性を持たない ALK^{ATI-KD} (KD: kinase-dead) を作製して (主論文 <Fig. 2D, 2E>) 細胞に発現させ、核内の SD 値を測定した。その結果、ALK^{ATI-KD} では、ALK^{ATI} の発現によって認められた SD 値の増加が検出されなかった (図 6 及び主論文 <Fig. 2F>)。このことから、ALK^{ATI} によるクロマチン構造変換は、キナーゼ活性に依存していることが示唆された。

2. ヒストン修飾の誘導

クロマチン凝縮・脱凝縮はヒストン修飾によって、調節されていることが知られている [参考文献 18]。また c-Abl や Lyn などのチロシンキナーゼが核内において、ヒストン H3 の 9 番目のリジンが 3 つメチル化され、(H3K9me3: histone H3 lysine 9 trimethylation) を介してヘテロクロマチン構造を誘導していることを当研究室で報告してきた [参考文献 14, 16, 17]。そのため、ALK^{ATI} も、核内において H3K9me3 を介して、ヘテロクロマチン構造を誘導しているのではないかと予想した。そこで、ALK^{ATI} と H3K9me3 の関係性について、H3K9me3 抗体を用いた免疫染色を行って調べた。その結果、ALK^{ATI} を発現させた細胞では、H3K9me3 が上昇した。また、ALK^{ATI-KD} を発現させた細胞では、H3K9me3 は上昇しなかった (主論文 <Fig. 3A, 3B>)。このことから、ALK^{ATI} はキナー

ゼ活性依存的に H3K9me3 を促進し、H3K9me3 を介してヘテロクロマチン構造を誘導することが示唆された。

3. A-kinase anchor protein 8 (AKAP8) のチロシンリン酸化

Src 型チロシンキナーゼである Lyn などのチロシンキナーゼが核内において、核マトリックス結合タンパク質 AKAP8 のリン酸化を介して、クロマチン構造を調節することを当研究室で報告してきた [参考文献 17]。そのため、ALK^{ATI} も、核内において Lyn の基質として見出された AKAP8 をリン酸化するのではないかと考えた。そこで、ALK^{ATI} が AKAP8 をリン酸化するかどうか調べるため、免疫沈降法を用いた。細胞に ALK^{ATI} と AKAP8 を過剰発現させて 24 時間培養した。その後、細胞溶解液を回収し、抗 myc 抗体で、myc-AKAP8 を免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10)、抗 myc 抗体及び抗 ALK 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で各種のタンパク質の発現量を解析した。ALK を発現させた細胞では、AKAP8 のチロシンリン酸化が認められた (図 9 及び主論文 < Fig. 4B >)。一方で、キナーゼ活性欠損体である ALK^{ATI-KD} と AKAP8 の共発現や、ALK^{ATI} 及び ALK の阻害剤であるクリゾチニブ [参考文献 13, 19] を処理させた場合では、AKAP8 のチロシンリン酸化は認められなかった (図 9 及び主論文 < Fig. 4B >)。このことから、ALK^{ATI} はキナーゼ活性 AKAP8 をチロシンリン酸化することが示唆された。次に、AKAP8 のリン酸化部位を特定するために、リン酸化候補部位のチロシン残基をチロシンリン酸化されないフェニルアラニン残基に置換した YF 変異体を作製した。まず、Tyr146, Tyr150, Tyr152, Tyr154, Tyr170 を置換した AKAP8-5NYF と Tyr170, Tyr311, Tyr436,

Tyr539 を置換した AKAP-4CYF を作製し、これらが ALK^{ATI} によってリン酸化されるかどうかを調べた (主論文<Fig. 4A>)。その結果、これらの変異体は ALK^{ATI} によって、チロシンリン酸化されることが分かった (図 10 及び主論文<Fig. 4C>)。次に、Tyr51, Tyr53, Tyr80, Tyr146, Tyr150, Tyr152, Tyr154, Tyr170, Tyr311, Tyr436, Tyr539 を置換した AKAP8-11YF を作製して ALK^{ATI} によるリン酸化を解析すると AKAP8-11YF ではチロシンリン酸化が認められなかった (図 11 及び主論<Fig. 4D>)。このことから、ALK^{ATI} による AKAP8 の主要なリン酸化部位は、チロシンリン酸化されなかった AKAP8-11YF からチロシンリン酸化された AKAP8-5NYF と AKAP-4CYF を引いた、残りのチロシン残基である AKAP8 (Tyr51, Tyr53, Tyr80) だと考えられる (図 12)。

4. チロシンリン酸化による AKAP8 の核マトリクスから解離

チロシンリン酸化された AKAP8 は、核マトリックスから解離し、クロマチン構造変換に関与することを当研究室で報告してきた [参考文献 17]。そのため、ALK^{ATI} によって、チロシンリン酸化された AKAP8 も同様なメカニズムが働くのではないかと考えた。細胞を界面活性剤の Triton X-100 によって抽出し、insoluble と soluble にした。insoluble のマーカーとして、lamin A/C を、soluble のマーカーとして、cPLA₂ (cytosolic phospholipase A₂) を用いた [参考文献 17]。ALK^{ATI} の発現によって、insoluble の AKAP8 が減少し、soluble の AKAP8 が増加した (図 13 及び主論<Fig. 5A>)。一方で、ALK^{ATI-KD} の発現では、insoluble の AKAP8 と soluble の AKAP8 の量比は変化しなかった (図 13 及び主論文<Fig. 5A>)。また、ALK^{ATI-KD} によってリン酸化されない AKAP8-11YF を発現

させた細胞では、ALK^{ATI}を発現させても insoluble と soluble の量比は変化しなかった (図 14 及び主論文<Fig. 5B>)。このことから、核内において ALK^{ATI}によって、リン酸化された AKAP8 は核マトリックスから解離し、このことが、クロマチン構造変換に関与していることが示唆された。

5. がん抑制遺伝子 *RASSF1A* の発現抑制

核内において、チロシンキナーゼ c-Abl が、がん抑制遺伝子である *RASSF1A* (Ras association domain family member 1) の発現を抑制することを当研究室で報告してきた [参考文献 14]。そのため、核内において ALK^{ATI} も、*RASSF1A* の発現を調節するかどうかを調べた。quantitative real-time PCR (qPCR) を用いて、*RASSF1A* の mRNA 量を定量したところ、ALK^{ATI} の発現によって *RASSF1A* の発現が低下した。このことから、ALK^{ATI} は、クロマチン構造変換を誘導して *RASSF1A* の発現を抑制することが示唆された (図 15 及び主論文<Fig. 5C>)。

総括・考察

ALK^{ATI}は細胞質と核に局在することが報告されてきた [参考文献 13] が、核内の機能については、未解明であった。そこで、本研究は、核内の機能について注目し研究を行った。

本研究において核内の ALK^{ATI}は、クロマチン調節因子である AKAP8 をチロシンリン酸化させることを明らかにした。また、リン酸化された AKAP8 は核マトリックスから解離し、ヘテロクロマチン構造を誘導することを見出した。さらに ALK^{ATI}は、がん抑制遺伝子である *RASFF1A* の発現を抑制することも見出した。これらの結果から、核内において、ALK^{ATI}は AKAP8 をリン酸化することで、核マトリックスから解離する。そして、ヘテロクロマチン構造が誘導されることで、*RASFF1A* の発現が抑制されることが考えられる。

ALK の活性変異体である ALK^{ATI}も細胞質において、PI3K-AKT 経路、Ras-MAPK 経路、Jak-STAT 経路を介して、腫瘍形成を促進する [参考文献 13]。一方で、ALK-FL とは異なり、ALK^{ATI}は核内において、ヘテロクロマチン構造を誘導することでがん化が促進することを新規に発見した。EML4-ALK 融合タンパク質は、細胞質に局在し、ALK^{ATI}は細胞質と核の両方に局在する [参考文献 13]。このことから、核内におけるヘテロクロマチン誘導は ALK^{ATI}の特異的な機能であると考えられる。また、EML4-ALK 融合タンパク質は、二量体を形成して存在しているため大きい分子量 (280kDa) を持つのに対して、ALK^{ATI}は小さい分子量 (60kDa) である。そのため、分子量が小さい ALK^{ATI}のみが核膜孔を通過し核に局在すると考えられる。

当研究室では、核内において Lyn と c-Abl が AKAP8 をチロシンリン酸化しクロマチン構造を調節していることを報告してきた [参考文献 14, 16, 17]。しかし、ALK^{ATI} は Lyn と異なり、AKAP8 の主要なリン酸化部位が異なることが分かった。Lyn は AKAP8 の Tyr51, Tyr53, Tyr80, Tyr146, Tyr150, Tyr152, Tyr154, Tyr170, Tyr311, Tyr436, Tyr539 部位をチロシンリン酸化する。一方で ALK^{ATI} は AKAP8 の Tyr51, Tyr53, Tyr80 部位をチロシンリン酸化する。このチロシンリン酸化部位は異なるにも関わらず、AKAP8 を介したヘテロクロマチン構造の誘導は同じである。このことから、ヘテロクロマチン構造変換に最も重要なチロシンリン酸化は Tyr51, Tyr53, Tyr80 部位であると考えられる。その他のチロシンリン酸化部位は ALK^{ATI} とは異なるメカニズムで、ヘテロクロマチン構造の誘導を引き起こしていると考えられる。Tyr51, Tyr53, Tyr80 部位の近傍には NMTS (nuclear matrix targeting site) ドメインが存在し、NMTS ドメインは核マトリックスの構成成分と相互作用することが知られている [参考文献 20]。このことから、Tyr51, Tyr53, Tyr80 部位がチロシンリン酸化されることにより AKAP8 の NMTS ドメインと核マトリックスの構成成分の相互作用が減弱したことで AKAP8 は核マトリックスから解離すると考えられる。さらに、c-Abl による AKAP8 の主要なリン酸化部位は特定されていないが、ALK^{ATI}, c-Abl, Lyn などのチロシンキナーゼは核内において AKAP8 を介したヘテロクロマチン構造を誘導することが考えられる。その結果、核内においてチロシンキナーゼは *RASFF1A* を発現抑制することでがん化に寄与していることが考えられる。

クロマチンはヒストン修飾によってヘテロクロマチン構造やユークロマチン構造を介して遺伝子発現を調節する [参考文献 21, 22, 23, 24, 25 及び図 7]。こ

の遺伝子発現を調節することにより細胞増殖・分化・がん化を調節する。ヘテロクロマチン構造はヒストンアセチル化が低い状態やヒストンメチル化が高い状態 (H3K9, H3K27, H4K20) になることが知られている[参考文献 23, 24, 25]。H3K9 に特異的なジメチル化やトリメチル化する酵素群は同定されているが、モノメチル化する酵素群は同定されていない [参考文献 26]。H3K9 をメチル化するメチルトランスフェラーゼは SUV39H1 (suppressor of variiegation 3-9 homolog 1), SUV39H2 (suppressor of variiegation 3-9 homolog 2) などが挙げられる [参考文献 23]。ヒストンのメチル化の機能として、PC2 (polycomb 2) タンパク質が H3K27me に結合することにより不活性 X 染色体の維持に関与する [参考文献 23]。また HP1 (heterochromatin protein 1) タンパク質が H3K9 のジメチル化やトリメチル化に結合することにより転写を抑制する [参考文献 27, 28] ことや H3K9 のメチル化に結合することにより pericentric heterochromatin と呼ばれるセントロメアの領域に存在する恒常的なヘテロクロマチンの維持に関与する [参考文献 23]。

DNA のメチル化によっても遺伝子発現が制御されている [参考文献 29, 30 及び図 8]。DNA のメチル化のメカニズムとして、CG 配列が多く存在する CpG アイランドのシトシンがメチル化される [参考文献 29]。その後 MBD (methyl-CpG-binding domain) ドメインを持つタンパク質はメチル化された DNA に結合し、ヘテロクロマチン構造を誘導する。MBD ドメインを持つタンパク質は MBD1 (methyl-CpG-binding domain protein1), MBD2 (methyl-CpG-binding domain protein 2), MBD4 (methyl-CpG-binding domain protein 4) 存在し H3K9me と相互作用する [参考文献 30]。DNA のメチル化の機能として遺伝子

のプロモーター領域に CpG アイランドが存在し、がん細胞では CpG のメチル化によってがん抑制遺伝子の発現が抑制される [参考文献 29, 30]。この知見から核内の ALK^{ATI} は AKAP8 の他に SUV39H1 や SUV39H2 をチロシンリン酸化することでヘテロクロマチン構造を誘導することが考えられる。また、がん抑制遺伝子である *RASFF1A* の発現を抑制したことから、DNA のメチル化も亢進し MBD 結合タンパク質と H3K9me の相互作用が亢進することでヘテロクロマチン構造を誘導することも考えられる。このことから核内のチロシンキナーゼと DNA のメチル化の関係性についても検討する必要がある。

核内に存在する Src 型チロシンキナーゼである Lyn は KAP1 (KRAB-associated protein 1) をチロシンリン酸化することでヘテロクロマチン上の KAP1 と HP1 の相互作用が減弱する。その結果、ユークロマチン構造を誘導しサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 を発現誘導することを報告してきた [参考文献 16]。また、EGFR (epidermal growth factor receptor) ファミリーである ErbB4 は neuregulin-1 の刺激により、ErbB4 の細胞質内領域 (4ICD) が切断され、4ICD は細胞質内の下流分子をチロシンリン酸化する。一部の 4ICD は核内に移行し H3K9me を促進することも報告してきた [参考文献 31]。当研究室の報告から、核内に存在する ALK^{ATI} は KAP1 をチロシンリン酸化することや 4ICD によってチロシンリン酸化する基質についても ALK^{ATI} がチロシンリン酸化する可能性が考えられる。このことから、核内に存在するチロシンキナーゼはある程度同じ基質をチロシンリン酸化することで、ヘテロクロマチンを誘導すると考えられる。当研究室では、核内に存在する c-Abl の基質を質量分析により同定してきた。この結果から、多く RNA 結合タンパク質が同定された。チロシ

ンキナーゼと RNA 結合タンパク質の関係性についての報告はないが、チロシンキナーゼのリン酸化によって RNA の安定性などの調節が考えられる。

このことから核内におけるチロシンキナーゼによる表現型や分子機構に関して、今後更なる研究の発展が望まれる。

材 料

プラスミド

ALK full length (ALK-FL) と ALK^{ATI} の cDNA は、pENTR223.1/ALK (I.M.A.G.E.Consortium [LLNL] cDNA Clones) から PCR 法によって増幅し pcDNA4/TO vector (サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社、日本) に組み込んだ。ALK^{ATI} kinase-dead (KD) K1150A は inverse PCR 法によって作製した。pcDNA4/TO/FH-NLS-Lyn プラスミド [参考文献 15, 17] を Xho I で処理した後、ALK^{ATI} を Xho I 処理して Lyn の cDNA を除去したそのプラスミドに組み込むことで、NLS-ALK^{ATI} を作製した。PCR 法に使用したプライマー配列は表 1 に記載する。

抗 体

次の抗原に対する抗体：ALK (#3633；CST ジャパン株式会社、日本)、myc (ab9106；アブカム株式会社、日本)、lamin A/C (N-18；サンタクルズバイオテクノロジー社、米国)、phosphotyrosine (pTyr) (4G10；メルクミリポア、日本)、cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) (4-4B-3C；サンタクルズバイオテクノロジー社、米国)、actin (C4；メルクミリポア、日本)、FLAG (M2；シグマアルドリッチジャパン合同会社、日本)、H3K9me3 (Lys9 tri-methylated histone H3) (ab8898；アブカム株式会社、日本)を一次抗体として用いた。Horseradish peroxidase (HRP)-F(ab')₂ 二次抗体は GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 (日本) から購入した。

細胞・遺伝子導入

HeLa S3 cells (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク、大阪府茨木市、日本) は、5% bovine serum (BS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (ニッスイ、日本) で培養した [参考文献 34, 35]。遺伝子導入は、5 μ g (もしくは 15 μ g) の直鎖状ポリエチレンイミン (Polyscience, Inc., Warrington, PA, U.S.A.) または、リポフェクタミン 2000 (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社、日本) を使って、プラスミド DNA を一過性に遺伝子導入した [参考文献 14, 15, 16, 17, 32, 33]。

方法

免疫沈降及びウエスタンブロットティング

- ① ウエスタンブロットティングは以下の通りに行い実施した [参考文献 16, 17, 31, 32, 33]。概要を説明すると SDS サンプルバッファーを用いて細胞を溶解し、ポリアクリルアミドを用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。その後、セミドライ式で PVDF メンブレンに転写した。転写済みの PVDF メンブレンを適切な一次抗体、二次抗体で処理した。Enhanced chemiluminescence (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社、日本) を用いて検出を行った。
- ② 免疫沈降は以下の通りに行い、実施した [参考文献 16, 17, 32, 33]。概要を説明すると TNE buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 1 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 4 μ g/mL aprotinin, , 4 μ g/mL leupeptin,

2mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1.6 μ g/mL pepstatin A) を用いて、細胞を溶解し、4°C 21,130 \times g で 15 分間遠心した後、上清を回収した。Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社、日本) に抗 myc 抗体と回収した上清を、4°C に設定した低温室で 24 時間インキュベートさせた。インキュベート後、SDS サンプルバッファーでタンパク成分を溶解させてウエスタンブロッティングを行った。

細胞内分画 [参考文献 17]

細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で回収した後、0.2% Triton X-100 extraction buffer (0.2% Triton X-100 を含んだ PBS, 4 μ g/ml aprotinin, 2 mM Na₃VO₄, 4 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1.6 μ g/ml pepstatin A) で抽出を行った。その後、氷上に 10 分間放置した後、15,000 \times g で 10 分間遠心した。上清とペレットに分けた後、それぞれに SDS サンプルバッファーを加えた。ペレット側は、ソニケーションを行い、ペレットを溶解した。

quantitative real-time PCR (qPCR) [参考文献 34, 35]

細胞から RNAiso plus reagent (タカラバイオ株式会社、日本) を使って、RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡、日本) を使って、0.5 μ g RNA から cDNA を合成した。Thunderbird SYBR Green Polymerase Kit (東洋紡、日本) and an Eco RealTime PCR System (イルミナ株式会社、日本) を使って、PCR を行った。qPCR 法に使用したプライマー配列は表 2 に記載する。

参考文献

- 1) Blume-Jensen P and Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature*, 411 : 355-365 (2001)
- 2) Hallberg B and Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat. Rev. Cancer*, 13 : 685–700 (2013)
- 3) Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, and Wellstein A. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J. Biol. Chem.*, 277 : 35990–35998 (2002)
- 4) Stoica GE, Kuo A, Aigner A, Sunitha I, Souttou B, Malerczyk C, Caughey DJ, Wen D, Karavanov A, Riegel AT, and Wellstein A. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J. Biol. Chem.*, 276 : 16772–16779 (2001)
- 5) Stoica GE, Kuo A, Aigner A, Sunitha I, Souttou B, Malerczyk C, Caughey DJ, Wen D, Karavanovi A, Riegel AT, and Wellstein A. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J. Biol. Chem.*, 276 : 16772-16779 (2001)
- 6) Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, and Yamamoto T. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*, 14 : 439-449 (1997)
- 7) Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, and Witte PD. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*, 14 : 2175-2188 (1997)

- 8) Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, and Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 263 : 1281–1284 (1994)
- 9) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, and Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448 : 561–566 (2007)
- 10) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y, and Mano H. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 : 19893-19897 (2008)
- 11) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y, and Mano H. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 68 : 4971-4976 (2008)
- 12) Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4–ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci.*, 99 : 2349-2355 (2008)
- 13) Wiesner T, Lee W, Obenauf AC, Ran L, Murali R, Zhang QF, Wong EW, Hu W, Scott SN, Shah RH, Landa I, Button J, Lailier N, Sboner A, Gao D, Murphy DA, Cao Z, Shukla S, Hollmann TJ, Wang L, Borsu L, Merghoub T, Schwartz GK, Postow MA, Ariyan CE, Fagin JA, Zheng D, Ladanyi M, Busam KJ, Berger MF, Chen Y, and Chi P. Alternative transcription initiation leads to expression of a novel ALK isoform in

- cancer. *Nature*, 526 : 453–457 (2015)
- 14) Aoyama K, Fukumoto Y, Ishibashi K, Kubota S, Morinaga T, Horiike Y, Yuki R, Takahashi A, Nakayama Y, and Yamaguchi N. Nuclear c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation induces chromatin structural changes through histone modifications that include H4K16 hypoacetylation. *Exp. Cell Res.*, 317 : 2874–2903 (2011)
- 15) Takahashi A, Obata Y, Fukumoto Y, Nakayama Y, Kasahara K, Kuga T, Higashiyama Y, Saito T, Yokoyama KK, and Yamaguchi N. Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. *Exp. Cell Res.*, 315 : 1117–1141 (2009)
- 16) Kubota S, Fukumoto Y, Aoyama K, Ishibashi K, Yuki R, Morinaga T, Honda T, Yamaguchi N, Kuga T, Tomonaga T, and Yamaguchi N. 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.*, 288 : 17871–17883 (2013)
- 17) Kubota S, Morii M, Yuki R, Yamaguchi N, Yamaguchi H, Aoyama K, Kuga T, Tomonaga T, and Yamaguchi N. Role for tyrosine phosphorylation of A-kinase anchoring protein 8 (AKAP8) in its dissociation from chromatin and the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.*, 290 : 10891–10904 (2015)
- 18) Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, and Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129 : 823–837 (2007)

- 19) Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, and Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 363 : 1693–1703 (2010)
- 20) Akileswaran L, Taraska JW, Sayer JA, Gettemy JM, and Coghlan VM. A-kinase-anchoring protein AKAP95 is targeted to the nuclear matrix and associates with p68 RNA helicase. *J. Biol. Chem.*, 276 : 17448–17454 (2001)
- 21) Jenuwein T and Allis CD. Translating the histone code. *Science*, 293 : 1074–1080 (2001)
- 22) Turner BM. Defining an epigenetic code. *Nat. Cell Biol.*, 9 : 2–6 (2007)
- 23) Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128 : 693–705 (2007)
- 24) Strahl BD and Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403 : 41-45 (2000)
- 25) Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 22 : 836-845 (2000)
- 26) Black JC, Van Rechem C, and Whetstine JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol. Cell*, 48 : 491-507 (2012)
- 27) Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, and Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410 : 120-124 (2001)

- 28) Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, and Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410 : 116-120 (2001)
- 29) Kristiansen S, Nielsen D, and Sölétormos G. Methylated DNA for monitoring tumor growth and regression: How do we get there? *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 51 : 149-159 (2014)
- 30) Li L, Chen BF, and Chan WY. An Epigenetic Regulator : methyl-CpG-binding domain protein 1 (MBD1). *Int. J. Mol. Sci.*, 16 : 5125-5140
- 31) Ishibashi K, Fukumoto Y, Hasegawa H, Abe K, Kubota S, Aoyama K, Kubota S, Nakayama Y, and Yamaguchi N. Nuclear ErbB4 signaling through H3K9me3 is antagonized by EGFR-activated c-Src. *J. Cell Sci.*, 126 : 625-637 (2013)
- 32) Morii M, Kubota S, Honda T, Yuki R, Morinaga T, Kuga T, Tomonaga T, Yamaguchi N, and Yamaguchi N. Src acts as an effector for Ku70-dependent suppression of apoptosis through phosphorylation of Ku70 at Tyr-530. *J. Biol. Chem.*, 292 : 1648-1665 (2017)
- 33) Kuki K, Yamaguchi N, Iwasawa S, Takakura Y, Aoyama K, Yuki R, Nakayama Y, Kuga T, Hashimoto Y, Tomonaga T, and Yamaguchi N. Enhancement of TGF- β -induced Smad3 activity by c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of its coactivator SKI-interacting protein (SKIP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 490 : 1147-1153 (2017)
- 34) Hirata K, Takakura Y, Shibasaki M, Morii M, Honda T, Oshima M, Aoyama K, Iwama A, Nakayama Y, Takano H, Yamaguchi N, and Yamaguchi N. Forkhead box protein A1 confers resistance to transforming growth factor- β -induced apoptosis in

- breast cancer cells through inhibition of Smad3 nuclear translocation. *J. Cell. Biochem.*, 120 : 2259-2270 (2019)
- 35) Anzai E, Hirata K, Shibazaki M, Yamada C, Morii M, Honda T, Yamaguchi N, and Yamaguchi N. FOXA1 induces E-cadherin expression at the protein level via suppression of Slug in epithelial breast cancer cells. *Bio. Pharm. Bull.*, 40 : 1483-1489 (2017)
- 36) Cohen Y, Singer G, Lavie O, Dong SM, Beller U, and Sidransky D. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clin. Cancer Res.*, 9 : 2981-2984 (2003)
- 37) Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, and White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol. Cell. Biol.*, 22 : 4309-43018 (2002)

図表

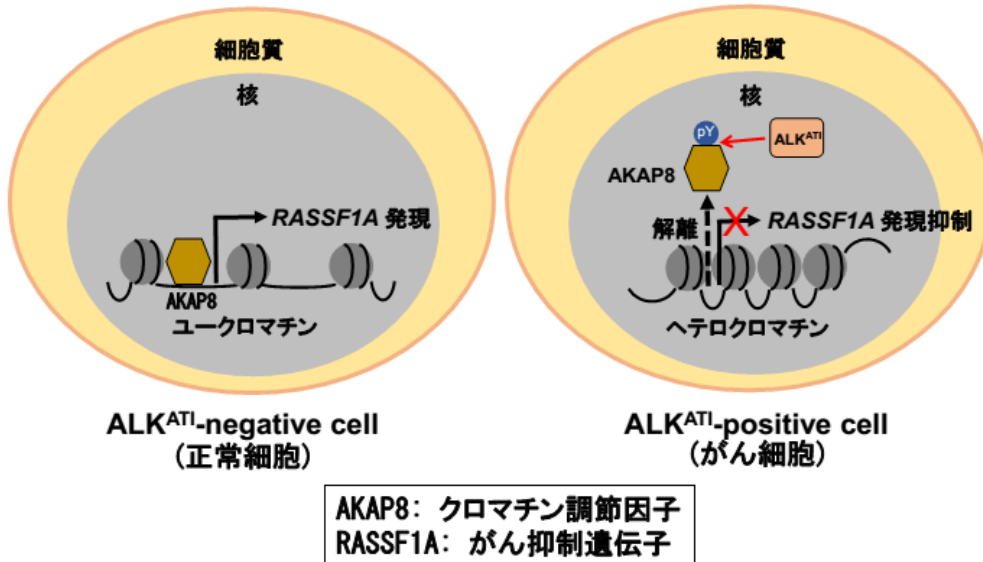
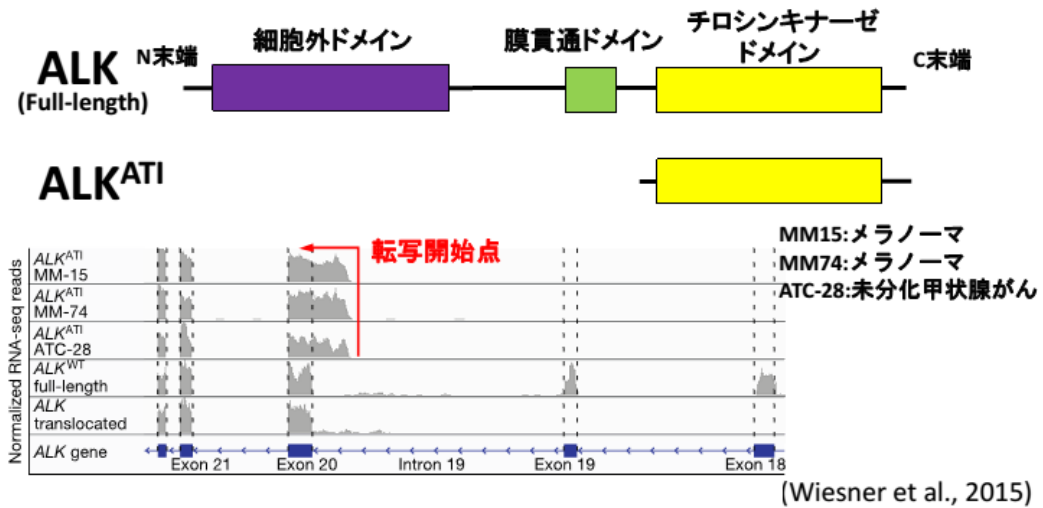
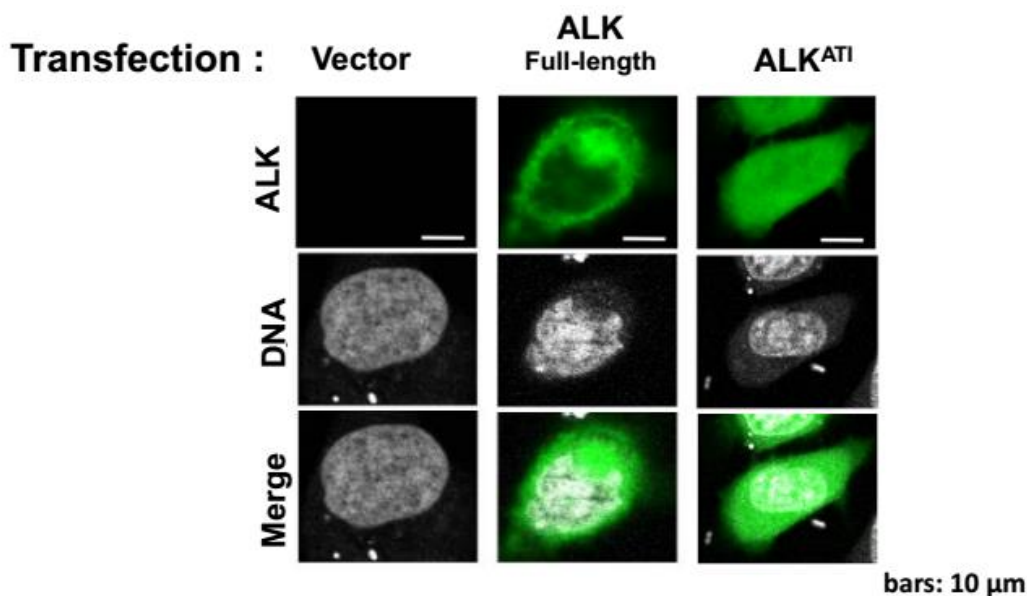


図 1. 本研究の概要



ALK^{ATI} (チロシンキナーゼドメイン) はALK full-length と異なり、Intron19の後半から転写される

図 2. ALK^{ATI} (alternative transcription initiation) [参考文献 13]



ALK^{ATI}は細胞質と核に局在する

図 3. ALK^{ATI}の局在 [参考文献 13]

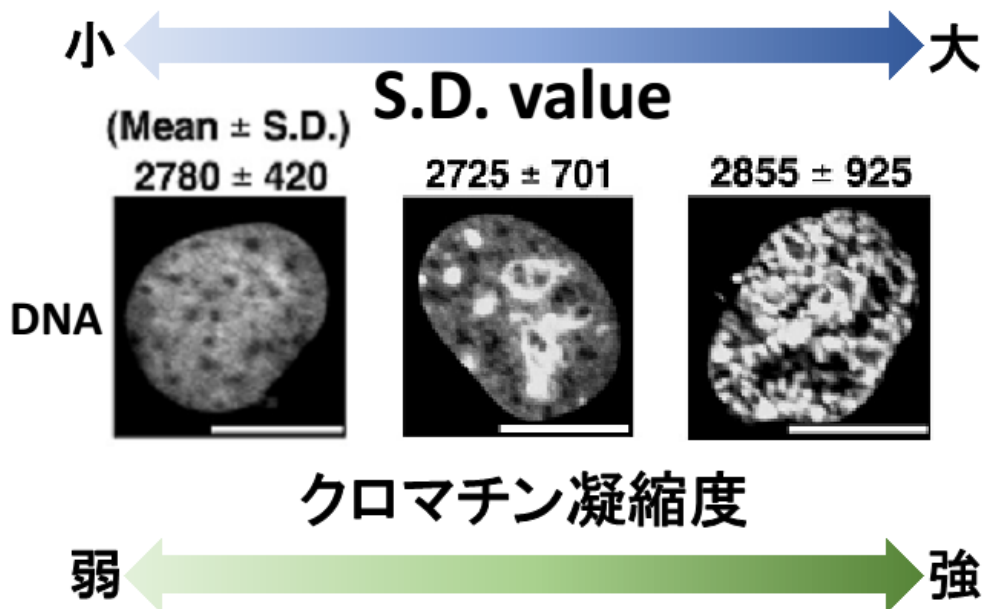
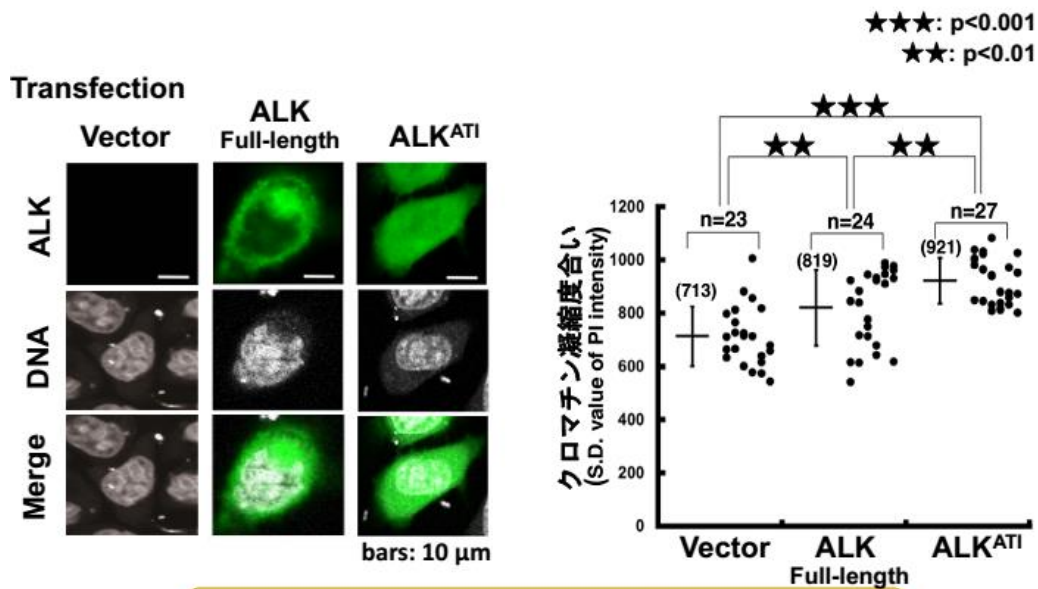
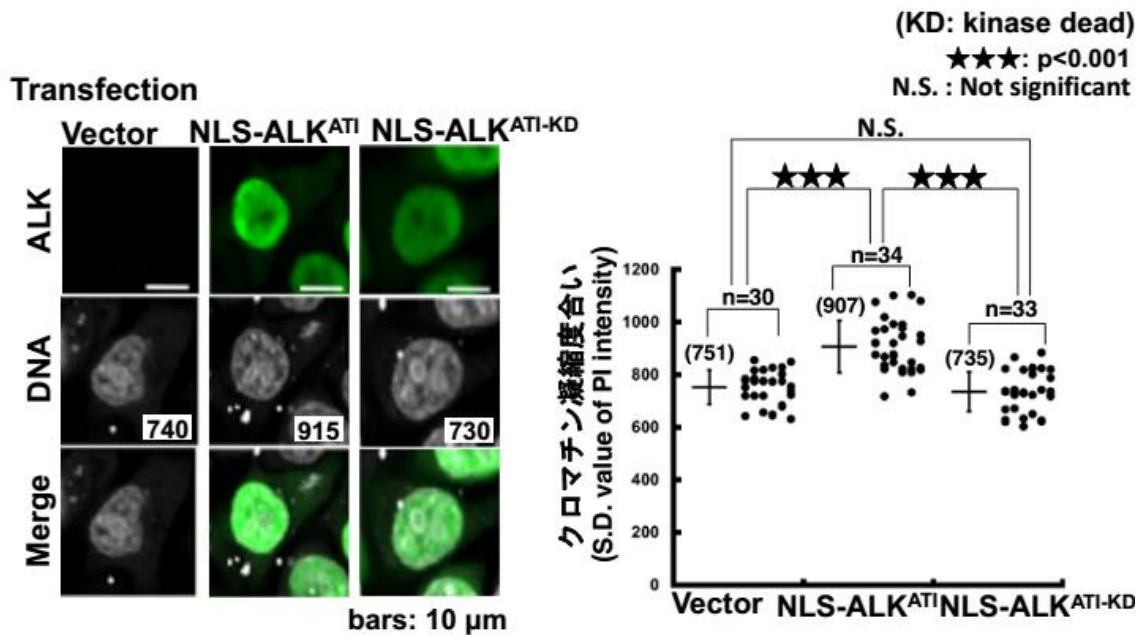


図 4. S.D. (標準偏差) を用いたクロマチン凝縮度計測【参考文献 15】



ALK^{ATI}はクロマチン凝縮を誘導する

図 5. ALK^{ATI}によるクロマチン構造変換



クロマチン凝縮はキナーゼ活性に依存している

図 6. チロシンリン酸化によるクロマチン凝縮

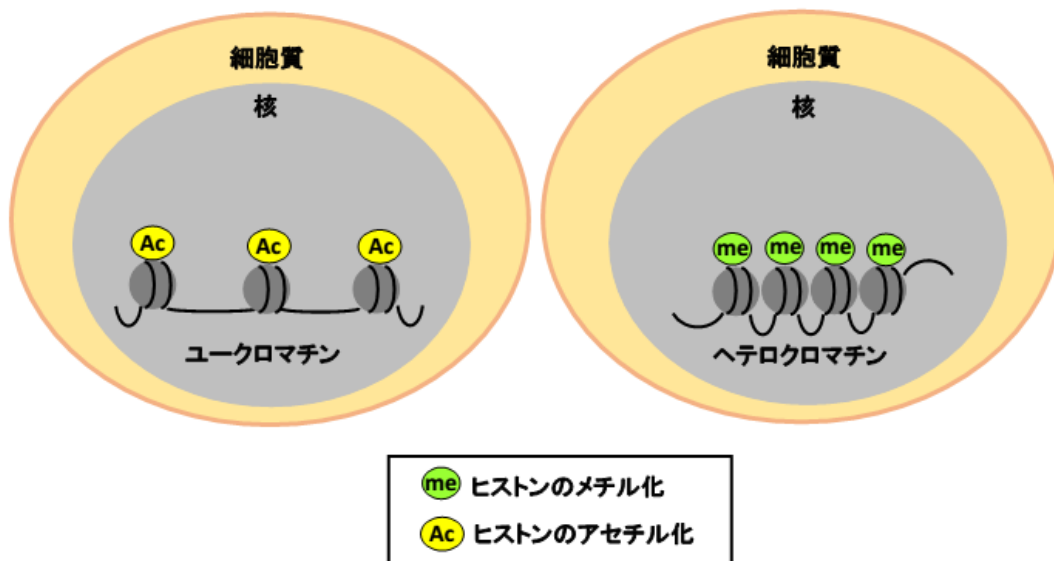
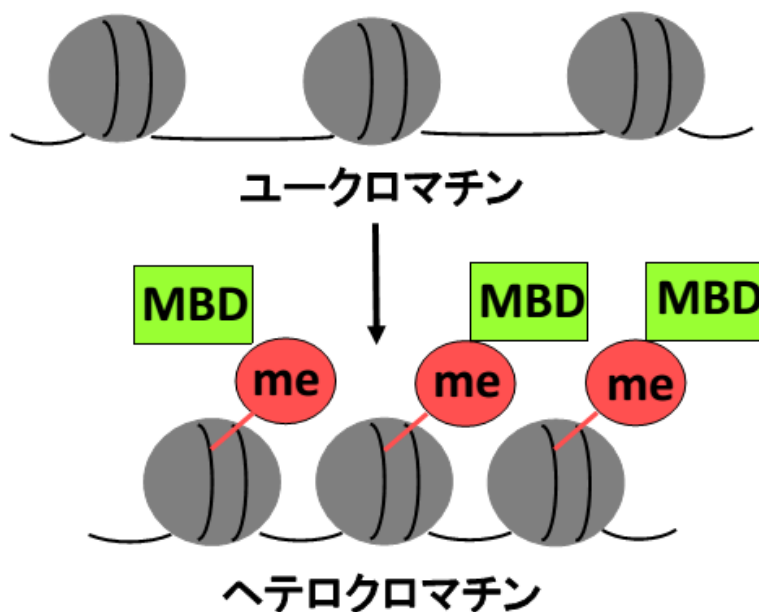
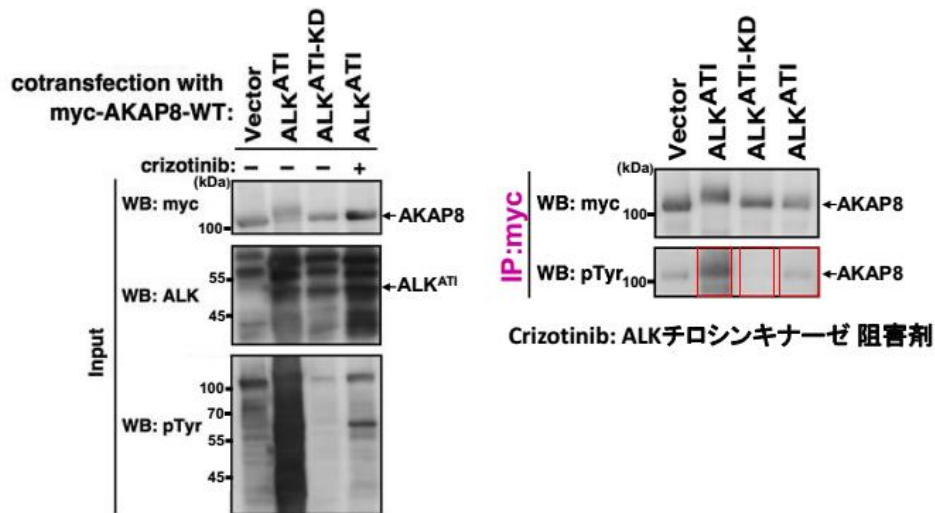


図 7. ヒストン修飾によるクロマチン構造変換



MBD MBD タンパク質(methyl-CpG-binding domain)
me DNAメチル化

図 8. DNAメチル化によるヘテロクロマチン構造変換



ALK^{ATI}はキナーゼ活性依存的にAKAP8をリン酸化する

図 9. ALK^{ATI}によるAKAP8のチロシンリン酸化

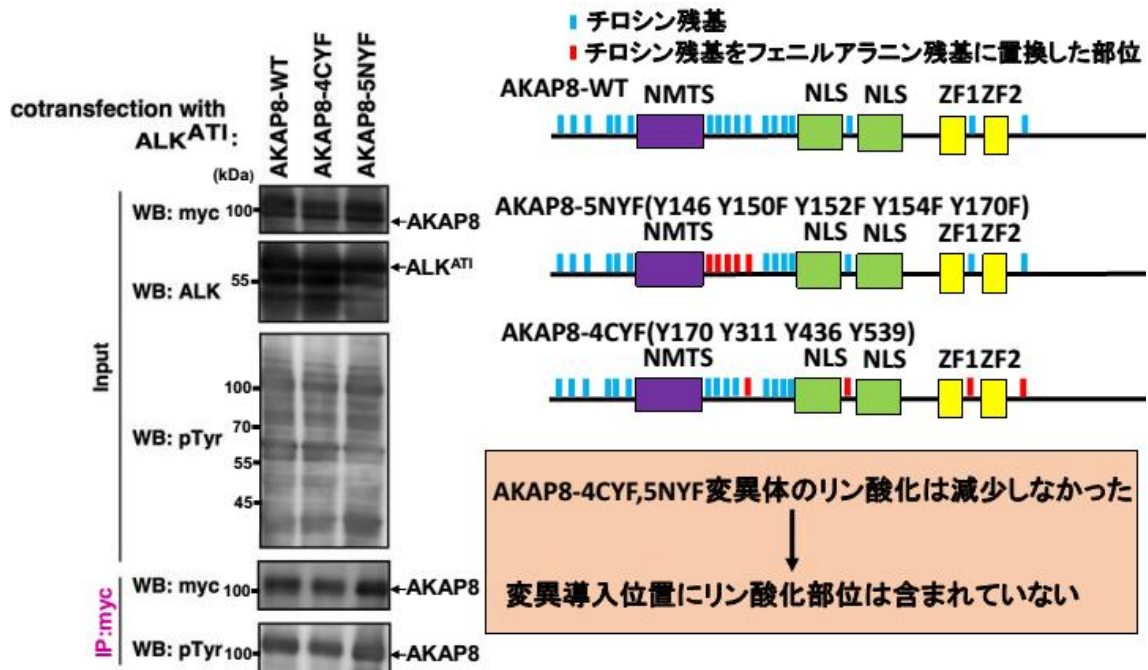


図 10. AKAP8-4CYF, 5NYF変異体のリン酸化

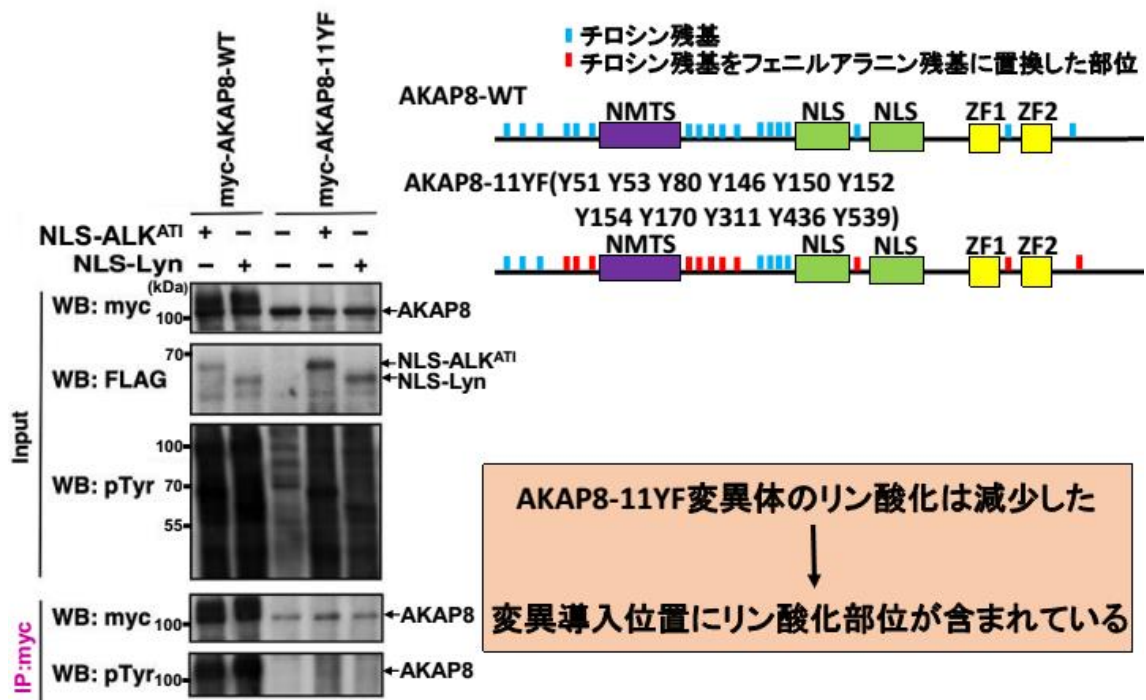


図 11. AKAP8-11YF変異体のリン酸化

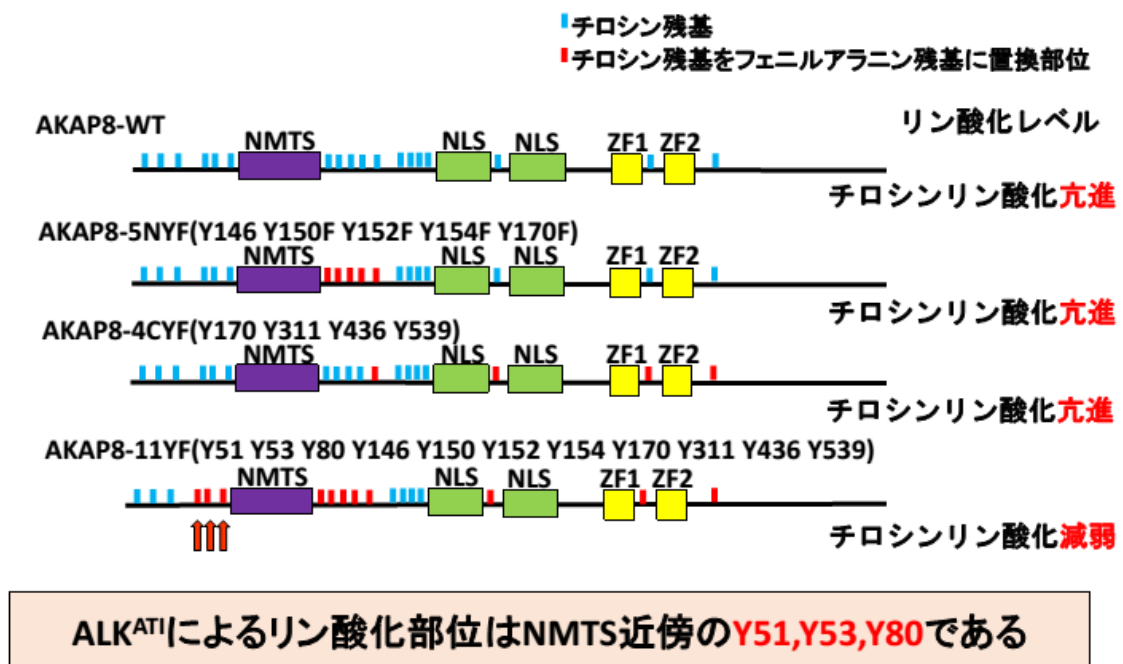
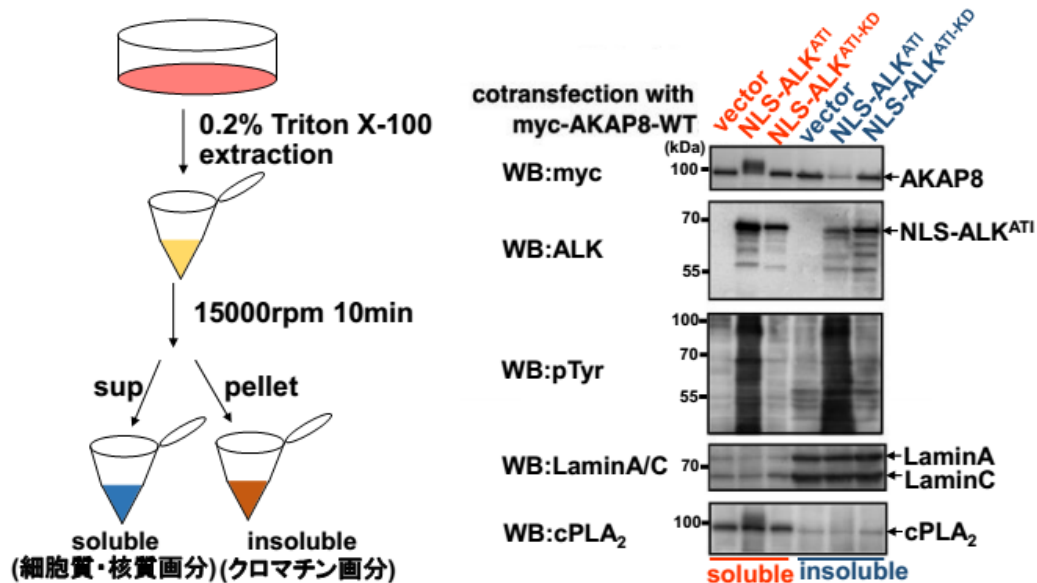
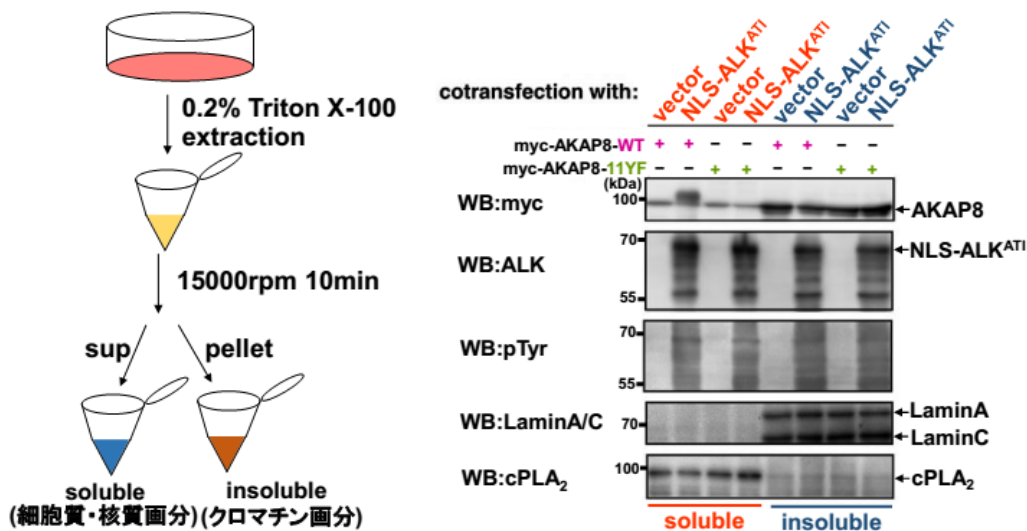


図 12. リン酸化部位の同定



リン酸化されたAKAP8は**クロマチン画分**から解離する

図 13. リン酸化されたAKAP8の局在

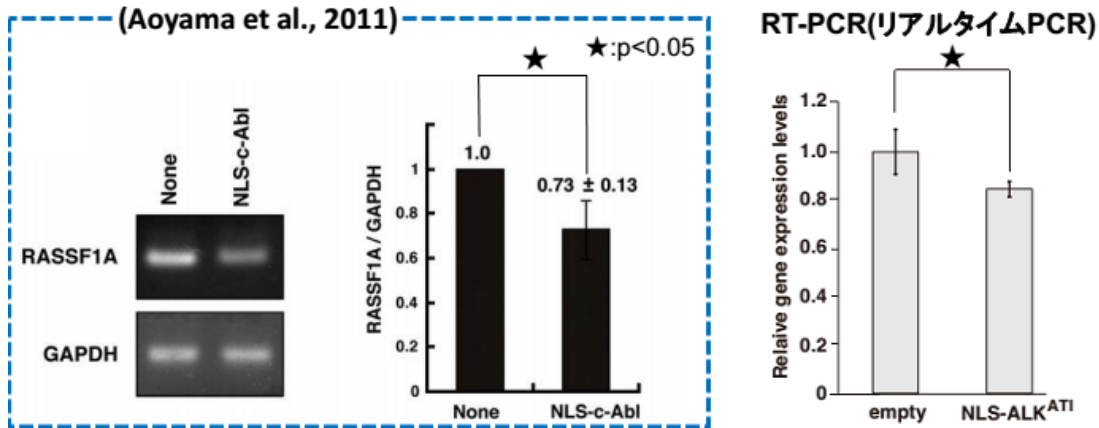


非リン酸化変異体AKAP8は局在変化しない

図 14. 非リン酸化変異体AKAP8の局在

RASSF1A(Ras association domain family member 1)

- ・がん抑制遺伝子
- ・プロモーター領域がメチル化されているため、腺がんでは抑制されている (参考文献 36)
- ・このタンパク質はサイクリンD1の集積を阻害することにより細胞周期を停止させる (参考文献 37)



ALK^{AT1}はRASSF1A発現を抑制する

図 15. ヘテロクロマチンによる遺伝子抑制

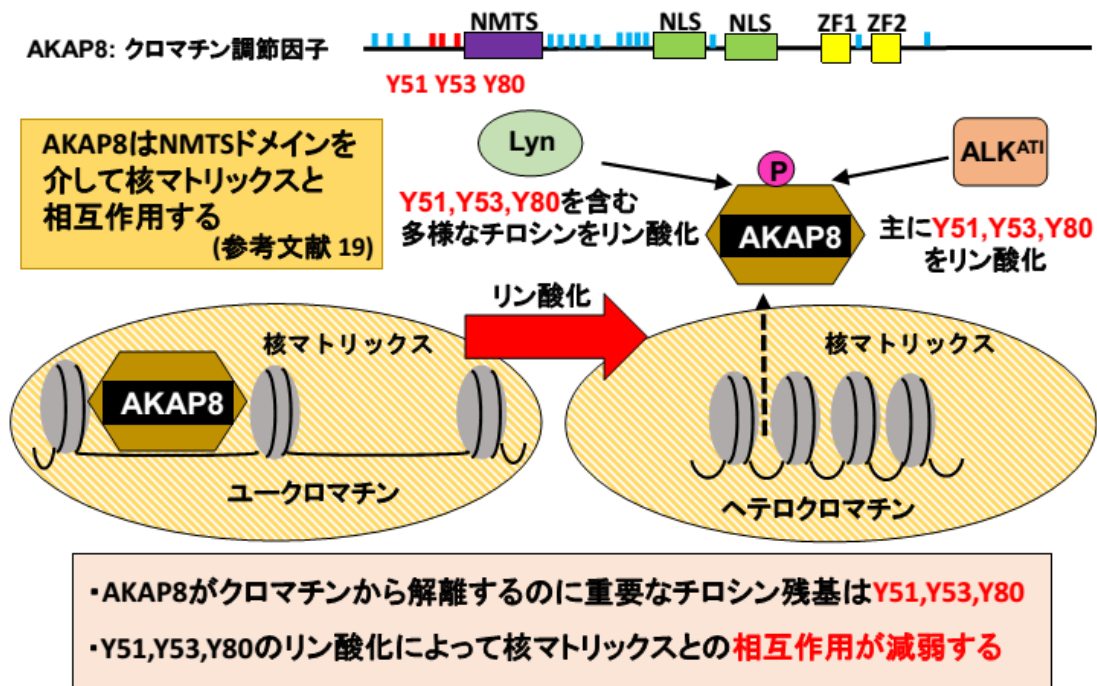
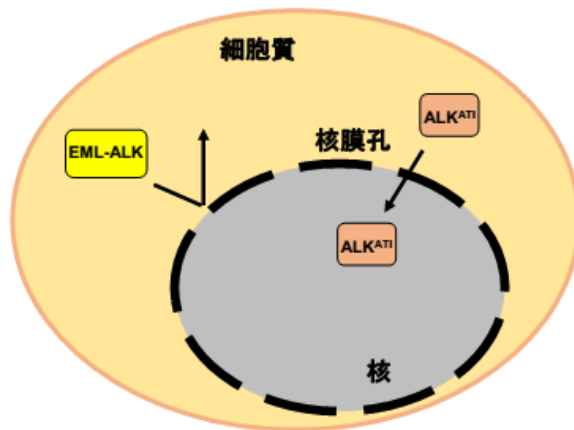
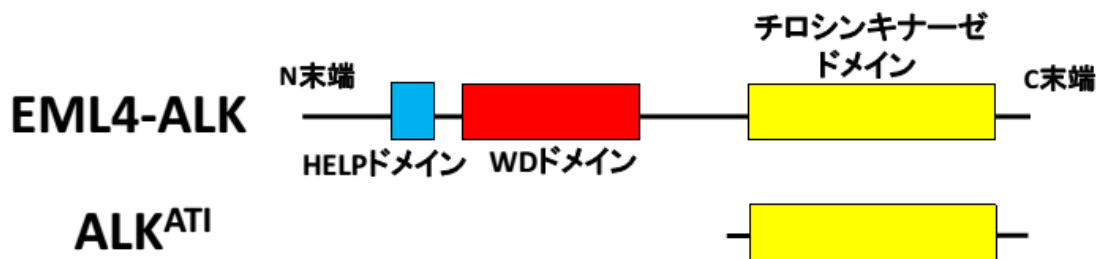


図 16. <考察1> AKAP8のチロシンリン酸化の役割



EML-ALK: $140\text{kDa} \times 2 = 280\text{kDa}$

- ・ キナーゼ恒常活性であるEML-ALKはWDドメインを介して二量体を形成し分子量が大きいため、核膜孔を通過できない。

ALK^{AT1}: 60kDa

- ・ ALK^{AT1}は分子量が小さいため、核膜孔を通過できる。

図 17. <考察 2> なぜALK^{AT1}のみ核移行するのか？

	上段 : Forward プライマー(5'→3')
	下段 : Reverse プライマー(5'→3')
ALK FL	AGTGATCGAATCCCACCATGGGAGCCATCGGGCTCCTGTGGCTCCTG CCAGATGCTCGAGTCAGGGCCCAGGCTGGTTCATGCTATTCTT
ALK ^{ATI}	TGCCATCGAATCCCACCATGCAGATGGAGCTGCAGAGCCCTGAGTACA ACTG CCAGATGCTCGAGTCAGGGCCCAGGCTGGTTCATGCTATTCT
ALK ^{ATI} kinase dead K1150A(ALK ^{ATI-KD})	CAAGCCCCCTGCAAGTGGCTGTGGCAACGTTGCCTGAAGTGTGCTCTG AACAGGACGAACTGG GGTCGTTGGGCATTCCGGACACCTGGCCTT-
NLS-ALK ^{ATI}	TCTCTCGAGATATGCAGATGGAGCTGCAGAGCCCTGAGTAC CCAGATGCTCGAGTCAGGGCCCAGGCTGGTTCATGCTATTCTT

表 1. PCR 法に使用したプライマー配列

	上段 : Forward プライマー(5'→3')
	下段 : Reverse プライマー(5'→3')
<i>RASSF1A</i>	GGCTGGGAACCCGCGGTG TCCTGCAAGGAGGGTGGCTTCT
<i>GAPDH</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCAC CTGTTGCTGTA

表 2. qPCR 法に使用したプライマー配列

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Yuki Takakura, Noritaka Yamaguchi, Takuya Honda, Mariko Morii, Ryuzaburo Yuki, Yuji Nakayama, and Naoto Yamaguchi. The truncated isoform of the receptor tyrosine kinase ALK generated by alternative transcription initiation (ALK^{ATI}) induces chromatin structural changes in the nucleus in a kinase activity-dependent manner. *Biol. Pharm. Bull.*, 40: 1968-1975 (2017)

本文中では「主論文」の名称で引用した。

学位論文審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院）薬学博士 村山俊彦

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院）医学博士 伊藤素行

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院）薬学博士 川島博人

謝 辞

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学研究室、山口直人教授、山口憲孝准教授に深く感謝致します。

大変お忙しい中、本論文を審査し、貴重な意見を下さった本学教授 村山俊彦先生、教授 伊藤素行先生、教授 川島博人先生に深く感謝致します。

研究を進めるにあたって、様々な助言を下さった先輩方、共に励まし合いながら研究を進めて下さった同輩、後輩の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、学生生活を陰で支え、励まし応援してくれた、家族、親戚一同に深く感謝致します。