紫外線による Ret チロシンキナーゼ活性化のメカニズム

名古屋大学 医学部免疫

加藤昌志

The cellular proto-oncogene *c-RET* encodes a receptor-tyrosine kinase. The catalytic activities of Ret kinases as the products of oncogene *RET* with multiple endocrine neoplasia type 2A (Ret-MEN2A) or 2B (Ret-MEN2B) mutations and the hybrid gene from *c-RET* and *RFP* (Rfp-Ret) were higher than those of c-Ret. Here we demonstrate that ultraviolet light (UV) irradiation induced activation of c-Ret and superactivation of genetically activated Ret-MEN2A, Ret-MEN2B and Rfp-Ret. The UV-induced activation and superactivation of Ret was closely associated with the redox reaction-mediated dimerization or polymerization of the Ret proteins. UV also induced intracellular dimerization and activation of the extracellular domain-deleted mutant Ret (Ret-PTC-1). Overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase in cells due to gene transfection prevented the promotion of UV-mediated dimerization and the superactivation of Ret-MEN2A kinase. These results suggest that the UV-induced intracellular oxidative condition mediates dimerization and the activation of Ret kinases.

1 緒 言

皮膚の老化は、シワやシミ(肝斑)を誘導し、美容上の 大きな問題となる。紫外線は、酸化ストレスの一種^{1,2)}で、 皮膚の老化を促進したり、悪性黒色腫などの皮膚癌を誘発 する可能性が、古くより報告されている。近年、紫外線が 細胞内シグナル伝達の初期段階であるチロシンキナーゼを 活性化することが、報告された²⁾。Src などのチロシンキ ナーゼの活性化は、コラーゲン分解酵素の生成を誘導する ³⁾ので、紫外線は、チロシンキナーゼを活性化を介して コラーゲン分解酵素の生成と活性化を誘導し、シワを誘導 する可能性がある。ゆえに、紫外線によるチロシンキナー ゼの活性化のメカニズムを解明することは、紫外線による シワの形成などを防ぐために有用であると考えられる。

*c-RET*は、レセプタータイプのチロシンキナーゼをコ ードしており、腎臓や腸管神経節の形成に不可欠な遺伝子 である⁴⁻⁶⁾。*c-RET*は、点変異やリアレンジメントを起こ すことにより、ヒトの多発性内分泌腺腫 2A型(MEN2A) や 2B型(MEN2B)および甲状腺癌(PTC)の発生に関 与していると考えられている⁷⁻¹²⁾。

本研究では、紫外線がRetキナーゼを活性化するメ カニズムを一部解明した。さらに、Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)が、紫外線によるRetチロシンキナ ーゼ活性化作用を抑制できることを示した。

2 実 験



Control of ultraviolet light-mediated Ret tyrosine kinase activation

Masashi Kato

Department of Immunology, Nagoya University School of Medicine

2.1 Ret 変異体蛋白質を発現した細胞株の樹立

Figure 1 に示すように、*c-RET* (Figure1A)、*RET*-MEN2A (c-RET の 634 番目のシステインをアルギニンに 変異; Figure1A)、RET-MEN2B (c-RET の 918 番目の メチオニンをスレオニンに変異; Figure1A) および細胞 外領域を欠損した *RET*-PTC-1 (Figure1B)、*RET*-PTC-1-C365A (*RET*-PTC-1 の 365 番目のシステインをアラニ ンに変異; Figure1B)、*RET*-PTC-1-C376A (*RET*-PTC-1 の 376 番目のシステインをアラニンに変異; Figure1B) の遺伝子を NIH3T3 細胞に導入し、これらの Ret 変異体 蛋白質を発現した細胞株の樹立した。また、HA のタグを



Figure 1. Schematic illustration of mutant *RET* cDNA constructs.

(A) *RET* cDNA encoding a long (1114 amino acids) isoform in which cysteine at codon 634 was replaced by arginine (C634R; *RET*-MEN2A), or methionine at codon 918 by threonine (M918T; *RET*-MEN2B). (B) Mutant RET cDNA encoding a long isoform in which the extracellular domain was deleted (*RET*-PTC-1). *RET*-PTC-1 in which cysteine at codon 365 or 376 was replaced with alanine (Ret-TPC-1-C365A, Ret-TPC-1-C376A). SS, signal sequence; CAD, cadherin-like domain; CYS, cysteine-rich region; TM, transmembrane domain 2; aa, amino acids. (参考文献 1 より引用)

つけた Cu/Zn superoxide dismutase (*HA-SOD1*) 遺伝子 を RET-MEN2A 遺伝子と同時に NIH3T3 細胞に導入し、 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) と *Ret*-MEN2A の 蛋白質を両方発現した細胞株も作製した。

2.2 ウエスタンブロット、免疫沈降、キナーゼアッセ イ

本研究で施行したウエスタンブロットについては、以前 記載した方法に準じた¹³⁾。また、免疫沈降およびキナー ゼアッセイについても、同様に以前記載した方法に準じて 施行した^{14,15)}。

2.3 紫外線照射

細胞に対する紫外線の照射は、Dhanwada *et al.*の方法
¹⁶⁾ に準じて施行された。紫外線Bの照射量はミクロボル



Figure 2. Comparison of kinase activity between c-Ret, Ret-MEN2A, and Ret-MEN2B.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with c-RET (lane 2 in A-C), RET-MEN2A (lane 3 in A-C) or RET-MEN2B (lane 4 in A-C) and non-transfected control NIH 3T3 cells (lane 1 in A-C) were immunoprecipitated with anti-Ret antibody. Then, those were subjected either to Western blotting with anti-phosphotyrosine antibody (A) or anti-Ret antibody (B) or to in vitro kinase assay (C). SDS-PAGE was done in 5 % (A-B) or 13 % (C) polyacrylamide gel. pRet (doublet band): autophosphorylated c-Ret, Ret-MEN2A or Ret-MEN2B; pMBP: phosphorylated MBP. All measurements were repeated 4 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文 献 1 より引用) トアンプメーター (UVR-3036/S; Topcon Corporation, Tokyo, Japan) にて測定した。

3 結 果

Retキナーゼは遺伝子レベルの変異により活 性化される

Figure 2 に示したように、Ret-MEN2A および Ret-MEN2B は、Figure 1 で示したような遺伝子レベルの変 異により、*c-Ret* に比較して 2 倍から数倍活性化されていた。

3.2 Ret キナーゼは紫外線により活性化される

*c-Ret*は、紫外線B照射後5分後に、著明に活性化された(Figure 3A-C)。さらに興味深いことには、遺伝子レベルの変異によりすでに活性化されているRet-MEN2AおよびRet-MEN2Bは、紫外線Bの照射によりさらに活



Figure 3. UV irradiation induces superactivation of mutant Ret.

Lysates from the NIH 3T3 cells transfected with c-RET (A-C), RET-MEN2A (D-F) or RET-MEN2B (G-I) after sham or UV irradiation were immunoprecipitated with anti-Ret antibody, and the resulting immunoprecipitates were subjected either to Western blotting with antiphosphotyrosine antibody (A, D, G) or anti-Ret antibody (B, E, H) or to in vitro kinase assay (C, F, I). SDS-PAGE was done in 5 % (A, B, D, E, G, H) or 13 % (C, F, I) polyacrylamide gel. (A-I) lane 1: sham irradiation; lane 2: 5 min after 600 J/m2 of UVB irradiation. pRet (doublet band): autophosphorylated c-Ret (C), Ret-MEN2A (F) or Ret-MEN2B (I); pMBP: phosphorylated MBP. All measurements were repeated 3-4 times with basically the same results. Representative results are provided. The exposure times to X-ray film for autoradiography for Figure A, D and G, and for Figure C, F and I were adjusted to develop bands with comparable density for lane 1 as sham irradiated control; see Figure 2 for comparison of the density of bands among c-Ret, Ret-MEN2A and Ret-MEN2B which were developed by the same exposure time. (参考文献 1 より引用)

性化された。我々は、この反応を紫外線によるスーパーア クティベーションと呼んだ。

3.3 Ret キナーゼの下流に位置するシグナル伝達 分子も紫外線により活性化される

Figure 4A-H に示したように、Ret-MEN2Aの下流に位 置するシグナル伝達分子である ERK、JNK、p38、cJun は、 c-Ret のそれらに比較して活性化されていた。紫外線 B の 照射は Ret-MEN2A の下流に位置するシグナル伝達分子 を、さらに活性化(スーパーアクティベーション)させた (Figure 4I-L)。



Figure 4 UV irradiation promotes phosphorylation of MAPK family and c-Jun.

Lysates from the NIH 3T3 cells transfected with *c-RET* (lane 2 in A-H) or *RET*-MEN2A (lane 3 in A-H, lane 4 and 5 in I-L) and nontransfected control NIH 3T3 cells (lane 1 in A-H) without stimulation (lane 1-3 in A-H, lane 4 in I-L) or 10 min after 600 J/m² of UVB irradiation (lane 5 in I-L) were subjected to Western blotting with anti-ERK (A), anti-phospho-ERK (E, I), anti-JNK (B), anti-phospho-JNK (F, J), anti-p38 (C), anti-phospho-p38 (G, K), anti-c-Jun (D) and anti-phospho-c-Jun (H, L) antibodies. SDS-PAGE was done in 10 % polyacrylamide gel (A-L). All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

3.4 紫外線は Ret 分子の二量体形成を促進させ、 Ret キナーゼを活性化させる

Figure 5 および Figure 6 に示したように、紫外線 B は、 c-Ret、Ret-MEN2A、Ret-MEN2B 分子の SS 結合を介し た二量体形成の促進し、それらのキナーゼを活性を亢進さ せた。

3.5 Ret 分子の細胞内領域は、紫外線のターゲットになる

Figure 7 に示したように、紫外線 B は細胞外領域を欠 落した Ret-PTC-1 の SS 結合を介した二量体形成の促進し、



Figure 5 UV promotes dimerization of c-Ret.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with c-RET after sham or UV irradiation were subjected to Western blotting with anti-Ret antibody (A, B) or to in vitro kinase assay (C-E) after immunoprecipitation with anti-Ret antibody. SDS-PAGE was done under reducing (A, C, E) or unreducing (B, D) conditions in 5 % (A-D) or 13 % (E) polyacrylamide gel. (A-D) lane 1: sham irradiation; lane 2: 5 min after 600 J/ m² of UVB irradiation. (E) Ret proteins were immunoprecipitated from the lysate of the transfectants that had received 600 J/m² of UVB irradiation 5 min before. The immunoprecipitated Ret proteins were untreated (lane 1) or treated with 5% 2ME for 30 min (lane 2), followed by 5 times washing for removing 2ME, and then subjected to in vitro kinase assay. pRet (doublet band): autophosphorylated c-Ret; pMBP: phosphorylated MBP; M: monomer Ret; D: dimer Ret. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

キナーゼ活性を亢進させた。これは、Ret 分子の細胞内領 域が、紫外線の標的になることを示している。

3.6 Ret-PTC-1 分子の 376 番目のシステインは、 紫外線のターゲットになる

Figure 8 に示したように、紫外線 B は Ret-PTC-1-C365 A の SS 結合を介した二量体形成の促進し、そのキ ナーゼ活性を亢進させた。しかし、紫外線 B 照射により Ret-PTC-1-C376 A の二量体形成とキナーゼ活性の亢進は おこらなかった。これらの結果は、Ret-PTC-1 分子の 376 番目のシステインが、紫外線の標的であることを示してい る。

3.7 SOD1 は、紫外線を介する Ret のスーパーア クティベーションを抑制できる

Figure 9に示したように、Ret-MEN2AとSOD1を同時に導入することにより紫外線B照射によるSS結合を介したRet分子の二量体形成を阻害し、そのキナーゼ活性の



Figure 6. UV promotes dimerization of Ret-MEN2A and Ret-MEN2B.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with *RET*-MEN2A (A-E) or *RET*-MEN2B (F-I) after sham or UV irradiation were subjected either to Western blotting with anti-Ret antibody (A, B, F, G) or to in vitro kinase assay (C, D, E, H, I) after immunoprecipitation with anti-Ret antibody. SDS-PAGE was done under reducing (A, C, E, F, H) or unreducing (B, D, G, I) conditions in 5 % polyacrylamide gel. (E) The dimerized bands in D were cut out from the gel and separated under reducing condition. (A-I) lane 1: sham irradiation; lane 2: 5 min after 600 J/m2 of UVB irradiation. M: monomer Ret; D: dimer Ret. For direct comparison of kinase activity between Ret-MEN2A and Ret-MEN2B, see Figure 2. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

亢進を抑制できた。

4 考 察

本研究では、試験管内において紫外線が c-Ret のみでな くすでに遺伝子の変異により活性化されている MEN2A 型 Ret (Ret-MEN2A) や MEN2B 型 Ret (Ret-MEN2B) を活性化する (スーパーアクティベーション) ことを示 した¹⁾。さらに、紫外線が、Ret 分子の SS 結合を介した 二量体形成を促進し、その活性を増強することを示すとと もに、紫外線の標的となるアミノ酸を一つ特定した。また、 SOD1を用いて、これらの紫外線の作用を緩和することに 成功した。これらの結果は、皮膚の老化や悪性黒色腫など の皮膚癌を誘発する紫外線に対する防護対策をこうじるた めの基礎データとして、有益であると考えられる。

一方、我々は Metallothionein-I (MT) をプロモーター



Figure 7. UV promotes activation and dimerization of extracellular domain-deleted Ret.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with *RET*-PTC-1 after sham or UV irradiation were analyzed either by Western blotting with anti-Ret antibody (B, C) or in vitro kinase assay after immunoprecipitation with anti-Ret antibody (A, D, E). SDS-PAGE was done under reducing (A, B, D) or unreducing (C, E) conditions in 7 % (B-E) or 13 % (A) polyacrylamide gel. (A-E) lane 1: sham irradiation; lane 2: 5 min after 600 J/m² of UVB irradiation. M: monomer Ret; D: dimer Ret. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用) .エンハンサーに用い、癌遺伝子 ret を導入することによ り、メラノサイト系良性腫瘍を必発するが、悪性転化しな い MT/ret トランスジェニックマウス 192 系を樹立した ¹⁷⁾。さらに、このトランスジェニックマウスに発症したメ ラノサイト系良性腫瘍に対する紫外線照射が、腫瘍細胞に おける Ret キナーゼの活性の増強を伴い、悪性黒色腫への 転化を誘導することことを見出した(Kato et al., 投稿中)。 これは、紫外線による Ret キナーゼのスーパーアクティベ ーションの生物学的意義を示していると考えられる。



Figure 8. UV does not promote activation and dimerization of extracellular domain-deleted Ret whose cysteine 376 was replaced with alanine.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with original RET-TPC-1 (lane 4 in D and E), RET-TPC-1-C365A (A, lane 1 in C, lane 1-3 in D) and RET-TPC-1-C376A (B, lane 2 in C, lane 1-3 in E) after sham or UV irradiation were analyzed either by in vitro kinase assay after immunoprecipitation with anti-Ret antibody (A, B) or by Western blotting with anti-Ret antibody (C-E). SDS-PAGE was done under reducing (A-C) or unreducing (D-E) conditions in 8 % (C-E) or 13 % (A, B) polyacrylamide gel. (A, B) lane 1: sham irradiation; lanes 2-4: 5 min (lane 2), 10 min (lane 3) and 15 min (lane 4) after 600 J/m² of UVB irradiation. (D, E) lane 1 and 4: sham irradiation; lanes 2-3: 5 min (lane 2) and 15 min (lane 3) after 600 J/m² of UVB. pRet: autophosphorylated Ret-TPC-1-C365A (A) or Ret-TPC-1-C376A (B); pMBP: phosphorylated MBP. M: monomer Ret; D: dimer Ret. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文 献 1 より引用)

(参考文献)

- Kato, M., Iwashita, T., Takeda, K., Akhand, A.A., Liu, W., Yoshihara, M., Asai, N., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I. (2000). Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. Mol. Biol. Cell 11, 93-101.
- 2. Devary, Y., Gottlieb, R.A., Smeal, T., Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. Cell 71, 1081-1091.



Figure 9. Over-expression of SOD1 in cells prevents UVmediated superactivation of Ret.

Lysates from the HA-SOD1⁻ (C, Iane 1 in A and B) or HA-SOD1⁺ (D, E, Iane 2 in A and B) NIH 3T3 cells transfected with Ret-MEN2A were analyzed either by Western blotting with anti-HA (A) or anti-Ret antibody (B, E), or by in vitro kinase assay (C, D) after immunoprecipitation with anti-Ret antibody. SDS-PAGE was done under reducing (A-D) or unreducing (E) conditions in 5 % (E), 10% (A, B) or 13 % (C, D) polyacrylamide gel. (C-E) lane 1: sham irradiation; lanes 2-4: 5 min (lane 2), 10 min (lane 3) and15 min (lane 4) after 600 J/m² of UVB irradiation. pRet (doublet band): autophosphorylated Ret-MEN2A with (C) or without (D) SOD1; pMBP: phosphorylated MBP; M: monomer Ret; D: dimer Ret. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

- 3. Sato H., Kita M., Seiki M. (1993). v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. J Biol Chem 268, 23460-23468.
- 4. Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F. and Pachnis, V. (1994). Nature 367, 380-383.
- 5. Takahashi, M. (1995). Oncogenic activation of the ret protooncogene in thyroid cancer. Crit. Rev. Oncogenesis 6, 35-46.
- Takahashi, M. (1997). The role of the ret protooncogene in human disease. Nagoya J. Med. Sci. 60, 23-30.
- 7. Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M.T., Melillo, R.M., Donghi, R., Bongarzone, I., Pierotti, M.A., Della Porta, G., Fusco, A. and Vecchio, G. (1990). PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and its frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. Cell 60, 557-563.
- Ishizaka, Y., Ushijima, T., Sugimura, T. and Nagao, M. (1990). cDNA cloning and characterization of ret activated in a human papillary thyroid carcinoma cell line. Biochem. Bioph. Res. Commun. 168, 402-408.
- 9. Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, T., Laimore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P. and Wells, S.A.Jr. (1993). Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum. Mol. Genet. 2, 851-856.
- Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L., Ponder, M.A., Telenius, H., Tunnacliffe, A. and Ponder, B.A.J. (1993). Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 A. Nature 363, 458-460.
- Carlson, K.M., Dou, S., Chi, D., Scavarda, N., Toshima, K., Jackson, C.E., Wells, S.A.Jr., Goodfellow, P.J. and Donis-Keller, H. (1994). Single missense mutation

in the tyrosine-kinase catalytic domain of the RET proto-oncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1579-1583.

- 12. Hofstra, R.M.W., Landsvater, R.M., Ceccherini, I., Stulp, R.P., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Hoppener, J.W.M., van Amstel, H.K.P., Romeo, G., Lips, C.J.M. and Buys, C.H.C.M. (1994). A mutation in the RET protooncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. Nature 367, 375-376.
- Kato, M., Liu, W., Yi, H., Asai, N., Hayakawa, A., Kozaki, K., Takahashi, M. and Nakashima, I. (1998a). The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits growth and metastasis of malignant melanoma primarily developed in ret-transgenic mice. J. Invest. Dermatol. 111, 640-644.
- Kato, M., Takahashi, M., Akhand, A.A., Liu, W., Dai, Y., Shimizu, S., Iwamoto, T., Suzuki, H. and Nakashima, I. (1998b). Transgenic Mouse Model for Skin Malignant Melanoma. Oncogene 17, 1885-1888.
- 15. Kato, M., Liu, W., Akhand, A.A., Dai, Y., Ohbayashi, M., Tuzuki, T., Suzuki, H., Isobe, K., Takahashi, M. and Nakashima, I. (1999). Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression for tolerance induction in metallothionein-I/ ret transgenic mouse lines. Oncogene 18, 837-842.
- 16. Dhanwada, K.R., Dickens, M., Neades, R., Davis, R. and Pelling, J.C. (1995). Differential effects of UV-B and UV-C components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. Oncogene 11, 1947-1953.
- Iwamoto, T., Takahashi, M., Ito, M., Hamatani, K., Ohbayashi, M., Wajjwalku, W., Isobe, K. and Nakashima, I. (1991). Aberrant melanogenesis and melanocytic tumour development in transgenic mice that carry a metallothionein/ret fusion gene. EMBO J. 10, 3167-3175.