

# 環境ストレスに応答する細胞内情報伝達機構の解明

武川 睦寛

## 研究のねらい

細胞は DNA 損傷、低酸素、温度や浸透圧変化など、外界からの様々なストレス刺激に応答して特定の情報伝達経路を活性化し、環境変化に適応する。p38MAP キナーゼ情報伝達経路は細胞の主要なストレス応答シグナル伝達システムであり、細胞周期停止やアポトーシスに代表されるストレス応答制御に中心的な役割を果たしている<sup>2)</sup>。さらにこの経路は炎症性サイトカインや抗原刺激によっても活性化され、IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 等のサイトカイン産生、および Th1 細胞の分化に必須の機構であることが示されている<sup>4, 8)</sup>。近年、生体の恒常性維持を担うこの経路の異常が、がんや自己免疫疾患などの病態に深く関与する証拠が蓄積されてきた。しかしながら、細胞がどのようにして物理化学的ストレス刺激を感受し、その結果生じたシグナルを如何にして p38 経路の活性化へと変換していくのか、その分子機構はほとんど明らかにされていない。

我々はこれまでに、ストレス応答 MAPK 経路を特異的に活性化する主要なヒト MAPKKK、MTK1 を同定し、MTK1 が環境ストレスによる p38 の活性化に中心的な役割を担う分子であることを明らかにしてきた。そこで本研究では、生体のストレス応答、免疫制御機構を分子レベルで解明することを目的とし、MTK1 を代表とするストレス応答 MAPKKK の活性制御機構と生理機能の解析を行った。

## 研究成果

本研究に於いては、1) GADD45 関連分子による MTK1 活性化メカニズムとその生理機能の解明、2) MTK1 の新規活性制御分子の探索、3) ストレス応答 MAPK 経路のシグナル特異性決定・維持機構の解明、の3点を中心に解析を進めた。

### 1) GADD45 関連分子による MTK1 活性化メカニズムとその生理機能の解明

我々はこれまでに、MTK1 の制御領域に結合して活性化因子として作用する3種類の GADD45 関連分子( $\alpha/\beta/\gamma$ )を同定し、これらの分子が DNA 損傷など、様々なストレスやサイトカイン刺激によって転写誘導される遺伝子であることを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。各 GADD45 関連遺伝子の発現はストレス刺激後、数十分以上経過してから認められることから、GADD45 関連分子を介した MTK1 の活性化は、細胞のストレス応答の遅延反応に極めて重要であると考えられる。しかしながら、GADD45 分子による MTK1 活性化機構の詳細はこれまで不明であった。我々はまず、ストレス応答シグナルにおける GADD45 分子内の機能ドメインを同定するため、GADD45 $\beta$ 分子全体に渡って約 10 アミノ酸ずつの欠失を有する系統的な変異体を作製した。これらの変異型 GADD45 $\beta$ 遺伝子をそれぞれ細胞に導入して生化学的解析を行い、GADD45 $\beta$ 分子内で MTK1 との結合に必要な領域、及び MTK1 活性化に必須のアミノ酸残基を同定した。また、アラニン置換変異体を作成してさらに詳細な解析を行っ

た結果、MTK1 との結合能は保たれているにも拘わらず、MTK1 活性化能のみを喪失した変異体が得られた。このような変異型 GADD45 $\beta$ 分子を細胞内に強制発現させると、ドミナント・ネガティブに作用し、正常の GADD45 関連分子による MTK1-p38 経路の活性化が有意に抑制されることを見出した。

一方、MTK1 分子内に存在する機能ドメインの解析も並行して行い、GADD45 結合ドメイン、自己抑制ドメイン、多量体化ドメイン、及び活性化に必須の自己リン酸化サイトをそれぞれ同定した。以上の解析の結果、GADD45 関連分子による MTK1 活性化機構として、GADD45 分子が MTK1 に結合すると、MTK1 分子内の制御ドメインとキナーゼドメイン間の抑制的相互作用が解除され、その結果、MTK1 分子同士の多量体化が誘導されること、さらにキナーゼドメイン内の自己リン酸化が起きて MTK1 のキナーゼ活性が亢進することを明らかにした。

次に GADD45-MTK1 経路が担う生理機能の一端を明らかにするため、本研究では特に発がん抑制作用を持つサイトカインである TGF- $\beta$ との関連を解析した<sup>1)</sup>。TGF- $\beta$ は、その受容体を介して転写因子 Smad をリン酸化して活性化する一方で、p38 経路をも活性化するが、その分子機構や、TGF- $\beta$  情報伝達系と p38 経路のクロストークがどのような生理的意義を持つかは不明であった。我々はまず始めに TGF- $\beta$ シグナル伝達に関わる各分子に変異を有する様々な腫がん細胞株を用いて、TGF- $\beta$ 刺激による p38MAPK の活性化を検討した。その結果、がん抑制遺伝子 Smad4 に変異を有する細胞では、p38 の活性化が強く抑制されることを見出した。さらに、このような Smad4 欠損細胞株に正常 Smad4 遺伝子を導入することで p38 の活性化も回復することを確認した。また、TGF- $\beta$ 応答細胞にドミナント・ネガティブ Smad4 変異体を導入すると p38 の活性化が阻害された。以上の結果から TGF- $\beta$  は、Smad 依存的な遺伝子発現を介して p38MAPK カスケードを活性化することが示唆された。

そこで、Smad 依存的に発現誘導され、p38 経路の活性化に作用する未知遺伝子の同定を試みたところ、MTK1 活性化因子である GADD45 $\beta$ が、TGF- $\beta$ 刺激後に選択的に強く発現誘導されることを見出した。さらに Smad4 欠損細胞を用いた解析により、GADD45 $\beta$ の転写誘導が Smad 依存的であることを確認した。また、アンチセンスを用いて GADD45 $\beta$  の発現をノックダウンしたり、ドミナント・ネガティブ MTK1 を細胞に導入することにより、TGF- $\beta$ による p38 の活性化が強く抑制された。以上の結果から、TGF- $\beta$ による p38MAPK カスケードの活性化機構として、Smad 依存的に発現誘導された GADD45 $\beta$ が MTK1 を介して p38 経路を活性化するという、新たなシグナル伝達機構の存在が明らかになった(図1)。

次に、TGF- $\beta$ の発がん抑制作用における p38MAPK カスケードの役割を明らかにするため、cDNA アレイ法を利用して、TGF- $\beta$ により発現量が変化する遺伝子の中から、その発現調節に p38MAPK の活性化を必要とする遺伝子の選別を行った。その結果、アポトーシス、細胞周期制御、腫瘍血管新生抑制などに関与する約 40 種類の遺伝子を同定することができた。

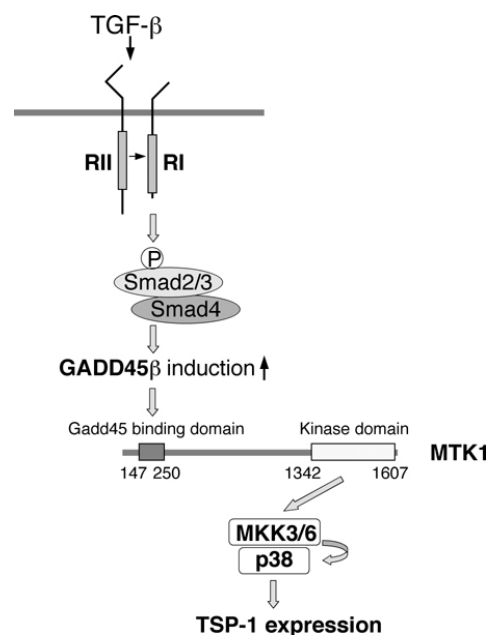


図1 : TGF $\beta$ によるp38経路活性化機構

最近、膵がん細胞を用いた研究から、Smad4 の遺伝子変異による機能喪失が腫瘍血管新生に作用し、膵がんの腫瘍形成および転移に深く関与することが報告されている。そこで我々は cDNA アレイで得られた遺伝子の中から、特に腫瘍血管新生抑制因子である thrombospondin-1 (TSP-1) に着目し、さらなる解析を行った。TGF- $\beta$  シグナル伝達経路が intact な細胞を TGF- $\beta$  で刺激すると、cDNA アレイの結果に一致して、TSP-1 の強い発現誘導が認められた。一方、細胞を前もって p38 特異的阻害剤で処理しておくことで TGF- $\beta$  による TSP-1 の発現はほぼ完全に抑制された。このような TSP-1 の発現変化は蛋白質レベル、及びその機能(血管内皮細胞の遊走阻止能)の両面からも確認した。従って TGF- $\beta$  による p38 経路の活性化が、少なくとも TSP-1 遺伝子の発現制御に関与することが明らかになった。

次に、TGF- $\beta$  による TSP-1 の発現誘導が、Smad 依存的 p38 活性化によって制御されているか検討した。Smad4 欠損細胞を TGF- $\beta$  で刺激しても、TSP-1 の発現誘導は認められなかったが、この細胞に正常 Smad4 遺伝子を導入すると TGF- $\beta$  による p38 の活性化が回復し、同時に TSP-1 の発現誘導も認められるようになった。一方、Smad4 の発現を回復させても、p38 のキナーゼ活性を特異的阻害剤(SB203580)を用いて抑制しておくことで、TSP-1 の発現はほぼ完全に消失した。以上の結果から、腫瘍血管新生抑制遺伝子 TSP-1 は、我々が新たに見出した TGF- $\beta$ -Smad4-GADD45 $\beta$ -MTK1-p38 経路というシグナル伝達システムによって発現制御を受けるターゲット遺伝子の一つであることが明らかになった。実際に、Smad4 に変異を持つ膵がん細胞では TGF- $\beta$  刺激後の p38 活性化と TSP-1 の発現が共に消失しており、がん抑制遺伝子 Smad4 の機能喪失に伴う GADD45 $\beta$ -MTK1 経路の制御異常が膵がんに関与することが示唆された(図1)。

## 2) MTK1の新規活性制御分子の探索

p38MAPK カスケードの新規活性化因子の同定を目的として、p38 経路の活性化によって細胞内に GFP の発現が誘導される新たなレポーターシステムを構築し、このシステムを安定して発現する哺乳類細胞株を樹立した。まず、このレポーターシステムが実際に *in vivo* で機能することを確かめるため、樹立した細胞株にレトロウイルスを用いて恒常的活性化型 MTK1 変異体を導入して p38 経路を活性化し、細胞内に GFP の蛍光が観察されることを確認した(図2)。その上で、この細胞株にヒト cDNA 発現ライブラリーを導入してスクリーニングを行い、p38 活性化能を有するヒト遺伝子の単離、同定を試みた。しかし様々な改良を試みたものの、バックグラウンドの問題でこのシステムを遺伝子スクリーニングに用いることは困難であった。

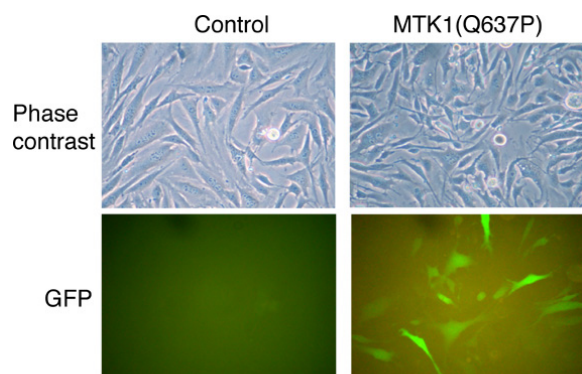


図2：恒常的活性化型MTK1を導入すると細胞内にGFPの産生が誘導される

そこで別法として、出芽酵母を利用して、MTK1 活性化能を持つヒト遺伝子を網羅的に同定する機能的遺伝子クローニング法を開発し、ヒト cDNA 発現ライブラリーのスクリーニングを行った。また、哺乳類細胞を用いて、MTK1 と特異的に結合して共沈する蛋白質分子を分離、精製し、質量分析(LC-MS/MS 法)による同定を行った。これら複数のスクリーニングを並行して行った結果、新たな

MTK1 活性制御因子の候補として、複数の分子を単離することが出来た。

### 3) ストレス応答MAPK経路のシグナル特異性決定、維持機構の解明

哺乳類細胞には、主に増殖因子によって活性化され、細胞増殖に作用する ERK 経路<sup>3,6)</sup>と、ストレス刺激に反応して、細胞周期停止やアポトーシス誘導に寄与する p38/JNK 経路<sup>7)</sup>という少なくとも3種類の MAPK カスケードが存在する。各 MAPK カスケード(MAPKKK-MAPKK-MAPK)を構成するキナーゼ分子の構造は、互いに類似しているにも関わらず、これら複数の MAPK カスケード間でシグナルの誤ったクロストークは起こらない。このような MAPK 経路の正確な情報伝達を可能にする機構は、細胞増殖と死の制御に極めて重要であると考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。本研究では MAPKKK-MAPKK 分子間の選択的結合を規定し、各 MAPK 経路のシグナル伝達特異性を決定づける未知メカニズムの解明を行った<sup>5,9)</sup>。

まず two-hybrid 法および免疫共沈による解析を行い、p38 経路の MAPKK である MKK6 分子内で、上流の MAPKKK 分子(MTK1 や ASK1 等)との選択的結合に必要なアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、MKK6 の非酵素領域に位置する約 20 アミノ酸の領域が MAPKKK との結合に必須の新規ドッキング・サイトであることが明らかになった。さらにこのドッキング・サイトがシグナル特異性の決定・維持のみならず、MAPKKK から MAPKK への効率的なシグナル伝達にも重要な役割を持つことを見出した。興味深いことに、同様のドッキング・サイトが MKK6 のみならず、全ての MAPK 経路の MAPKK 分子に保存されており、それぞれが対応する上流の MAPKKK 分子との特異的結合に必要であることが確認された(図3)。また、ドッキング・サイトのアミノ酸に点変異を導入したり、この領域に対応する人工ペプチドを用いて、MAPKKK-MAPKK 間の結合を阻害すると、様々なストレス刺激による MAPKK 分子の活性化が強く抑制された。以上の結果から、ドッキング・サイトを介した分子間結合が MAPK 経路のシグナル伝達に必須であり、MAPK 活性化阻害剤を創薬する上での新たなターゲットとなり得ることが強く示唆された。

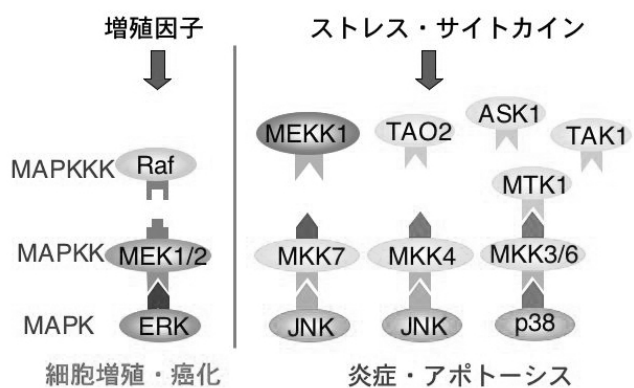


図3 : Docking interactionによるMAPK経路のシグナル特異性維持機構

## 今後の展開

当初、哺乳類細胞内で p38 経路の活性化を可視化するシステムを作成し、新規ストレス応答シグナル伝達分子の同定を試みた。その結果、p38 活性化に伴い細胞内に GFP の産生が誘導される新たなレポーターシステムを構築することに成功した。残念ながらバックグラウンド等の問題で遺伝子スクリーニングに用いることは出来なかったが、このシステムは p38 活性化を生きた細胞でモニターする簡便な方法として有用であり、今後 p38 活性阻害剤の同定等、様々な用途に応用可能であると考えられる。

また、新規ストレス応答制御因子を単離するため、別法として、出芽酵母を用いた機能的クローニン

グ法を開発してスクリーニングを行い、また並行してプロテオミクスの手法を利用し、MTK1 結合蛋白質分子の同定を行った。その結果、新たな MTK1 活性制御因子の候補として、複数の分子を単離することが出来た。これらの分子の一つは、環境ストレス刺激による MTK1 活性化の早期反応に関与することを示唆する予備的データを得ており、今後さらに解析を進め、ストレス応答におけるその機能の全容を明らかにしたい。

一方、GADD45 関連分子-MTK1 経路の生理機能に関しては、このシグナル伝達システムが TGF- $\beta$ の発がん抑制作用に寄与すること、また Th1 免疫応答に極めて重要であることを新たに示すことが出来た<sup>8)</sup>。また本研究により、GADD45 関連分子による MTK1 活性化の詳細な分子メカニズムが明らかとなった。今後、これらの知見を利用して、MTK1 キナーゼ活性を人工的に制御する薬剤の開発へと発展させ、がんや自己免疫疾患治療薬となり得るか検討したい。

さらに、MAPK 経路の正確なシグナル伝達を可能にする機構として、MAPKKK-MAPKK 間の選択的分子間結合を規定する新規ドッキング・サイトを同定し、この領域を介した分子間相互作用が MAPK カスケードの効率的なシグナル伝達に必須であることを示すことが出来た<sup>9)</sup>。最近、MAPK 経路に対する特異的阻害剤を開発して、がんや免疫疾患の治療に応用しようとする試みが盛んになされている。我々の実験結果は、ドッキング・サイトをターゲットとした分子標的療法を開発することで、特定の MAPK カスケードを MAPKK のレベルで選択的に阻害し得る可能性を示唆している。本研究で得られた成果を基に、今後さらに細胞のストレス感受機構、およびストレスシグナル制御機構の分子レベルでの解明を推進し、十分な基礎研究を通してがんや自己免疫疾患の病態解明や新規治療法開発への応用、発展を計りたい。

## 研究成果リスト

### (1)原著論文

- 1 Takekawa,M., Tatebayashi,K., Itoh,F., Adachi,M., Imai,K. and Saito,H.: Smad-dependent GADD45  $\beta$  expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- $\beta$ . *EMBO J.* 21, 6473-6482 (2002).
- 2 Shonai,T.,Adachi,M., Sakata,K., Takekawa,M., Endo,T., Imai, K., and Hareyama,M.: MEK/ERK pathway protects ionizing radiation-induced loss of mitochondrial membrane potential and cell death in lymphocytic leukemia cells. *Cell Death Differ.* 9, 963-971, (2002).
- 3 Nakamura,K., Tanoue,K., Satoh,T., Takekawa,M., Watanabe,M., Shima,H., and Kikuchi,K.: A novel low-molecular-mass dual-specificity phosphatase, LDP-2, with a naturally occurred substitution that affects substrate specificity. *J. Biochem.* 132, 463-470 (2002).
- 4 Sakon,S., Xue,X., Takekawa,M., Sasazuki,T., Okazaki,T., Kojima,Y., PiaJ-H., Yagita,H., Okumura,K., Doi,T. and Nakano,H.: NF- $\kappa$ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 22, 3898-3909 (2003).
- 5 Tatebayashi,K., Takekawa,M., and Saito,H.: A docking site that determining specificity of Pbs2 MAPKK to Ssk2/Ssk22 MAPKKs in yeast HOG pathway. *EMBO J.* 22, 3624-3634, (2003).

- 6 Mitsuhashi,S., Shima,H., Tanuma,N., Matsuura,N., Takekawa,M., Urano,T., Kataoka,T., Ubukata,M. and 6) Kikuchi,K.: Usage of tautomycin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1) reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 82-88, (2003).
- 7 Takagaki,K., Satoh,T., Tanuma,N., Masuda,K., Takekawa,M., Shima,H. and Kikuchi,K.: Characterization of a novel low-molecular-mass dual-specificity phosphatase 3 that enhances activation of JNK and p38. *Biochemical J.* 383, 447-455 (2004).
- 8 Chi,H., Lu,B., Takekawa,M., Davis,R.J., and Flavell,R.A.: GADD45 $\beta$ /GADD45 $\gamma$  and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT-independent IFN $\gamma$  production in T cells. *EMBO J.* 23, 1576–1586 (2004).
9. Takekawa, M., Tatebayashi, K. and Saito, H.: Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinases. *Molecular Cell* 18, 295-306 (2005)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果

・受賞

日本癌学会奨励賞(2003年)「プロテインキナーゼ及びホスファターゼによるストレス応答シグナル制御機構の研究」

・総説

10. 武川睦寛、館林和夫、斎藤春雄：ストレス応答 MAP キナーゼ。蛋白質・核酸・酵素 Vol. 47: 1379–1389 (2002)

・学会発表

11. 武川睦寛、斎藤春雄：TGF- $\beta$ による Smad 依存的 p38MAP キナーゼ情報伝達系の活性化機構。日本癌学会(第61回;東京)
12. 武川睦寛、三宅善嗣、斎藤春雄：TGF- $\beta$ による Smad 依存的 p38MAP キナーゼ情報伝達経路の活性化。日本分子生物学会(第25回;横浜)
13. 武川睦寛、斎藤春雄：MAPKKKとMAPKKの特異的分子間結合を規定する新規ドッキングドメインの同定とMAPKシグナル伝達におけるその意義。日本癌学会(第63回;福岡)