

研究課題別評価

1 研究課題名:環境ストレスにตอบสนองする細胞内情報伝達機構の解明

2 研究者氏名:武川 睦寛

3 研究の狙い:

細胞は DNA 損傷、低酸素、温度や浸透圧変化、炎症性サイトカインなど、外界からの様々なストレス刺激にตอบสนอง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、アポトーシスやサイトカイン産生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。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。

4 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($\alpha/\beta/\gamma$)を同定してきた。ストレス応答シグナルにおけるGADD45分子の機能ドメインを同定するため、GADD45 β に系統的な欠失変異を導入して解析を行い、GADD45分子内でMTK1の活性化に必須のアミノ酸残基を同定した。さらに、MTK1活性化領域を欠くGADD45 β 変異体がドミナントネガティブに作用し、細胞内でMTK1の活性化を抑制することを見出した。また、MTK1分子内の機能ドメインの同定も平行して行った。これらの解析の結果、GADD45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、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こってMTK1が活性化され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- β との関連を解析した。TGF- β 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- β 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 TGF- β シグナル伝達に関わる各分子に変異を有する様々な腫瘍細胞株を利用して実験を行い、TGF- β 刺激後の p38 活性化に、Smad 依存的な転写を介する機構が存在することを見出し、さらに Smad によって発現誘導され、p38 活性化に作用する遺伝子が GADD45 β であることを明らかにした。即ち、TGF- β 刺激により Smad 依存的に転写誘導された GADD45 β が MTK1 を介して p38 経路を活性化するという新規シグナル伝達機構の存在を示した。また、cDNA アレイ法を用いて TGF- β と p38 経路のクロストークによって発現が制御される遺伝子のスクリーニングを行い、腫瘍血管新生抑制因子 TSP-1 を同定した。実際に、がん抑制遺伝子 Smad4 に変異を持つがん細胞では TGF- β 刺激後の p38 活性化と TSP-1 の発現が共に消失しており、Smad4 の機能喪失に伴う GADD45 β -MTK1 経路の制御異常が発がんに関与することが示唆された。

2) MTK1 の新規活性制御分子の探索

まず 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細胞株を樹立した。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出来なかった。そこで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。さらに哺乳類細胞を用いて MTK1 と特異的に結合する蛋白質分子を分離、精製して LC-MS/MS 法により同定した。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、複数の分子を単離し得た。

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、細胞増殖に作用する ERK と、ストレス応答に関与する p38/JNK 経路という少なくとも3種類の MAPK カスケードが存在するが、これら複数の MAPK 経路間でシグナルの誤った混線は起こらない。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い。本研究では MAPKKK-MAPKK 分子間の選択的結合を規定し、シグナル伝達の特異性を決定づける未知メカニズムを解明するため、まず p38 経路の MAPKK である MKK6 分子内で、MTK1 等の MAPKKK 分子との結合に必要な領域の同定を試みた。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・サイトであることを見出した。興味深いことに、同様のサイトが MKK6 のみならず、全ての 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。また、ドッキング・サイトに変異を導入したり、この領域に対応する人工ペプチドを細胞に導入して、MAPKKK-MAPKK 間の結合を阻害することにより、ストレス刺激による MAPKK 分子の活性化がほぼ完全に抑制された。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(投稿中)。

5 自己評価:

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は成功した。このシステムは p38 活性化を生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に应用可能であると考えられるが、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が出来なかった点は残念である。そこで別法として、出芽酵母を用いた機能的クローニング法を開発し、またプロテオミクスの手法を利用してスクリーニングを行い、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- β 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。また本研究により、GADD45 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ていきたい。

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、この経路が MAPK カスケードのシグナル伝達に必須であることを示すことが出来た。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薬が、特定の MAPK 経路に対する新たな選択的阻害剤となり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、今後の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、発展が期待される。

6 研究総括の見解:

MKT1を中心に、その上流ならびに下流に位置する制御分子を明らかにし、ストレス応答シグナルの伝達経路を解明したことは、本領域の目指した目的に答える成果として評価できる。惜しむらくは、下流に位置する分子の十分な解明にまで至らなかったが、今後の進展に期待し、ストレス応答MKT1ワールドの完成を楽しみにしたい。

7 主な論文等:

論文

1. Takekawa,M., Tatebayashi,K., Itoh,F., Adachi,M., Imai,K. and Saito,H.; Smad-dependent GADD45 β expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- β . *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- κ 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 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 β /GADD45 γ and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT-independent IFN γ production in T cells. *EMBO J.* 23, 1576-1586 (2004).

総説

1. 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

1. 武川睦寛、斎藤春雄:TGF- 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)
2. 武川睦寛、三宅善嗣、斎藤春雄:TGF- 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)
3. 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)

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」