

# 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

## 1. 研究のねらい

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密接に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、その分子機構には不明な点が多く残されている。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 である MTK1 を同定し、MTK1 が環境ストレスによる p38MAPK 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。

## 2. 研究成果と考察

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伝達における GADD45 分子の機能ドメインを同定するため、GADD45 $\beta$  分子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 活性化ドメインを欠く GADD45 $\beta$  変異体が、細胞内でドミナントネガティブに作用し、MTK1 の活性化を強く抑制し得ることを見出した。また、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、さらに MTK1 分子同士の

多量体化が誘導されて活性化に至ることを明らかにした。

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。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 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膀胱がん細胞株を利用して実験を行い、TGF- $\beta$  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 $\beta$  であることを明らかにした。即ち、TGF- $\beta$  刺激により Smad 依存的に転写誘導された GADD45 $\beta$  が MTK1 を介して p38 経路を活性化するという新規シグナル伝達機構の存在を明らかにした。また、cDNA アレイ法を用いて TGF- $\beta$  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いることから、Smad4 の機能喪失に伴う GADD45 $\beta$ -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。また、TSP-1 は潜在型 TGF- $\beta$  を活性型に変換するのに必須の分子であることが知られている。従って、TGF- $\beta$  刺激により p38 経路の活性化を介して TSP-1 の発現が誘導された結果、活性型 TGF- $\beta$  が増加し、TGF- $\beta$  の生理作用がさらに増強されるという positive feedback 機構の存在が示唆された。

## 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、p38 の活性化によって細胞内に GFP の発現が誘導される細胞株を樹立した。また、環境ストレスに応答して MTK1 の活性化に作用する新規遺伝子を単離するため、出芽酵母を用いた機能的スクリーニング法を開発した。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のプロテオーム解析を施行した。これら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く残されている。我々は MAPKKK-MAPKK 分子間の選択的

結合を規定し、シグナル特異性を決定づける未知メカニズムを解明するため、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、ストレス刺激や増殖因子による MAPKK 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ることが明らかになった。

最近、MAPK カスケードに対する特異的阻害剤を開発して、がんや自己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。

### 3. 成果リスト

#### 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., Pia J-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 Kikuchi, K.: Usage of tautomycetin, 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.

#### 総説

9. 武川睦寛、館林和夫、齋藤春雄：ストレス応答 MAP キナーゼ。 **蛋白質・核酸・酵素** 47: 1379-1389, 2002

#### 口頭発表

10. 武川睦寛、齋藤春雄：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）
11. 武川睦寛、三宅善嗣、齋藤春雄：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）
12. 武川睦寛、齋藤春雄：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」