

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390091

研究課題名（和文） レドックス代謝制御における核—細胞質クロストークとアポトーシス誘導機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation for crosstalk of the nuclear-cytoplasmic signalling in the apoptotic response to oxidative stress

研究代表者

吉田 清嗣 (YOSHIDA KIYOTSUGU)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：70345312

研究成果の概要（和文）：細胞は、酸化ストレスによって惹起されるレドックス代謝制御により、様々な応答を引き起こす。そのひとつとして細胞死（アポトーシス）誘導があり、これまでの研究から、アポトーシスを制御するいくつかのキナーゼ群は細胞質から細胞核に移行すること、そして核に存在する細胞死関連因子をリン酸化することでアポトーシスを誘導することを見出した。さらにこの核移行を阻害するとアポトーシスが抑えられることから、これらキナーゼ群の核移行がアポトーシス誘導の本質であるという今までにない全く新しいモデルを提唱している。本研究では、この核移行が酸化ストレスで惹起されるアポトーシスの本質であるメカニズムの詳細を明らかにすることを通してレドックス代謝制御機構を理解し、その破綻ががんを始めとする酸化ストレス関連疾患とどのように関わっているかに迫り、さらにその知見を機軸とした診断と治療への応用の可能性を追求した。

研究成果の概要（英文）：Oxidative stress has been implicated in the initiation and development of many diseases and causes a various types of cellular injury, including DNA and protein damage, lipid peroxidation, and damage to other biomolecules. Oxidative stress also occurs during apoptotic cell death. We have shown that several pro-apoptotic kinases including PKCdelta, c-Abl, and DYRK2 undergo nuclear-cytoplasmic shuttling in response to oxidative stress. Importantly, whereas precise regulation for the shuttling of these kinases remain uncertain, this mechanism has consequences for induction of apoptosis and implies that proper localization is central to the function of pro-apoptotic kinases. These findings highlight recent efforts on molecular medicine demonstrating that the nuclear targeting of kinases is novel and essential regulatory mechanisms that directly influences the induction of apoptosis in response to oxidative stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：分子腫瘍学、腫瘍薬理学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：アポトーシス、酸化ストレス、レドックス制御、がん治療

## 1. 研究開始当初の背景

酸素はヒトを含む好気性生命体に必須な分子であるが、生物が生きていくために体内で営まれている酸素代謝によって活性酸素が常時生じている。活性酸素は化学反応が極めて高く傷害性が強いことから、その蓄積はさまざまな臓器の障害、細胞死、がん化のみならず、感染症や虚血性脳疾患、さらに動脈硬化・高血圧・糖尿病などの生活習慣病に至る幅広い疾患の発症要因の一つになっている。細胞は活性酸素を代謝するために、還元状態を保つ機構と生体防御機能を備えることで生体の恒常性を維持しており、この活性酸素代謝をレドックス（酸化還元）制御機構と呼ぶ。活性酸素により生じる酸化ストレスは細胞のセンサー機構によって認知されると考えられており、リン酸化反応を含めた細胞内のさまざまなシグナル伝達系を修飾することが知られている。酸化ストレスは幅広い要因で生じており、放射線、抗癌剤などのDNA損傷やTNF $\alpha$ などのサイトカインによっても二次的な酸化ストレスが生じることが知られている。このような酸化ストレスをはじめとする様々なストレスに対する適応形態の一つであるアポトーシスと呼ばれる細胞死は、生体の恒常性維持において不可欠な生命現象として獲得され保存されてきた基本機能である。この制御の破綻は、がんをはじめさまざまな疾患の病因に結びつくことが知られている。そもそも生物が外的環境変化やストレスに適応して生存していくためには、その変化を正確に認識し、情報として迅速かつ効率的に、核や小胞体などの細胞内小器官に伝えなければならない。特にアポトーシスが核のない細胞では生じないことから、アポトーシス誘導においては細胞質から核あるいは核から細胞質への何らかの情報交換が必須である。この細胞内情報伝達網としてキナーゼによるタンパク質リン酸化システムが用いられており、多彩な細胞応答を可能にしている。ストレス応答におけるアポトーシス制御機構もこのシステムによって厳格にコントロールされていると考えられているが、その分子メカニズムは多くが未だ明らかにされていない。また、リン酸化による情報伝達機構が、如何にしてアポトーシス実行因子である種々の蛋白・DNA分解酵素へとシグナルを伝えているのかについても、国内外で広く研究が行われているにも関わらずその多くが不明である。とりわけリン酸化によるストレス誘導性アポトーシスの分子制御機構は、多くの場合細胞種に特異的であったり、惹起するストレスによって全く逆の事象が観察され、混沌としているのが現状である。

## 2. 研究の目的

申請者が見出したプロアポトーティックキナーゼ群の細胞質→核トランスフィッキングがアポトーシス誘導の本質であるというモデルの妥当性を検証する。次にその詳細なメカニズムを解明するために、キナーゼ群の新たな核内基質の同定を行う。特にリン酸化とアポトーシス誘導との関わりに注目して機能解析を進める。さらにキナーゼ群のストレス応答に伴う細胞内局在の時空間的な違いに注目し、その差異がアポトーシス誘導にどのように関わっているかについて検討する。さらに、疾患によるキナーゼ群の局在の変動について従来用いている細胞株だけでなく可能であれば臨床サンプルを解析し、アポトーシス誘導異常との関連について詳細かつ慎重に調べる。最後にこれらキナーゼ群の細胞質→核トランスフィッキングとがんを代表とする疾患におけるその異常に着目し、診断や治療への応用に繋がる分子ターゲットを明らかにする。

## 3. 研究の方法

まず申請者の研究計画の前提となる“プロアポトーティックキナーゼ群の細胞質→核トランスフィッキングがアポトーシス誘導の本質である”というモデルの妥当性について検証する。次にその詳細なメカニズムを解明するために、プロテオミクス解析を基盤としたキナーゼ群の新たな核内基質の同定を行う。さらにキナーゼ群のストレス応答に伴う細胞内局在の時空間的な違いに注目し、その差異がアポトーシス誘導にもたらす意義を明らかにする。さらに、疾患によるキナーゼ群の局在の変動について従来用いている細胞株だけでなく臨床サンプルにまで広げ、アポトーシス誘導異常との関連について詳細かつ慎重に調べる。最後にこれらキナーゼ群の細胞質→核トランスフィッキングとがんを代表とするその異常に着目し、診断や治療への応用に繋がる分子ターゲットを明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1)shRNA 発現ライブラリーを用いた酸化ストレス応答性アポトーシス関連因子の網羅的探索

酸化ストレスにおけるアポトーシス誘導に関わる新規遺伝子の網羅的探索を目的として、shRNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニング系を構築した。様々な試行錯誤を経て、細胞に shRNA 発現ライブラリーを導入後、酸化ストレス刺激によりアポトーシスから逃れた細胞を回収して、いかなる遺伝子に発現抑制が起きているかを調べていくという作業仮説で実験を進めた。その結果、アポトーシス関連遺伝子の候補として 32 クローンを同定し、そのなかで最も細胞死誘導に関与している遺伝子として TAF1 という分子

を見出した。TAF1 は基本転写因子の中核をなす分子であり、そのアポトーシス誘導における機能解析を進めるために、マイクロアレイによる発現解析を行った。その結果、TAF1に制御されている分子群においてp27の発現が細胞死誘導に関わっていることを見出した(文献12)。

## (2) c-Abl チロシンキナーゼの細胞内局在制御機構の解明

c-Ablチロシンキナーゼは様々な細胞内シグナル伝達に関わっており、核内と細胞質を行き来することが知られている。これまでの申請者の研究によりc-AblはDNA損傷に伴って核に移行することを見い出しており、この一過性の核移行がアポトーシス誘導に必須であることを明らかにしていた。多くのc-Ablは14-3-3と結合することによって不活性の状態に細胞質にとどまっているが、細胞に酸化ストレスやDNA損傷が加わると、14-3-3から解離し核に移行した後に活性化し、アポトーシスを誘導するのである。c-Abl Thr735のリン酸化は14-3-3結合モチーフでありc-Ablの局在制御において重要な役割をもつことが予想される。しかしながら、Thr735をリン酸化するキナーゼが不明であった。そこで、Thr735特異的リン酸化抗体とcDNAライブラリーフェージを用いたスクリーニングによりc-Abl Thr735をリン酸化するキナーゼの同定を試みた。その結果、候補にCLK1、CLK4、MST1、MST2、TTK/Mps1という5種類のキナーゼが候補として同定され、またsiRNAを用いた実験から、内在性のTTKが細胞内でThr735をリン酸化するキナーゼであることを明らかにした。さらにTTKをノックダウンするとc-Ablの核内集積が起り、酸化ストレスによるc-Abl依存的なアポトーシスが促進したことから、c-Ablを細胞質内に留めることで酸化ストレスによるアポトーシスに抵抗性を示すというTTKの新たな機能が示唆された。本研究は、TTK/Mps1という今までほとんど基質が明らかにされていなかったキナーゼが、c-Ablのリン酸化とアポトーシス誘導という、極めて重要な機能を果たしている可能性を提示することができた。さらにこのキナーゼが、がんをはじめとするアポトーシスに関与する疾患の治療を考える上で、新たなターゲットになり得る可能性が示唆された(文献11)。

そもそもc-Ablチロシンキナーゼは細胞質、核両方に存在するが、核内c-AblがDNA損傷により活性化し、アポトーシスを誘導することが知られている。Pitx1は転写因子であり、近年癌抑制遺伝子として注目されている。活性化するとp53の発現を高め、アポトーシスを誘

導するが、その生理機能と調節機構の詳細ははっきりしない。我々は、DNA損傷にตอบสนองしてc-AblがPitx1の発現を制御していることを見いだした。この機構には核内c-Ablが関与していることも明らかとなった。またc-AblはPitx1をリン酸化するが、どのチロシン残基であるかは不明である。さらにPitx1をノックダウンすると、DNA損傷によって誘導されるアポトーシスが有意に抑制され、これはc-Ablの活性依存的であった。このことから、Pitx1はc-Ablによる発現制御により、細胞死誘導を正に調節していることが判明した(文献5)。

## (3) p53の発現制御と細胞死誘導

癌抑制遺伝子p53は細胞周期の制御や、アポトーシス誘導に重要な役割を果しているが、その生理機能と調節機構の詳細ははっきりしない。特に、p53転写活性の調節についての情報は極めて少ないのが実状である。我々は、Ras responsive element binding protein 1(RREB1)と呼ばれる機能未知の転写因子がp53の発現を転写レベルで制御していることを見いだした。まずp53のプロモーターを用いたレポーターアッセイの解析から、RREB1がp53のプロモーター領域のうちCPEと呼ばれる配列を介して、p53の転写活性を促進することを明らかにした。またクロマチン免疫沈降法を用いた解析から、DNA損傷によりRREB1はp53のプロモーターにリクルートされp53のプロモーター活性を誘導するが、RREB1の発現抑制によりp53のプロモーター活性が顕著に抑制されることが明らかとなった。その結果、p53のmRNAと蛋白質レベルの発現も明らかに減少した。それに伴って、p53によって制御を受けている下流遺伝子の発現もその多くが低下した。さらにRREB1のsiRNAを用いることで、DNA損傷によるp53依存性アポトーシス誘導が著しく低下した。これらの結果から、RREB1はp53の転写制御を介して、DNA損傷によるアポトーシスを誘導することが明らかになった(文献9)。今後は、RREB1がどのような機序でDNA損傷にตอบสนองして転写活性を上げるのかについて解明していきたい。

## (4) DYRK2 キナーゼの活性制御と機能解析

DNA損傷によって惹起されるアポトーシスでは、がん抑制遺伝子であるp53がその中心的な働きを担っており、中でもSer46のリン酸化はアポトーシス誘導に必須と考えられている。我々は世界に先駆けてSer46キナーゼとしてDYRK2を同定することに成功した。しかしその細胞内制御は多くが不明であった。そこで

DYRK2の機能解析を進めたところ、DYRK2はATMによって制御されていることが判明した。具体的には、DNA損傷に伴ってATMはDYRK2のThr33とSer369をリン酸化し、DYRK2を活性化するだけでなく、DYRK2の核内での安定化にも寄与していることが明らかになった。さらにDYRK2は核内にも存在するが、MDM2によって恒常的にユビキチン化され分解されていること、DNA損傷後ATMによるThr33のリン酸化によってMDM2がDYRK2から解離し分解が抑制されることを見いだした。そしてこの制御がDNA損傷におけるp53依存性アポトーシス誘導に本質的なステップであることが示された。以上の結果から、DYRK2は細胞質だけでなく核にも存在しているが、核内DYRK2はMDM2によって恒常的に分解されており、DNA損傷によってATMによるリン酸化を受け核内で安定化し活性化され、p53をリン酸化しアポトーシスを誘導するというモデルを提唱した(文献7)。今後は、根本的な課題として、p53のSer46がリン酸化されるとどのようにアポトーシスを誘導するのかについて、その詳細なメカニズムの解明に軸足を移す予定である。

#### (5) Pim-1 による NF-kappaB シグナルの制御

癌の進展と密接に関わっている細胞内シグナル経路の一つとして、NF-kappaB シグナルが知られている。この標的遺伝子の大部分が細胞生存に関与しており、多くの癌でこのシグナルが活性化している。このシグナルを抑制することが出来れば、癌の進展や転移を抑えることが出来る可能性が高まる。NF-kappaBを構成する転写因子の一つであるRelA/p65はリン酸化などの多様な翻訳後修飾を受け転写活性が制御されている。なかでもセリン276残基のリン酸化はRelA/p65のDNA結合活性を亢進すると共に、転写コアオペレーターCBP/p300との結合を誘導することから、RelA/p65の転写能を活性化する重要な修飾であることが明らかになってきた。しかしこのリン酸化を担うキナーゼははっきりしない。そこでこのキナーゼを同定するためにラムダファージによるSer276リン酸化特異的抗体を用いた発現クローニングを行い、候補となるキナーゼの同定を試みた。その結果Pim-1を同定した。Pim-1はTNFalphaなどのサイトカインによる酸化ストレス刺激によりRelA/p65をリン酸化し、その転写活性能を亢進するとともに、SOCS-1によるRelA/p65のユビキチン化を抑制し、安定化に寄与していることが明らか

となった。さらにPim-1によるNF-kappaBの活性化は、TNFalpha依存的なアポトーシス誘導を抑制していることが示唆された。以上の結果、Pim-1によるSer276のリン酸化は、RelA/p65の活性化のみならず安定化にも寄与することで、NF-kappaBシグナルを正に制御していることが示唆された(文献8)。多くの癌でPim-1の過剰発現や活性化が報告されていることから、Pim-1が癌の分子標的となることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Hew HC, Liu H, Lu Z-G, Kimura J, Miki Y, Yoshida K. Identification of Evi-1 as a novel effector of PKC $\delta$  in the apoptotic response to DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta* in press.
2. Hew HC, Liu H, Miki Y, Yoshida K. PKC $\delta$  regulates Mdm2 independently of p53 in the apoptotic response to DNA damage. *Mol. Carcinog.* in press
3. Kimura J, Kudoh T, Miki Y, Yoshida K. Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *Int. J. Cancer* 128:1524-1531 (2011)
4. Kudoh T, Kimura J, Lu Z-G, Miki Y, Yoshida K. D4S234E, a novel p53-responsive gene, induces apoptosis in response to DNA damage. *Exp. Cell Res.* 316:2849-2858 (2010)
5. Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. The c-Abl tyrosine kinase stabilizes Pitx1 in the apoptotic response to DNA damage. *Apoptosis* 15:927-935 (2010)
6. Yoshida K, Miki Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 101:831-835 (2010)
7. Taira N, Yamamoto H, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. ATM augments nuclear stabilization of DYRK2 by inhibiting MDM2 in the apoptotic response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 285:4909-4919 (2010)

8. Nihira K, Ando Y, Yamaguchi T, Kagami Y, Miki Y, Yoshida K. Pim1 controls NF- $\kappa$ B signalling by stabilizing RelA/p65. *Cell Death Differ.* 17:689-698 (2010)
9. Liu H, Hew HC, Lu Z-G, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. DNA damage signalling recruits RREB-1 to the p53 tumor suppressor promoter. *Biochem. J.* 422:543-551 (2009)
10. Lu Z-G, Liu H, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. Protein kinase C $\delta$  activates RelA/p65 and nuclear factor- $\kappa$ B signaling in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cancer Res.* 69:5927-5935 (2009)
11. Nihira K, Taira N, Miki Y, Yoshida K. TTK/Mps1 controls nuclear targeting of c-Abl by 14-3-3-coupled phosphorylation in response to oxidative stress. *Oncogene* 27:7285-7295 (2008)
12. Kimura J, Nguyen ST, Liu H, Taira N, Miki Y, Yoshida K. A functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in response to genotoxic stress. *Nucleic Acids Res.* 36:5250-5259 (2008)
13. Yoshida K. Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage. *Trends. Mol. Med.* 14:305-313 (2008)
14. Yoshida K. Role for DYRK family kinases on regulation of apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 14:305-313 (2008)
15. Tomiyoshi G, Takenaka K, Yoshida K, Miki Y. A novel BRCA2-interacting protein BJ-HCC-20A is involved in promotion of cell growth and in DNA repair in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 99:747-754 (2008)
16. Shinagawa H, Miki Y, Yoshida K. BRCA1-mediated ubiquitination inhibits topoisomerase II $\alpha$  activity in response to oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.* 10:939-950 (2008)

[学会発表] (計 43 件)

1. Yoshida K. DYRK2 induces apoptosis via p53 phosphorylation at Ser46 in response to DNA damage. Apoptosis World 2008, Luxembourg, Luxembourg 1/23-1/26/08
2. Kimura J, Nguyen ST, Liu H, Taira N, Miki Y,

- Yoshida K. A functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in response to genotoxic stress. Second JCA-AACR Special Joint Conference, Hyogo, Japan: 7/14-7/16/2008
3. Tomiyoshi G, Nakanishi A, Takenaka K, Yoshida K, Miki Y. A novel BRCA2-interacting protein BJ-HCC-20A inhibits the induction of apoptosis in response to DNA damage. Second JCA-AACR Special Joint Conference, Hyogo, Japan: 7/14-7/16/2008
4. Yoshida K. Role for DYRK2 on induction of apoptosis in response to DNA damage, The Joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network and Osaka University Global COE (Frontier Biomedical Science Underlying Organelle Network Biology) Symposium, Osaka; 1/31~2/1/09
5. Yoshida K. A genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as an apoptosis modulator that implies a potential therapeutic target. Annals Oncol. 20 (Suppl. 3): iii36, 2009. 7th International Symposium on Targeted Anticancer Therapies 2009, Amsterdam, Netherlands: 3/23-25/2009
6. Lu Z-G, Liu H, Yamaguchi T, Miki Y and Yoshida K. PKCdelta activates RelA/p65 and NF-kappaB signalling to prevent TNFalpha-induced apoptosis. 17th ECDO Euroconference on Apoptosis, Paris, France: 9/23-9/26/2009
7. 吉田清嗣 DNA 傷害におけるシグナル伝達機構とアポトーシス誘導 第 1 2 回 Molecular Cardiovascular Conference、北海道；9 月 7 日、2008
8. 吉田清嗣 DNA 傷害性アポトーシス誘導における p53 のリン酸化とその意義 第 3 2 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ；p53 研究のニューパラダイム)、横浜；1 2 月 9 日、2009
9. 吉田清嗣 p53 リン酸化依存性アポトーシス誘導における転写指向性と分子機構 BMB2010 (ワークショップ；「p53 ワールド」、その多彩な生理作用 ー複雑なシグナルネッ

トワークから疾患病態生理まで)、神戸 ; 1  
2月7日、2010

〔図書〕(計4件)

1. Yoshida K. Functional roles for pro-apoptotic kinases on nuclear targeting and induction of apoptosis in response to DNA damage. In: Miura S and Nakano S (eds), *Progress in DNA Damage Research*. Nova Science Publishers, Inc. pp.227-242 (2008)
2. Yoshida K. Cell signalling, cell cycle defect and apoptosis in Cockayne syndrome. In: Ahmad SI (ed), *Molecular Mechanisms of Cockayne Syndrome*. Landes Biosciences Publication. pp.43-51 (2009)
3. Yoshida K. PKC, p53, and DNA damage. In: Mrcelo KG (ed), *Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy*. Springer Science & Business Media. pp.253-265 (2010)
4. Yoshida K. Molecular function of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. In: Nguyen SD (ed), *Tumor Suppressors*. Nova Science Publishers, Inc. pp.229-242 (2011)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.tmd.ac.jp/mri/mgen/index\\_j.html](http://www.tmd.ac.jp/mri/mgen/index_j.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 清嗣 (YOSHIDA KIYOTSUGU)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号 : 70345312

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし