

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390090

研究課題名（和文） ストレス応答キナーゼMTK1による細胞死、細胞増殖制御機構と癌におけるその異常

研究課題名（英文） Regulation of cell death and proliferation by the MTK1 SAPKKK and its failure in cancer

研究代表者

武川 睦寛 (TAKEKAWA MUTSUHIRO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：30322332

研究成果の概要（和文）：ストレス応答 MAPK 経路は、DNA 損傷などの環境ストレス刺激によって活性化され、細胞のストレス応答の制御に中心的な役割を果たしている。また、この経路の制御異常が癌を始めとする難治性疾患の発症にも関与する。本研究ではストレス応答経路の主要な MAPKKK である MTK1 の生理機能の解析を行い、MTK1 がサイクリンの発現を負に制御して増殖抑制に寄与することを見出した。また MTK1 の新たな基質分子として特定のキナーゼ分子 (Mip1 と命名) を同定することに成功し、MTK1 によって活性化された Mip1 が、アポトーシス抑制する機能を持つことを見出した。また、癌細胞において Mip1 の発現異常が起きていることを確認した。

研究成果の概要（英文）：Stress-responsive MAPK pathways are activated by a wide array of stress stimuli such as DNA-damage, and play pivotal roles in the regulation of cellular stress responses, ranging from survival to apoptotic cell death. Perturbation of these critical signaling systems is involved in a variety of life-threatening disorders including cancer. In this study, we investigated physiological functions of a stress-responsive MAPKKK, MTK1. We found that, under stress conditions, MTK1 participated in down-regulation of cyclin expression. Furthermore, we screened for molecules that interact with MTK1, and identified a protein kinase (termed Mip1) as a novel substrate of MTK1. In response to stress, Mip1 was phosphorylated and activated by MTK1, thereby inhibiting stress-induced apoptosis. Interestingly, we confirmed that Mip1 expression was aberrantly regulated in human cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：分子病態学、分子腫瘍学、シグナル伝達、MAP キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

ストレス応答 MAPK 情報伝達経路は、様々

な環境ストレス刺激（紫外線、放射線や抗がん剤などによる DNA 損傷、高浸透圧、熱シヨ

ック、酸化など)によって活性化され、ストレスを被った細胞の細胞周期停止やアポトーシス誘導の制御に寄与している。またこの経路は、TNF $\alpha$  および IL-1 などの炎症性サイトカインや、病原体の感染などによっても強く活性化され、炎症や免疫応答の制御に中心的な役割を果たしている。近年、ストレス応答経路の異常が、癌や自己免疫疾患などを始めとする難治性疾患の発症に深く関与する証拠が蓄積されてきた。しかしながら、ストレス応答経路の活性制御機構には、不明な点が多く残されており、その解明は癌の病因、病態の理解、および新規治療法開発の観点からも必要不可欠である。

申請者は、これまでにストレス応答 MAPK 経路の主要なヒト MAPKKK である MTK1 をクローニングし、さらに MTK1 の制御ドメインに直接結合して、活性化因子として機能する 3 つの GADD45 関連分子 (GADD45  $\alpha$  /  $\beta$  /  $\gamma$ ) を同定してきた。本研究においては、申請者自身が見出したこれらの知見を基に、MTK1-p38/JNK 経路の生理機能および、癌病態との関連について解析を行った。

## 2. 研究の目的

本研究に於いては、癌や自己免疫疾患を始めとする難治性疾患の克服を最終的な目標とし、細胞増殖・死の制御に重要なヒト・ストレス応答 MAPKKK 分子、MTK1 の活性制御機構と生理機能を分子レベルで詳細に解明すべく解析を行った。さらに癌において、MTK1-p38/JNK 経路の制御異常が観察されるか検証を行った。

## 3. 研究の方法

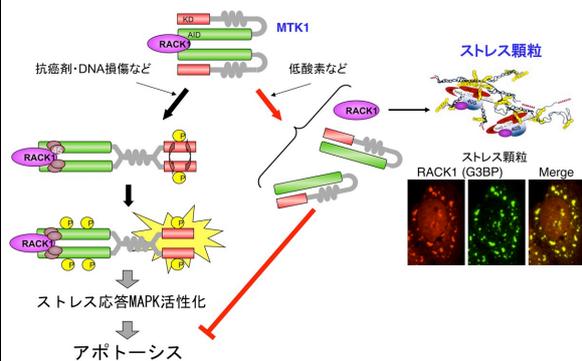
MTK1 の新たな活性制御分子および基質分子を同定するため、細胞内で MTK1 と複合体を形成して共沈してくる蛋白質分子を質量分析 (LC-MS/MS 法) により網羅的に同定した。さらに得られた分子の遺伝子クローニングを行うと共に、これらの分子が MTK1-p38/JNK 経路の活性制御に与える影響や細胞機能に与える影響を、生化学的解析および分子細胞生物学的解析を実施して検証した。

## 4. 研究成果

### 1) ストレス顆粒形成によるストレス応答 MAPKKK、MTK1 の活性制御

MTK1 結合分子のスクリーニングを行った

結果、アダプター蛋白質 RACK1 を同定することに成功した。RACK1 は WD40 リピード配列を持つ分子であり、様々なシグナル伝達経路において足場蛋白質として機能することが知られている。生化学的解析から、RACK1 は MTK1 分子同士を 2 量体化し、その活性化を促進する機能を持つ分子 (MTK1 活性化のエンハンサー) であることが明らかとなった。さらに興味深いことに、低酸素などの特定の刺激によって「ストレス顆粒」と呼ばれる細胞質内構造体が形成されると、RACK1 が MTK1 から解離して顆粒内に取り込まれ、その機能が阻害されて MTK1 の活性化が強く抑制されることを見出した。さらにその結果、下流の p38 の活性化も抑制されて、DNA 損傷によるアポトーシスが阻害されることを見出した。また、このようなストレス顆粒形成による細胞死抑制が、固形癌を治療する上で問題となっている「固形腫瘍内部低酸素環境による癌細胞の抗癌剤抵抗性」に関与する事を示した。



### ストレス顆粒によるストレス応答MAPK経路の制御

### 2) MTK1-p38/JNK 経路による細胞増殖制御

ストレス応答 MAPKKK である MTK1 が、ストレス刺激のみならず特定の増殖刺激によっても活性化されることを見出した。そこで、細胞周期制御における MTK1 の役割を詳細に解析した結果、MTK1 の活性化によって特定のサイクリン分子の発現が有意に抑制されて、細胞増殖が阻害されることを見出した。また、MTK1 によるサイクリンの発現抑制機構として、MTK1-p38/JNK 経路の活性化により、サイクリンのユビキチン分解が亢進することを見出した。

### 3) MTK1 の新規基質分子の同定

我々は、MTK1 の生理機能および活性制御機構の解析を進める過程で、MTK1 が細胞内で、細胞分裂の制御に重要な役割を担う特定の

キナーゼ分子 (Mip1 と命名) と相互作用し、複合体を形成することを見出した。実際に、*in vivo* の共沈実験により、MTK1 と Mip1 がストレス刺激依存的に結合することを確認した。さらに生化学的解析を推し進め、MTK1 が Mip1 を *in vitro* で直接リン酸化し、活性化することを見出した。また Mip1 に系統的な欠失変異、点変異を導入して解析を行い、Mip1 分子内で MTK1 によってリン酸化されるアミノ酸残基を決定して同部位に対するリン酸化特異抗体を樹立することに成功した。この抗体を用いて *in vivo* においても、DNA 損傷などのストレス刺激に反応して、MTK1 依存的に Mip1 がリン酸化され、活性化されることを確認した。Mip1 の活性化を阻害すると、ストレス刺激後のアポトーシスが顕著に亢進することから、Mip1 の活性化はアポトーシスを抑制して細胞の生存を促進する機能を持つと考えられる。

そこで更に、癌における Mip1 の発現を検討したところ、幾つかのがん細胞において Mip1 の発現が有意に亢進していることを見出した。

#### 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 8 件)

- ① 中村貴紀、武川睦寛、細胞内シグナル伝達と分子標的薬剤の作用機構、Medical Science Digest 「特集：分子標的薬」、38 巻、14-17 (2012) 査読無
- ② 久保田祐二、中亮介、武川睦寛、ユビキチンおよびユビキチン様タンパク質による MAP キナーゼ経路の制御、実験医学増刊「シグナル伝達研究最前線 2012 -翻訳後修飾、解析技術、疾患との関連から創薬応用まで-」、30 巻、72-79、(2012) 査読有
- ③ Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kojima K, Kishikawa T, Shibata C, Takekawa M, Yoshida H, Omata M, and Koike K., Receptor for activated protein kinase C: Requirement for efficient microRNA function and reduced expression in hepatocellular carcinoma. PLoS ONE 6, e24359 (2011) 査読無

④ Kubota Y, O'Grady P, Saito H and Takekawa M., Oncogenic Ras abrogates MEK SUMOylation that suppresses the ERK pathway and cell transformation. Nature Cell Biol. 13, 282-291 (2011) 査読有

⑤ 武川睦寛、ストレス顆粒によるストレス応答シグナルの制御と癌、実験医学増刊「秒進分歩する癌研究と分子標的治療」29 巻、125-131、(2011) 査読無

⑥ 武川睦寛、久保田裕二、がん遺伝子産物 Ras は MEK の SUMO 化による ERK 経路の不活性化を阻止し発がんを導く、ライフサイエンス 新着論文レビュー (オンラインジャーナル)、(2011) 査読無

⑦ Takekawa M, Kubota Y, Nakamura T and Ichikawa K., Regulation of stress-activated MAP kinase pathways during cell fate decisions. Nagoya J. Med. Sci. 73, 1-14 (2010) 査読有

⑧ Tomida T, Takekawa M, O'Grady P and Saito H, Stimulus-specific distinctions in spatial and temporal dynamics of stress-activated protein kinase kinase kinases revealed by FRET biosensor. Mol. Cell. Biol. 29, 6117-6127 (2009)

[学会発表] (計 38 件)

① Takekawa M, "A novel role of the stress-responsive MAP kinase pathways in regulation of the numeral integrity of centrosomes" MBSJ2011(第 34 回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、2011 年 12 月 15 日 (横浜))

② 久保田裕二、斎藤春雄、武川睦寛、「先天性 Ras-MAPK 症候群および孤発性癌における変異型 MEK1/2 の異常活性化機構」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日 (横浜)

- ③ 中村貴紀、齋藤春雄、武川睦寛、「ストレス応答 MAPKKK, MTK1 の新規基質分子の同定及び機能解析」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日 (横浜)
- ④ Matsuzaki-Arimoto K, Takekawa M, Saito H, “Formation of stress granules under multiple stress conditions” 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日 (横浜)
- ⑤ Takekawa M, “Regulation of ERK signaling and cell transformation by protein SUMOylation” 第 70 回日本癌学会学術総会(Symposia)、2011 年 10 月 5 日 (名古屋)
- ⑥ Saijyo N, Saito H, Takekawa M, “Regulation of the ERK MAPK pathway and cell proliferation by feedback phosphorylation of MEK” 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 14 日 (名古屋)
- ⑦ Takekawa M, “A novel role of the stress-responsive MAP kinase pathways in regulation of the numeral integrity of centrosomes” MBSJ2011(第 34 回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、2011 年 12 月 15 日 (横浜)
- ⑧ 武川 睦寛、「蛋白質 SUMO 化による ERK MAP キナーゼ経路と発癌の制御」、「がん支援」公開シンポジウム、2011 年 2 月 9 日 (東京)
- ⑨ 武川 睦寛、「蛋白質 SUMO 化による MAPK シグナルと発癌の制御」BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会)、2010 年 12 月 8 日 (神戸)
- ⑩ Matsuzaki-Arimoto K, Takekawa M, Saito H, “Regulation mechanism of a novel stress granule-associated protein USP10”, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会), 2010 年 12 月 8 日 (神戸)
- ⑪ 武川 睦寛、「ストレス顆粒形成における SUMO 化による細胞生死の制御と癌」第 19 回日本 Cell Death 学会学術集会 (シンポジウム)、2010 年 7 月 31 日 (名古屋)
- ⑫ 市川 研史、久保田裕二、武川睦寛、癌および Ras/MAPK 症候群における変異型 MEK の機能解析と ERK 新規基質分子 MSP1 の同定、第 19 回日本 Cell Death 学会学術集会、2010 年 7 月 31 日 (名古屋)
- ⑬ Ichikawa K, Saito H, Takekawa M, “Identification of p11, a novel substrate for ERK MAP kinase” 第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 8 日 (横浜)
- ⑭ Nishizawa T, Arimoto K, Saito H, Takekawa M, “Identification of SUMO-specific proteases (SENPs) that deconjugate SUMOylated MAPKK, 第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 8 日 (横浜)
- ⑮ Saijyo N, Saito H, Takekawa M, “Regulation of the ERK pathway and cell proliferation by feedback phosphorylation of MEK”, 第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 8 日 (横浜)
- ⑯ Nakamura T, Takekawa M, Saito H, “Identification of a novel substrate for the stress-responsive MAPKKK, MTK1” 第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 8 日 (横浜)
- ⑰ Matsuzaki-Arimoto K, Takekawa M, Saito H, “Identification and functional analysis of a novel stress granule-associated protein USP10”, 第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 8 日 (横浜)
- ⑱ 武川 睦寛、「ストレス顆粒形成によるストレス応答 MAPK 経路と抗癌剤誘導アポトーシスの制御」第 7 回がんとハイポキシア研究会、2009 年 12 月 5 日 (京都)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武川 睦寛 (TAKEKAWA MUTSUHIRO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：30322332

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者