

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390081
 研究課題名（和文） ストレス応答キナーゼ MTK1 による細胞増殖、炎症制御機構と疾患におけるその異常
 研究課題名（英文） Regulation of cell growth and inflammation by stress-responsive kinase MTK1
 研究代表者
 武川 睦寛（TAKEKAWA MUTSUHIRO）
 東京大学・医科学研究所・准教授
 研究者番号：30322332

研究成果の概要：ストレス応答 MAPK 経路（MAPKKK-MAPKK-MAPK）は、環境ストレスによって活性化され、細胞のストレス応答の制御に重要な役割を果たしている。また、この経路の制御異常が癌や慢性炎症性疾患に深く関与する。本研究では、ストレス応答経路の主要なヒト MAPKKK である MTK1 の活性制御機構の解明を行った。その結果、1）ストレス刺激後に GADD45 分子の発現が誘導されて MTK1 と結合すると、まず MTK1 制御ドメインと酵素ドメイン間の抑制的な分子内相互作用が解除されて MTK1 が多量体化し、さらに隣接した MTK1 分子同士が相互にリン酸化し合っ、強い活性化が起こることを見出した。また、2）MTK1 の新たな活性化促進分子として RACK1 を同定した。さらに、低酸素によってストレス顆粒が形成されると、RACK1 が顆粒内に取り込まれて MTK1-p38/JNK 経路が失活し、DNA 損傷による細胞死が阻害されることを見出した。即ち、ストレス顆粒形成による MTK1 の活性化阻害が、腫瘍内部低酸素環境において癌細胞が抗癌剤抵抗性を獲得する一因となっていることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：分子病態学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：p38、JNK、MTK1、ストレス顆粒

1. 研究開始当初の背景

ストレス応答 MAPK（p38/JNK）情報伝達経路は、様々なストレス刺激（紫外線、放射線や抗癌剤による DNA 損傷、酸化、熱ショック、高浸透圧など）によって活性化され、

細胞周期停止やアポトーシス、炎症・免疫応答の制御に中心的な役割を果たしている。近年、この経路の制御異常が癌や自己免疫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

制御機構や、疾患における制御異常の詳細には不明な点が多く残されており、その解明は上記疾患の病因、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。

私達はこれまでに、ストレス応答 MAPK 経路の主要なヒト MAPKKK である MTK1 を同定してきた。さらに、MTK1 の制御ドメインに結合して、活性化因子として機能する3つの GADD45 関連分子 (GADD45 $\alpha/\beta/\gamma$) を単離し、これら GADD45 分子が、ストレス刺激やサイトカインによって発現誘導され、MTK1 を介して p38/JNK 経路を活性化することを示してきた。

私達はさらに、MTK1 の生理機能を明らかにすべく研究を推進し、ノックアウトマウスを用いた解析から、GADD45 関連分子-MTK1-p38 というシグナル伝達システムが、Th1 細胞からの IFN- γ 産生に必須であり、Th1 免疫応答の制御に極めて重要であることを明らかにした。また、抗癌剤による DNA 損傷が引き起こす p38/JNK 経路の活性化とアポトーシス誘導にも MTK1 が重要であることを示してきた。従って、MTK1 の活性制御機構を分子レベルで詳細に解明し、得られた知見を利用して MTK1 活性を人工的に制御する方法や薬剤を開発することが出来れば、Th1 免疫応答を選択的に調節することが可能であり、自己免疫疾患、特に Th1 病 (臓器特異的自己免疫疾患: クローン病、Behcet 病、多発性硬化症、I 型糖尿病、関節リウマチ等) の治療に応用し得ると考えられる。一方、DNA 損傷型抗癌剤を用いた癌治療に於いては、MTK1 の効率的な活性化が、抗癌剤の治療効果や有効性を左右する重要な要因の一つであると考えられる。しかしながら、MTK1 の活性制御機構の詳細には不明な点が多く残されている。

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・死と炎症・免疫応答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 の制御異常が観察されるか検証を行った。

3. 研究の方法

GADD45 関連分子による MTK1 活性化機構の詳細を明らかにするため、GADD45 β および MTK1 に系統的な欠失変異を導入して、生化学的解析を行い、各分子内に存在する機能ドメインの同定を行った。

また MTK1 の新たな活性制御分子を同定

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。

4. 研究成果

1) ストレス応答 MAPKKK、MTK1 の活性制御機構

我々はこれまでに、MTK1 の活性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 (GADD45 $\alpha/\beta/\gamma$) を同定し、これらの分子が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ストレス誘導遺伝子であることを明らかにしてきた。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、MTK1 の活性化に必要な GADD45 分子内の機能ドメインを同定するため、GADD45 β 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 β 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 β 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を得られた。このような変異型 GADD45 β 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 分子内で自身の活性制御に重要な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。

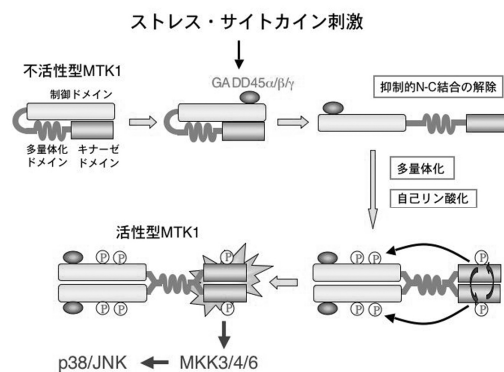


図 1: MTK1 の活性化機構 (モデル)

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が明らかとなった(図1)。

次にこの知見を利用し、MTK1 活性化に必要な自己リン酸化サイトに対するリン酸化特異抗体を作成して、MTK1 のキナーゼ活性をウエスタンブロットにより簡便に検出する実験系を確立した。その結果、MTK1 は様々なストレスやサイトカイン刺激によって活性化されることが明らかとなった。

2) MTK1 の新規活性制御分子の探索

Flag タグを付加した MTK1 を発現させた COS 細胞から細胞抽出液を作成して、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、MTK1 と特異的に結合して共沈する蛋白質分子を LC-MS/MS 法により同定した。その結果、RACK1 を含む複数の MTK1 結合分子を同定し得た。RACK1 は WD40 リピートを持つ分子であり、様々なシグナル伝達システムにおいて足場蛋白質として機能し、細胞内情報伝達をコントロールすることが示唆されている。そこで、RACK1 が MTK1 の活性制御に果たす役割を検証したところ、RACK1 が MTK1 を多量体化して、その活性化を促進する分子(MTK1 活性化のエンハンサー)として機能することを見出した。

さらに RACK1 と MTK1 の細胞内局在を蛍光免疫染色により解析したところ、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、ストレス顆粒内に取り込まれることを発見した。またその結果、MTK1 が失活して p38/JNK 経路の活性化が強く抑制され、DNA 損傷によるアポトーシスが阻害されることを明らかにした。さらに、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」に關与する事を示した。

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2件)

Arimoto K, Fukuda H, Ohmi S, Saito H, and

Takekawa M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive p38/JNK MAPK pathways *Nature Cell Biology* 10, 1324-1332 (2008). (査読有り)

Miyake Z*, Takekawa M*, Ge Q and Saito H. (*Equal contribution) Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans-autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2765-2776 (2007). (査読有り)

[学会発表](計10件)

富田太一郎、武川睦寛、齋藤春雄「MAP3K 活性化のリアルタイムイメージングによるストレス応答シグナル動態の解明」第82回日本薬理学会年会、平成21年3月16日(横浜)

富田太一郎、武川睦寛、齋藤春雄「ストレス応答 MAP3K 活性の可視化解析」第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、平成20年12月12日(神戸)

有本京子、武川睦寛、齋藤春雄「低酸素による細胞質内ストレス顆粒形成は、SAPK 経路の活性化を抑制し、癌細胞の抗癌剤抵抗性に寄与する」第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、平成20年12月11日(神戸)

久保田裕二、武川睦寛、齋藤春雄「蛋白質 SUMO 化による MAPK 経路の活性制御」第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、平成20年12月11日(神戸)

武川睦寛、齋藤春雄「細胞質内ストレス顆粒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67回日本癌学会学術総会(ワークショップ)、平成20年10月28日(名古屋)

中村貴紀、武川睦寛、齋藤春雄「MAPK によるストレス応答 MAPKK、MKK4 のフィードバック・リン酸化とその機能解析」東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム2008、平成20年9月23日(東京)

有本京子、武川睦寛、齋藤春雄「細胞質内ストレス顆粒によるストレス応答 MAPK

経路の制御」第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会(ワークショップ)、平成 19 年 12 月 15 日(横浜)

富田太郎、武川睦寛、斎藤春雄「ストレス応答 MAP3K 活性可視化プローブの創製とその応用」第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会(ワークショップ)、平成 19 年 12 月 12 日(横浜)

中村貴紀、武川睦寛、斎藤春雄「MAPK によるストレス応答 MAPKK、MKK4 のフィードバック・リン酸化」第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会(ワークショップ)、平成 19 年 12 月 12 日(横浜)

有本京子、武川睦寛、斎藤春雄「細胞質内ストレス顆粒によるストレス応答 MAPK 経路の制御」東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 2007、平成 20 年 9 月 15 日(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武川 睦寛 (TAKEKAWA MUTSUHIRO)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30322332

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者