

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591491

研究課題名（和文） 新規MAP3K抑制因子STK38を標的とした放射線増感

研究課題名（英文） Radiosensitization by targeting a novel MAP3K negative regulator STK38

研究代表者

榎本 敦 (ENOMOTO ATSUSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20323602

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、様々なストレスに対する STK38 活性を比較し、放射線や過酸化水素などの酸化ストレスが STK38 活性を上昇させることを見出した。この酸化ストレス誘発 STK38 活性化は Wortmannin により抑制された。次に、PI-3K-AKT 経路の構成因子の阻害剤や遺伝子過剰発現による STK38 活性への影響や生化学的解析により GSK-3 が STK38 をリン酸化すること、そのリン酸化部位、さらには同定した部位が STK38 制御部位であることを明らかにした。また STK38 発現抑制は、酸化ストレス誘発細胞死を増強させた。

研究成果の概要（英文）：Serine-threonine kinase 38 (STK38) is a member of the protein kinase A (PKA)/PKG/PKC-like family (AGC). However, little is known about its functions or regulatory mechanisms. Among various environmental stresses, STK38 was specifically activated by X-irradiation or H₂O₂, and the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin or AKT inhibitor IV suppressed this activation. STK38 was also activated by a constitutively active AKT1 or by GSK-3beta inhibitor VII. Co-immunoprecipitation analysis revealed that GSK-3 physically interacted with STK38 in cells. Overexpression of GSK-3beta inhibited the oxidative stress-stimulated STK38 activity. We identified GSK-3 as an STK38 kinase. GSK-3beta phosphorylated STK38 on residues S6 and T7 *in vitro*, largely depending on a PKA-mediated priming phosphorylation of STK38 on residues S10 and S11, respectively. STK38's oxidative stress-stimulated activity was enhanced by alanine substitution at its priming sites and/or at S6 and T7, but was partially reduced by a phosphomimetic mutation at S6 or T7. Knockdown or overexpression of the phosphomimetic mutant of STK38 enhanced oxidative stress-induced cell death. Taken together, our results indicate that that GSK-3 inhibits STK38 full activation through phosphorylation, and suggest that the activation of STK38 is required for preventing cell death against 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	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：放射線科学・放射線治療生物学

キーワード：増感、STK38、リン酸化、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年、ストレス応答シグナルの研究は、分子生物学の発展に伴い多くの機能分子の同定が進み、少しずつであるが複雑なネットワークの仕組みが明らかにされつつある。MAPKシグナル伝達経路は、MAPKKK (MAP3K), MAPKK (MAP2K), MAPKからなるリン酸化カスケードである。哺乳類細胞では、ERK, JNK, P38の3経路が存在し、増殖、細胞死、分化などの制御に深く関わっている。特に、JNKカスケードは、ストレス応答伝達経路として細胞増殖・細胞死を制御していると考えられている。しかしながら、細胞外ストレスがどのようにMAP3Kを活性化させるのかは、未解明である点が多い。研究代表者はJNKカスケードの最上流分子であるMAPKKK (MEKK1, 2, 3)の活性化を抑制する新規のセリン・スレオニンキナーゼ (STK38)を同定した (Enomoto et al., Oncogene 2008)。STK38過剰発現によりJNKカスケード最上流因子であるMAP3Kの活性化が阻止され、その結果としてJNKカスケードのシグナル伝達の抑制が認められた。そこで、反対にSTK38のKnock downによりその機能を阻害出来れば、ストレス刺激によるMAP3Kの活性化亢進とその結果として細胞死の増加や細胞周期の停止などの細胞応答が誘導され、感受性を増大させることができるのではないかと着想に至った。

2. 研究の目的

研究代表者は、MEKK1, MEKK2, MEKK3, TAK1など多くのMAP3Kファミリー分子に結合する分子STK38 (Serine Threonine Kinase 38)を免疫沈降法により同定した。そしてSTK38は、MAP3Kの自己リン酸化およびそれに続く活性化を抑制する制御因子として機能していることを明らかにした。またSTK38抗体を作製し、発現状態を調べた結果、組織では脳、肝臓、心臓をはじめ腎臓、肺など様々な組織でユビキタスに発現していること、またHeLa, MCF-7, SK-BR3, U937, HL-60など多く培養細胞株でもその発現が認められた。そこで、STK38 Knock downによる発現抑制による放射線感受性へのインパクトを評価し、増感法の基礎を確立する

3. 研究の方法

1) STK38を標的としたsiRNA発現ベクターの構築と放射線感受性への影響評価

STK38 に対する siRNA 発現ベクターを構築・細胞へ導入し、ノックダウンを誘導する。STK38 をノックダウンした細胞に対して、X線照射を行い、コロニー形成法に基づく放射線感受性試験を実施する。また STK38 はストレス応答経路 JNK カスケードの MAP3K 抑制因子として機能していることから、ノックダウン細胞における JNK 活性化の亢進やその結果としての細胞死や細胞周期停止などの細胞応答について解析を行う。細胞死の解析には、コロニー形成法を用いる。アポトーシスの解析には、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼの活性測定、DNA Ladder formation、クロマチン凝縮といったアポトーシス特有の現象について検証を行う。細胞周期の解析には、FLOW CYTOMETRY を用いる。

2) 培養細胞株・腫瘍組織におけるSTK38活性の比較

これまで各種培養細胞株や正常組織を用いて発現量の比較を行った結果、ほとんどの細胞株・組織でその発現が認められた。次に STK38 特異的抗体を用いた *in vitro* kinase assay により細胞間、組織間の STK38 活性を比較検討する。特に正常組織と腫瘍組織 (共に市販されているものを用いる) あるいは正常細胞と癌由来細胞株の間で活性の差について検証を行い、感受性指標や腫瘍マーカーとして有用性について検討する。

3) STK38 活性化制御機構の解析

様々なストレス刺激に対する STK38 活性を比較するとともに STK38 活性化を抑制する阻害剤をスクリーニングする。スクリーニングの結果、STK38 制御因子の候補となるものについては、遺伝子過剰発現やノックダウンによる STK38 活性への影響を解析する。さらに STK38 制御因子がどのように STK38 活性を制御するのか (リン酸化、ユビキチン化等の翻訳後修飾) を *in vitro* 系を用いて解析する。

4. 研究成果

1) 酸化ストレスによる STK38 活性の亢進

研究代表者は、様々なストレス (X線、エトポシド、ソルビトール、過酸化水素、アノソマイシン) に対するキナーゼ活性を比較した。その中で、放射線や過酸化水素などの酸化ストレスにより、STK38 キナーゼ活性が上昇することを見出した。この酸化ストレス誘

発 STK38 活性化は PI-3K 阻害剤として知られている Wortmannin や AKT 阻害剤により抑制された。

2) 活性化型 AKT による STK38 活性の亢進

AKT 阻害剤により酸化ストレスによる STK38 活性が抑制されることから、AKT による制御の可能性を検討した。恒常的活性化型 AKT 発現ベクターを HEK293T 細胞株に導入すると STK38 活性の亢進が見られた。また STK38 のドミナントネガティブ (STK38(K118A)) を導入した場合は、活性化型 AKT 存在下でも STK38 は活性化を示さなかった。次に AKT によるダイレクトな STK38 制御を検討するために、*in vitro* AKT assay を行った。しかしながら、STK38 は AKT のダイレクトな基質ではないことを確認した。

3) GSK-3 阻害による STK38 活性の亢進

AKT の基質として知られている GSK-3 の阻害剤や GSK-3 ノックダウンによって STK38 活性は、亢進することを見出した。

4) GSK-3 と STK38 の相互作用

HeLa 細胞株細胞抽出液を用いて、STK38 抗体による免疫沈降を行い、STK38 沈降産物中の GSK-3 の存在を抗 GSK-3 抗体による Western blotting により解析した。その結果、内在性レベルで GSK-3/STK38 の結合が確認された。

5) GSK-3 による STK38 のリン酸化

in vitro GSK-3 assay の結果から、GSK-3 が STK38 をリン酸化することを突き止め、そのリン酸化部位を複数同定 (Ser6/Thr7) した。そしてそれらのリン酸化部位変異体の STK38 活性を解析した結果、これらのリン酸化部位のリン酸化は、STK38 を負に制御するのに必要であることが明らかとなった。さらに酸化ストレスによる STK38 活性化には、これらのリン酸化部位の脱リン酸化を伴うことを作成した抗リン酸化 STK38(phospho S6/T7 STK38)抗体により明らかにした。従って、GSK3 による STK38 のリン酸化は、酸化ストレスによる活性制御に重要な制御部位であることが判明した。

6) STK38 を標的とした放射線増感

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に stk38 shRNA 発現ベクターを導入し、X線照射や過酸化水素処理を行い、コロニー形成法により放射線感受性を検討した。STK38 のノックダウンは、酸化ストレスに対して JNK シグナルの亢進と細胞死の増強を誘発した。一方、アネキン V を指標としたアポトーシスについては、ノックダウンによる増感は見られなかった。よって STK38 ノックダウンによる酸化ストレス誘発細胞死は、アポトーシス以外の細胞

死プロセスが実行されていると推測される。

7) 様々な細胞株を用いて STK38 活性

次に様々なヒト細胞株を用いて STK38 活性 *in vitro* kinase assay により検討した。用いた細胞は、ヒト正常皮膚細胞として Hs27 の他、12 種のヒト癌細胞 (HeLa, MKN45, A431, DLD1, MOLT-4, HepG2, A172, MCF-7, MDA-MB468, SKBR-3, T47D, Lu99) を用いた。その結果、13 種の癌細胞のうち、12 種の細胞株において、STK38 活性が亢進していた。また多くの細胞株において、GSK-3 活性と STK38 活性の間に相関が見られた。これらの結果から、STK38 活性は腫瘍マーカーとして有用性が期待される。

本研究により、多くのヒト癌細胞株は、正常細胞株に比べて高い STK38 活性を示すこと、さらに STK38 を標的とした放射線増感が起こることが明らかとなった。これらのことから、STK38 を標的とした増感は、新たながん治療法の 1 つとしての可能性があり、今後、STK38 を標的とした分子治療薬の開発が待たれる。また GSK-3 による STK38 リン酸化部位を認識する抗リン酸化 STK38 (phospho S6/T7 STK38) 抗体は、STK38 活性を間接的にモニターできる。従って、STK38 のリン酸化を指標とした感受性予測が可能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 8 件)

1) A. Ito, A. Morita, S. Ohya, S. Yamamoto, A. Enomoto, and M. Ikekita. Cycloheximide suppresses radiation-induced apoptosis of MOLT-4 cells with arg72 variant of p53 through transcriptional inhibition of p53 accumulation. J. Radiat. Res. 掲載確定 (印刷中) 査読有.

2) 榎本 敦、宮川 清

酸化ストレスによる STK38 活性化機構、-新規酸化ストレスマーカーとしての可能性 放射線生物研究 45 (2010) 408-416. 査読無

3) N. Sasano, A. Enomoto, Y. Hosoi, Y. Katsumura, Y. Matsumoto, A. Morita, K. Shiraishi, K. Miyagawa, H. Igaki, and K. Nakagawa. Edaravone, a known free radical scavenger, enhances X-ray-induced apoptosis at low concentrations. Cancer lett, 293 (2010) 52-57. 査読有

4) A. Morita, S. Yamamoto, B. Wang, K. Tanaka, N. Suzuki, S. Aoki, A. Ito, T. Nanao, S. Ohya, M. Yoshino, J. Zhu, A. Enomoto, Y.

Matsumoto, O. Funatsu, Y Hosoi, and M. Ikekita. Sodium orthovanadate is a bifunctional inhibitor of transcription-dependent and -independent p53-mediated apoptosis. *Cancer Res*, 70 (2010) 257-265. 査読有

5) 笹野 仲史、榎本 敦、細井 義夫、宮川 清、中川 恵一

エダラボンによる放射線感受性の修飾、放射線生物研究 44 (2009) 106-113. 査読無

6) A. Enomoto, N. Kido, M. Ito, A. Morita, Y. Matsumoto, N. Takamatsu, Y. Hosoi, and K. Miyagawa. Negative regulation of MEKK1/2 signaling by Serine-Threonine Kinase 38 (STK38). *Oncogene*. 27 (2008) 1930-1938. 査読有

7) A. Enomoto and K. Miyagawa. How to cope with DNA damage induced by ionizing radiation and anti-cancer drugs? *Prog. Theor. Phys.* 173 (2008) 109-123. 査読有

8) 榎本 敦、木戸 直樹、細井 義夫、宮川 清

PI-3K 阻害剤 Wortmannin による STK38 の阻害放射線生物研究 43 (2008) 203-209. 査読無

〔学会発表〕(計7件)

1) 榎本 敦、「GSK-3 による STK38 活性制御とその酸化ストレス応答における意義」、第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

2) 榎本 敦、「酸化ストレス応答における STK38 の役割」第 53 回日本放射線影響学会、2010 年 10 月 21 日、京都テルサ(京都府京都市)

3) 榎本 敦、「STK38/NDR1 の制御機構と機能解析」第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

4) 榎本 敦、「STK38 を介したストレスシグナル制御」、第 52 回日本放射線影響学会 2009 年 11 月 13 日、広島市南区文化センター(広島県広島市)

5) 榎本 敦、「Serine-Threonine Kinase 38 (STK38) によるストレスシグナル制御」、第 31 回日本分子生物学会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

6) 榎本 敦、「STK38 による新しいストレスシグナルネットワーク」第 51 回日本放射線影響学会、2008 年 11 月 19 日、北九州国際会議場(福岡県小倉市)

7) 榎本 敦、「STK38 によるストレスシグナル制御」、第 17 回日本アポトーシス研究会、2008 年 8 月 1 日、メルパルク京都(京都府京都市)

〔図書〕(計1件)

福士 政広、大久保 恭仁、加藤 真介、大竹 洋輔、小川 雅之、志村 紀子、榎本 敦、医療科学社、「医用放射化学」2009年、229 項(175-197)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 敦 (ENOMOTO ATSUSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20323602

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし