

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390079

研究課題名(和文) ストレス応答シグナルによる染色体安定性保持機構と癌におけるその破綻

研究課題名(英文) Maintenance of chromosomal stability by stress-responsive signaling systems and its failure in cancer

研究代表者

武川 睦寛 (Takekawa, Musuhiro)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30322332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA損傷等のストレス刺激によって活性化される2つのシグナル伝達経路、即ち、ストレス応答MAPK経路とp53経路が、協調してPLK4の活性を制御しており、ストレス環境下で中心体の複製を停止させて、染色体の安定性を保持する機能を持つことを明らかにした。さらに癌細胞で高率に観察されるMKK4(ストレス応答MAPKK)およびp53の機能欠損変異によって、中心体複製調節機構が破綻し、染色体の倍数体異常が惹起されることを見出した。本研究により、MKK4がストレス環境下でp53と協調して機能し、中心体の過剰複製と染色体不安定性を防御する新たなタイプの癌抑制遺伝子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified that PLK4, a key regulator for centrosome duplication, is directly phosphorylated and activated by SAPKKs. Stress-induced PLK4 activation promotes centrosome duplication, whereas stress-induced SAPK activation prevents it. In the early phase of stress response, the balance of these opposing signals prevents centrosome overduplication. However, in the late phase of stress response, p53 downregulates PLK4 expression, thereby preventing sustained PLK4 activity and centrosome amplification. If both p53 and MKK4 are simultaneously inactivated, persistent PLK4 activity combined with the lack of SAPK-mediated inhibition of centrosome duplication conspire to induce supernumerary centrosomes under stress. Indeed, tumour-derived MKK4 mutants induced centrosome amplification under stress, but only in p53-negative cells. Thus, our results reveal a mechanism that preserves the numeral integrity of centrosomes, and an unexplored tumour-suppressive function of MKK4.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ストレス応答 p38 JNK p53 中心体

1. 研究開始当初の背景

細胞が正常に増殖するには、細胞分裂時に遺伝情報の源である染色体を2つの娘細胞に正確かつ均等に分配する必要がある。細胞が分裂する際に、染色体は、微小管と中心体からなる紡錘体と呼ばれる細胞内装置によって2方向から牽引されることで均等に分配されている。紡錘体内で微小管の重合中心となる中心体は、細胞周期のG1期には1つしか存在しないが、G2期までに複製されて倍加し、M(分裂)期には紡錘体を形成する2つの極として機能することで、娘細胞への染色体の均等分配に本質的な役割を果たしている。従って、中心体を正しく複製し、その数を制御することは、細胞分裂に極めて重要であり、一方、その異常は染色体の異数化や転座の原因となることが明らかにされている。特に癌細胞では、様々なストレス刺激(DNA損傷や酸化など)に応答して中心体の過剰複製が起こることが報告されており、また中心体数の異常が、癌の更なる悪性を招いて、患者の生命予後を悪化させることも示されている。一方、正常な細胞では中心体数は厳密に制御されており、ストレス環境下でも中心体の複製異常は起こらないが、そのメカニズムに関してはこれまでほとんど知見が無い。本研究においては、ストレス環境下で中心体複製を制御する分子メカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス環境下で中心体複製を制御し、染色体の安定性を保持するメカニズムを明らかにすることを目標とし、特に、細胞のストレス応答に重要な2つのシグナル伝達システム、即ち、ストレス応答MAPK(p38/JNK)経路とp53経路が、中心体複製制御に果たす役割を明らかにすべく研究を推進した。また、中心体の制御異常と癌病態との関連についても解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、ストレス応答MAPK経路とp53経路が、中心体複製の鍵分子であるpolo-like kinase 4(PLK4)の活性制御に果たす役割について、遺伝子操作、免疫共沈実験、ウエスタンブロット、アフィニティーゲル電気泳動など、様々な分子生物学的・生化学的手法を用いて解析を実施した。また、蛍光顕微鏡を用いた中心体複製の解析や、FACSを用いたアポトーシスの定量化など、細胞生物学的な手法を駆使して実験を行った。

4. 研究成果

我々はまず、ストレス応答MAPKKKであるMTK1の生理機能の解析を進める過程で、MTK1がDNA損傷などのストレス刺激に応じてPLK4と結合し、細胞内で複合体を形成することを見出した。PLK4は細胞質と中心体の間をシャトルする分子であるが、*in situ* proximity ligation assay法を用いた解析から、PLK4

は主に細胞質でMTK1と結合することがわかった。さらに解析を進めた結果、ストレスによって活性化されたMTK1が、PLK4のT170を直接リン酸化して強く活性化することを見出した。またMTK1以外のストレス応答MAPKKK分子(MEKK1、TAK1、MLK3など)も、同様にPLK4をリン酸化し、活性化することも確認した。以上の結果から、ストレス応答MAPKKK分子は、p38/JNK経路を活性化するのみならず、同時にPLK4をもリン酸化して活性化することが明らかとなった。

次に、ストレス応答MAPKKKによるPLK4の活性化が、細胞のストレス応答の制御にどのような役割を果たしているか検証を行った。PLK4をノックダウンした細胞に各種ストレス刺激を与えて解析を行った結果、MAPKKK依存的なPLK4の活性化が、ストレス誘導アポトーシスを阻害して、細胞死を抑制する作用を持つことを見出した。また、興味深いことに、ストレス刺激が長引くとp53が徐々に活性化してPLK4の発現が抑制され、アポトーシスの阻害が解除されることがわかった。従ってPLK4は、p53が活性化するまでの間、即ち、ストレス応答の初期にのみ作用し、細胞死を抑制する機能を持つことが明らかとなった。

一方、これまでの研究から、PLK4が強く活性化されると中心体の過剰複製が誘発され、その数が異常に増加することが知られている。そこで次に我々は、ストレス応答MAPKKKによるPLK4の活性化が中心体数の異常を惹起するかどうか検討を行った。その結果、予想に反して、ストレスによってPLK4が活性化された場合には、中心体の過剰複製が殆ど起こらないことを見出し、さらにそのメカニズムとして、i) ストレス環境下でPLK4と同時に活性化されるp38/JNKが、中心体の複製を速やかに停止させること、また上述の様にii) p53がPLK4の発現を徐々に低下させて、PLK4の過剰な活性化を防いでいることを明らかにした。即ち、ストレス環境下でp38/JNKとp53が協調して作用し、中心体の過剰複製を防いでいることが明らかとなった。

興味深いことに、癌細胞ではMKK4(p38/JNK経路のMAPKK)およびp53の遺伝子変異が高頻度に認められ、さらに両者の変異が同時に起こる場合が多いことが知られている。この様な癌細胞ではp38/JNKとp53の活性化が共に阻害されており、中心体の複製制御機構が破綻している可能性が示唆される。そこで、この可能性を検証するため、ヒト培養細胞に癌患者由来の変異型MKK4、およびp53を失活させる癌ウイルス蛋白質(パピローマウイルスE6)を導入して、癌細胞と同様の状況を作り出したところ、DNA損傷などのストレス刺激に応じて中心体の過剰複製とそれに伴う染色体の異数化が誘導されることが確認された。

これまで、MKK4は様々な癌で機能欠損変異が認められることから、癌抑制遺伝子として機能すると考えられてきたが、その発癌抑制

メカニズムは不明であった。本研究により、癌細胞における MKK4 の機能喪失が、ストレス刺激後の p38/JNK 経路と PLK4 活性化のバランスを破綻させて、中心体の過剰複製および染色体異常を惹起し、発癌に寄与することが明らかになった。即ち、MKK4 はストレス環境下で p53 と協調して機能し、中心体の過剰複製と染色体不安定性を防ぐ新たなタイプの癌抑制遺伝子であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

① Ichikawa K, Kubota Y, Nakamura T, Weng JS, Tomida T, Saito H and Takekawa M. MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-mesenchymal transition by regulating the co-repressor CtBP. *Molecular Cell* 58: 35-46 (2015) 査読有

② Ohshima D, Matsuzaki-Arimoto K, Tomida T, Takekawa M and Ichikawa K. Spatio-temporal dynamics and mechanisms of stress granule assembly. *PLoS Comp. Biol.*, in press 査読有

③ Sato Y, Goto E, Shibata Y, Kubota Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Inoue J, Takekawa M, Tokunaga F, Fukai S. Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 22: 222-229 (2015) 査読有

④ 武川睦寛 ストレス応答 MAPK 経路および p53 による中心体複製の制御 生化学 86 巻 666-670 (2014). 査読有

⑤ 松崎(有本)京子, 武川睦寛, 斎藤春雄 細胞質内ストレス顆粒の形成と細胞生存への寄与 放射線生物学 49 巻 3 号 248-262 (2014). 査読無

⑥ Nakamura T, Saito H and Takekawa M. SAPK pathways and p53 cooperatively regulate PLK4 activity and centrosome integrity under stress. *Nature Commun.* 4:1775 doi: 10.1038/ncomms2752 (2013). 査読有

⑦ 久保田祐二, 武川睦寛 p38 とそのカスケード Clinical Neuroscience 特集「神経系の MAP キナーゼ」31 巻 657-660 (2013). 査読無

⑧ 久保田祐二, 武川睦寛 Ras/MAPK 症候群および孤発性癌で認められる MEK 遺伝子変異体の異常活性化機構と疾患発症メカニズムの解明生物物理化学 57 巻 s21(2013). 査読無

⑨ Tomida, T., Oda, S., Takekawa, M., Iino, Y., Saito, H. The temporal pattern of stimulation

determines the extent and duration of MAPK activation in a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Science Signaling*. 5: ra76 (2012). 査読有

⑩ 中村貴紀, 武川睦寛 JNK/p38-AP1 経路とストレス反応系 日本臨床増刊号「分子標的薬: がんから他疾患までの治療をめざして」70 巻 218-224 (2012). 査読無

⑪ 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* 38, 14-17 (2012). 査読無

〔学会発表〕(計 46 件)

① Takekawa, M. MCRIP1, a novel ERK substrate, mediates ERK-induced epigenetic gene silencing during epithelial-to-mesenchymal transition. 2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Tokyo, Japan, Jan. 23-24, (2015).

② 武川睦寛 癌および Ras/MAPK 症候群における MEK 変異体の異常活性化機構と抗癌剤抵抗性 第 37 回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、横浜、11月25-27日、2014年

③ Takekawa, M. MCRIP1, a novel ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-to-mesenchymal transition. 第 73 回日本癌学会総会(ワークショップ). Yokohama, Japan, Sep. 25-27, (2014).

④ 武川睦寛 癌および Ras/MAPK 症候群における MEK 変異体の異常活性化機構と抗がん剤抵抗性 日本薬学会 134 年会(シンポジウム)、熊本、3月27-30日、2014年

⑤ 武川睦寛 ストレス応答 MAP キナーゼ経路の制御機構と疾患におけるその破綻「ストレス応答制御に基づく次世代型健康寿命化学の研究拠点形成」シンポジウム、東京、3月15日、2014年

⑥ Takekawa, M. MCRIP1, a novel substrate of ERK, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-to-mesenchymal transition. The 20th East Asia Symposium. Tokyo, Japan, Nov. 6-8, (2013).

⑦ 武川睦寛 新規 ERK 基質分子 MCRIP1 による上皮間葉転換の制御 第 86 回日本生化学会大会(シンポジウム)、横浜、9月10-12日、2013年

⑧ 武川睦寛 新規 ERK 基質分子 MCRIP1 による ERK 依存的ジーンサイレンシングと上皮間葉転換の制御 第 69 回日本細胞生物学会大会(シンポジウム)、名古屋、6月19-21日、2013年

⑨ Takekawa, M. Regulation of human MAPK pathways and its failure in cancer. 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Tokyo, Japan, Feb. 1-2, (2013).

⑩ 武川睦寛 MAPキナーゼシグナルによる細胞運命決定機構と癌におけるその破綻、第67回病態生化学セミナー、島根、11月30日、2012年

⑪ Takekawa, M. A novel role of the stress-responsive MAPK pathways in preventing centrosome amplification and its failure in cancer. 第71回日本癌学会学術総会 (Symposium), Sapporo, Sep. 19-21, (2012).

⑫ 武川睦寛 MAPキナーゼ情報伝達経路による細胞運命決定機構と癌におけるその破綻、第5回Symphony、東京、9月1-2日、2012年

⑬ 武川睦寛 MAPキナーゼ・シグナル伝達システムの活性制御機構と癌におけるその破綻 第63回日本電気泳動学会総会 (シンポジウム)、那覇、8月21日、2012年

⑭ Takekawa, M. Regulation of cell-fate decisions by MAPK signaling pathways and its failure in cancer. Nagoya University GCOE program: Cancer science seminar. Nagoya, Japan, Jul. 10 (2012).

⑮ Takekawa, M. Regulation of cell-fate decisions by MAP kinase signaling pathways and its failure in cancer. 39th IMSUT Founding Commemorative Symposium. Tokyo, Japan, Jun. 1 (2012).

〔図書〕 (計 3 件)

① Takekawa M., and Kubota Y. Mitogen-activated protein kinase signaling and cancer. “*Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling*” (Springer), (2015) in press

② Ohshima D, Arimoto-Matsuzaki K, Tomida T, Takekawa M., and Ichikawa K. Stochastic Simulation of Stress Granules. “*Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling*” (Springer), (2015) in press

③ 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 30, 72-79 (2012).

〔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.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSM/Top.html>

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・教授

研究者番号 : 30322332

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者