

論文内容の要旨

論文題目

Regulation of the stress responsive p38/JNK MAPK pathways

by formation of cytoplasmic stress granules

(細胞質内ストレス顆粒形成によるストレス応答 MAPK 経路の制御)

氏名 有本 京子

細胞は外界からの様々なストレス刺激に応答して、細胞損傷を防御し、生存を図るストレス適応機構を持つ一方で、積極的に細胞死（アポトーシス）を誘導するシグナル伝達システムをも兼ね備えている。これらの相反する応答を、刺激の種類、持続時間や強弱に応じて細胞レベルで適切に使い分けることで、最終的に個体としての恒常性が維持されている。前者の代表的な機構として、細胞質内ストレス顆粒の形成による翻訳抑制が知られており、また後者の代表として、ストレス応答 MAPK 経路が知られている。

細胞は、ヒ素や低酸素などの特定の刺激に曝されると、細胞質内に一過性にストレス顆粒と呼ばれる構造体を形成する。この時、ハウスキーピング遺伝子などをコードする多くの mRNA や、RNA 結合タンパク質がストレス顆粒内へと取り込まれ、mRNA の翻訳が一時的に停止する。細胞は、ストレス顆粒の形成による一時的な翻訳制御により、異常タンパク質の蓄積を防ぎ、更なる細胞損傷を防御している。一方、ストレス応答 MAPK 経路は、環境ストレス刺激や、サイトカインによって活性化され、アポトーシスや細胞周期の制御に中心的な役割を果たしている。ストレス応答 MAPK 経路は、細胞外シグナルを核内へと的確に伝達する役割を担い、その中心となる部分は MAPKKK, MAPKK, MAPK と呼ばれる 3 郡のプロテインキナーゼから構成されている。細胞外からのシグナルは、MAPKKK から MAPKK, MAPK へと至る連続したリン酸化反応を経て核内へと伝達される。

細胞質内ストレス顆粒の形成と、ストレス応答 MAPK 経路は、共に重要なストレス応答機構であるが、両者の機能的関連は明らかにされていない。

MTK1 はストレス応答 MAPK 経路の主要なヒト MAPKKK であり、その活性化因子として GADD45 関連分子が同定されている。これまでの研究により、MTK1 は刺激依存的に発現誘導される GADD45 関連分子が結合することにより、活性化に至ることが明らかにされている。本研究では、MTK1 活性制御機構の解析を行い、MTK1 の新規結合因子として RACK1 を同定した。更に、RACK1 機能解析の結果、RACK1 を介したストレス顆粒とストレス応答 MAPK 経路との相互作用の存在が明らかになった。

はじめに、細胞内で MTK1 と相互作用するタンパク質を質量分析の手法を用いて同定した。その結果、MTK1 の新規結合因子として、RACK1 タンパク質が同定された。RACK1 は7つの WD40 ドメインから構成される scaffold タンパク質である。共沈実験の結果から、RACK1 はストレス応答経路の他の MAPKKK (ASK1 や TAK1) とは結合しないことがわかった。更に、MAPKK (MEK1, MKK3, MKK6, MKK4, MKK7) や MAPK (p38, JNK, ERK) との結合も観察されなかったことから、RACK1 は MTK1 に特異的な結合因子であると考えられる。MTK1 の系統的な欠失変異体を作製し、RACK1 結合領域のマッピングを行った結果、RACK1 は MTK1 のアミノ酸 22-371 番目の領域に結合することが明らかになった。この領域は MTK1 活性化因子である GADD45 の結合領域、及び MTK1 自己抑制領域を含み、MTK1 の活性化に重要な領域である。従って、RACK1 もまた、MTK1 の活性制御に関与する可能性が示唆された。

RACK1 の機能を明らかにするため、shRNAi を用いて RACK1 をノックダウンした結果、GADD45 分子、或はストレス刺激依存的な MTK1 の活性化が顕著に抑制された。このことから、RACK1 は MTK1 活性を positive に制御する機能を持つと考えられる。一方、GADD45 の場合と異なり、RACK1 の過剰発現だけでは、MTK1 の活性化は誘導されなかった。従って、RACK1 は MTK1 の活性化に必須ではあるものの、RACK1 単独では MTK1 の活性化には不十分であると考えられる。

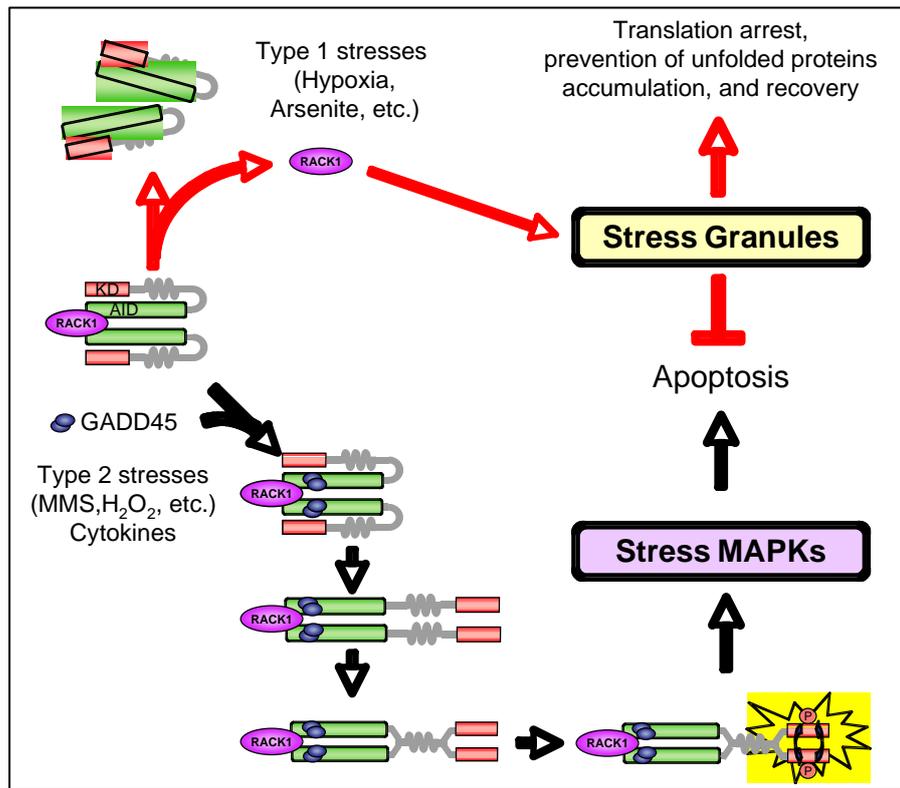
そこで、RACK1 による MTK1 の活性制御機構の解明を試みた。これまでの研究から、MTK1 は定常状態では N 末端と C 末端との間の抑制的相互作用により不活性化状態に保たれていることがわかっている。刺激依存的に発現誘導される GADD45 分子が MTK1 に結合すると、MTK1 の N-C 相互作用は解除され、その結果 coiled-coil ドメインが露出する。MTK1 は coiled-coil ドメインを介して二量体化し、二分子間でトランスにリン酸化が入ることにより活性化に至る。そこで、1) N-C 相互作用の解除、及び 2) MTK1 二量体化、の二つの活性

化ステップに着目し、RACK1の関与を検証した。その結果、RACK1はMTK1のN-C相互作用は解除しないが、MTK1を二量体化する機能を持つことがわかった。以上のことから、RACK1は定常状態でMTK1を不活性状態のまま二量体化させ、刺激依存的なMTK1の活性化を促進する、活性化エンハンサーとして機能することが明らかになった（図参照）。

次に、MTK1及びRACK1の細胞内局在を観察した結果、非刺激時にはRACK1はMTK1と共に細胞質に彌漫性に共局在することが確認された。一方、細胞に様々なストレス刺激を加えたところ、ヒ素等の特定の刺激に応答してRACK1がMTK1から解離し、細胞質内で顆粒状に局在変化することを見出した。これまでに、細胞をヒ素で刺激すると、ストレス顆粒が形成されるとの報告がある。そこで、ストレス顆粒マーカーとして知られるeIF4Gと内在性RACK1との共染色を行った。その結果、RACK1はヒ素刺激に応答してストレス顆粒へ取り込まれることが明らかになった。タプシガルギンやeIF2 α のリン酸化により細胞にストレス顆粒を形成させた場合にも同様に、RACK1は細胞質からストレス顆粒内へ集積した。従ってRACK1が、新たなストレス顆粒構成分子であることが明らかとなった。

上述の様に、RACK1はMTK1の活性化エンハンサーとして機能しており、RNAiによるRACK1の発現抑制はMTK1の活性化を阻害する。RACK1のストレス顆粒への集積もまた、細胞質でのRACK1の枯渇を意味することから、ストレス顆粒形成がMTK1の活性化に影響を与える可能性が強く示唆される。これまでに、ストレス顆粒構成分子であるG3BPを細胞に過剰発現させると、外部刺激を加えること無くストレス顆粒が形成されることが知られている。そこで、G3BPを用いて強制的にストレス顆粒を形成させ、RACK1のストレス顆粒への集積がMTK1の活性化にどのような影響を与えるか検証を行った。まず、細胞にG3BPを導入すると、巨大なストレス顆粒の形成が観察され、この時、MTK1はストレス顆粒へは取り込まれず、RACK1のみが顆粒へ取り込まれることを確認した。この状況で、細胞にGADD45 β を導入したところ、ストレス顆粒を形成させた細胞では、MTK1の活性化が顕著に抑制されることがわかった。GADD45によるMTK1の活性化は、細胞にアポトーシスを誘導することから、次にストレス顆粒の形成がMTK1依存的アポトーシス誘導に与える影響を調べた。HeLa細胞にGADD45 β を導入し、48時間培養すると、細胞の多くがアポトーシスに特徴的な形態変化を示した。この時、細胞にG3BPを共導入してストレス顆粒を形成させると、アポトーシスが顕著に阻害されることがわかった。以上の結果から、ストレス顆粒はRACK1を取り込むことによって、MTK1の活性化を抑制し、その結果MTK1依存的なアポトーシスを阻害することがわかった（図参照）。

固形癌の内部では、腫瘍血管の還流不全により、低酸素環境に曝される領域が必ず存在する。そのような領域内の細胞は、抗がん剤抵抗性を示すことから、腫瘍内部の低酸素環境が癌治療の大きな障害となっている。ストレス顆粒は、低酸素環境下で



も形成されることが報告されており、また、MTK1は抗がん剤によっても活性化されてアポトーシス誘導に寄与することから、低酸素環境下での抗がん剤抵抗性に、ストレス顆粒形成による MTK1 の活性阻害が関与しているのではないかと考えた。そこで、細胞を 0.5% 酸素濃度条件下で培養した結果、ストレス顆粒の形成が確認された。この時、抗がん剤 etoposide によるストレス応答 MAPK p38/JNK の活性化が顕著に抑制され、同時に caspase-3 の切断も抑制された。ストレス顆粒に取り込まれない RACK1 変異体である RACK1(DE) を細胞に導入すると、p38/JNK の活性化が回復することから、RACK1 がストレス顆粒に取り込まれることにより、ストレス応答 MAPK 経路の活性化が阻害されたと考えられる。更にこの機構が、低酸素環境下での細胞の抗がん剤抵抗性に関与することが示唆された。

本研究により、MTK1 の新規結合因子として同定された RACK1 は、MTK1 を定常状態で二量体化し、MTK1 の活性化エンハンサーとして機能することが明らかになった。また、細胞がストレス顆粒の形成を促すような特定の刺激に曝された場合には、RACK1 は MTK1 から解離してストレス顆粒内へ取り込まれ、その結果 MTK1-p38/JNK 経路の活性化が抑制されることが示された。更に、RACK1 を介したストレス顆粒とストレス応答 MAPK 経路の相互作用が、低酸素環境下での癌細胞の抗がん剤抵抗性に寄与する可能性が示唆された。