

だに「層形成のドラマ」の全体像を描き出すまでには至っていない。しかしながらその成果は、今後追究すべきターゲットを浮き彫りにし、具体化することに大きく貢献した。今後はその中で特にブレイクスルーになりうる重要な問題がどれかを見極め、「ドラマ」の本質を明らかにしていくことが求められる。斬新な発想を持つ多くの若い頭脳が、この分野に参入してくれることを願っている。

最後に、本稿では引用文件数の制限のため多くの重要な文献を引用できなかつたことをお詫びしたい。

- 1) Valiente, M. & Marin, O. (2010) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **20**, 68–78.
- 2) 仲嶋一範 (2009) ブレインサイエンス・レビュー 2009 (伊藤, 川合編), pp. 207–232, クバプロ, 東京.
- 3) Nakajima, K. (2007) *Neurochem. Int.*, **51**, 121–131.
- 4) D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., & Curran, T. (1995) *Nature*, **374**, 719–723.
- 5) Honda, T., Kobayashi, K., Mikoshiba, K., & Nakajima, K. (2011) *Neurochem Res.*, in press.
- 6) Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A., & Anton, E.S. (2000) *Neuron*, **27**, 33–44.
- 7) Magdaleno, S.M. & Curran, T. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, R1032–1035.
- 8) Sanada, K., Gupta, A., & Tsai, L.H. (2004) *Neuron*, **42**, 197–211.
- 9) Belvindrah, R., Graus-Porta, D., Goebbels, S., Nave, K.A., & Muller, U. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 13854–13865.
- 10) Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C., & Muller, U. (2001) *Neuron*, **31**, 367–379.
- 11) Magdaleno, S., Keshvara, L., & Curran, T. (2002) *Neuron*, **33**, 573–586.
- 12) Meyer, G., Cabrera Socorro, A., Perez Garcia, C.G., Martinez Millan, L., Walker, N., & Caput, D. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 9878–9887.
- 13) Yoshida, M., Assimacopoulos, S., Jones, K.R., & Grove, E.A. (2006) *Development*, **133**, 537–545.
- 14) Tabata, H. & Nakajima, K. (2001) *Neuroscience*, **103**, 865–872.
- 15) Kubo, K., Honda, T., Tomita, K., Sekine, K., Ishii, K., Uto, A., Kobayashi, K., Tabata, H., & Nakajima, K. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 10953–10966.

仲嶋 一範

(慶應義塾大学医学部解剖学教室)

What does Reelin control to regulate neuronal layer formation in the developing cerebral cortex ?

Kazunori Nakajima (Department of Anatomy, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan)

MAP キナーゼのサブタイプ特異的シグナルクロストークによるがん抑制性ケモカイン CXCL14/BRAK の発現制御

1. はじめに

日本において国民の1/2ががんに罹患し、1/3ががんで死亡する。その治療にかかる費用も年間3兆円を超えるようになってきた。現在のがん治療薬の主流はがんにおいて発現が上昇する、あるいは活性化が起こる分子を標的とし、その分子の活性を阻害する分子、あるいは阻害抗体を用いて標的分子を阻害する分子標的治療が主流である。しかし、がんで活性が上昇する分子も正常細胞の生理機能発現に重要な分子である場合が多く、その分子の活性阻害により強い副作用を示す場合が多い。我々は正常細胞が種々のがん増殖抑制分子を合成しているためにがんの発生、増殖が抑えられており、その分子の発現低下、あるいは活性の低下によりがんが進行する可能性を考え、がんの増殖過程で発現が低下する分子を探索し、*in vivo* でがん抑制作用を示すケモカイン CXCL14/BRAK を見いだした。この分子は殆どすべての正常細胞によって合成されており、その発現制御機構の解析から MAP キナーゼのサブタイプ特異的クロストークによって発現が制御されていることが明らかになった。

2. CXCL14/BRAK はがん抑制性のケモカインである

がんは種々の段階を経て徐々に進展・悪性化し、かつ、各段階はがん進展促進因子とがん抑制分子との活性のバランスによって進行すると考えられている。

頭頸部がんを含む多くのがんで上皮増殖因子 (EGF) 受容体 (EGFR) の異常な活性化が観察されるので、がん抑制分子を見いだすことを目的として無血清培養下で EGF 処理により発現の低下する分子を DNA チップ法と RT-PCR 法でスクリーニングし、顕著に低下する分子として、白血球の遊走を促進するケモカイン (chemotactic cytokine) の一種である CXCL14 を見いだした¹⁾。この分子は 1999 年に細胞のトランスフォーメーションやがん化で低下する分子として報告され、Breast And Kidney で発現が高いことから BRAK などと呼ばれたが²⁾、現在は分子の N 末端領域に二つのシステインを含む CXC 配列を持つことから統一名として CXC 型ケモカインの 14 番目のリガンド

(CXCL14) と命名されている³⁾。ここでは以下 CXCL14/BRAK を使用する。この分子はヒトの頭頸部がんでも低下していることが報告されているので、正常細胞で合成されているがん抑制分子の可能性が示唆された。実際に舌がん細胞に CXCL14/BRAK 分子を強制発現させると *in vitro* の培養系では親細胞と増殖速度に差は見られない。しかし、T 細胞機能を欠損するヌードマウス¹⁾あるいは T 細胞、B 細胞機能をともに欠損する SCID マウス⁴⁾に移植すると 1 ヶ月後には親細胞の腫瘍は増殖するのに対して、CXCL14/BRAK 発現細胞の腫瘍は縮小あるいは消滅した

ので、この分子は生体内で腫瘍抑制分子として機能していると考えられる。

3. CXCL14/BRAK の EGF による発現制御

CXCL14/BRAK 遺伝子の発現は細胞の EGF 処理により低下するので CXCL14/BRAK の発現に関与する細胞内シグナルを検索した⁵⁾。舌がん由来の HSC-3 細胞を通常の血清を含む培地で培養すると CXCL14/BRAK の発現は非常に低いが、無血清下で培養すると CXCL14/BRAK タンパク質の顕著な発現が検出できる。EGF を添加すると

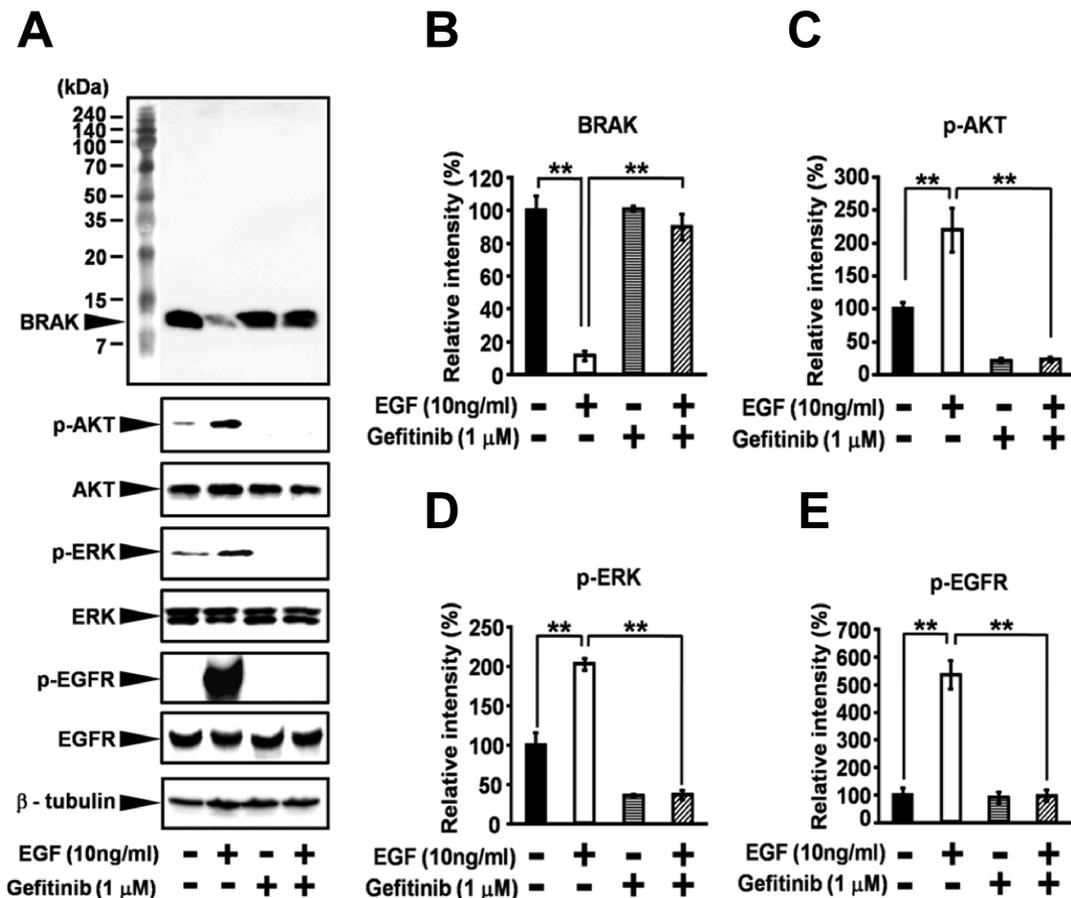


図1 上皮増殖因子(EGF)はEGF受容体(EGFR)とMAPキナーゼのERKを活性化してCXCL14/BRAKの発現を低下させる

(A) EGFとGefitinib(EGFR阻害薬)によるCXCL14/BRAKとシグナル分子に対する各種抗体を用いたウェスタンブロット法による検出。

(B), (C), (D), (E) はそれぞれCXCL14/BRAK, 活性型AKT(プロテインキナーゼB, pAKT), 活性型ERK(pERK), および活性型EGFR(pEGFR)タンパク質の相対発現量を示す。* $P < 0.001$ 細胞をEGFで処理するとEGFRおよび、ERKの活性化が起こり、BRAKタンパク質の発現量は低下する。Gefitinibを添加するとEGFRおよび、ERKの活性化は阻害され、同時にBRAKタンパク質の発現量はもとにもどる。これらの結果からEGFはEGFR, ついでERKの活性化を介してBRAKタンパク質の発現量を低下させていることが判明した。詳細は本文参照。

CXCL14/BRAK の発現は低下するが、同時に EGFR のリン酸化（活性化）とともに ERK MAP キナーゼのリン酸化が促進される（図 1A, B, D）。EGFR の活性化阻害薬である Gefitinib（商品名：イレッサ）を添加すると EGF の有無にかかわらず EGFR と ERK のリン酸化が阻害され、CXCL14/BRAK の発現が回復する（図 1A, B, D, E）。EGF 処理により、AKT のリン酸化も促進されるが（図 1A, C）、AKT の活性化に参与する PI3 キナーゼの阻害薬（LY24002）の共存によって AKT のリン酸化を阻害しても CXCL14/BRAK の発現は回復しなかったので AKT の経路は CXCL14/BRAK の発現に直接は参与しないと考えられる⁵⁾。

一方、ERK1/2 の活性化に参与する MEK1/2 の阻害薬（PD98059, U0126）あるいは ERK1/2 の阻害薬（FR180204）を添加すると ERK1/2 の活性化阻害とともに濃度依存的に CXCL14/BRAK の発現が回復した。これらの結果から EGF は EGFR, MEK1/2, ERK1/2 遺伝子の活性化を介して CXCL14/BRAK 遺伝子の発現を抑制すると考えられた⁵⁾。

4. CXCL14/BRAK の遺伝子構造とその発現制御

CXCL14/BRAK 遺伝子はヒト染色体 5q31 領域に、マウスでは染色体 13 に存在し、ともに四つのエキソンから構成されている。CXCL14/BRAK の発現低下とがん化には密接な関係があると考えられるが、発現制御のメカニズムは解明されていない。そこで CXCL14/BRAK 遺伝子発現に関わるプロモーター領域の解析を行った。まず CXCL14/BRAK の転写開始点を確定するために、CXCL14/BRAK の発現が確認されたヒト舌由来口腔扁平上皮がん細胞株である HSC-3 細胞などを用いて 5'RACE 法による解析を行った。その結果、これまでに報告のあった 2 種類の転写開始点のうち、上流の転写開始点²⁾は確認できず、+284 下流に存在する転写開始点と一致した⁶⁾。次にルシフェラーゼをレポーター遺伝子とするベクター（pGL4.10）に遺伝子の発現を制御するプロモーター領域と考えられる転写開始点の上流の配列を導入し、プロモーターの解析を行った。これらの結果からこれまでに報告のあった二つの転写開始点の間にプロモーター活性があることが明らかになった。この領域にはプロモーターとなり得る典型的な TATA 配列は存在しなかったが、TATTAA 配列（TATA-like sequence）が 1 箇所、転写因子結合配列である GCbox が 4 箇所、AP1 結合配列が 1 箇所存在したため、これらの配列を除いた欠損ベクター、あるいは配列に変異をかけた

変異ベクターを作成した。これらのベクターを導入した HSC-3 細胞のルシフェラーゼ活性を解析した結果、TATTAA 配列はプロモーター、AP1 結合配列と 3 番目と 4 番目の GCbox がエンハンサーであると考えられた。エンハンサーとして働く転写因子である AP1 はプロテインセリン/トレオニンホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸によって活性化することが知られていることから、オカダ酸で細胞を処理したところ、野生型の配列では転写活性の上昇が認められたが、AP1 結合配列の変異ベクターでは転写活性の上昇が認められなかった。これらの結果より、オカダ酸は活性型 MEK3 の脱リン酸化酵素の阻害により MEK3 の活性化状態を維持し、さらに、p38 δ の活性化を介して AP-1 を活性化し、最終的に CXCL14/BRAK 遺伝子の転写活性を上昇させることが考えられた⁶⁾。しかし、このレポーター遺伝子コンストラクトあるいは CXCL14/BRAK 遺伝子の上流 3.5 kb の配列を含むコンストラクトの発現は EGF によって影響を受けなかった。この結果は ERK1/2 が CXCL14/BRAK 遺伝子の本実験で用いたレポーターの領域外を標的としている、あるいは間接的に CXCL14/BRAK 遺伝子の発現を制御している可能性を示している。

5. CXCL14/BRAK 遺伝子の MAP キナーゼのサブタイプ特異的クロストークによる発現制御

種々の細胞外ストレスは MAP キナーゼの p38、あるいは JNK によって制御されていることが報告されている。HSC-3 細胞を紫外線（UV）で照射すると 10 分後から一時的に p38 の活性化が起これり、30 分後には CXCL14/BRAK 遺伝子発現上昇が観察された（図 2Aa, Ac）。興味深いことに p38 の活性化パターンと鏡像の関係で ERK の不活性化が観察された（図 2Ab）⁷⁾。このデータは CXCL14/BRAK 遺伝子発現上昇に p38 の活性化が関与していることを示唆したが、p38 の活性化阻害剤である SB203580 の共存によっても CXCL14/BRAK 遺伝子の上昇は阻害されなかった。p38 には α , β , γ , δ の 4 種のサブタイプが存在し、SB203580 はそのうちの α , β を阻害することが報告されている。UV 照射による CXCL14/BRAK 遺伝子の発現上昇に関与する 4 種のサブタイプの関与を調べるためにそれぞれのサブタイプを特異的に阻害する short hairpin (Sh-) RNA あるいは対照としてスクランブル配列の Sh-RNA を細胞に導入後 UV 照射し、CXCL14/BRAK 遺伝子の発現を調べた。その結果、Sh-p38 δ で細胞を前処理したときのみ CXCL14/BRAK 遺伝子の発現上昇が阻害され

た⁷⁾。以上の結果から細胞を UV 照射すると p38 δ が活性化され、ついで *CXCL14/BRAK* 遺伝子の発現が促進されると考えられた。p38 の活性化と ERK の不活性化の関係を調べるために、緑色の蛍光を発するクサビラグリーンベクター (mKG) を用いて調べた。mKG を二つに分断し、その N 末端領域と C 末端領域に相互作用すると考えられる二つのタンパク質をそれぞれ結合させ、細胞内で発現させると、両者が実際に結合したときのみ mKG タンパク質が再構成されて緑色の蛍光を発する。細胞に種々の MAP キナーゼのサブタイプを結合したベクターを導入し、細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、それらを単独に発現させた時は蛍光が検出できなかったが p38 δ と ERK1 あるいは ERK2 とを同時に発現させた時のみに蛍光が観察された (図 2B)。この結果から p38 δ と ERK1 あるいは ERK2 が細胞内で結合していることが示された。さらに細胞に p38 δ に対する Sh-RNA を導入すると ERK のリン酸化が促進された (図 2C)。これらの結果から UV 照射により p38 δ は活性化されると下流にシグナルを伝えるとともに ERK1/2 MAP キナーゼに結合して ERK の活性化を阻害し、結果として *CXCL14/BRAK* 遺伝子の発現が促進する MAP キナーゼサブタイプ特異的クロストークによって制御されていると考えられた⁷⁾。他方、この細胞を無血清で培養すると *CXCL14/BRAK* 遺伝子の発現は促進されたが、この促進は p38 α , β の活性化阻害薬である SB203580 により阻害されることから、細胞は細胞外の異なったストレスに対しては p38 の異なったサブタイプを用いて応答していると考えられる⁷⁾ (図 3)。また、頭頸部がん細胞を、OH ラジカルで処理すると、OH ラジカルは細胞膜を通過して EGFR を活性化し、*CXCL14/BRAK* 遺伝子の発現を阻害することが明らかにされた⁸⁾ (図 3)。また、ERK は MAP キナーゼを不活性化する MAP キナーゼホスファターゼ (MKP) を活性化して MAP キナーゼを不活性化する経路も存在する。これらの結果は *CXCL14/BRAK* 遺伝子の発現が種々の MAP キナーゼのシグナル特異的サブタイプおよびそのクロストークによって制御されていることを示している (図 3)。

6. 多彩な機能を示す *CXCL14/BRAK* 研究の今後

我々は扁平上皮がんが多くを占める頭頸部がん (口腔がん) で発現が低下するがん抑制因子として *CXCL14/BRAK* を見いだしたが、前立腺がん⁹⁾、乳がん¹⁰⁾などの腺がんでは発現の上昇が報告されている。これらの結果はがんの由来による機能の違いを示している可能性があるが、他方が

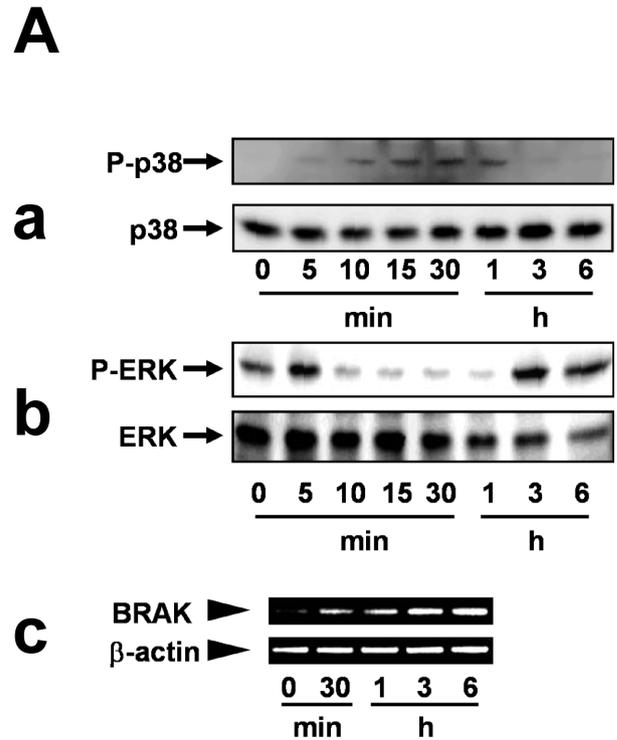
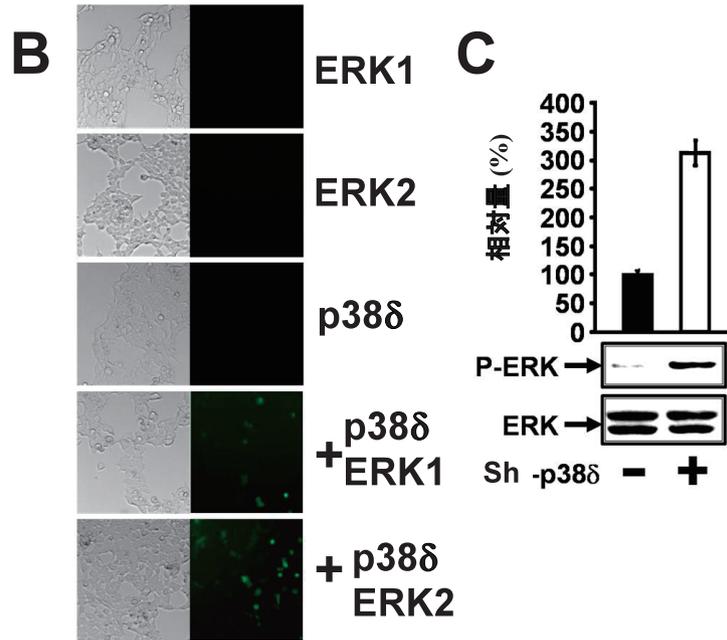


図 2 *CXCL14/BRAK* 遺伝子の発現における MAP キナーゼの役割

(A) UV 照射ストレスにより (a) p38 は活性化されると同時に、(b) ERK は不活性化され、(c) *CXCL14/BRAK* の発現は促進される。これらの結果から、細胞の UV 照射により p38 の活性化 (リン酸化) により ERK は不活性化し、この条件で BRAK mRNA 量は増加する。

んで発現が上昇するのは合成された分子が機能不全のためである可能性もある。実際に前立腺がんでもがん細胞に *CXCL14/BRAK* を強制発現するとがんの増殖は遅くなる⁹⁾。また、血中の *CXCL14/BRAK* レベルが野生型マウス (1 ng/mL) の 10 倍発現するトランスジェニックマウス (Tg) はルイス肺がん細胞や黒色腫細胞の増殖を抑制することから、*CXCL14/BRAK* は線がんを含む多くのがんに対して抑制作用を示すことが期待される¹¹⁾。この Tg は 2 年を経過しても異常を示さず、また、健康人の中には Tg と同じレベルの *CXCL14/BRAK* を発現しているヒトも存在する¹²⁾ ことから、この分子を高発現しても大きな副作用を示さないと考えられる。それゆえ *CXCL14/BRAK* は副作用のないがん治療の分子標的として有望であろう。

CXCL14/BRAK は種々の細胞によって合成されており、白血球への作用以外にも、血管新生阻害^{11,13)}、糖代謝における作用¹⁴⁾など多彩な機能が報告されている。*CXCL14/BRAK* の発現は脳で一番高く、実際に脳の神経細胞にも



(B) クサビラベクターを結合した MAP キナーゼサブタイプの相互作用の蛍光による検出. p38δ, ERK1 または ERK2 の発現ベクターの単独の導入では蛍光は検出されないが, p38δ と ERK1 または ERK2 との共存の時のみ緑色の蛍光が検出され, 両者の結合が観察された.

(C) p38δ に対する Sh-RNA の導入は ERK MAP キナーゼの活性化を促進する. 縦軸は Sh-p38δ 導入前の ERK の値を 100% とした相対量で示した. これらの結果から, p38δ と ERK は相互作用により活性を制御していることが示された.

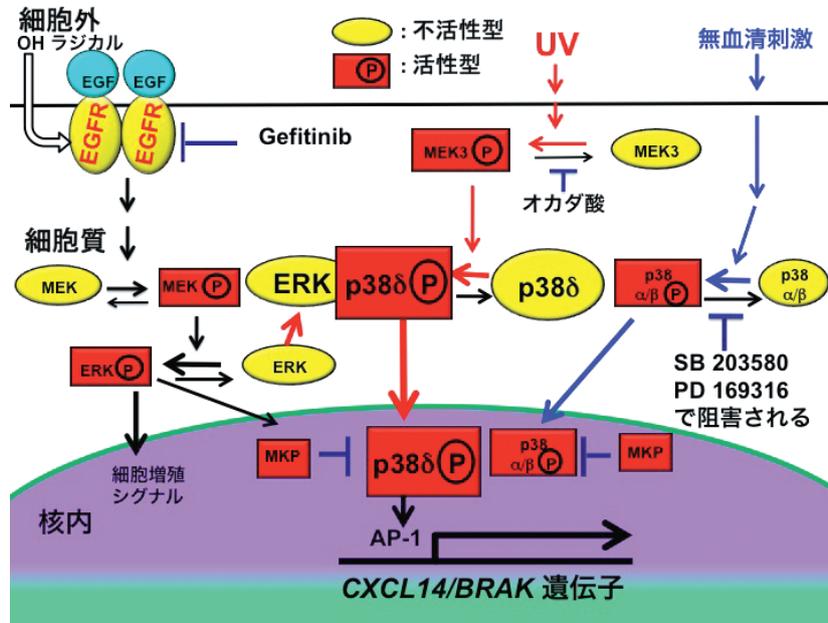


図3 MAP キナーゼサブタイプのシグナルクロストークによる CXCL14/BRAK 遺伝子の発現制御

MKP: MAP キナーゼホスファターゼ, その他の分子については本文を参照.

矢印は活性化シグナルを示す. 赤矢印は UV 刺激によるシグナル伝達経路を示し, 青矢印は無血清刺激によるシグナル伝達経路を示す. ⊥ は阻害を示す.

発見している¹⁵⁾。CXCL14/BRAKの分子機能を明らかにすることにより、これまでの単に白血球の走化性を制御するというケモカインの機能の概念を変える展開が期待される。

謝辞

本研究の遂行に際して協力していただいた小澤重幸博士(現神奈川歯科大学顎顔面外科学講座助教)、加藤靖正博士(現奥羽大学歯学部口腔機能分子生物学講座教授)をはじめ共同研究者の方々に感謝する。また、本ミニレビューで引用した研究は文部科学省ハイテクリサーチセンタープロジェクトおよび科学研究費補助金によって行われた。

- Ozawa, S., Kato, Y., Komori, R., Maehata, Y., Kubota, E., & Hata, R. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348, 406-412.
- Hromas, R., Broxmeyer, H.E., Kim, C., Nakshatri, H., Christopherson II, K., Azam, M., & Hou, Y-H. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 703-706.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., & Nomiyama, H. (2006) *Genome Biol.*, 7, 243.
- Ozawa, S., Kato, Y., Kubota, E., & Hata, R. (2009) *Biomed. Res.*, 30, 315-318.
- Ozawa, S., Kato, Y., Ito, S., Komori, R., Shiiki, N., Tsukinoki, K., Ozono, S., Maehata, Y., Taguchi, T., Imagawa-Ishiguro, Y., Tsukuda, M., Kubota, E., & Hata, R. (2009) *Cancer Sci.*, 100, 2202-2209.
- Komori, R., Ozawa, S., Kato, Y., Shinji, H., Kimoto, S., & Hata, R. (2010) *Biomed. Res.*, 31, 123-131.
- Ozawa, S., Ito, S., Kato, Y., Kubota, E., & Hata, R. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396, 1060-1064.
- Maehata, Y., Ozawa, S., Kobayashi, K., Kato, Y., Yoshino, F., Miyamoto, C., Izukuri, K., Kubota, E., Hata, R., & Lee, M.C. (2010) *Free Radic. Res.*, 44, 913-924.
- Schwarze, S.R., Luo, J., Isaacs, W.B., & Jarrard, D.F. (2005) *Prostate*, 64, 67-74.
- Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W.R., & Polyak, K. (2004) *Cancer Cell*, 6, 17-32.
- Izukuri, K., Suzuki, K., Yajima, N., Ozawa, S., Ito, S., Kubota, E., & Hata, R. (2010) *Transgenic Res.*, 19, 1109-1117.
- Izukuri, K., Ito, S., Nozaki, N., Yajima, N., Iwamiya, M., Kawahara, S., Suzuki, K., Kubota, E., & Hata, R. (2010) *Lab. Med.*, 41 478-482.
- Shellenberger, T.D., Wang, M., Gujrati, M., Jayakumar, A., Strieter, R.M., Burdick, M.D., Ioannides, C.G., Efferson, C.L., El-Naggar, A.K., Roberts, D., Clayman, G.L., & Frederick, M. J. (2004) *Cancer Res.*, 64, 8262-8270.
- 原 孝彦 (2008) 生化学, 80, 1133-1136.
- Yamamoto, T., Yamashita, A., Yamada, K., & Hata, R. (2011) *Neurosci. Lett.*, 487, 335-340.

畑 隆一郎

(神奈川歯科大学口腔難治疾患研究センター)

Regulation of CXCL14/BRAK, a tumor-suppressing chemokine, by MAP kinase subtype-specific crosstalk
Ryu-Ichiro Hata (Oral Health Science Research Center, Kanagawa Dental College, 82 Inaoka-cho, Yokosuka 238-8580, Japan)

投稿受付：平成 23 年 1 月 11 日

出芽酵母におけるリボソームタンパク質遺伝子の新規転写開始制御機構

1. 始めに—真核生物のリボソーム合成

リボソームは生物のタンパク質合成を担う巨大複合体であり、その構造と機能に関する研究に対し2009年のノーベル化学賞が与えられたことは記憶に新しい。真核生物のリボソームは4種類のリボソームRNA(rRNA)と79種類(出芽酵母の場合)のリボソームタンパク質(RP; ribosomal protein)から構成され、その合成は核内に存在する3種類全てのRNAポリメラーゼ(Pol I, Pol II, Pol III)が関わる唯一の細胞内イベントである(Pol Iが35S rRNA, Pol IIがRPのmRNA, Pol IIIが5S rRNAをそれぞれ転写する)。活発に増殖する酵母細胞においては、全転写反応の約60%がrRNAの転写に、全mRNA転写の約50%がRPのmRNAの転写に費やされるなど、リボソームの合成には膨大な細胞資源を必要とする¹⁾。そのため生物は、細胞内外の環境に応じて三つの転写系を速やか、かつ協調的にon/offすることで、無駄のないリボソーム合成を行っている。近年、リボソームの合成が、細胞のサイズや分裂のタイミングの決定、転写や複製、mRNAの局在など、様々な細胞機能と密接に関与することが明らかになりつつある。そのため、リボソーム合成制御の正しい理解は、転写や翻訳のみならず幅広い研究領域に重要な知見をもたらすと考えられる。各転写系の制御機構については、それぞれが独立に大きなテーマであるため、本稿ではPol IIによるRP遺伝子の転写制御に絞り、主に著者らが独自に見いだしたHmo1(High mobility group protein 1)タンパク質によるRP遺伝子の新規な転写開始点決定機構について述べる。