

ストレス応答 MAPK 経路および p53 による中心体複製の制御

武川 睦寛

1. はじめに

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二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、均等に分配される(図1)。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期には一つしか存在しないが、G2期までに複製されて倍加し、M期には紡錘体を形成する二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。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きわめて重要であり、一方、その異常は染色体の異数化や転座を招いて発がんの原因となることが明らかにされている¹⁾。特にがん細胞では、さまざまなストレス刺激(DNA損傷、酸化や熱ショックなど)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がんのさらなる悪性を招いて、患者の生命予後を悪化させることも示されている^{2,3)}。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ほとんど知見がない。我々は最近、さまざまなストレス刺激に応答して活性化される二つの重要な細胞内シグナル伝達システム、すなわちストレス応答MAPK(mitogen-activated protein kinase)経路とp53経路が、協調して中心体複製の鍵分子であるPLK4(polo-like kinase 4)の活性を調節しており、ストレス環境下での中心体複製停止と染色体安定性の保持に重要な役割を果たしていることを見いだした⁴⁾。本稿ではストレス応答MAPK経路の活性制御機構、およびストレス応答シグナルとPLK4とのクロストークについて、我々の研究室で得られた知見を中心に概説する。

東京大学医科学研究所分子シグナル制御分野(〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

Centrosome integrity under stress is maintained by a network of PLK4, p53 and SAPK pathways

Mutsuhiro Takekawa (Division of Cell Signaling and Molecular Medicine, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

2. ストレス応答 MAP キナーゼ経路

細胞は、外界からのさまざまな刺激に応答して、特定のシグナル伝達ネットワークを活性化し、外部環境の変化に適応している。MAPKカスケードは細胞内情報伝達の根幹をなすシステムであり、さまざまな遺伝子の発現を調節して、増殖、分化、アポトーシス、炎症・免疫応答など、多彩な生命機能の制御に中心的な役割を果たしている。MAPK経路はMAPKKK、MAPKK、およびMAPKという3種類のキナーゼ分子から構成されるが、ヒト細胞内には機能の異なるMAPK経路が少なくとも4種類存在することが知られている(図2)。古典的MAPK経路であるERK経路が、増殖因子などによって活性化され、主に細胞増殖に作用するのに対し、ストレス応答MAPK経路であるp38およびJNK経路は、環境ストレス(紫外線や放射線によるDNA損傷、活性酸素、高浸透圧、熱ショックなど)や炎症性サイトカイン(腫瘍壊死因子、インターロイキン1など)によって活性化され、アポトーシス誘導や免疫応答の制御に中心的な役割を果たしている⁵⁾。またERK5経路は、増殖因子および環境ストレスによって活性化され、G1/S期の進行や細胞分化などに関与する。これらMAPK経路のうち、特にp38/JNK経路はストレスを被った細胞の運命(生か死か)を決定して、生体の恒常性維持を担う重要なシグナル伝達システムであり、その制御異常ががん、自己免疫疾患、神経変性疾患や2型糖尿病などの発症に深く関与することが明らかにされている。

3. ストレス応答 MAPKKK, MTK1 の活性制御機構と生理機能

ストレス応答MAPK経路を活性化するヒトMAPKKKとして、これまでにMEKKファミリーに属するMEKK1~3、MTK1(MEKK4)、およびMLKファミリーに属するMLK1~3、DLK、LZK、MLTK、さらにTAK1、ASK1/2、TAO1/2など十数種類の分子が同定されている⁵⁾(図2)。このうちMTK1は、我々が遺伝子クローニングを行ったMAPKKK分子であり、DNA損傷をはじめとする多彩なストレス刺激やトランスフォーミング増殖因子β(TGFβ)な

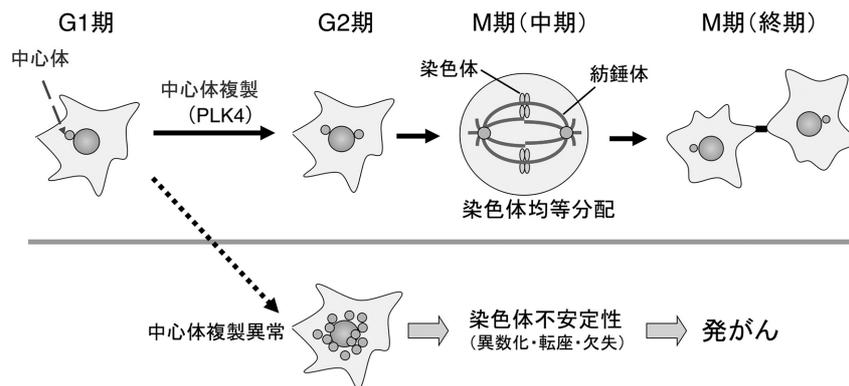


図1 細胞分裂と中心体複製

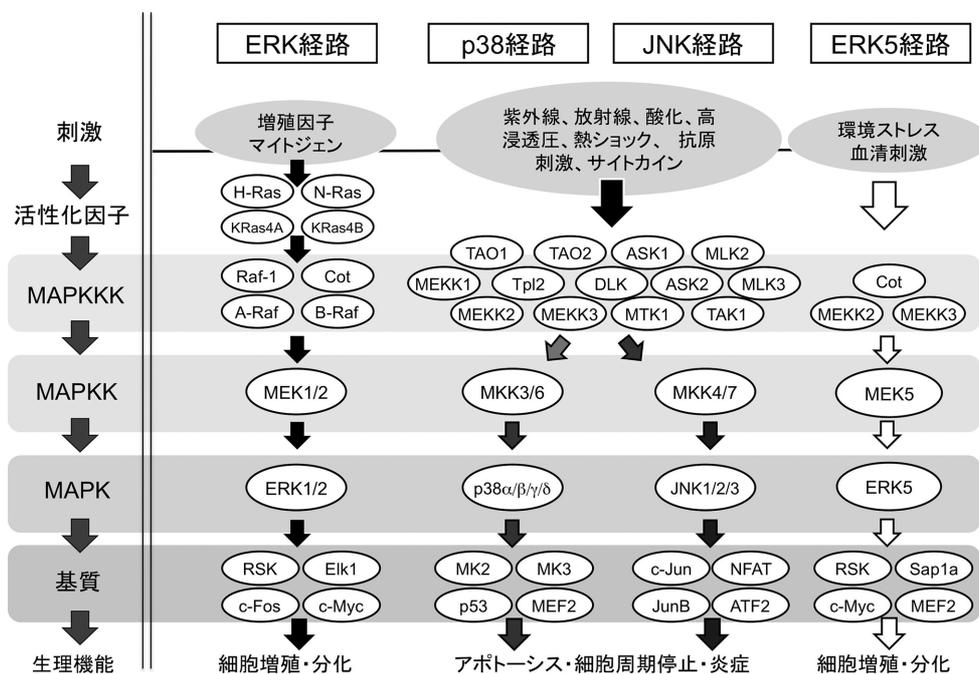


図2 ヒト MAP キナーゼカスケード

どのサイトカインに応答して活性化される。MTK1 と相同な遺伝子が、出芽酵母からヒトに至るすべての真核生物に高度に保存されていることから、MTK1 はストレス応答 MAPKKK のプロトタイプであると考えられる⁶⁾。多様なストレス刺激によって、どのようにして MTK1 が活性化されるのかを明らかにするため、我々はまず MTK1 と特異的に結合する分子のスクリーニングを行い、3 種類の GADD45 (growth arrest and DNA damage-inducible) 関連分子 (GADD45 $\alpha/\beta/\gamma$) を単離することに成功した。GADD45 関連分子は、さまざまなストレスやサイトカイン刺激によって発現誘導されるストレス誘導遺伝子であるが、生化学的解析から、これら GADD45 分子は、いずれも MTK1 の制御ドメインと直接結合してアクチベーターとして作用し、MTK1 のキナーゼ活性を著しく亢進させる機能をもつことを見いだした。すなわち、ストレスやサイトカイン刺

激によって発現誘導された GADD45 関連分子が、MTK1 を介して p38 および JNK 経路を活性化し、アポトーシスを誘導するという、新たなシグナル伝達システムの存在を明らかにした⁷⁾。

また我々は GADD45-MTK1 経路の生理機能の解析を行い、まず GADD45 β が転写因子 Smad4 の標的遺伝子であることを見いだした。さらに、TGF β 刺激によって Smad4 依存的に発現誘導された GADD45 β が、MTK1-p38 経路の活性化を介して腫瘍血管新生抑制因子 TSP-1 の発現を亢進させ、発がん阻止に作用することを見いだした。Smad4 は膀胱がんや大腸がんなどで高率に機能欠損変異が認められるがん抑制遺伝子であるが、実際に Smad4 に変異を持つ膀胱がん細胞では、TGF β による GADD45 β -MTK1-p38 経路の活性化、および TSP-1 の発現はともに消失しており、MTK1 の制御異常が発がんに関与することが明らかと

なった⁸⁾。また MTK1 遺伝子欠損マウスを作製して、免疫系における機能についても解析を進め、GADD45 分子による MTK1 の活性化が、Th1 細胞からのインターフェロン γ (IFN- γ) 産生に必須であり、Th1 免疫応答の制御にも重要であることを明らかにした⁹⁾。

4. ストレス応答 MAPK 経路による中心体複製の制御

ストレス応答経路を構成するキナーゼ分子のうち、MAPKK が高い基質特異性を示し、下流の MAPK を選択的にリン酸化するのに対し、MAPKKK の基質特異性は比較的緩やかであり、MAPKK のみならずさまざまな分子をリン酸化することが報告されている⁵⁾。我々は最近、MTK1 を含む特定のストレス応答 MAPKKK が、中心体複製制御分子である PLK4 を直接リン酸化して活性化することを見いだした。

1) PLK4 による中心体複製制御

ポロ様キナーゼ (polo-like kinase: PLK) ファミリーは、N 末端にキナーゼドメインを、また C 末端に基質認識に重要なポロボックスドメインを持つ Ser/Thr 特異的リン酸化酵素であり、哺乳類では 5 種類のアイソフォーム (PLK1~5) が存在する¹⁰⁾。これらのキナーゼ分子は、いずれも細胞周期の制御に関与するが、PLK1、PLK2 および PLK4 は中心体にも局在し、中心体の複製制御に寄与することが示されている。特に PLK4 は、中心小体の基底部に集積する分子であり、その発現抑制によって中心体の複製が阻害され、一方、強制発現によって中心体の過剰複製が誘発されることから、中心体複製制御の鍵分子であると考えられている。PLK4 遺伝子を完全に欠損したホモノックアウトマウスは、さまざまな組織でアポトーシスが亢進し、胎生致死となるが、片方のアレルのみを欠失したヘテロノックアウトマウスでは、中心体複製異常および染色体異常が惹起され、肝がんや肺がんを発症する¹¹⁾。実際にヒトの臨床がん組織 (肝細胞がんや大腸がんなど) でも、PLK4 の発現異常 (過剰発現および発現低下の両方) が見いだされており、PLK4 の制御異常が発がんや密接に関与することが示されている。

PLK4 の活性調節機構に関しては、これまでに転写およびタンパク質レベルでの発現調節や、リン酸化による酵素活性の制御など、複数のメカニズムが同定されている。PLK4 の転写は、中心体複製が起こる S 期から M 期にかけて亢進し、タンパク質レベルでも細胞周期の進行に伴って発現量が増加する。細胞周期がさらに進んで M 期が終了すると、PLK4 はユビキチン化されて速やかに分解され、その発現がほぼ完全に消失する。PLK4 の発現を亢進させる転写因子として NRF1 や NF- κ B が、一方、転写抑

制には、がん抑制遺伝子 p53 が関与することが報告されている。実際に我々は、DNA 損傷などのストレス刺激によって p53 が活性化すると PLK4 の発現量が顕著に低下することを示した。p53 による PLK4 の転写阻害機構として、最近、p53 が p21^{WAF1/CIP1} の発現を介して転写抑制装置である DREAM (DP, RB-like, E2F4 and MuvB) 複合体の形成を促進し、PLK4 のプロモーター活性を阻害することが明らかにされた¹²⁾。また、PLK4 タンパク質をユビキチン化し、分解を導く E3 リガーゼとして SCF-Slimb/ β TrCP 複合体が同定されている。一方、PLK4 のキナーゼとしての活性化には、酵素ドメイン内に存在する T170 のリン酸化が必要であることが示されている。細胞内の PLK4 活性は、これら複数の機構により統合的に制御されている。また、PLK4 は中心体複製制御のみならず、細胞質分裂やアポトーシスの制御にも寄与することが報告されている。

2) ストレス応答 MAPK 経路および p53 による PLK4 と中心体複製の制御

上述のように PLK4 の活性化には T170 のリン酸化が必要であるが、同サイトのリン酸化を担うキナーゼとして、これまでに PLK4 自身による自己リン酸化が報告されているのみであり、それ以外の制御機構に関しては、ほとんど知見がない¹³⁾。これに対し我々は最近、MTK1 を含む特定のストレス応答 MAPKKK が、ストレス刺激に反応して PLK4 の T170 を直接リン酸化することを明らかにした⁴⁾。

我々はまず、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いだした。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いだした。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、活性化することを確認した。以上の結果から、少なくとも一部のストレス応答 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いだした。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。したがって PLK4 は、p53 が活性化するまでの間、すなわ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ほとんど起こらないことを見だし、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、また上述のように 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。すなわち、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 (図 3 左)。

3) がん細胞における中心体複製制御の破綻

興味深いことに、がん細胞では 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¹⁴⁾。このようながん細胞では p38/JNK と p53 の活性化がともに阻害されており、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、ヒト培養細胞にがん患者由来の変異型 MKK4、および p53 を失活させるがんウイルスタンパク質 (パピローマウイルス E6) を導入して、がん細胞と同様の

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 (図 3 右)。

5. おわりに

これまで、MKK4 はさまざまながんで機能欠損変異 (ミスセンス変異や欠失変異) が認められることから、がん抑制遺伝子として機能すると考えられてきたが¹⁵⁾、その発がん抑制メカニズムは不明であった。本研究により、がん細胞における 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、発がんに寄与することが明らかになった。すなわち、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がん抑制遺伝子であると考えられる。今後さらに、ストレス応答 MAPK による中心体複製阻害メカニズムを解明するとともに、中心体複製制御機構の破綻と発がんとの関連を明らかにしていきたい。

- 1) Janssen, A., van der Burg, M., Szuhai, K., Kops, G.J., & Medema, R.H. (2011) *Science*, 333, 1895-1898.
- 2) Inanc, B., Dodson, H., & Morrison, C.G. (2010) *Mol. Biol. Cell*, 21, 3866-3877.
- 3) Chan, J.Y. (2011) *Int. J. Biol. Sci.*, 7, 1122-1144.
- 4) Nakamura, T., Saito, H., & Takekawa, M. (2013) *Nat. Commun.*, 4, 1775. doi:10.1038/ncomms2752.
- 5) Avruch, J. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1773, 1150-1160.
- 6) Takekawa, M., Posas, F., & Saito, H. (1997) *EMBO J.*, 16, 4973-4982.
- 7) Takekawa, M. & Saito, H. (1998) *Cell*, 95, 521-530.
- 8) Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K.,

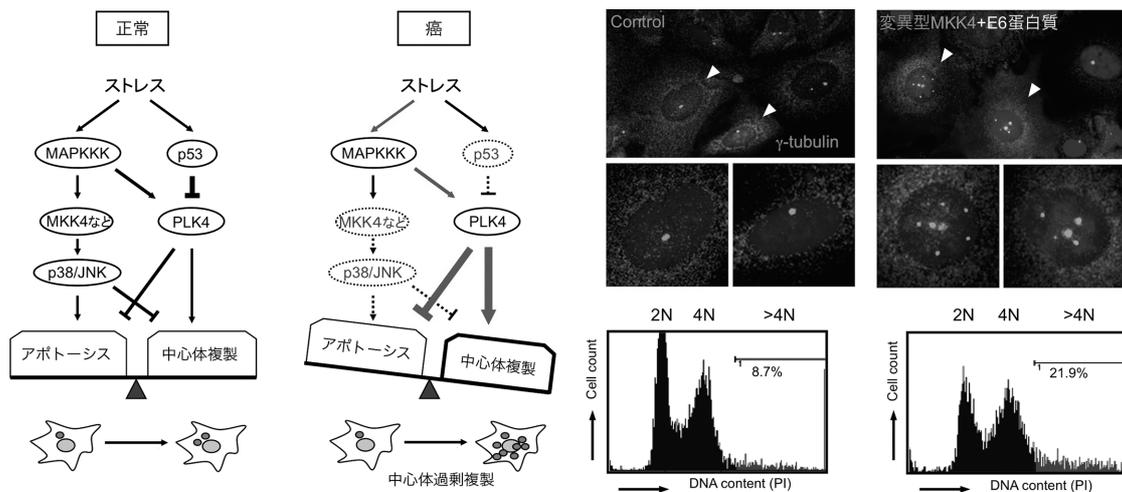


図 3 ストレス応答 MAPK 経路と p53 による中心体複製の制御

ストレス応答 MAPK 経路および p53 による中心体複製の制御とがんにおけるその破綻 (左)。MKK4 変異体および E6 タンパク質を細胞に導入して、ストレス応答 MAPK 経路と p53 を同時に抑制すると、ストレス刺激に応じて中心体の過剰複製と染色体の異数化が惹起される (右)。(文献 4 を改変)

- & Saito, H. (2002) *EMBO J.*, 21, 6473–6482.
- 9) Chi, H., Lu, B., Takekawa, M., Davis, R.J., & Flavell, R.A. (2004) *EMBO J.*, 23, 1576–1586.
- 10) Archambault, V. & Glover, D.M. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 265–275.
- 11) Ko, M.A., Rosario, C.O., Hudson, J.W., Kulkarni, S., Pollett, A., Dennis, J.W., & Swallow, C.J. (2005) *Nat. Genet.*, 37, 883–888.
- 12) Fischer, M., Quaas, M., Wintsche, A., Muller, G.A., & Engeland, K. (2014) *Nucleic Acids Res.*, 42, 163–180.
- 13) Holland, A.J., Lan, W., Niessen, S., Hoover, H., & Cleveland, D.W. (2010) *J. Cell Biol.*, 188, 191–198.
- 14) Ahn, Y.H., Yang, Y., Gibbons, D.L., Creighton, C.J., Yang, F., Wistuba, I.I., Lin, W., Thilaganathan, N., Alvarez, C.A., Roybal, J., Goldsmith, E.J., Tournier, C., & Kurie, J.M. (2011) *Mol. Cell Biol.*, 31, 4270–4285.
- 15) Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverty, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., Moorhead, M., Chaudhuri, S., Tomsho, L.P., Peters, B.A., Pujara, K., Cordes, S., Davis, D.P., Carlton, V.E., Yuan, W., Li, L., Wang, W., Eigenbrot, C., Kaminker, J.S., Eberhard, D.A., Waring, P., Schuster, S.C., Modrusan, Z., Zhang, Z., Stokoe, D., de Sauvage, F.J., Faham, M., & Seshagiri, S. (2010) *Nature*, 466, 869–873.

著者寸描

●武川睦寛 (たけかわ むつひろ)



東京大学医科学研究所分子シグナル制御分野教授。医学博士。

■略歴 1964年東京生まれ。90年公立札幌医科大学医学部卒業。94年同大学院修了。92年大阪大学微生物病研究所。94年ハーバード大学医学部ダナ・ファーバー癌研究所。2000年東京大学医科学研究所助

教 (JST さきがけ研究 PRESTO 研究者兼任)。03年同准教授。09年名古屋大学環境医学研究所教授。12年より現職。

■研究テーマと抱負 疾患発症に関与する細胞内シグナル伝達システムの解明と治療応用。

■趣味 音楽鑑賞。