

宇宙環境ストレスにตอบสนองする p38/JNK シグナル伝達経路の活性制御機構の解明

東京大学医科学研究所分子細胞情報分野 武川睦寛、吉田尚子、奈古屋美穂、斎藤春雄

Elucidation of the regulatory mechanisms of the p38 and JNK signaling pathways that respond to environmental stresses in space

Mitsuhiro Takekawa, Naoko Yoshida, Miho Nagoya and Haruo Saito

Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo

E-mail: takekawa@ims.u-tokyo.ac.jp

Abstract: An important health concern for astronauts in a space environment is the high risk of cancer associated with cosmic radiation. In order to understand and avoid these health risks to astronauts it is thus vital to elucidate the regulatory mechanisms of intracellular signaling pathways induced by environmental stresses in space. The stress-responsive MAPK (p38 and JNK) pathways are activated by diverse environmental stresses, and play pivotal roles in cellular stress responses such as cell cycle arrest and apoptosis. The regulatory mechanisms of these MAPK cascades are, however, only vaguely defined. We demonstrated previously that a human MAPKKK, MTK1, is involved in stress-induced activation of p38 and JNK MAPKs. Therefore, in order to obtain basic data that will contribute to the health of astronauts in space we investigated the regulatory mechanisms of MTK1 as well as the effects of micro-gravity on the activation of the stress responsive MAPK pathways.

Key words; Environmental Stress, MAP kinase

宇宙環境では、宇宙放射線により地上よりも遙かに高い放射線被曝を被り、しかも微小重力である。このような宇宙環境に特異的なストレス刺激に対して、細胞がどのようにして適応反応を示すのか、そのメカニズムを明らかにすることは宇宙開発の前提として必要不可欠である。ストレス応答 MAP キナーゼ (p38 及び JNK) シグナル伝達経路は紫外線や放射線など、宇宙空間で問題となる様々な環境ストレス刺激によって活性化される細胞内情報伝達システムであり、細胞周期停止やアポトーシス誘導に代表される細胞のストレス応答の制御に極めて重要な役割を果たしている。

MAP キナーゼ経路は MAPKKK-MAPKK-MAPK という 3 段階のキナーゼによって構築されている。近年、MAPK および MAPKK に関しては、リン酸化・脱リン酸化による活性制御機構が明らかにされつつある。しかし、MAPKKK の活性化機構や、そのさらに上流のシグナル伝達機構に関しては、不明な点が多く残されている。また、p38/JNK 経路の活性制御における微小重力の影響も明らかにされていない。

我々はこれまでに、ストレス応答 MAPK 経路を特異的に活性化するヒト MAPKKK として、MTK1 を同定し、さらに MTK1 が環境ストレスによる p38/JNK 経路の活性化に中心的な役割を担う MAPKKK 分子であることを明らかにしてきた。本研究においては、人間が宇宙環境を安全に利用出来るようにするための基礎的データとして、MTK1 を代表とするストレス応答 MAPKKK の活性制御機構の解析を行った。また、クリノスタットを用いて微小重力がストレス応答 MAPK の活性化にどのような影響を与えるか検討を行った。

1) ストレス応答 MAPKKK、MTK1 の活性制御機構

我々はこれまでに、MTK1 の活性制御ドメインに特異的に結合して活性化因子として作用する 3 種類の GADD45 関連分子 (GADD45 $\alpha/\beta/\gamma$) を同定し、これらの分子が DNA 損傷を含む様々な環境ストレス刺激によって転写誘導される遺伝子であることを明らかにしてきた。本研究においては、GADD45 分子による MTK1 活性化の分子機構の解明を行った。その結果、MTK1 が活性化される際には、まず MTK1 の N 末の制御ドメインと C 末のキナーゼドメインの抑制的な相互作用が解除されると共に、MTK1 の多量体化が誘導されること。さらに MTK1 のキナーゼドメイン内の特定のアミノ酸残基が自己リン酸化されて活性化に至ることを見出した (Fig. 1)。

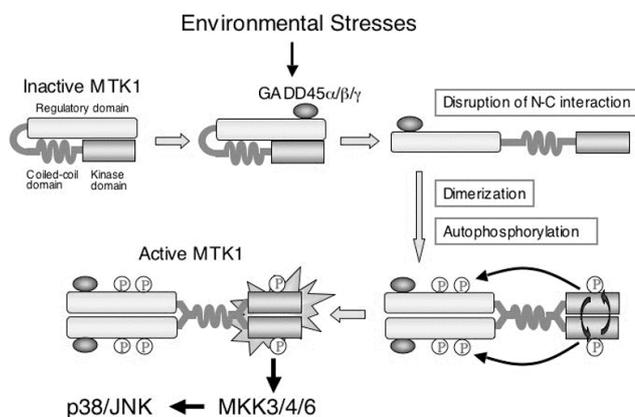


Fig.1 : Schematic model of MTK1 activation

さらに MTK1 の活性化に必須の自己リン酸化サイトに対するリン酸化特異抗体を作成して、MTK1 の活性

化をウェスタンブロットにより簡便に検出する実験系を確立した。この抗体を用いて解析を行った結果、MTK1 が DNA 損傷等の環境ストレス刺激によって強く活性化され、p38/JNK 経路の活性制御に極めて重要な分子であることを見出した。従って MTK1 を介するシグナル伝達システムが宇宙環境においても、生体の恒常性維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

2) ストレス応答 MAPK 経路のシグナル特異性決定、維持機構の解明

哺乳類細胞には、主に増殖因子によって活性化され、細胞増殖に作用する ERK 経路と、ストレス刺激に応答して、細胞増殖停止やアポトーシス誘導に寄与する p38、JNK 経路という少なくとも 3 種類の MAPK カスケードが存在する。各 MAPK カスケードを構成するキナーゼ分子の構造は、互いに類似しているにも関わらず、これらの複数の MAPK 経路間でシグナルの誤ったクロストークは起こらない。この様な MAPK 経路の正確な情報伝達を可能にする機構は、細胞増殖と死の制御に極めて重要であると考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。本研究では MAPKKK-MAPKK 分子間の選択的結合を規定し、MAPK 経路の正確な情報伝達を可能にする未知機構の解明を行った (Fig. 2)。

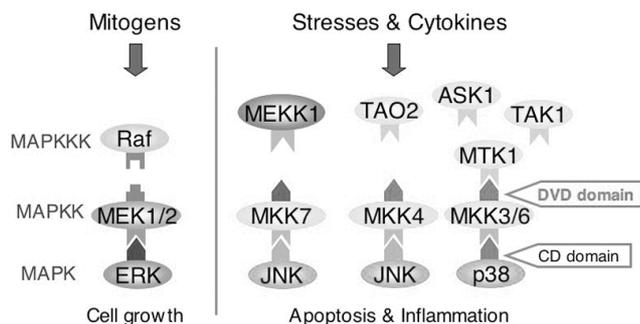


Fig.2 The DVD and CD docking interactions in MAPK pathways

まず MTK1 の基質である MKK6 分子内で MTK1 との選択的結合に必要な領域の同定を試みた。その結果、MKK6 の C 末端非酵素領域に位置する約 20 アミノ酸の領域が、MTK1 や他のストレス応答 MAPKKK 分子との結合に必須の新規ドッキング・サイト (DVD サイト) であることを見出した。興味深いことに、同様のドッキング・サイトが MKK6 のみならず、我々が調べた全ての MAPKK 分子 (MEK1, MKK3/4/6/7) に保存されており、それぞれが対応する上流の MAPKKK 分子との選択的分子間結合に必要であることが確認された。また、ドッキング・サイトにアミノ酸変異を導入したり、この領域に相同なアミノ酸配列を持つ合成ペプチドを細胞に導入して、MAPKKK-MAPKK 間の結合を阻害することにより、ストレス刺激、サイトカインや増殖因子等による MAPKK の活性化が強く抑制された。以上の結果から、ドッキング・サイトを介した

MAPKKK-MAPKK の分子間結合が、MAPK 経路のシグナル特異性維持のみならず、効率的なシグナル伝達にも必須であることが明らかになった。また、ドッキング・サイトをターゲットとした分子標的薬剤を開発することで、特定の MAPK 経路を MAPKK のレベルで選択的に阻害し得る可能性が示唆された。

3) ストレス応答シグナル制御に微小重力が与える影響の検討

ストレス応答 MAPK カスケードの活性制御における重力の影響に関しては、これまでほとんど報告が成されていない。我々は、ストレス応答における微小重力の影響を解明するため、様々なストレス刺激 (紫外線、高浸透圧、過酸化水素、シスプラチン、エトポシド) を与えた細胞を正常重力下、あるいはクリノスタット内の微小重力環境下で培養し、p38/JNK の活性化、およびその基質である転写因子 ATF2 の核内でのリン酸化状態を経時的にモニターした。その結果、少なくとも今回我々が調べた刺激では、ストレス応答 MAPK 経路の活性化に微小重力による明らかな影響は観察されなかった。従って、p38/JNK 経路は、宇宙環境においても細胞のストレス応答の制御に重要な役割を果たすことが示唆された。