

研究テーマ Ablチロシンキナーゼの核—細胞質クロストークと細胞死誘導機構

1、はじめに

癌治療を困難にしている大きな要因の一つとして、抗癌剤耐性獲得という問題があり、その多くが解決されていない。抗癌剤は高い細胞死(アポトーシス)誘導能を有するが、癌細胞ではアポトーシスの誘導を含む様々な細胞内シグナル伝達に異常があることが知られている。申請者は c-Abl, Lyn, PKC δ といった蛋白リン酸化酵素の細胞周期制御とアポトーシスシグナルにおける役割を、主にそのリン酸化によって制御される分子の同定を通じて明らかにしてきた¹⁻⁶⁾。これらの分子は様々なストレス刺激に伴って核に移行し、細胞周期を制御しながらアポトーシスを誘導するという点において共通であり、この機構の破綻がアポトーシス誘導に抵抗性を示す一つの可能性として考えられる。例えば、実際にある癌細胞ではこれらの核移行阻害あるいは機能不全により抗癌剤によるアポトーシス誘導が抑制されていることが、申請者の最近の研究により明らかになってきている。その機構は未だ多くが不明だが、何らかの抑制因子の関与を示唆する知見が得られており、このような分子の同定は癌のみならず、アポトーシスの破綻に関わる疾患の新たなターゲットにつながると考えられる。そこで我々は、機能プロテオミクス解析を用いた酸化ストレス誘発性アポトーシスを抑制する分子群の探索とその機能解析により、癌治療における新たな標的分子の同定や、種々の癌に選択的かつ特異的な治療法開発への端緒となることを目指し研究を進めてきた。本研究では、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子である Bcr-Abl の制御機構を明らかにするために、その生理的リン酸化酵素である c-Abl の細胞内局在を制御する因子の同定並びに機能解析を試みた。

2、方法および結果

これまでの申請者の研究により c-Abl は DNA 損傷に伴って核に移行することを見い出している⁷⁾。また、c-Abl の核移行には、14-3-3 というアダプタータンパク質との解離が必要であり、MAPK スーパーファミリーの一つである JNK による 14-3-3 のリン酸化がその解離に重要な機能を果たしていることも明らかにしている⁷⁾。c-Abl の 14-3-3 結合部位も明らかにしているが、結合に最も重要なスレオニン(Thr735)をリン酸化するキナーゼが不明であった。そこでこのキナーゼを同定するために Thr735 リン酸化特異的抗体による免疫沈降を行い、SDS-PAGE にて展開後、複合体構成群を逐次質量分析計にて解析しキナーゼの同定を試みたが、残念ながらキナーゼの同定には至らなかった。そこでゲノムワイドな網羅的解析として、 λ ファージによる Thr735 リン酸化特異的抗体を用いた発現クローニングも並行して進め、候補となるキナーゼの同定を試みた(図 1A)。まず、GST-c-Abl(683-790) wild-type 又は T735A(735 番目のアミノ酸残基スレオニンをアラニンに置換した変異体)を発現できるように形質転換したバクテリア(LE392)を用意した。GST-c-Abl(683-790)wild-type を発現できるバクテリアにヒト胎児脳由来 cDNA ライブラリーファージを感染させた。IPTG の添加によって GST-c-Abl(683-790)とライブラリー由来タンパク質の発現を誘導し、これらのタンパク質をメンブレンに移した。このメンブレンを抗 c-Abl(Thr735)リン酸化抗体を用いて免疫染色した(図 1B)。ポジティブプラークからファージを回収し、スクリーニングを繰り返すことでクローンを得た。GST-c-Abl(683-790)T735A を発現できるバクテリアに得られたクローンを感染させたところ、リン酸化反応は検出できなかった。ファージがもつ cDNA 配列を決定し、データベースと照合した結果、CLK1, CLK4, MST1, MST2, TTK の 5 種類のタンパク質が c-Abl Thr735 をリン酸化するキナーゼの候補として挙げられた。これらのキナーゼが *in vitro* で c-Abl Thr735 をリン酸化するか確認するため、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。キナーゼと組み換えタンパク質を精製した GST-c-Abl(683-790)wild-type を ATP の存在下で反応させたところ、5 種類のキナーゼで Thr735 のリン酸化反応が検出された。また、GST-c-Abl(683-790)T735A ではリン酸化反応が検出できなかった。次に、COS-7 細胞に GFP ベクター、5 種類の GFP-キナーゼ(wild-type 又は不活性型)をそれぞれ Flag-c-Abl とコトランスフェクションした。細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降し、抗 c-Abl(Thr735)リン酸化抗体でブロットした。その結果、不活性型キナーゼである CLK1(K191R)、CLK4(K189R)、MST1 触媒ドメイン(K64R)、MST2(K56R)では

リン酸化反応が検出できなかったのに対して、wild-type のキナーゼでは Thr735 のリン酸化亢進が見られた。よって、過剰発現系において CLK1, CLK4, MST1, MST2, TTK はキナーゼ活性依存的に Thr735 をリン酸化することが明らかとなった。

c-Abl Thr735 のリン酸化をより詳しく解析するため、キナーゼ不活性型である Flag-c-Abl(K-R)を安定的に発現する HeLa/Flag-c-Abl(K-R)細胞を作製した。この細胞を H₂O₂ で処理すると、Thr735 のリン酸化は 20 分をピークに亢進し、4 時間で元に戻った。HeLa/Flag-c-Abl(K-R)細胞で 5 種類のキナーゼが Thr735 のリン酸化に関与するかどうかを調べるため、siRNA を用いてキナーゼをノックダウンし、H₂O₂ で処理をした。CLK4, MST1, MST2 をノックダウンしても H₂O₂ の処理による Thr735 のリン酸化亢進に影響は見られなかったが、CLK1 と TTK をノックダウンし H₂O₂ で処理をすると、このリン酸化の亢進は抑制された。また、CLK1 をノックダウンしたときに比べて TTK をノックダウンした方がリン酸化亢進の抑制が顕著であった。

c-Abl と TTK の細胞内局在を見るため、HeLa/Flag-c-Abl(K-R)細胞を抗 Flag 抗体と抗 TTK 抗体を用いて免疫染色を行った。Flag-c-Abl(K-R)は主に細胞質にあり、TTK は細胞質と核に存在した。次に、c-Abl の核内移行に TTK が関与するかを検討するため、HeLa/Flag-c-Abl(K-R)細胞に Scramble siRNA と TTK siRNA をトランスフェクションし、H₂O₂ 処理した細胞と処理していない細胞で抗 Flag 抗体を用いて免疫染色を行った。コントロールでは酸化ストレスによって細胞質にある c-Abl が核内へと移行した。一方、TTK をノックダウンした細胞では、H₂O₂ 処理に関係なく c-Abl の核内集積が起こった。さらに、HeLa/Flag-c-Abl(K-R)細胞に Scramble siRNA と TTK siRNA をトランスフェクションし、H₂O₂ で処理し核分画を抗 c-Abl 抗体でプロットした。この結果、コントロールでは c-Abl は核内に移行するのにに対し、TTK をノックダウンすると H₂O₂ に関係なく c-Abl が核内に集積した。これらの結果から TTK は c-Abl を細胞質にとどめておく機能をもつことがわかった。

TTK が c-Abl を細胞質にとどめておくことが、アポトーシスとどのような関係にあるか調べるため、HeLa/Flag-c-Abl(K-R)細胞に Scramble siRNA と TTK siRNA をトランスフェクションし、DMSO 又は c-Abl の阻害剤である STI571 で前処理した後に H₂O₂ で処理を行い TUNEL アッセイを行った (図2)。この結果、TTK をノックダウンすると酸化ストレスによるアポトーシスを起こしやすくなった。また、このアポトーシスは STI571 による前処理で抑制された。したがって TTK は c-Abl 依存的なアポトーシスに抵抗性を示すと考えられる。

3、考察

c-Abl Thr735 をリン酸化するキナーゼをスクリーニングした結果、CLK1, CLK4, MST1, MST2, TTK という 5 種類のキナーゼがリストアップされた。CLK1 と CLK4 は、スプライソソームの形成に重要である SR タンパク質をリン酸化することでスプライシングの制御に関与するキナーゼである⁸⁾。MST1 と MST2 は、不活性の状態では細胞質にとどまっており、酸化ストレス応答によってカスパーゼによる切断を受けて核内へと移行し、活性化することでアポトーシスを誘導することが知られている⁹⁾。TTK は Mps1 としても知られ、スピンドルチェックポイントである^{10, 11)}。これら 5 つのキナーゼは *in vitro* キナーゼアッセイと過剰発現系において c-Abl Thr735 のリン酸化反応が検出できた。これらのことより、cDNA ライブラリーフェージと部位特異的リン酸化抗体を用いた、今回のスクリーニング法は有効であると考えられる。また今回スクリーニングから得られたクローンのほとんどが CLK1 をコードする cDNA であった。CLK1 は脳で強く発現していることが既に報告されている¹²⁾。今回のスクリーニングで用いた cDNA がヒト胎児脳由来であることから、ライブラリー内に CLK1 をコードする cDNA が多く含まれていたかもしれない。このためにクローンの多くが CLK1 をコードしていたと考えられる。

c-Abl Thr735 のリン酸化は、H₂O₂ の処理後 20-60 分間で亢進が見られた。TTK をノックダウンすると、H₂O₂ の処理後 20-60 分間のリン酸化亢進が抑制されたことから、酸化ストレスに応じて TTK が c-Abl Thr735 をリン酸化していると考えられる。また免疫染色の結果、c-Abl と TTK はともに細胞質に多く存在することから、TTK による c-Abl のリン酸化は細胞質で起こっていることが示唆される。

酸化ストレスによる Thr735 のリン酸化亢進の原因として、2つの可能性がある。第一に、酸化ストレスによる TTK の活性化が考えられる。TTK は DNA 損傷によって Chk2 Thr68 をリン酸化することから¹³⁾、ストレス応答で活性化するキナーゼなのかもしれない。第二に、酸化ストレスによるホスファターゼの不活性化が考えられる。酸化ストレスが細胞に加わると一部のホスファターゼの活性が低下するということが知られている¹⁴⁾。酸化ストレスによる Thr735 のリン酸化亢進の生理的な意義は明らかではないので、今後さらなる解析が必要である。TTK をノックダウンすると、c-Abl の核内集積が見られた。このことから、TTK は c-Abl を細胞質にとどめる機

能をもつと考えられる。しかし、TTK のノックダウンによって恒常的な Thr735 のリン酸化の低下は見られなかったことから、Thr735 以外のリン酸化によって c-Abl を細胞質にとどめている可能性がある。

酸化ストレス、DNA 損傷によって、c-Abl は p73, Rad9 を活性化し、アポトーシスを誘導することが知られている^{5,7,15,16}。TTK をノックダウンするとアポトーシスが誘導され、さらに STI571 の添加によりこのアポトーシスが抑制された (図 2)。このことから c-Abl 依存的なアポトーシスを TTK が抑制していると考えられる。TTK による酸化ストレスによるアポトーシスを抑制するという報告は本研究が初めてである。今後、スピンドルチェックポイントである TTK が酸化ストレスや DNA 損傷といったストレス応答にどのように関わっているのか検討していきたい。

4、謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りました財団法人 病態代謝研究会に深謝致します。

5、参考文献

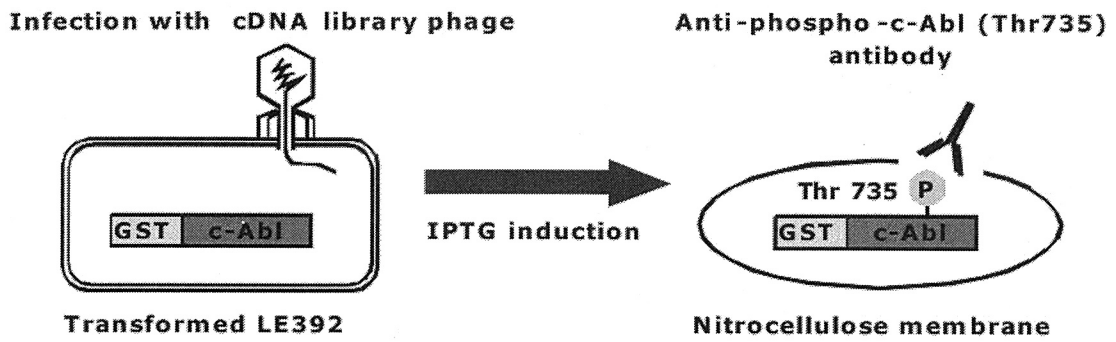
1. Yoshida K, Kharbanda S and Kufe D: Functional interaction between SHPTP1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem* **274**, 34663-34668 (1999).
2. Yoshida K, Weichselbaum R, Kharbanda S and Kufe D: Role for Lyn tyrosine kinase as a regulator of stress-activated protein kinase activity in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **20**, 5370-5380 (2000).
3. Yoshida K and Kufe D: Negative regulation of the SHPTP1 protein tyrosine phosphatase by protein kinase C delta in response to DNA damage. *Mol Pharmacol* **60**, 1431-1438 (2001).
4. Yoshida K, Miki Y and Kufe D: Activation of SAPK/JNK signaling by protein kinase Cdelta in response to DNA damage. *J Biol Chem* **277**, 48372-48378 (2002).
5. Yoshida K, Komatsu K, Wang HG and Kufe D: c-Abl tyrosine kinase regulates the human Rad9 checkpoint protein in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **22**, 3292-3300 (2002).
6. Yoshida K, Wang HG, Miki Y and Kufe D: Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9. *EMBO J* **22**, 1431-1441 (2003).
7. Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D and Miki Y: JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **7**, 278-285 (2005).
8. Hagiwara M: Alternative splicing: a new drug target of the post-genome era. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 324-331 (2005).
9. de Souza PM and Lindsay MA: Mammalian Sterile20-like kinase 1 and the regulation of apoptosis. *Biochem Soc Trans* **32**, 485-488 (2004).
10. Stucke VM, Sillje HH, Arnaud L and Nigg EA: Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J* **21**, 1723-1732 (2002).
11. Fisk HA, Mattison CP and Winey M: Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14875-14880 (2003).
12. Menegay HJ, Myers MP, Moeslein FM and Landreth GE: Biochemical characterization and localization of the dual specificity kinase CLK1. *J Cell Sci* **113** (Pt 18), 3241-3253 (2000).
13. Wei JH, Chou YF, Ou YH, Yeh YH, Tyan SW, Sun TP, Shen CY and Shieh SY: TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68. *J Biol Chem* **280**, 7748-7757 (2005).
14. Whisler RL, Goyette MA, Grants IS and Newhouse YG: Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells. *Arch Biochem Biophys* **319**, 23-35 (1995).
15. Yoshida K: Regulation for nuclear targeting of the Abl tyrosine kinase in response to DNA damage. *Adv Exp Med Biol* **604**, 155-165 (2007).
16. Yoshida K and Miki Y: Enabling death by the Abl tyrosine kinase: mechanisms for nuclear shuttling of c-Abl in response to DNA damage. *Cell Cycle* **4**, 777-779 (2005).

6、図の説明

図 1 Thr735 キナーゼの発現クローニング (A) スクリーニングのモデル. (B) 1 次スクリーニングでは、GST-c-Abl(683-790)wild-type を発現するバクテリアにヒト胎児脳由来 cDNA ライブラリーファージを感染させた。抗 c-Abl(Thr735)リン酸化抗体を用いてポジティブブランクを検出した(左上)。ポジティブファージを用いて二次スクリーニングを行った(右上)。得られたクローンを、GST-c-Abl(683-790)wild-type 又は T735A を発現できるバクテリアに感染させた(下)。

図 2 酸化ストレスによるアポトーシス誘導と TTK ノックダウンの効果 HeLa/Flag-c-Abl(K-R)に Scramble siRNA 又は TTK siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に DMSO 又は STI571 で 2 時間前処理し、250 μ M H₂O₂ で 1 時間処理した。24 時間後、TUNEL 法を用いてアポトーシスを起こした細胞を調べた。

A



B

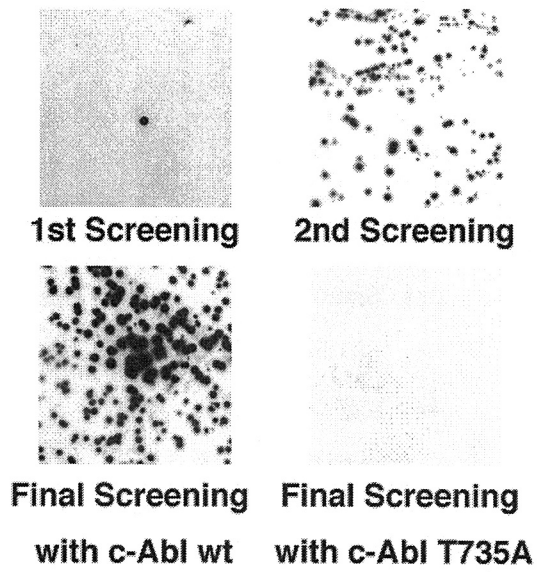


Figure 2

