

# ストレス顆粒形成によるストレス応答シグナルと細胞運命の制御機構

名古屋大学 環境医学研究所 分子シグナル制御分野

武川 睦寛

## 1. 背景および目的

細胞は外界からの様々なストレス刺激に対して、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、ストレスを被った細胞に積極的に細胞死を誘導するシグナル伝達機構（“細胞死誘導シグナル”）の両方を兼ね備えている。この様な相反する応答を、刺激の種類、持続時間や強弱に応じて使い分け、細胞運命（生か死か）を制御することで、個体としての恒常性が維持されている。

細胞が持つ基本的な“ストレス適応機構”の一つとして、最近、「ストレス顆粒」の形成が重要であることが見出された。ストレス顆粒は、特定のストレス刺激（低酸素、熱ショック、ウイルス感染、砒素、異常蛋白質蓄積など）に応答して形成される細胞質内構造体であり、その本体はmRNA、RNA結合蛋白質、及び40Sリボソームなどからなる凝集体である。ストレス顆粒が形成されると、ハウスキーピング遺伝子などのmRNAが顆粒内へ取込まれ、一部の蛋白質への翻訳が一時的に停止する。ストレス顆粒は膜構造を持たないため、その形成は動的かつ可逆的であり、細胞がストレスから回復すると数分で消失して翻訳が再開される。この様な一過性の翻訳抑制は、異常蛋白質の蓄積を防ぎ、更なる細胞損傷を回避する重要なストレス適応機構である。

一方、ストレスによって惹起される“細胞死誘導シグナル”としては、ストレス応答MAPキナーゼ（p38およびJNK）経路が重要であることが知られている。この経路は、DNA損傷などによって活性化され、ストレスを被った細胞にアポトーシスを誘導して排除する機能を有している。

この様な“ストレス適応機構”と“細胞死誘導シグナル”のバランスが、細胞運命（生存か死か）の決定に極めて重要であり、その異常が癌や感染症、神経変性疾患などの病態にも深く関与する。しかし、ストレス顆粒形成とストレス応答シグナルの機能的関連や相互作用のメカニズムは、未だ不明のままである。特にストレス顆粒の研究は途に就いたばかりであり、その形成機構や翻訳制御以外の生理機能はほとんど明らかにされておらず、これらの問題の解明はストレス応答研究のホット・トピックとして注目を集めている。

私達はこれまでに、ストレス応答MAPK経路（MAPKKK-MAPKK-MAPK）の研究を推進し、この経路の主要なヒトMAPKKKであるMTK1を単離して、その活性制御機構と生理機能を解明してきた（*Cell*, 1998; *EMBO J*, 2002; *Mol Cell*, 2005 他）。その過程で我々は最近、MTK1の新たな結合分子として足場蛋白質RACK1を同定し、RACK1がMTK1を多量体化してその活性化を促進する、活性化のエンハンサーとして機能することを見出した。次にRACK1の細胞内局在を解析したところ、無刺激の状態では、MTK1と結合して細胞質に局在するRACK1が、砒素などのストレス刺激に応答してMTK1から解離し、ストレス顆粒内に取り込まれることを見出した。さらにその結果、細胞質内のRACK1が枯渇した状態となってMTK1、およびその下流のp38/JNKの活性化が強く阻害されること

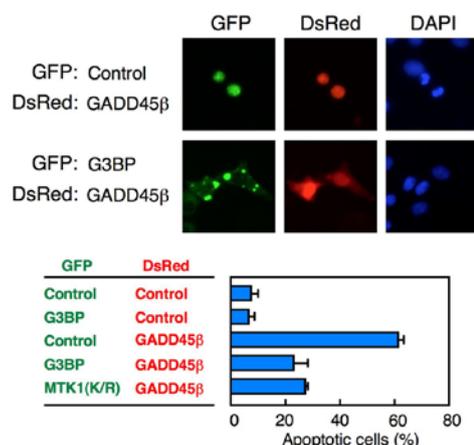
を見出した。

そこで本研究では、ストレス顆粒形成によるp38/JNK経路の活性化阻害が、アポトーシスを代表とする細胞のストレス応答にどのような影響を与えるのか解析を行った。また、ストレス顆粒の形成機構および生理機能の全容解明を目指して、未知ストレス顆粒構成分子の同定を行った。

## 2. 方法および結果

### 1) ストレス顆粒形成によるMTK1-p38/JNK経路の活性化阻害とその生理機能

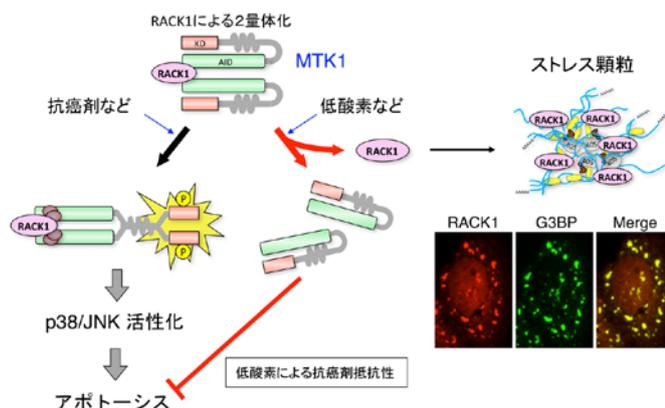
我々はこれまでに、DNA損傷などに応答して発現誘導されるGADD45関連遺伝子 (GADD45 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) が、MTK1の活性化因子であり、p38/JNK経路を介して、ストレスを被った細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた (Cell, 1998; MCB, 2002; MCB, 2007)。そこでまず、ストレス顆粒形成に伴うMTK1の活性化阻害が、GADD45関連分子によって誘導されるアポトーシスを抑制し得るか、検証を行った。GADD45 $\beta$ をHeLa細胞に遺伝子導入して強制発現すると、MTK1およびp38/JNKが強く活性化され、細胞萎縮やmembrane blebbing、核DNAの凝集、断片化などを伴うアポトーシスが誘導された。一方、GADD45 $\beta$ と共にストレス顆粒構成分子であるG3BPを強制発現して、ストレス顆粒を形成させると、MTK1の活性化が阻害され、GADD45 $\beta$ によるアポトーシス誘導も顕著に抑制された(右図)。また、DNA損傷誘導剤methylmethanesulfonate (MMS) 処理によって誘発されるMTK1の活性化が、細胞内に前もってストレス顆粒を形成させておくことにより、ほぼ完全に抑制されることも確認した。従って、ストレス顆粒形成が、MTK1-p38/JNK経路の活性化を阻害して、細胞死を抑制する作用を持つことが明らかとなった。



最近、低酸素環境下で顕著にストレス顆粒が形成されることが明らかにされた。組織低酸素は、心筋梗塞、脳梗塞は固より、炎症や悪性腫瘍など、様々な病的状態で発生し、これらの疾患の病態に深く関与する。特に固形腫瘍内部の低酸素環境下にある癌細胞は、抗癌剤や放射線治療に対して抵抗性であることが知られており、このことが癌を治療する上での大きな問題となっている。MTK1はエトポシドなどの抗癌剤によるp38/JNK経路の活性化とアポトーシス誘導に重要であることから、次に我々は、ストレス顆粒形成によるMTK1の活性化阻害が、低酸素環境下での癌細胞の抗癌剤抵抗性に関与するか検討を行った。まず細胞を低酸素環境 (0.5% O<sub>2</sub>) で培養すると、ストレス顆粒が形成され、MTK1の活性化に必要なRACK1分子が顆粒内に取り込まれることを確認した。さらにこの様な低酸素状況下で細胞をエトポシドで処理すると、正常酸素濃度下の細胞と比較して、p38/JNK経路の活性化が有意に抑制されることを見出した。また、活性型caspase 3の検出やAnnexin V染色により、アポトーシス誘導効率をモニターしたところ、低酸素環境下ではエトポシドによるアポトーシスが抑制されることが明らかとなった。

そこでさらに、この様な低酸素によるアポトーシス阻害の原因が、ストレス顆粒内にRACK1が集積してMTK1-p38/JNK経路が失活する為であるか検証を行った。ストレス顆粒に取り込まれないRACK1点変異体 (RACK1-DE) を作成して細胞に導入すると、ストレス応答MAPK経路の活性化が

回復し、低酸素環境下でもp38/JNKがエトポシドによって効率よく活性化されるようになった。またその結果、エトポシドによるアポトーシス誘導も回復することを確認した。反対に、RNAiを用いて細胞内のRACK1をノックダウンすると、正常酸素濃度下でもエトポシドによるアポトーシスが抑制された。以上の結果から、ストレス顆粒形成によるストレス応答MAPK経路の活性化阻害とアポトーシス抑制が、腫瘍内部低酸素環境下で認められる癌細胞の抗癌剤抵抗性獲得の一因となることが示唆された（右図）。



## 2) 新規ストレス顆粒構成分子の同定

上述の様に本研究によって、ストレス顆粒は翻訳制御に作用するのみならず、シグナル伝達分子とも相互作用して、細胞運命をダイナミックに制御する「ストレス応答シグナル制御複合体」としての機能を併せ持つことが明らかとなった。そこで次に我々は、ストレス顆粒の形成機構と生理機能の全容解明を目指し、ストレス顆粒の未知構成分子の同定を試みた。ストレス顆粒への局在を指標とした遺伝子クローニング法を開発してスクリーニングを行った結果、脱ユビキチン化酵素や、NF- $\kappa$ B経路の制御分子を含む複数のシグナル伝達分子が、実際に細胞内でストレス顆粒内に局在することを新たに見出した。次に、これらの分子がストレス顆粒の形成に必須の分子であるか、又は、受動的に顆粒内に取込まれる分子であるかを判別するため、RNAiを用いて各分子をノックダウンし、ストレス顆粒形成に与える影響を検討した。その結果これまでに、特定の脱ユビキチン化酵素が、顆粒形成に必須の分子であることを見出している。またこの分子の脱ユビキチン化活性を消失させた点変異体を作成して、細胞に強制発現させたところ、ドミナント・ネガティブに作用し、ストレス顆粒の形成が阻害されることも確認した。従って、ストレス顆粒の形成には、顆粒構成分子が持つ脱ユビキチン化活性が重要であることが明らかとなった。現在、この酵素によって特異的に脱ユビキチン化されるターゲット分子を同定するため、質量分析法を利用した蛋白質複合体解析を行っており、複数の結合分子を同定することに成功している。今後さらに、これらの分子が実際に細胞内で脱ユビキチン化酵素のターゲットとなり得るか、また、ストレス顆粒形成にどのような役割を果たしているのかを解明して行きたい。

## 3. 考察

ストレス応答は、細胞運命を決定して生体の恒常性維持を担う、最も重要な生命機能の一つであり、その異常が癌や神経変性疾患などの発症にも深く関与する。しかし、細胞のストレス応答機構には、未だ不明な点が数多く残されている。特にストレス顆粒がストレス応答シグナルの制御に果たす役割は、生物学上未知の領域であり、その解明は医学的にも生物学的にも極めて大きなインパクトを持つと考えられる。これまでストレス顆粒の生理機能として、蛋白質の翻訳制御に作用することのみが報告されてきた。しかしながら本研究により、ストレス顆粒がストレス応答 MAPK 経路の活性化に必要なシグナル伝達分子 (RACK1) を顆粒内に取り込んでその機能を阻害し、p38/JNK 依存的なアポ

トーシスを抑制する、という新たな機能を持つことが明らかになった。私達は現在、ストレス顆粒が多様なシグナル伝達分子と相互作用して、細胞のストレス応答シグナルをダイナミックに制御する多機能構造体である可能性を想定して研究を推進しており、上述の様に脱ユビキチン化酵素や NF- $\kappa$ B 経路などに関与する複数のシグナル伝達分子が、実際に顆粒内に取り込まれることを見出している。ストレス顆粒形成によるストレス応答シグナルの制御メカニズムとその生理機能に関しては、今後さらに研究を推進し、その全容を分子レベルで解明したい。

また、ストレス顆粒と疾患との関連については、癌のみならず、最近、ウイルス感染細胞内でストレス顆粒が形成され、ウイルス蛋白質の合成を阻害して感染防御に寄与すること、また、脆弱 X 症候群の原因遺伝子である FMRP や、脊髄性筋萎縮症の原因となる SMN が、ストレス顆粒の構成分子であり、これらの遺伝子の異常によって顆粒形成が顕著に抑制されることが報告されている。今後さらに、ストレス顆粒の形成異常と疾患との関連を解析して、癌、感染症や神経疾患などの難治性疾患に対する新たな治療法や分子診断法の開発へと研究を進展させて行きたい。最後に、本研究に多大なご援助を頂きましたことを、ここに深く感謝申し上げます。

#### 4. 発表論文、参考文献

Kubota Y, O'Grady P, Saito H, and Takekawa M. *Nature Cell Biol.*, in press

Tomida T, Takekawa M, O'Grady P and Saito H. Stimulus-specific distinctions in spatial and temporal dynamics of stress-activated protein kinase kinase kinases revealed by FRET biosensor. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6117-6127 (2009)

Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, and Takekawa M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nature Cell Biol.* 10: 1324-1332 (2008)

Miyake Z, Takekawa M, Ge Q and Saito H. Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans-autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2765-2776 (2007)

Takekawa, M., Tatebayashi, K., and Saito, H. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Molecular Cell* 18, 295-306 (2005)

Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K. and Saito, H. Smad-dependent GADD45 $\beta$  expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- $\beta$ . *EMBO J.* 21, 6473-6482 (2002)

Mita, H., Tsutsui, J., Takekawa, M., Witten, E.A. and Saito, H. Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal autoinhibitory domain and GADD45 binding. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4544-4555, (2002)

Takekawa, M. and Saito, H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95, 521-530, (1998)