

MAPK phosphatase遺伝子のがん組織における遺伝子解析

増田 公平 [北海道大学遺伝子病制御研究所/客員研究員]

背景・目的

MAPK phosphatase (MKP) は、MAPK cascade の抑制因子の一つである。申請者らは新規 MKP 遺伝子として MKP-5 および MKP-7 を単離し、これらが共に (1) ストレス応答性 MAPK (JNK および p38) 特異的 MKP であり、(2) がん組織のゲノム上欠損が起きる領域に位置することを示した。MAPK cascade 制御の破綻ががん化を導くと考えられていることから、両遺伝子共にかん抑制遺伝子である可能性が示唆された。

本研究は MKP-5 および MKP-7 遺伝子の発現制御ならびにストレス応答の抑制作用の解明を目的とした。

内容・方法

1. MKP-5 および MKP-7 遺伝子の発現制御機構の検討

MKP-5 および MKP-7 は、ストレス応答を負に制御する機能を持ち、発がんに関与することが考えられたので、がん組織由来培養細胞およびがん組織での発現をノーザンブロット法および RT-PCR 法で検討した。また、培養細胞を用いて、細胞外刺激に対する発現誘導性をノーザンブロット法で検討した。

2. MKP-5 および MKP-7 のストレス応答の抑制作用の検討

MKP-5 および MKP-7 は、ストレス応答性 MAPK である JNK および p38 を特異的に抑制する。これらの細胞応答における生理的な役割を明らかにするため、(1) MKP-5 および MKP-7 両遺伝子の恒常発現 HeLa 細胞株の樹立とその解析、(2) ストレス応答を引き起こす細胞外刺激に対する両 MKP 分子種の MAPK 活性化抑制能の検討を行った。

結果・成果

1. MKP-5 および MKP-7 遺伝子の発現制御機構の検討

遺伝子発現を検討するがん組織由来培養細胞として、Jurkat、K562、HL-60、A549、H1299、MCF-7 を用いた。これらすべての細胞株において、ノーザンブロット法により、MKP-5 および MKP-7 mRNA の発現が確認された。ヒトがん組織での両 MKP 遺伝子の発現は現在検討中である。

一方、K562、H1299、A549、MCF-7 に対し、EGF、PMA、 H_2O_2 、sorbitol、UV 照射、ガンマ線照射処理を行い、両 MKP 遺伝子の発現変動をノーザンブロット法により検討した。MKP-5 mRNA の発現量は、これら細胞株すべてに共通して PMA および H_2O_2 処理で上昇し、UV 照射で減少した。ま

た、sorbitol 処理において A549 および MCF-7 で上昇が見られた。MKP-7 mRNA の発現量は、これら細胞株すべてに共通して H_2O_2 処理で上昇し、UV 照射で減少した。また、PMA 処理で A549 および MCF-7 で上昇が見られ、sorbitol 処理において A549 のみ上昇が見られた。これらは、MKP-5 および MKP-7 遺伝子発現が、正・負の両方の制御を受けることを示唆する結果である。

2. MKP-5 および MKP-7 のストレス応答の抑制作用の検討

(1) MKP-5 および MKP-7 両遺伝子の恒常発現 HeLa 細胞株の樹立とその解析

両 MKP 遺伝子の Tet-Off 誘導発現系恒常発現 HeLa 細胞株の樹立を目指したが、細胞株の単離には至らなかった。薬剤耐性の選択後、コロニー化に至らずに細胞が死滅することから、導入した MKP 遺伝子の発現のリークのため細胞の増殖に影響が出たのではないかと考えられた。現在、他の誘導発現システムでの恒常発現細胞株の樹立を試みている。

(2) ストレス応答を引き起こす細胞外刺激に対する両 MKP 分子種の MAPK 活性化抑制能の検討

COS-7 細胞株に両 MKP 遺伝子を一過性に過剰発現させ、共発現させた ERK、JNK および p38 MAPK の活性化への影響を調べた。EGF、PMA、 H_2O_2 、sorbitol、NaCl、UV 照射処理を行い、ウエスタンブロット法により検討を行った。調べた細胞外刺激に対し、MKP-5 は JNK および p38 を強く、MKP-7 は JNK を強く抑制した。また、MKP-7 の Ser-446 が ERK によりリン酸化されることを明らかにした。このリン酸化は JNK 共発現時にも観察され、内在性の ERK によるものであることを明らかにしたが、p38 共発現時には全く観察されなかった。さらに、MKP-7 の C 末端領域欠損変異体が p38 活性化を強く抑制した。このことは MKP-7 の C 末端領域が p38 活性化抑制能を抑制すると考えられた。現在、MKP-7 に関し MAPK 活性化抑制能への C 末端領域の役割を検討している。

今後の展望

本研究により、MKP-5 および MKP-7 遺伝子の発現は、細胞外刺激により各々特異的に制御されていることが明らかとなった。ストレス応答性 MAPK である JNK および p38 は、発生における細胞の分化や適正な細胞死を誘導し、器官形成や形態形成に関わることで報告されている。ストレス応答性 MAPK に対する特異的な活性抑制因子である MKP-5 および MKP-7 の遺伝子発現制御の存在を明らかにしたことにより、当初の目的である発がんのみならず、発生での MKP 分子種の機能解明において新たな展開が望まれる。