

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、両遺伝子共にが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プロット法および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プ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、ノーザンプロット法により、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プ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ド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、ウエスタンプ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に關し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が報告されている。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。