

CDKインヒビターによるアポトーシス制御

梶原隆太郎¹、福重翔太¹、田邊香野¹、乾 誠治¹

Cyclin-dependent kinase inhibitors in the regulation of apoptosis

Ryutaro Kajihara¹, Shota Fukushige¹, Kano Tanabe¹, Seiji Inui¹

Abstract :

Cell division relies on the activation of cyclins, which bind to cyclin-dependent kinases (CDKs) to induce cell cycle progression towards S phase and later to initiate mitosis. Since uncontrolled cyclin-dependent kinase activity is often the cause of human cancer, their function is tightly regulated by cell-cycle inhibitors such as the p21 and p27 Cip/Kip proteins. Following anti-mitogenic signals or DNA damage, p21 and p27 bind to cyclin-CDK complexes to inhibit their catalytic activity and induce cell-cycle arrest. Interestingly, recent discoveries suggest that p21 and p27 might have new activities that are unrelated to their function as CDK inhibitors. The identification of new targets of Cip/Kip proteins as well as evidence of Cip/Kip cytoplasmic relocation have revealed unexpected functions of these proteins in the regulation of apoptosis. This article discusses recent insights into this possible additional functions of p21 and p27.

Key words : Cell cycle, Cyclin, Cyclin-dependent kinase, p27, p21, Apoptosis

I. はじめに

真核細胞は一定の時間周期で有糸分裂 (mitosis) とDNA複製 (synthesis) を繰り返しており、この周期は細胞周期とよばれている。DNA複製によりDNAが倍加する時期をS期とよび、倍加したDNAが有糸分裂によって娘細胞に等分される時期をM期とよぶ。S期とM期の間の期間は間期 (gap) とよばれ、SからMに移る間をG2期、MからSに移る間をG1期という。増殖を停止している細胞はG1期にあるが、栄養や増殖因子な

どの条件が整うとS期に入り、G2、M期を経てG1期に戻る。栄養が絶たれたりすると、細胞は増殖を止めG1期で増殖を停止するが、この状態が長く続くとG0期という休眠状態に入ることもある¹ (図1)。

この細胞周期を駆動させているエンジンは、調節サブユニットであるサイクリンと、触媒サブユニットであるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の複合体の活性である。サイクリン/CDK複合体にはM期で主に働くものとS期で主に働くものがある。酵母ではこの場合のCDKは1種類であり、結合するサイクリンがM期とS期で異なるし

1 熊本大学大学院保健学教育部・検査技術科学分野・病態情報解析学領域

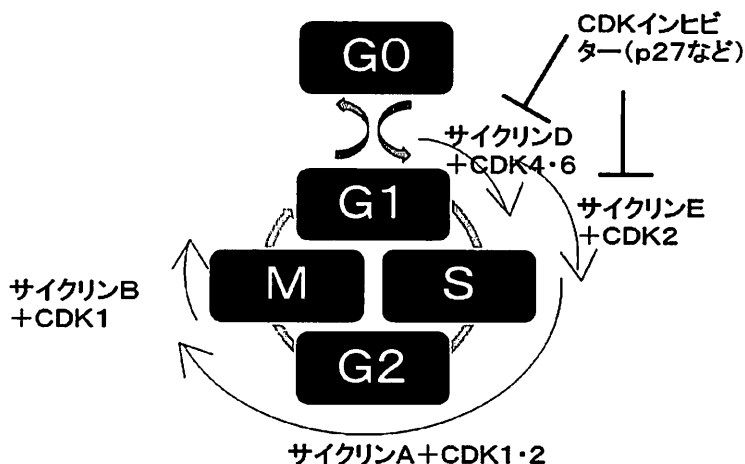


図1 細胞周期とサイクリン/CDK複合体

くみになっている。それに対して、哺乳類ではM期とS期で働くCDKが異なり、M期ではCDK1、S期ではCDK2が、さらにG0-G1期ではCDK4/6が重要な役割を果たす。これらは、それぞれ特異的なサイクリンと結合し機能を発揮する。すなわち、CDK1はサイクリンAまたはB、CDK2はサイクリンAまたはE、CDK4/6はサイクリンDと協調する²⁾(図1)。

これらのサイクリン/CDKエンジンの異常は、無制限な細胞増殖を引き起こして腫瘍に至り、個体を殺すこともある。エンジンの暴走を起こさないようにブレーキ役を担っているのが、CDKインヒビター (CKI) である。

II. CDKインヒビター

CDKインヒビターは主に2つのファミリーに大別される。1つはINK4ファミリーと呼ばれ、サイクリンとは結合せず、CDK4/6のみと結合し、したがって初期のG1期に特異的である。もう1つはCip/Kipファミリーと呼ばれており、p21やp27が有名である。これらはすべてのサイクリン/CDK複合体に対してその活性を抑制する。しかしながら、それらの発現時期や抑制活性の程度から、細胞内では主にサイクリンE/CDK

2複合体の活性を抑制し、細胞のS期への進行を阻害していると考えられている³⁾(図1)。

III. CKI以外の役割をもつCip/Kipファミリー

CDKインヒビターの研究が進むにつれて、最近ではCip/KipファミリーはCKIとしての役割以外の機能をもつことが分かってきた。新しい機能としてassembly factor⁴⁾、アポトーシスの制御、細胞遊走の制御または転写因子⁵⁻¹⁰⁾として働くことが知られている。

IV. Cip/Kipタンパク質の細胞内局在の変化

サイクリン/CDK複合体は核内で機能しているので、Cip/KipファミリーがCKIとして働くためには、核内に局在することが必要である。p21とp27はC末端側に存在する核移行シグナルにより核内に移行するが、核膜孔結合タンパク質Nup/mNPAP60との結合もまたp27の核内移行に重要な役割を果たしていることが分かっている¹¹⁾。

しかしながら、Cip/Kipタンパク質がassembly factor、アポトーシスの制御、細胞遊走制御の働きをするときには、これらのタンパク質が細胞質に存在していることが重要であることが示唆され

ており¹²⁾、また、p27は増殖刺激により10番目のセリン残基がリン酸化され、核外移行トランスポーターであるCRM 1と結合して、細胞質に移行することが知られている^{13,14)}。

V. アポトーシス

アポトーシスとは、細胞死の一形態で、電子顕微鏡による観察から病的に定義されたものである。アポトーシスでは、核や染色体、細胞質の凝集、細胞膜上の微細構造の消失に始まり、最終的に核や細胞の分断化にいたる。そして、この死細胞は、壊れて細胞内の酵素などを放出することなく、周囲のマクロファージなどにより貪食を受けて消失する。成体では、癌細胞やウイルス感染細胞の除去に働くほか、発生過程においては、さまざまな臓器・器官の形態形成や細胞数の調整に関与する。

過度の物理・化学的刺激により引き起こされる偶発的細胞死であるネクロシスとしばしば対比される。ネクロシスでは、核の変性はほとんど認められず、ミトコンドリアの膨潤、細胞の肥大を伴い、最終的に細胞膜が破裂して細胞融解にいたる。

アポトーシスを開始させる細胞内のシグナル伝達経路は主に線虫の遺伝学的研究から明らかになった。その後線虫や昆虫から哺乳類まで多細胞動物のアポトーシス経路には共通点が多いことが明らかとなった。これは非常に複雑に調節されるネットワークであるが、さまざまな刺激によって活性化されたアポトーシスシグナルは、一部を除いて多くの場合ミトコンドリアに集約して、最終的にカスパーゼと総称される一連のプロテアーゼが中心的な働きをし、下流のカスパーゼを順に開裂・活性化していく。これによって活性化したカスパーゼ3がその他のタンパク質を分解するなどしてアポトーシスを実行する。

その過程は、おおよそ次のようにまとめられる(図2)。

- ① TNFなどのサイトカインやFasリガンドなど(デスリガンドによる)細胞外からのシグナルは、それらの受容体(デスレセプター)を介してカスパーゼ8、-10を活性化し、これらがカスパーゼ3を活性化する。また、一部はミトコンドリアにシグナルが伝わり、ミトコンドリアからシトクロムcの漏出を引き起こし、カスパーゼ9、そしてカスパーゼ3を活性化する。
- ② DNA損傷などによりp53が活性化すると、転写依存的または非依存的に様々な分子を修飾する。この際に、ミトコンドリア上のBcl-2などの制御(またはミトコンドリア自体の異常)が必須の経路となっており、最終的にミトコンドリアからのシトクロムc漏出からカスパーゼ3の活性化を引き起こす。
- ③ 小胞体ストレス(小胞体で異常なタンパク質が生成するなど)により、ストレスキナーゼ(SAPK)と呼ばれるASK1/JNK, p38などのキナーゼが活性化すると、ミトコンドリアのアポトーシス制御分子が修飾され、最終的にカスパーゼ3が活性化する。

このように、アポトーシスはさまざまな刺激によって誘導されるが、各刺激によって活性化されたアポトーシスシグナルは、最終的にほとんどすべての細胞死に共通のマシナリーに集約される。FasやTNFレセプターによる刺激の一部を除いて、多くの場合ミトコンドリアが集約される場となる。ミトコンドリアがアポトーシスの刺激を受けるとその膜透過性が亢進し、外膜と内膜により区画された膜間スペースに存在するシトクロムcやSmac/Diablo、Htr2/Omiなどのアポトーシス誘導タンパク質が細胞質に漏出する。漏出したシトクロムcはATP、Apaf-1と共同で開始カスパーゼであるカスパーゼ9を活性化する。活性型カスパーゼ9は実行カスパーゼであるカスパーゼ3(-7)を活性化しアポトーシスが実行される。また、Smac/DiabloやHtr2/Omiはカスパーゼの阻害タンパク質であるIAPファミリータンパク

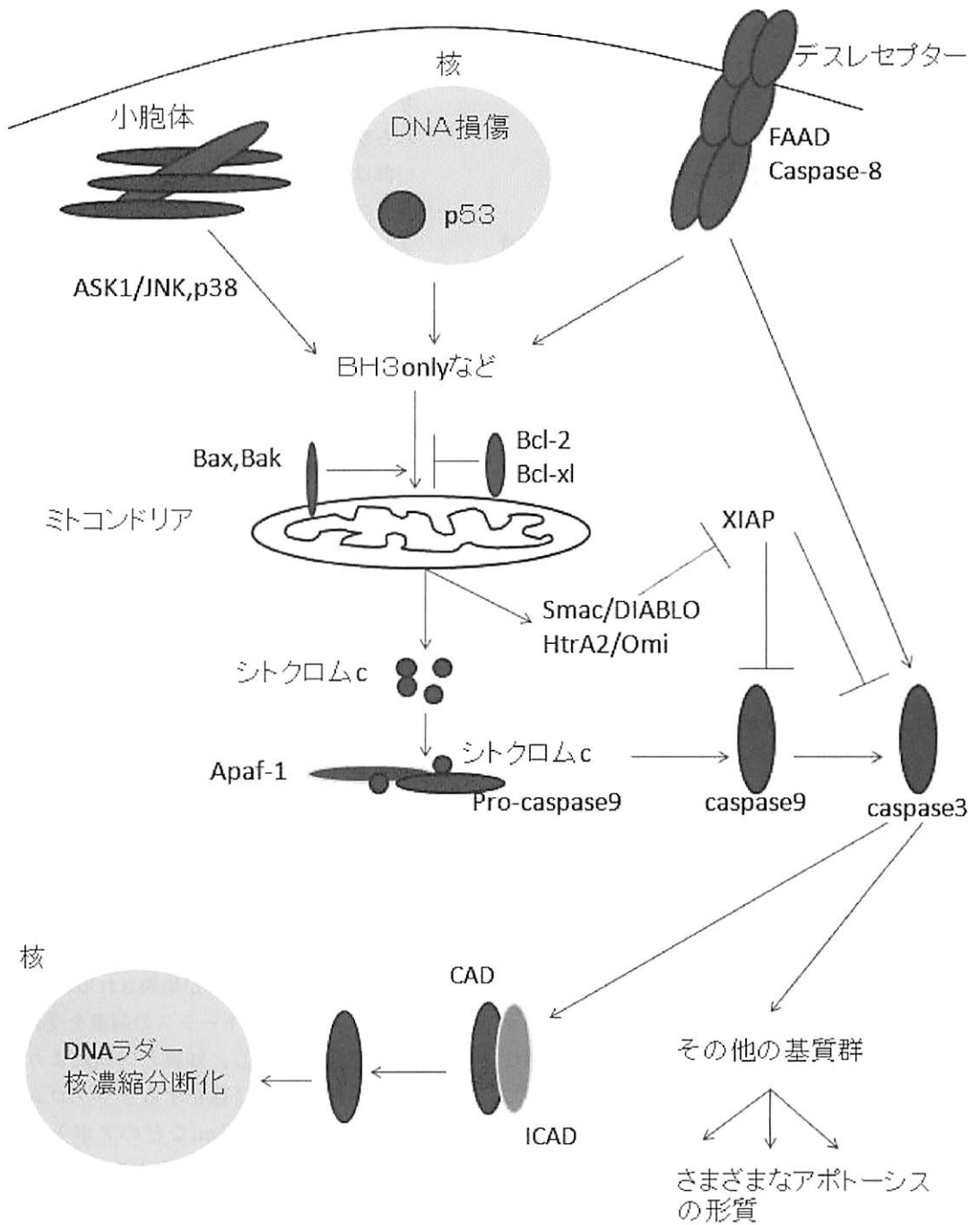


図2 アポトーシスの実行経路

質 (XIAP) の機能を抑制することによりアポトーシス実行に寄与する。Bcl-2ファミリータンパク質は主にミトコンドリアの膜透過性を制御し、これらのアポトーシス誘導タンパク質の細胞質への漏出を調整することによってアポトーシスシグナルのon/offを決定している。Bcl-2ファミリータンパク質にはアポトーシスを抑制するものと促進するものがあり、機能と構造から3つのグループに分けられている。Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1に代表されるアポトーシスを抑制するグループはBcl-2サブファミリーと呼ばれ、BaxとBakに代表されるアポトーシスを促進するグループはBaxサブファミリー、BidやBimに代表されるアポトーシスを促進するグループはBH3-onlyタンパク質と呼ばれている。これら3つのグループのうち、BH3-onlyタンパク質はBcl-2サブファミリーやBaxサブファミリーの上流に位置し、これらの分子と直接結合することによって、その機能をそれぞれネガティブ、ポジティブに調節している。すなわち、上流のアポトーシスシグナルをミトコンドリアに伝えるシグナル伝達タンパク質として機能している (図3)。Bcl-2サブファミリーはBaxサブファミリーやBH3-onlyタンパク質と直接結合し、これらを抑制的に調節している。このよ

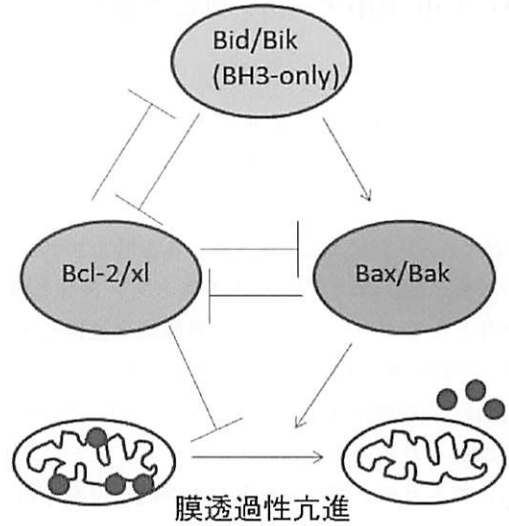


図3 Bcl-2ファミリータンパク質の機能

うな諸反応の総体として、アポトーシス促進タンパク質の活性が抑制タンパク質の活性を凌駕した場合に膜透過性亢進が誘導され、アポトーシスが実行される¹⁵⁾ (図4)。

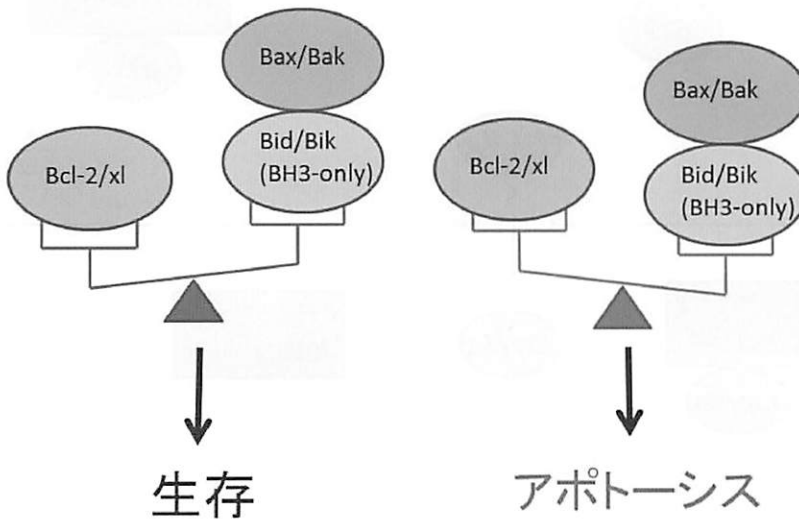


図4 Bcl-2ファミリータンパク質のバランスでアポトーシスのon/offが決定される

VI. Cip/Kipタンパク質とアポトーシス

(図5)

p21とp27は異なるメカニズムでアポトーシスを制御していると考えられている。

p21を結腸癌細胞株でノックアウトすると、DNAダメージによるアポトーシスを増加させる¹⁶⁾。

また、p21は、プロスタグランジンA₂とp53を介したアポトーシスから、結腸癌細胞株とメラノーマ細胞株を保護することが知られている^{17, 18)}。p21はp53の標的遺伝子であり、p53はp21の転写を増加させるので、p53を介するアポトーシスにおいてネガティブフィードバック的な役割を担っていることが想像される。

さらに、p21を細胞に発現させると、抗アポトーシスタンパク質を産生させ、パラクリン作用によって、近隣の細胞の生存に影響を与える¹⁹⁾。

また単球への分化、または神経分化の過程で、p21は細胞質に現れ^{20, 21)}、そこでSAPK (JNKとp

38) またはASK1と結合し、それらのキナーゼ活性を抑制することによって、アポトーシスを抑えることが知られている^{20, 22)}。

このほかに、p21はミトコンドリア上でプロカスパーゼ3と結合し、カスパーゼ3の活性化を抑制して、Fas誘導によるアポトーシスを抑えることから、p21の細胞内局在が、アポトーシス制御において重要であることが示唆される^{23, 24)}。

p21はアポトーシスシグナルを抑制するので、逆に、アポトーシスが起きるときにはp21は不活化されなければいけないことが予想される。

実際、カスパーゼ3はp21の核移行シグナルを切断し、細胞質に局在させることによって、CDK2活性を上昇させてアポトーシスを引き起こす²⁵⁾。

dominant-negative formのCDK2を発現させ、CDK2活性を抑制させるとアポトーシスが抑えられ、また、CDK2を過剰発現させるとアポトーシスを起こすことから、CDK2がアポトーシスに関与していると考えられている²⁵⁾。この場合、p21

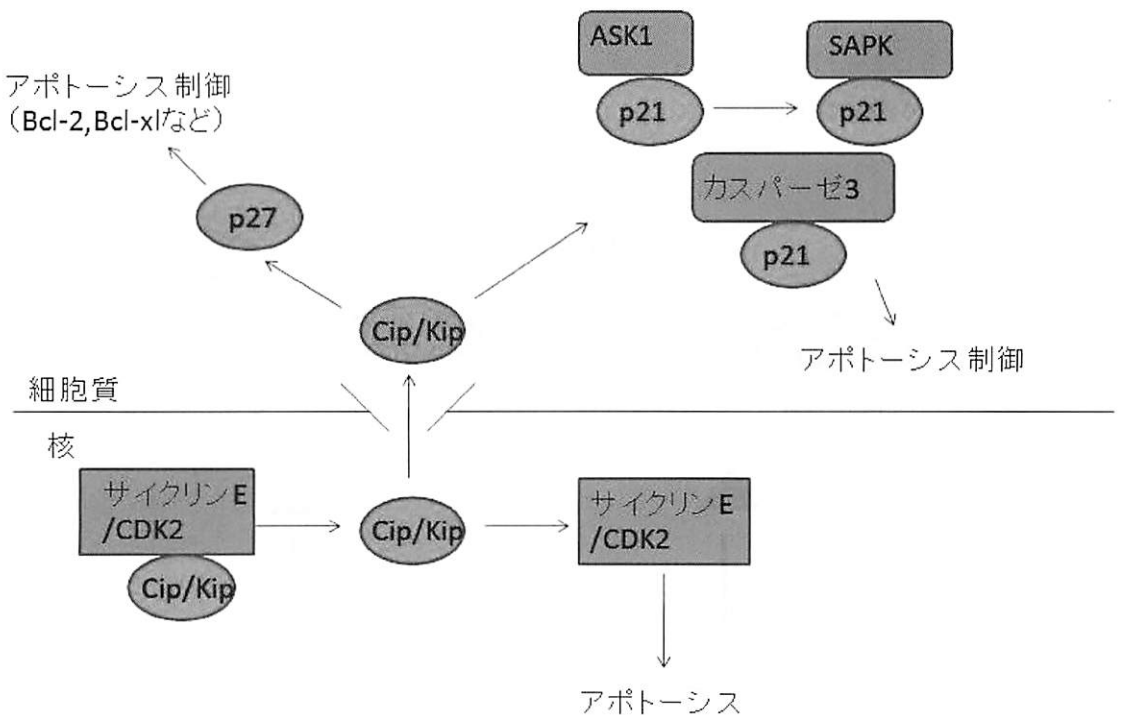


図5 CDKインヒビターによるアポトーシスの制御

のアポトーシス抑制効果は、核内移行とCDK2活性化抑制に依存しているということになる。

しかしながら、カスパーゼによるp21の細胞質内局在は、前述のとおりSAPK、ASK1またはミトコンドリア上でのアポトーシス抑制を起こしうるので、p21はアポトーシス誘導のネガティブフィードバックに寄与しているのかもしれない。

p27のアポトーシスに対しての機能は、p21ほど明確に分かっていない。p27の過剰発現が、アポトーシス抵抗性を与えるという研究報告がある一方、別の研究では、アポトーシスを引き起こさせるという報告があり²⁶⁾、用いるアポトーシス刺激や細胞株などの実験方法の違いによって、現れてくる結果が異なってきているようである。

p21と同様に、p27もカスパーゼ3によって切断されるので、これによってCDK2活性を上昇させ得る²⁵⁾。しかしながら、p21と異なり、切断によってp27が細胞質に局在するようになることは確認されていない。さらに、p27が抗アポトーシス作用を示すことが確認されている白血病細胞で、p27の切断とCDK2活性または細胞内局在は関連していない。このことは、p27の抗アポトーシス作用は、CDK2以外を標的にしていることが予想される。このことを示唆するように、切断型のp27を過剰発現させると、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出を抑制させ、アポトーシスに抵抗性を示すことがわかっている²⁷⁾。さらに、p27は抗アポトーシスタンパク質であるMcl-1、Bcl-2

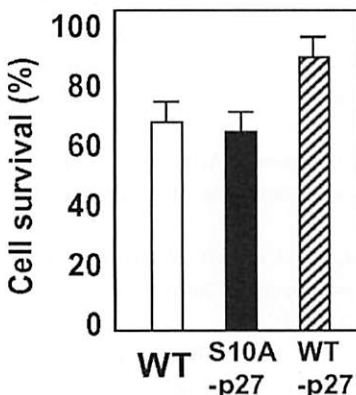


図6 HeLa細胞 (WT) にp27 (S10A) とp27 (WT) を過剰発現後、TNF刺激によりアポトーシスを誘導した。

などの量も調節することが報告されている^{27,28)}。

筆者らは、10番目のセリン残基をアラニン残基に置換した変異型p27を作成し、この変異型p27 (S10A) と野生型p27 (WT) をHeLa細胞で過剰発現した。これらの2種類の過剰発現細胞をTNF刺激によりアポトーシスを誘導すると、p27 (WT) を発現させた細胞のみアポトーシス耐性となり、p27 (S10A) を発現した細胞のアポトーシス感受性は対照細胞と変わらなかった (図6)。10番目のセリン残基は、p27の核外移行に必要であるため、p27 (S10A) は専ら核内で発現し、p27 (WT) は核外に発現した。このときのBcl-x_Lの発現量を調べてみると、p27 (WT) を発現させた時にのみBcl-x_Lが増加していることが分かった (図7)²⁹⁾。筆者らのこの研究結果から、p27は

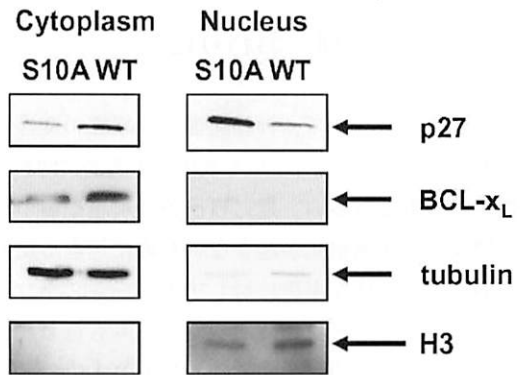


図7 HeLa細胞にp27 (S10A) とp27 (WT) を過剰発現後、細胞質分画と核分画に分け、抗p27抗体と抗Bcl-x_L抗体にてウエスタンブロットした。抗α-tubulin および抗histone H3抗体は、それぞれ細胞質または核分画の分離精度の指標として用いた。

Bcl-x_Lタンパク量の調節を介してアポトーシスを抑制する作用をもち、しかもその作用を発揮するためにはp27が細胞質に局在することが重要であることを示した。

興味深いことに、Bcl-2またはBcl-x_Lを過剰発現させた細胞では、逆に、p27の量が上昇し、G0からG1への移行が遅れることが報告されている³⁰⁾。Cip/Kipタンパク質によるアポトーシス制御メカ

ニズムは、まだまだ解明しなければいけないことが山積みであるが、これらのタンパク質が、アポトーシスからの回避というアドバンテージを細胞に与えている可能性があるということは確かなようである。腫瘍細胞からしてみれば、Cip/Kipタンパク質の核外移行によって、CDKインヒビターブレーキを緩めさせ、サイクリン/CDK複合体エンジンの暴走を引き起こし、無限増殖能を獲得できる。しかも、その細胞質内Cip/Kipタンパク質によって、抗アポトーシス能も獲得し、不死化するという一石二鳥な事象である。

このように、細胞のがん化をこれら細胞周期制御因子の異常という分子レベルでの視点で捉えることが可能となり、今日では、癌で異常をきたしている細胞周期制御因子を標的にした制癌剤の開発が盛んに進められている。

VII. おわりに

劇症肝炎、エイズ、神経組織や筋組織の変性性疾患など細胞死が病態形成や死因に本質的に関わっている疾患は数多い。逆に自己免疫疾患や癌の様に起きるべき細胞死が起きないために起きる病気もある。この様な疾患に対しアポトーシスをコントロールすることにより治療する試みも行われている。しかも、現代の先進国の死因第1位である癌については、アポトーシスだけではなく、細胞周期の異常もともっており、CDKインヒビターが発癌に非常に密接に関与しているので、CDKインヒビターによるアポトーシス制御のさらなる解明が重要になってくると思われる。

文 献

- 1) 田村隆明 他：基礎分子生物学（第2版）、181-182. 東京化学同人、東京、2002
- 2) 中山敬一 他：実験医学、522. 羊土社、東京、2002
- 3) 中山啓子 他：実験医学、527. 羊土社、東京、2002
- 4) Cheng, M. et al. : The p21 (Cip1) and p27 (Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18 : 1571-1583, 1999
- 5) Kitaura, H. et al. : Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21 (cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J. Biol. Chem.* 275 : 10477-10483, 2000
- 6) Coqueret, O. and Gascan, H. : Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J. Biol. Chem.* 275, : 18794-18800, 2000
- 7) Harris, T.E. et al. : CCAAT/enhancer-binding protein-alpha cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding. *J. Biol. Chem.* 276, : 29200-29209, 2001
- 8) Snowden, A.W. et al. : A novel transcriptional repression domain mediates p21 (WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 20, : 2676-2686, 2000
- 9) Delavaine, L. and La Thangue, N.B. : Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene* 18 : 5381-5392, 1999
- 10) Chamovitz, D.A. and Segal, D. : JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO Rep.* 2, : 96-101, 2001
- 11) Muller, D. et al. : Cyclin E-mediated elimination of p27 requires its interaction with the nuclear pore-associated protein mNAP60. *EMBO J.* 19, : 2168-2180, 2000
- 12) Olivier Coqueret : New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *TRENDS in Cell Biology.* 13 :65-70, 2003
- 13) Rodier G, Montagnoli A, Di Marcotullio L, et al. : p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J.* 20 : 6672-6682, 2001
- 14) Ishida N, Hara T, Kamura T, et al. : Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem.* ,277: 14355-14358, 2002
- 15) 辻本賀英：バイオ研究マスターシリーズ 細胞死・アポトーシス集中マスター、羊土社、東京、2006
- 16) Bunz, F. et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282: 1497-1501, 1998
- 17) Gorospe, M. et al. : Protective role of p21 (Waf1/Cip1) against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6654-6660, 1996
- 18) Gorospe, M. et al. :p21 (Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14: 929-935, 1997
- 19) Chang, B.D. et al. :Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and aged-related diseases. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A. 97: 4291-4296, 2000
- 20) Asada, M. et al. :Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. EMBO J. 18: 1223-1234, 1999
- 21) Tanaka, H. et al. : Cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. J. Cell Biol. 158: 321-329, 2002
- 22) Shim, J. et al. : A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stressactivated protein kinases. Nature 381: 804-806, 1996
- 23) Suzuki, A. et al. : Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. Oncogene 17: 931-939, 1998
- 24) Suzuki, A. et al.:Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. Mol. Cell. Biol. 19: 3842-3847, 1999
- 25) Levkau, B. et al. :Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. Mol. Cell 1: 553-563, 1998
- 26) Philipp-Staheli, J. et al. :p27 (Kip1) : regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. Exp. Cell Res. 264: 148-168, 2001
- 27) Eymin, B. et al. :p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells. Oncogene 18: 1411-1418, 1999
- 28) Woltman, A.M. et al. : Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. Blood, 26:2002
- 29) Kajihara R et al.: CaMKII phosphorylates serine 10 of p27 and confers apoptosis resistance. Biochem. Biophys. Res. Commun. 401 : 350-355, 2010
- 30) Courtney Greider et al. : BCL-xL and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. Oncogene: 7765-7775, 2002