

# 知識天地

## 淺談 DAPK 與癌症生成

王琬菁博士後、陳瑞華研究員（生物化學研究所）

「癌症」又叫“惡性腫瘤”，人人聞之而色變。癌症的英文為“CANCER”，這字源出於古希臘，原本指的是螃蟹“CRAB”，象徵腫瘤的外觀貌似人體某些皮膚癌形狀，更意味著癌細胞會像螃蟹般四處蔓延、破壞、橫行無阻，為害人體的事實。它指的是人體內一群不正常的細胞，因為生長脫離了生物體嚴密的控制，因而快速生長以致影響生物體內其他正常的細胞組織。最可怕的是，癌細胞會隨著血液或淋巴系統擴散到身體的其他部位，也就是腫瘤轉移（metastasis），危害生命安全。

據估計，正常成人個體內至少有十兆以上的細胞。在正常情況下，這些細胞的生長、分化、死亡等生理功能都受到非常嚴密的控管，假使因外來的刺激或內在基因的突變，使細胞無法再維持正常的生理功能，這些不受控管的細胞我們就稱它為癌細胞。癌細胞最主要的特色就是會異常地快速增生，且喪失了細胞調控自身細胞凋亡（apoptosis）的機轉。

治療癌症的最好方式就是從了解癌症開始，醫學界至今仍無法斷定真正致癌的因素，不過可確定的是，癌症是由多種因素所造成，除了後天環境的影響，像是吸入過量的油煙、柴油廢氣或二手煙、紫外光照射、飲食不正常等均會增加罹癌機率。因分子生物學的技术逐漸成熟，近來學界對於癌症生成（tumorigenesis）有了較深入的研究，讓我們進一步了解癌細胞生成的機轉。我們知道造成癌症的原因可分為兩種，一種是當致癌因子（oncogene）被活化使細胞失控而快速增長，另一種則是腫瘤抑制因子（tumor suppressor）喪失功能，使細胞無法修復其不正常現象和引發細胞凋亡，最終導致癌症。

致癌基因的蛋白，需要先經過被活化才能顯現其致癌能力。致癌因子活化造成的影響包括細胞內訊息傳遞路徑的改變及生長調控的功能失調，目前許多致癌因子已經被找出，它們包括 Src、E2F、Myc、Ras、c-fos 等。腫瘤抑制因子則可發揮保衛的機轉，在癌症的研究上也是相當重要的課題。腫瘤抑制因子指的是一群蛋白，它們主要的工作是在細胞內修復壞損的基因或是使失控的細胞走向細胞凋亡，如果它們的功能消失，癌細胞便會像脫疆野馬般地生長。最有名的腫瘤抑制因子是 p53，p53 是 cell cycle 中的煞車系統，它在緊急狀況下（例如 DNA 複製有缺陷時）會暫時停止細胞分裂，啟動修復機制，在損害嚴重時，就會促進細胞凋亡，是相當重要的腫瘤抑制因子，目前約有半數的癌症都出現 p53 缺陷的特徵。但除了 p53 之外，許多的蛋白也被證明扮演腫瘤抑制的角色，像 PTEN、Rb、APC、NF1 和我們接下來所要介紹的 DAPK 等，都被證實具有於腫瘤抑制的功能。

本研究室數年來一直致力於研究 DAPK，全名為死亡相關蛋白激酶（Death associated protein kinase），是一個重要的腫瘤抑制因子。最初是由以色列的 Kimchi 實驗室研究團隊，在 1995 年利用功能性分析實驗中所找到。DAPK 是一個具有 160kDa 分子量的大分子，也是一個 Ser/Thr 蛋白激酶，會受到鈣離子和攜鈣素所共同調控。仔細去看它的結構，DAPK 具有激酶活性區塊（kinase domain）、鈣離子和攜鈣素調控區塊（Ca/CaM regulated domain）、ankyrin repeats、細胞骨架結合區塊（cytoskeleton binding domain）和死亡區塊（death domain）（Fig.1）。DAPK 屬於 DAPK 家族中的一員，直至今日，總共有 5 個家族成員被找出（Fig.1），除了我們今天要介紹的 DAPK 外，還有 DRP、ZIPK、DARK1 和 DARK2。他們被歸類於同一個蛋白家族，主要原因是它們在激酶活性區塊有高度的相似性。目前也已經知道，當 DAPK 家族成員在細胞內被過度表現時，也都會在細胞中看到細胞凋亡的現象。

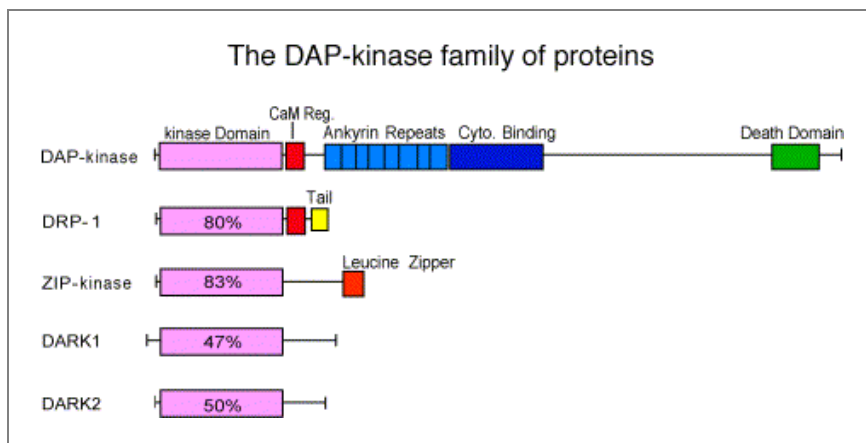


Fig. 1 DAPK 家族的家族成員和功能區塊

DAPK 如何發揮腫瘤抑制的功能呢？根據文獻，知道在許多種不同類型的癌症病人中，DAPK 蛋白常常是不表現或者是功能被抑制。在細胞中，當 DAPK 被過度表現，則會促進細胞走向細胞凋亡 (apoptosis)，這暗示 DAPK 和癌症生成有一定的關係存在。且已知在許多促死因子諸如 Fas、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、INF- $\gamma$ 、Ceramide 等的刺激下，DAPK 會參與在這些促死因子刺激下所產生的訊號路徑，加上表現 DAPK 會抑制致癌因子 (如 c-myc 或 E2F) 所造成的細胞轉型 (transformation) 現象，在動物實驗也觀察到 DAPK 的作用和腫瘤的轉移有正相關。在在的證據都顯示，DAPK 的確在調控細胞正常生理活性上非常重要。

至於 DAPK 執行其腫瘤抑制的分子機轉為何？在這幾年的研究中，我們知道這主要是因為 DAPK 會抑制 Integrin 的活性。Integrin 是存在於細胞膜上的一種受體，主要的功能在傳遞外界訊號到細胞內。在附著性細胞 (Adherent cell) 中，Integrin 的角色格外重要，因為這些細胞十分依賴由細胞外基質 (Extracellular matrix) 所提供的生存訊號，所以當 Integrin 的活性被抑制無法傳遞生存訊號給細胞，就會引發細胞凋亡，我們稱之為失巢效應 (Anoikis) (Fig.2)。

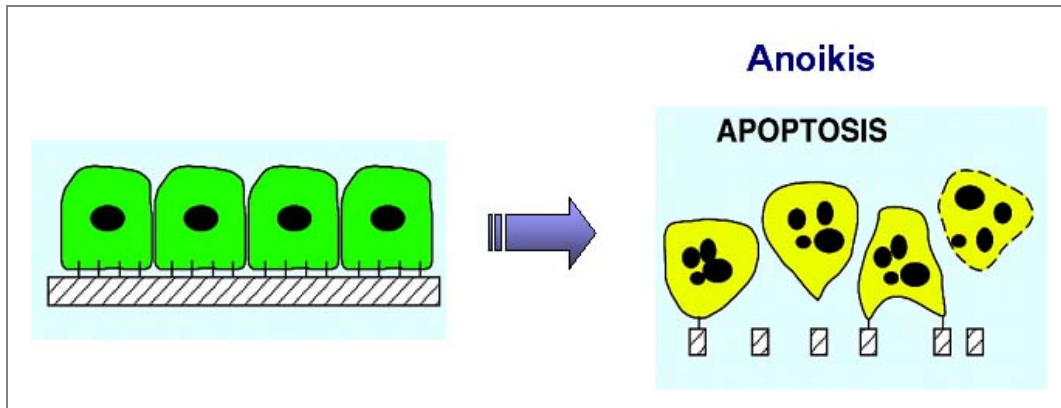


Fig. 2 失巢效應 (Anoikis)

在我們過度表現 DAPK 到附著性細胞時，發現原本應該和細胞間質 (matrix) 緊密附著的細胞變得貼附得不甚牢靠，這是因為 DAPK 抑制 Integrin 的活性，進而破壞細胞和細胞間質的交互作用。如此一來，DAPK 過度表現的細胞便不能正常接受從細胞間質所傳來的生存訊號，Integrin 所參與相關的生存路徑也因此被抑制，導致 p53 的活性上升最後造成細胞凋亡。然而，我們知道許多的癌細胞，其 p53 是沒有表現或不具活性的，是不是在這類的癌細胞中 DAPK 就沒有作用呢？答案是否定的。在這類的細胞中，我們實驗室也看到了 DAPK 的另外一種作用機制：DAPK 藉由抑制 Integrin 活性的特性，影響了細胞運動 (cell motility)。我們發現當過量表現 DAPK 時，會破壞細胞剛開始爬行所需的細胞極性 (cell polarity) 之形成，如此一來，細胞無法立即地決定它要往哪去，使得最後我們看到 DAPK 過度表現的細胞，會移動得比沒有過度表現 DAPK 的細胞慢很多。這樣的結果也可以應用在癌細胞的侵入能力 (invasion) 和腫瘤轉移 (metastasis) 能力的課題上。當我們表現 DAPK 到原本只有少量 DAPK 表現的癌細胞中，可以抑制這類癌細胞的侵入和腫瘤轉移能力。反之，在原本就會高度表現 DAPK 的細胞中抑制 DAPK 的表現，則癌細胞的侵入能力和腫瘤轉移能力確實增強。這顯示 DAPK 在生理活性上有促進細胞凋亡和抑制細胞移動的能力，進而說明 DAPK 它在腫瘤抑制上的重要性 (Fig.3)。

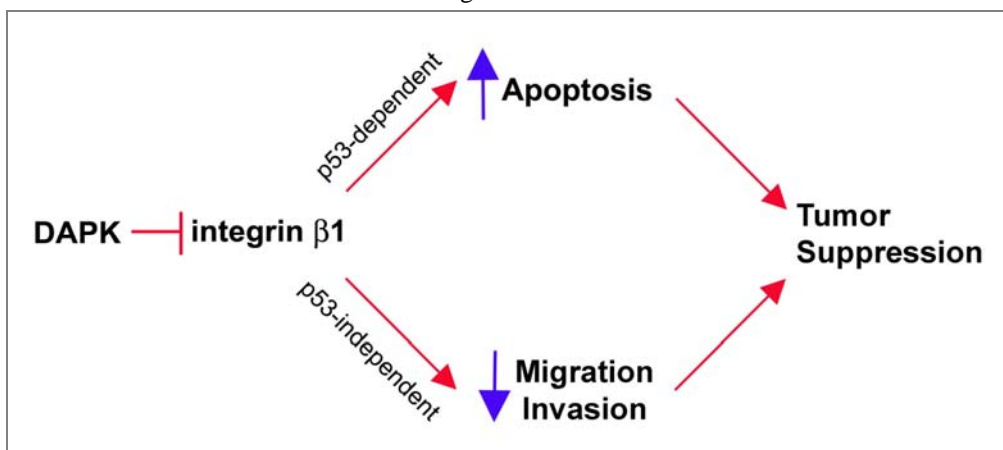


Fig. 3 DAPK 的腫瘤抑制途徑

研究 DAPK 如何被活化也是非常重要，因為幾乎所有 DAPK 的生理功能都是藉由它的激酶活性所調控。由於 DAPK 是一個相當具大的分子，許多的轉譯後修飾 (post-translational modification) 被證實會影響 DAPK 的激酶活

性。目前已知會發生於 DAPK 上的轉譯後修飾的總共有四個。最早知道的是當 DAPK 的 S308 位置被磷酸化後，會影響 DAPK 攜鈣素調控區塊和活性區間 (catalytic cleft) 之間結合上的穩定性，進而干擾攜鈣素和攜鈣素調控區塊的結合作用，最後會抑制 DAPK 的活性。

過度表現 DAPK 會造成細胞死亡，所以活化細胞生存的訊號路徑被推測可以抑制 DAPK 的活性。在這樣的假設前提下，發現當細胞在 PMA 刺激下活化 Ras-MAPK 訊號路徑後，DAPK 本身的磷酸化程度會上升。利用質譜去分析 DAPK 的轉譯後修飾，發現在此訊號傳遞下，DAPK 發生磷酸化的主要位置是 S286。也找出會作用於 DAPK S286 的蛋白激酶是 RSK (p90 ribosomal S6 kinase)。此外，在細胞實驗中，看到 RSK 對 DAPK 的修飾作用會減弱 DAPK 所引發的細胞凋亡。因為 RSK 是一個致癌因子，顯示在致癌因子 RSK 被活化後，其癌症生成的機轉包含會抑制 DAPK 蛋白激酶活性。

ERK 是細胞存活所需要的一種 Ser/Thr 蛋白激酶，我們實驗室也證實它會磷酸化 DAPK。我們找出 ERK 磷酸化 DAPK 的位置是在 S735。當 ERK 將 DAPK 的 S735 磷酸化後，會活化 DAPK 的活性。由於 DAPK 只存在於細胞質，也由於 DAPK 和 ERK 會交互作用，當 DAPK 被活化會產生了另一個效應，就是 DAPK 會抑制 ERK 蛋白激酶進入細胞核內。如此一來，ERK 就無法執行它原本會促進細胞生長的功能。不僅如此，當比較多的 ERK 留在細胞質，還會磷酸化更多的 DAPK S735，進而更增強 DAPK 的活性和的生理功能。所以 ERK 和 DAPK 在特定的情況下，存在這樣一個正向回饋 (positive feedback) 的機制，最終大量活化 DAPK 而導致細胞凋亡。

最近，我們實驗室找到 DAPK 上的第四個轉譯後修飾位置：DAPK 的 Y491 和 Y492。我們發現，當 DAPK Y491/Y492 沒有被磷酸化，此時的 DAPK 具有較高的活性和下游生理功能。反之，當 DAPK 的 Y491/Y492 被磷酸化，這樣一個發生於 DAPK ankyrin repeats 區塊上的磷酸化，會造成 DAPK 產生分子內或分子間的交互作用，進而改變 DAPK 的結構，而 DAPK 結構上的改變則會減弱 DAPK 的活性。我們還找出磷酸化 DAPK Y491/Y492 位置的蛋白激酶為 Src，也發現會移除 Src 所造成 DAPK Y491/Y492 磷酸化的去磷酸酵素 (tyrosine phosphatase) 為 LAR。簡而言之，我們證實 Src 和 LAR 會互相拮抗、共同作用於 DAPK 這個腫瘤抑制因子上。

在許多癌細胞中，Src 是會被活化的重要致癌因子。我們分析數十個腫瘤細胞株和一些癌症病人的檢體，發現具有高度 Src 活性的樣本中，DAPK Y491/492 的磷酸化程度也偏高，且這兩者存在很高的正相關。既然 Src 會經由磷酸化 DAPK Y491/492 抑制 DAPK 的活性，且因為 DAPK 是一個腫瘤抑制因子，所以這樣的結果顯示，Src 被活化後所導致的癌症生成 (Tumorigeneis) 路徑有部份和 Src 抑制 DAPK 活性有關。

經由許多實驗室共同努力，已逐漸地揭開 DAPK 這個腫瘤抑制因子的神秘面紗，如同一條條 DAPK 相關的訊號路徑圖被解開一般，對於其他的致癌因子或抑癌因子，在研究上也是如此。相信隨著我們對基因的功能及調控機轉的研究越來越透徹，在對癌症的篩選和治療上，所能採用的方法也就越多。