

論文内容の要旨

論文題目 BH3-only タンパク質とキナーゼによる細胞死誘導機構の解析

砂山 潤

細胞の生死は細胞死シグナルと生存シグナルの拮抗によって制御されており、この拮抗が崩れると多様な疾患の原因となる。例えば、細胞死シグナルが生存シグナルに比べて過剰になると神経変性疾患などを引き起こすと考えられる。従って細胞死誘導メカニズムを解明することで、各種疾患に対する治療法の開発に有益な情報が得られると期待される。

様々なストレス刺激によって活性化された細胞死シグナルはミトコンドリアに収束しシトクロム C を放出することが知られている。細胞質に放出されたシトクロム C はカスパーゼカスケードを活性化する。カスパーゼは細胞死実行に中心的な役割を果たすプロテアーゼで様々な基質を切断することで細胞死を誘導する。この経路において、ミトコンドリア下流のカスケードはよく研究されているのに対し、ストレスシグナルがミトコンドリアに至るまでの分子機構は大部分が不明である。ミトコンドリアを経由する細胞死シグナルの調節分子として大きな役割を担っているのが Bcl-2 ファミリータンパク質である。

Bcl-2 ファミリータンパク質は BH (Bcl-2 homology)ドメインと呼ばれるファミリー内で保存されたアミノ酸配列を持つタンパク質で、細胞死抑制性メンバーと細胞死促進性メンバーに大別され、これらはいずれもシトクロム C などの細胞死伝達分子がミトコンドリアから放出される過程を制御している。促進性メンバーさらに BH1、2、3 を持つ Bax サブファミリーと BH3 のみを持つ BH3-only サブファミリー (Hrk、Bad など) に分けられる。近年の様々な報告から、BH3-only サブファミリーが Bax サブファミリーの上流で機能することが示された。つまり、細胞死シグナルに応答して、BH3-only サブファミリータンパク質の発現誘導、あるいは修飾により活性化し、Bax サブファミリーの活性化を介してシトクロム C を放出する。BH3-only サブファミリーは、ほ乳類では少なくとも 10 種が同定されており、細胞死刺激ないしは細胞の種類に応じて特異的に機能するのではないかと予想されている。本研究では、BH3-only サブファミリータンパク質の内、Hrk と Bad に関しての研究を行った。Hrk については、これに結合する因子の単離と機能解析を行い、Bad については細胞死シグナルをミトコンドリアへ伝えるメディエーターの一つである JNK との関係について解析を行った。

Hrk に結合する因子の単離と機能解析

Hrk/DP5はBH3-onlyサブファミリーの一つでアミロイドβタンパク質による神経の細胞死の過程で誘導されることなどが知られているが、その細胞死誘導機構は未知の部分が多い。そこで、yeast two-hybrid systemによりHrkに結合するタンパク質のスクリーニングを行った。その結果、Hrkに特異的に結合するタンパク質としてp32を単離した。p32は三量体によるpore (孔) 形成能を持つミトコンドリアタンパク質であるが、その機能は不明であった。p32はN末端側にミトコンドリアを標的とするシグナルシーケンスがあり、C末端側には種を超えて高度に保存された領域conserved C-terminal regionを有する。そこで、p32のN末端側とC末端側のHrkへの結合の影響を調べる為にN末端側シグナルシーケンスを欠損したp32(74-282)とN末端側シグナルシーケンスとC末端側conserved C-terminal regionの両方を欠いたp32(74-221)を作製し、Hrkとの結合を検討した。その結果、p32(74-282)はHrkに結合したが、p32(74-221)はHrkに結合しなかったことからp32のconserved C-terminal regionがHrkとの結合に必要であることが示された。次にHrkの細胞死誘導能に対するこれら変異体の効果を核の凝集により検討した。Hrkによる細胞死はp32(74-282)の共発現により抑制できたが、p32(74-221)には抑制効果はなかった。p32(74-282)はHrkに結合することで、Hrkのp32への結合を阻害し、Hrkに対し優性抑制的に機能しているためであると考えられる。このことはp32への結合がHrkの細胞死誘導に重要であることを示唆している。次にHrkの細胞死におけるp32の必要性を検討した。このためにconserved C-terminal regionを欠損したp32(1-221)を作製した。結晶構造解析からp32はドーナツ型の孔を形成し、この形成にはp32のC末端側が重要であると考えられる。p32(1-221)を細胞に発現させると、この欠変異体を含む三量体、すなわちdefective poreの形成により内在性p32の機能を抑制すると推測される。Hrkと共にp32(1-221)を細胞に発現させると、p32(1-221)はHrkによる細胞死を顕著に抑制した。以上の結果はHrkによる細胞死誘導の過程にp32が密接に関わっていることを示唆している。

JNK による Bad の細胞内局在制御機構の解析

細胞死は細胞内外の様々なストレス刺激により引き起こされるが、これらのストレス刺激のメディエーターの一つに c-Jun N-terminal kinase (JNK)がある。JNK は MAPキナーゼファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼで、さまざまなストレス刺激に応答しミトコンドリアへシグナルを伝え、細胞死を誘導する。一部の組織では JNK は c-Jun などの転写因子を介して細胞死を誘導することが報告されているが、UV による細胞死は蛋白質合成阻害剤では抑制されないことから、JNK は転写を介さないで細

胞死を誘導する経路が重要であることが示唆されている。しかし、転写因子以外の JNK の標的因子は必ずしも明らかでなかった。本研究では JNK の細胞死誘導における基質候補として 14-3-3 に着目した。14-3-3 は多数の細胞死促進因子 (Bad、FKHRL1、Nur77 など) と結合し、その細胞死誘導活性を抑制することが知られている。哺乳類の 14-3-3 の 4 つのアイソタイプには JNK のリン酸化コンセンサス配列 (Ser-Pro) が α -ヘリックスの7番目の8番目の間に存在し、しかも β と γ については、この Ser 残基が *in vivo* でリン酸化されていることが報告されていたが、そのキナーゼは不明であった。そこで、14-3-3 が JNK のターゲットである可能性を検討した (当研究室鶴田との共同研究)。免疫沈降法で回収した活性型 JNK とリコンビナント 14-3-3 を用いて *in vitro* kinase assay を行った結果、JNK は 14-3-3 δ の Ser184、14-3-3 σ の Ser186 を *in vitro* でリン酸化することが明らかとなった。

14-3-3 の標的因子の一つに BH3-only サブファミリーの Bad がある。Bad は生存シグナルにより活性化された Akt や PKA によりリン酸化され、リン酸化された Bad は 14-3-3 と結合することによってミトコンドリアから細胞質に移行して、その細胞死活性を失う。14-3-3 上の JNK リン酸化部位と 14-3-3 の Bad が結合すると考えられる部位は近傍にあることから、JNK による 14-3-3 のリン酸化が 14-3-3 と Bad の結合に何かしらの影響を与える可能性を考えた。そこで内在性の Bad と 14-3-3 の結合に対する活性型 JNK の効果を検討した。活性型 JNK を COS-1 細胞に発現させると Bad と共沈する 14-3-3 量が減少したが、不活性型 JNK を発現させても減少は見られなかった。次にストレス刺激により 14-3-3 からの Bad の解離が起こるのか、もし起こるのであれば JNK が必要なのかを検討した。アニソマイシン処理すると内在性の Bad と共沈する 14-3-3 量が減少したが、このとき優性抑制型 JNK を細胞に発現させておくと、Bad と共沈する 14-3-3 量の減少は見られなかった。以上の結果から、細胞内では JNK の下流で 14-3-3 と Bad の解離が起こることが明らかとなった。しかし、この解離が JNK による 14-3-3 の直接のリン酸化に依存しているかは不明である。そこで、この点を調べるために、リコンビナント 14-3-3 (GST tag) と Bad (His tag) を用いた *in vitro* 再構成実験を行った。GST-14-3-3 と His-Bad の結合は GST pull-down assay で検討した。Bad はそのままでは 14-3-3 に結合しないが、これまでの報告どおり、あらかじめ活性型 Akt でリン酸化した Bad は 14-3-3 に結合した。一方、14-3-3 をあらかじめ活性型 JNK でリン酸化した場合は、Akt でリン酸化した Bad への結合が低下した。しかし、不活性型 JNK とインキュベートした場合は、このような Bad への結合の低下が見られなかったので、JNK によって直接リン酸化された 14-3-3 は Bad との結合能が低下することが示された。さらに、JNK リン酸化部位である S184 を Ala に置換した 14-3-3 変

異体を用いた場合にも、活性型 JNK とインキュベートした時の Bad との結合能の低下が起きなかったことから、S184 のリン酸化によって 14-3-3 と Bad の結合の低下が起きたことが明らかとなった。

Bad は通常細胞質に存在するが、ミトコンドリアに局在して、シトクロム C の放出に貢献することで細胞死を誘導する。そこで、JNK が Bad のミトコンドリア移行を促進しているかを細胞分画により検討した。活性型 JNK の発現によりミトコンドリア画分に含まれる Bad 量が増加したが、不活性型 JNK ではこのような増加は見られなかった。14-3-3 は Bad の細胞質アンカーとして機能しているので、JNK による Bad のミトコンドリア移行は 14-3-3 のリン酸化によるものと考えられる。また、この効果は 14-3-3 リン酸化部位変異体の発現により抑制できたことから、JNK による Bad のミトコンドリア移行は 14-3-3 のリン酸化を介していることが示唆された。以上のことは、JNK が 14-3-3 を標的に Bad のミトコンドリア移行を促進し細胞死を誘導していることを示唆している。