

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 13 年度博士課程進学
氏名 阿部 友照
指導教官 豊島 近

論文題目

プロテインホスファターゼ PP2C β X と相互作用する
アンキリンリピートタンパク質の機能解析

はじめに

細胞は紫外線、放射線、浸透圧変化、温度変化、オキシダントによる酸化など、常に様々な物理化学的なストレスに晒されている。これらは、DNA の損傷、タンパク質の変性、生体膜の損傷など、細胞に致命的なダメージを与える。細胞は恒常性を保つために、物理化学的ストレスあるいはそれに伴う変化を感知し、細胞内シグナルに変換し、厳密な制御の下にシグナルを伝達・処理し、適切なストレス応答反応を達成するための一連の機構を有している。

物理化学的ストレスのシグナル伝達を担う細胞内情報伝達経路に、ストレス応答性 MAP キナーゼ経路と呼ばれる一群の経路が同定されている。これらは多段階のタンパク質リン酸化酵素によりシグナルが伝達される経路であり、その構成要素の構造や生理機能が酵母から哺乳類に至るまで真核生物全般にわたり高度に保存されている。

哺乳類ストレス応答性 MAP キナーゼ経路

哺乳類においては、p38 経路、JNK 経路と呼ばれる二つのストレス応答性 MAP キナーゼ経路が知られている。これらの経路は高浸透圧、熱ショック、紫外線、放射線、過酸化水素といった物理化学的ストレスに加え、タンパク質合成阻害剤、抗癌剤などの薬剤や LPS、

TGF- β 、炎症性サイトカインなどによっても活性化されることが知られている。これらの経路が担う生理機能は、アポトーシスの制御を含めた物理化学的ストレスに対する応答をはじめ、細胞増殖・癌化、細胞分化・器官形成、炎症・免疫応答など多岐にわたる。また近年、炎症性サイトカインを介するこれらの経路の活性化が、免疫疾患等の様々な難治性疾患の発症や、病理的反応に参与していることが指摘されており、応用的見地からも経路の詳細な解析が期待されている。

ストレス応答性 MAP キナーゼ経路の制御機構

ストレス応答性 MAP キナーゼ経路の制御機構については、活性化機構、抑制機構、特異性規定機構の三点が重要である。

MAP キナーゼ経路は、MAP キナーゼ (MAPK)、MAPK キナーゼ (MAPKK)、MAPKK キナーゼ (MAPKKK) から成るプロテインキナーゼのカスケードによって構成されている。MAPKKK はセリン/スレオニンキナーゼであり、MAPKK の活性化ループの特定のセリンあるいはスレオニン残基をリン酸化して活性化する。MAPKK はセリン/スレオニン/チロシンキナーゼであり、MAPK の活性化ループの特定のスレオニンとチロシン残基をリン酸化して活性化する。活性化された MAPK は核内に移行して、転写因子や他のキナーゼのリン酸化を行い、応答に必要な遺伝子群の発現誘導などを引き起こすことが知られている。p38 経路・JNK 経路における MAPKKK の活性化機構に関しては、いくつかのキナーゼやその他の制御因子が報告されているが不明な部分が多い。

また、リン酸化によって活性化された経路は、プロテインホスファターゼによる脱リン酸化によって不活性化されることが必要である。経路の活性化と不活性化は、キナーゼとホスファターゼのバランスによって厳密に制御されていると考えられている。p38 経路・JNK 経路を不活性化するプロテインホスファターゼは、セリン/スレオニンホスファターゼやセリン/スレオニン/チロシンホスファターゼなどが報告されている。しかし、ホスファターゼによる不活性化機構の解析は、キナーゼによる活性化機構に比べあまり進んでいない。

また近年、MAP キナーゼ経路の制御に関わる scaffold (足場) タンパク質の存在が多数報告されている。細胞内では構造の類似した複数の MAP キナーゼ経路が存在するため、経路間の情報の交錯を防ぐ機構が重要であると考えられる。scaffold タンパク質は経路に関わる複数の因子を結合し情報伝達を効率化すると共に、特異性を確保する働きを担っていることが示されている。

本研究の目的

p38 経路・JNK 経路の制御機構に関してこれまで多くの報告が成されてきたが、これらの経路が担う多様な生理機能を生み出す機構や、MAPKKK の活性制御機構、経路の抑制機構、特異性規定機構など未知な部分が多く残されている。そこで本研究では p38 経路あるいは JNK 経路に関わる制御因子を同定し機能を解析することで、新たな制御機構を解明することを目的とした。

結果と考察

PP2C β X について

我々はこれまでに、酵母のストレス応答性 MAP キナーゼ経路である HOG 経路の活性化を抑制する哺乳類の因子の同定を、変異株を利用した機能スクリーニングにより試みてきた。哺乳類のストレス応答性 MAP キナーゼ経路と酵母の HOG 経路が相同であることから、この因子は p38 経路あるいは JNK 経路の抑制因子として機能することが期待される。スクリーニングの結果、プロテインセリン/スレオニンホスファターゼである PP2C β のアイソフォームの一つ(PP2C β X)を同定した。PP2C β はこれまでマウスにおいて PP2C β -1 から PP2C β -5 までの 5 つのサブタイプが報告されており、C 末端領域にそれぞれ異なる配列を有している。PP2C β X は特徴的な長い C 末端領域を有していること、組織普遍的な発現パターンを示すこと、細胞質に局在することなどが明らかになっている。また COS7 細胞を用いた解析から、PP2C β X の高発現により p38、JNK、MKK3、MKK6、MKK4 のストレス刺激による活性化を抑制することを明らかにした。

PP2C β X の相互作用因子の同定と機能解析

これまでの解析で PP2C β X は、p38 経路・JNK 経路の抑制因子として機能する可能性が示されたが、脱リン酸化の標的となる因子や機構は不明であった。また PP2C は *in vitro* において基質特異性の低いホスファターゼであることが知られている。そこで *in vivo* において PP2C β X の基質特異性を規定する因子の存在を想定し、PP2C β X を bait とした two-hybrid スクリーニングを行った。その結果 C 末端側にアンキリンリピートを持つタンパク質をコードする cDNA が同定された。このタンパク質(ANK4)と PP2C β X との相互作用は、PP2C β X の C 末端領域を介していた。このことから ANK4 は PP2C β X に特異的な相互作用因子であると考えられる。

また、COS7 細胞内における PP2C β X と ANK4 との相互作用を解析した。その結果 p38 経路・JNK 経路の活性化を引き起こす種々のストレス刺激のうちで、タンパク質合成阻害剤、紫外線の刺激では相互作用は観察されなかったのに対し、ソルビトールによる浸透圧刺激では相互作用が観察された。このことから ANK4 は、p38 経路・JNK 経路の浸透圧刺激の情報伝達において、浸透圧刺激依存的に PP2C β X と相互作用し、経路の制御に関わる可能性が考えられる。

また、COS7 細胞において ANK4 を高発現させると、活性化刺激存在下において MEK1、MKK3、MKK4、MKK6 のリン酸化の亢進の増強が観察され、MEK1、MKK3 では活性化刺激非存在下においてもリン酸化の亢進が観察された。このことは ANK4 が、これら MAPKK の上流の複数のキナーゼの活性化因子として機能したか、あるいは ANK4 の高発現により PP2C β X などの内在性の抑制因子の機能が阻害され、経路の活性化を引き起こしたと考えられる。

次に ANK4 と相互作用し PP2C β X の標的となり得る因子を同定するために、p38 経路・JNK 経路の構成因子と ANK4 の相互作用を共沈実験により検討した。p38、JNK、ERK の各 MAPK と、MEK1、MKK3、MKK4、MKK6、MKK7 の各 MAPKK、さらに 14 種類の

MAPKKK それぞれと ANK4 の COS7 細胞における相互作用を検討した結果、MAPKKK の一つである DLK (dual leucine zipper kinase) との相互作用が観察された。DLK は浸透圧などのストレス刺激により活性化され、MKK4、MKK7 のリン酸化を介して JNK 経路を活性化することが報告されている。またこの相互作用はストレス刺激非存在下においても観察された。これにより ANK4 が PP2C β X と DLK を結合し、PP2C β X による DLK の抑制を促す scaffold タンパク質として機能している可能性が示唆された。

まとめ

p38 経路・JNK 経路の抑制因子を同定する目的で、酵母の変異株を用いたスクリーニングにより PP2C β X を同定した。また、PP2C β X に特異的に相互作用する ANK4 を同定し、これらのタンパク質の相互作用が浸透圧刺激依存的であることを見出した。さらに JNK 経路の MAPKKK である DLK が ANK4 と相互作用することを見出した。このことは DLK が PP2C β X の脱リン酸化の基質となる可能性を示唆している。DLK は生理的な条件下においては、ストレス刺激に依存して JNK 経路のみを活性化することが報告されている。ANK4 と PP2C β X の相互作用が観察される浸透圧条件下では、タンパク質合成阻害剤による刺激と比較して、JNK 経路の活性が p38 経路の活性よりも抑制されている。このことは高浸透圧条件下において、JNK 経路を抑制する機構の存在を示唆しており興味深い。

今後、PP2C β X、ANK4、DLK の三者が一つの複合体を形成するか否か、PP2C β X により DLK の活性化が抑制されるか否か、またその生理的意義について検証する必要がある。

