

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 阿部 友照

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おり、これに抗して恒常性を保つために、物理化学的ストレスを感知し、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 (MAPK) 経路と呼ばれる一群の経路が同定されている。ストレス応答性 MAPK 経路の制御機構に関しては、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。本論文は、プロテインホスファターゼ PP2C β X によるストレス応答性 MAPK 経路の負の制御と、さらに PP2C β X と相互作用する因子として同定したアンキリンリピートタンパク質 ANKRA2 の機能に関する研究をまとめたもので、序論と 3 部から構成されている。

序論では、哺乳類の MAPK 経路について概説した後、特にストレス応答性 MAPK 経路の活性制御機構について、経路の構成因子のリン酸化による活性化、scaffold (足場) タンパク質による特異性規定、プロテインホスファターゼによる不活性化の 3 つの側面から現在までの知見をまとめ、本研究の目的を明らかにしている。

第 1 部では、2 C 型プロテインホスファターゼ PP2C β のスプライシングバリエーションである PP2C β X の機能解析を行っている。まず、酵母を用いた機能スクリーニングで PP2C β X を単離した経緯を述べた後、浸透圧やタンパク質合成阻害剤アニソマイシン、紫外線などのストレス刺激により誘導される p38 や JNK などのストレス応答性 MAPK の活性化が、PP2C β X の高発現により抑制されることを示している。これに対して、増殖刺激で活性化される MAPK である ERK の活性化は、PP2C β X の高発現では抑制されない。さらに、ストレス応答性 MAP キナーゼキナーゼ (MAPKK) の活性化も、PP2C β X の高発現により抑制されることを明らかにしている。このことから、PP2C β X はストレス応答性 MAPK 経路に特異的な負の制御因子であり、その標的分子は少なくとも MAPKK より上流に位置していることを論じている。

第 2 部では、PP2C β X の相互作用因子として同定したアンキリンリピートタンパク質 ANKRA2 について述べている。酵母 two-hybrid 法を用いて PP2C β X に結合する因子をスクリーニングし、ヒトリンパ球由来の cDNA ライブラリーから ANKRA2 を同定した。PP2C β X と ANKRA2 との結合を *in vitro* の結合実験によっても確認し、PP2C β X と ANKRA2 の結合が、他のスプライシングバリエーションになく PP2C β X に特異的な C 末端領域を介していることを明らかにしている。また、COS 細胞に共発現した両タンパク質の共沈実験により、ストレス応答性 MAPK 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相互作用が起こることを明らかにし、ANKRA2 が浸透圧に応答したシグナル伝達に機能している可能性について論じている。また、PP2C β X と ANKRA2 の細胞内局在について検討し、前者が細胞質に、後者が核と細胞質の両方に局在すること、この局在が浸透圧ストレスによって変化しないことを示している。

第3部では、さらに、ANKRA2 がストレス応答性 MAPK 経路の活性制御に果たす役割について検討している。まず、COS 細胞で ANKRA2 を高発現すると、ストレス刺激時の JNK の活性化の増強が観察され、さらに活性化の持続時間が延長されていることを明らかにしている。また、ANKRA2 の高発現が MAPKK の活性化も引き起こすことを明らかにし、ANKRA2 の標的分子が少なくとも MAPKK よりも上流に位置していることを明らかにしている。さらに、MAPK 経路を構成する種々のキナーゼと ANKRA2 を COS 細胞において共発現し、共沈実験により相互作用を検討したところ、MAPK、MAPKK とともに共沈が認められなかったのに対し、調べた 14 種類の MAPKKK のうち、DLK、MLK3、ASK1、ASK2 の 4 つが ANKRA2 と共沈することを見出している。また、この相互作用はストレス刺激には依存しないで起こることも明らかにしている。これらの結果を踏まえ、ANKRA2 が PP2C β X と MAPKKK を結合し、PP2C β X による MAPKKK の抑制を促す scaffold タンパク質として機能している可能性について論じ、ANKRA2 の高発現により経路の活性化が起こる機構についてもモデルを提出している。

以上、本論文は、不明な点が多かったストレス応答性 MAPK の制御機構について、プロテインホスファターゼ PP2C β X とその相互作用因子 ANKRA2 の機能に焦点を当てて明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。