

論文の内容の要旨

ストレス応答性キナーゼ JNK/SAPK の相乗的活性化の分子機構の解明

中川 健太郎

【序】

c-Jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase (JNK/SAPK)系は、紫外線や熱などの物理化学的ストレスや腫瘍壊死因子(TNF α)、インターロイキン1 β (IL-1 β)などの炎症性サイトカインによって活性化され、免疫応答や細胞の生死の制御などに関与する重要な細胞内シグナル伝達経路である。JNKの活性化因子としてはSEK1とMKK7の2つの上流キナーゼが存在する。この2つのJNK活性化因子に関して、物理化学的なストレスやGタンパク質共役型受容体を介する刺激に対してはSEK1が強く活性化され、一方TNF α やIL-1 β などの炎症性サイトカインに対してはMKK7が主に活性化することが知られている。またSEK1とJNK、MKK7とJNKを細胞内で結ぶ分子として、キナーゼの効率的なシグナル伝達および特異性の規定を担うと考えられる足場タンパク質(scaffold protein)が複数同定されたことから、SEK1とMKK7は刺激や組織の違いに応じてJNKの活性化に寄与していると考えられている(図1)。実際、免疫細胞においてはMKK7によるJNK制御がその生理機能の発現に重

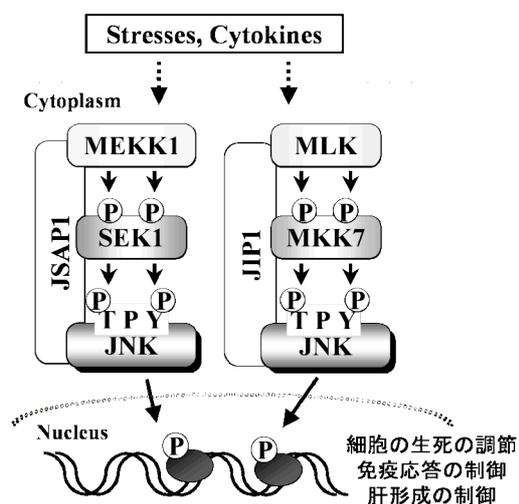


図1 哺乳類のJNKシグナル伝達経路とそのscaffold protein

要する。実際、免疫細胞においてはMKK7によるJNK制御がその生理機能の発現に重

要であることが報告されている。しかしながら、SEK1 と MKK7 の生理的な機能を明らかにするために当研究室において作製された SEK1 欠損マウス、および MKK7 欠損マウスは共に胎児期において肝形成不全の表現型を示し、少なくとも肝形成過程においては JNK の機能発現には SEK1 と MKK7 の両者を必要とすることが明らかとなった。そこで私は SEK1 と MKK7 による JNK の活性化機構を解明するために SEK1, MKK7 をそれぞれ欠損する ES 細胞を用いて生化学的な解析を行い、SEK1 と MKK7 が JNK 活性化因子として異なる生化学的特性を有しており、JNK は活性化の際に2つの MAPKK による連続的な二重の制御を受けること、またその際に細胞骨格系の分子である filamin が scaffold protein として機能している可能性を見出した。

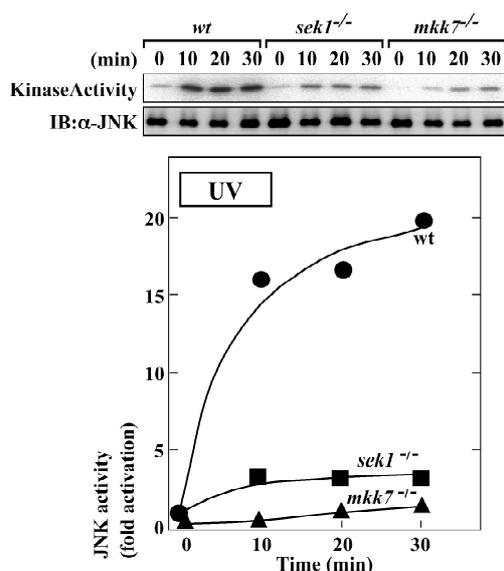


図2 SEK1、MKK7欠損細胞におけるJNKの活性化動態

欠損細胞は MKK7 の過剰発現によってのみ、JNK の活性化が回復したことから、それぞれの欠損細胞における JNK 活性の低下が細胞内の JNK 活性化因子の量的な減少に起因するものではないことが確認された。逆に *sek1*, *mkk7* を JNK と共に HeLa 細胞に強制発現させたところ、*sek1*, *mkk7* それぞれを単独で発現させた場合よりも、両者を共に発現させたときに著しく強い、相乗的な JNK の活性化が認められた。以上のことから JNK の相乗的な活性化には SEK1, MKK7 のどちらか一方の MAPKK だけでは不十分であり、2つが存在してはじめて JNK は相乗的な活性化状態に誘導されること、また SEK1 と MKK7 が質的に異なる JNK キナーゼであることが明らかとなった。

2. SEK1 と MKK7 は JNK 活性化の際に異なる部位をリン酸化する

質的に異なる特性をもつ SEK1 と MKK7 による協調的な JNK 活性制御機構の詳細を明らかにするために、JNK 上のリン酸化の修飾部位から検討を行った。JNK は分子内の Thr-Pro-Tyr 配列中、Thr 残基と Tyr 残基のリン酸化により活性化型へ

1. JNK の相乗的な活性化には SEK1 と MKK7 の2つを必要とする

JNK 活性化の際の SEK1 または MKK7 の寄与を定量的に検討するために、SEK1 欠損細胞、および MKK7 欠損細胞において種々の物理化学的なストレスや炎症性サイトカインで処理した際の JNK の活性化を GST-cJun を基質とする *in vitro* のキナーゼアッセイにより測定した。その結果、野生型の細胞では刺激に応じて JNK が強く数十倍程度まで活性化することが認められるのに対して、SEK1 欠損細胞、MKK7 欠損細胞においては、どの刺激に対しても活性が著しく減弱しており数倍の活性化しか示さなかった (図2)。SEK1 欠損細胞、すなわち MKK7 のみを発現する細胞に MKK7 を過剰発現させても JNK の活性化能は回復せず、SEK1 を導入することによってのみ回復することが認められた。また MKK7

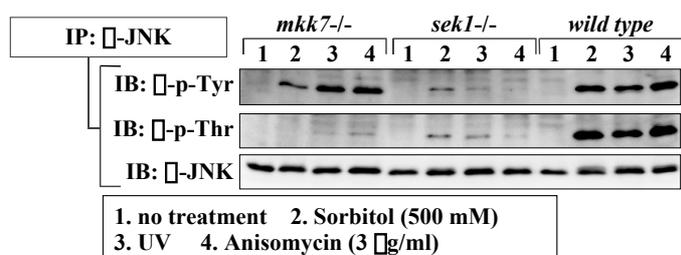


図3 SEK1、MKK7欠損細胞におけるJNKのリン酸化修飾状態

と移行する。そこで、SEK1 欠損細胞および MKK7 欠損細胞から JNK を免疫沈降し、リン酸化状態をリン酸化特異的な抗体にて検出した。その結果、MKK7 欠損細胞では Tyr 残基は野性型の細胞と同等にリン酸化されていたが、Thr 残基のリン酸化はほぼ消失していた。このことは MKK7 が JNK の Thr 残基リン酸化の主な担い手であること、また残っている SEK1 が Tyr をリン酸化していることを示唆する。一方 SEK1 を欠損する細胞では Tyr 残基のリン酸化が失われていることに加え、MKK7 によりリン酸化されると考えられる Thr 残基のリン酸化も失われていた (図3)。これらの結果から、SEK1 は JNK の Tyr 残基を主にリン酸化すること、また MKK7 は Tyr 残基がリン酸化された JNK の Thr 残基を基質として効率よくリン酸化し JNK を活性化型へ誘導していることが示唆された (図4)。

3. JNK は SEK1 と MKK7 により連続的なリン酸化を受ける

欠損細胞の JNK リン酸化修飾状態から、Thr 残基のリン酸化に Tyr 残基のリン酸化が影響している可能性が考えられたので、JNK リン酸化部位の変異体を作成し、Thr 残基のリン酸化への影響を検討した。その結果、Thr 残基を Ala 残基に置換した変異体 (Ala-Pro-Tyr) では Tyr 残基へのリン酸化が野性型の JNK と同様に認められたが、Tyr 残基を Phe 残基に置換した変異体 (Thr-Pro-Phe) では Thr 残基へのリン酸化も抑制された。このことは、MKK7 による JNK の Thr 残基のリン酸化には、まず SEK1 による Tyr 残基のリン酸化を必要とすることを示唆している。また、どちらの変異体においても活性はほとんど検出されなかったことから、JNK の活性化には Tyr, Thr 両残基のリン酸化を必要とすることが明らかとなった (図4)。

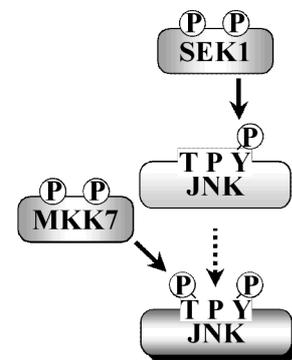


図4 SEK1とMKK7による連続的なJNK活性化機構

4. filamin-A は SEK1, MKK7 の共通の足場タンパク質として機能する

JNK の活性化に際し SEK1 と MKK7 が協調的に機能することから、この2つの活性化因子を近傍に維持させる分子の存在が想定された。そこで MKK7 と結合する因子を酵母 Two-hybrid 法により探索を行ったところ、アクチンの裏打ちタンパク質である filamin-A が MKK7 結合因子として同定された。filamin-A は先に SEK1 と結合し TNF α からのシグナルを SEK1-JNK に伝達する際に足場として機能していることが報告されていることから、SEK1 と MKK7 をつなぐアダプター分子として有力な候補であると考えられた。filamin-A と SEK1 もしくは MKK7 を共発現させた 293T 細胞から免疫沈降すると filamin-A は両者と共に回収され、filamin-A が SEK1 と MKK7 のどちらとも細胞内で相互作用しうることが明らかとなった (図5)。細胞内の局在を蛍光タンパク質である YFP を付加した MKK7、および RFP

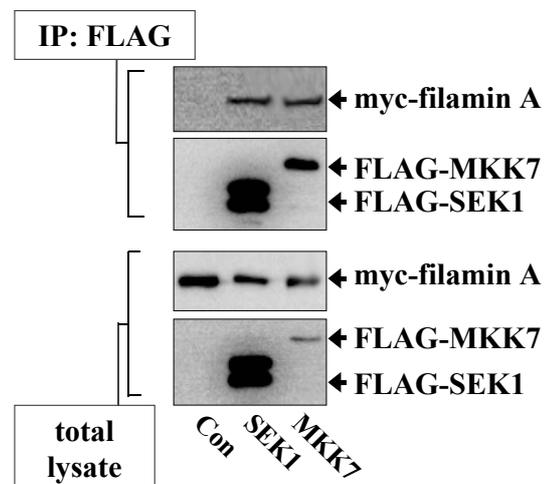


図5 SEK1とMKK7に結合する filamin-A

を付加した filamin-A を用いて共焦点顕微鏡にて観察したところ、細胞骨格上においてファイバー状に MKK7 と filamin-A が共局在している様子が認められた。この MKK7 のファイバー状の局在は filamin-A との結合部位を欠く MKK7 では認められなかった。これらの結果は filamin-A が SEK1 の足場として機能するだけでなく MKK7 の足場としても機能していることを示唆している。また、filamin-A を欠損するヒト・メラノーマ由来の M2 細胞、M2 細胞に filamin-A の遺伝子を導入した A7 細胞を用いて刺激時の JNK 活性を測定した。

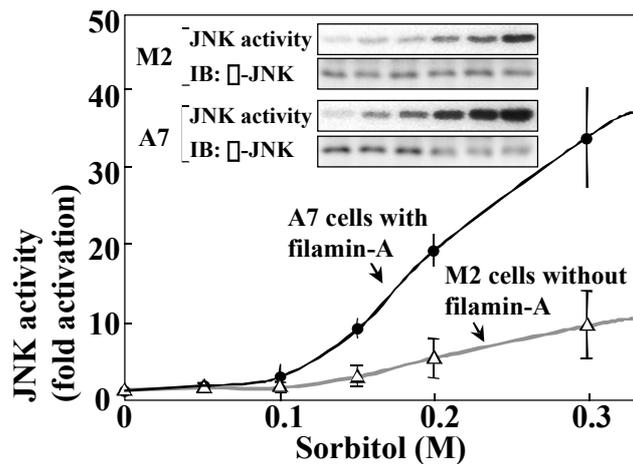


図6 JNK活性化に寄与するfilamin-A

その結果 filamin-A を欠失する M2 細胞では TNF α 刺激だけでなく浸透圧ストレスの際にも JNK の活性化が減弱していることが認められ (図6)、JNK が活性化する様々な局面にて JNK 経路の制御因子として filamin-A が機能していることが考えられた。また、filamin には他に filamin-B, -C が存在し、共に SEK1, MKK7 に対する結合を示したことから、アクチンフィラメントを架橋する filamin family が広く SEK1 と MKK7 の足場として機能する可能性が示唆された。

【総括】

本研究において私は、JNK の活性化因子である SEK1 と MKK7 のどちらが欠損しても JNK の活性化が著しく減弱すること、その原因として SEK1 と MKK7 という2つの MAPKK が異なる生化学的な特性を有しており、両者が協調的に機能してはじめて JNK は相乗的に活性化することを明らかにした。さらに、MKK7 に結合し JNK 活性化に関与する分子として新たに filamin-A を見出した。filamin は他に filamin-B, C が存在し、それぞれ SEK1, MKK7 双方と結合することが認められた。この filamin を介して SEK1 と MKK7 が近接化することが可能であることから、2つの MAPKK を近傍に集めることにより、JNK の相乗的な活性化に関与する新しいタイプの scaffold protein として filamin が機能している可能性が示唆された。SEK1, MKK7 どちらの欠損マウスも肝形成不全を示したのは、今回示した SEK1 と MKK7 による相乗的な JNK の活性化が肝細胞の増殖制御に必要な役割を果たすためであると考えられる。また、欠損細胞においても数倍程度の活性化が認められることから、JNK は SEK1 もしくは MKK7 のみによる活性化を受けた場合と、両者により相乗的に活性化された場合の2段階の活性化状態をもち、それぞれが異なる生理機能を担いうることが示唆された。

参考文献

1. Wada, T.*, Nakagawa, K.*, et al. *J. Biol. Chem.* **276**, 30892-30897 (2001).
2. Kishimoto, H.*, Nakagawa, K.*, et al. *J. Biol. Chem.* **278**, 16595-16601 (2003).
3. Nishina, H., Nakagawa, K., et al. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* in press (2003).

*Both authors contributed equally to this work.