

審査の結果の要旨

氏名 中川 健太郎

多細胞生物を構成する細胞は、栄養状態や浸透圧の変化、熱や異常タンパク質の蓄積など、様々なストレスに応答して個体の恒常性の維持に努めている。これらのストレスに応答して活性化されるプロテインキナーゼの 1 つとして、c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) が知られており、その上流には SEK1 と MKK7 という 2 種の JNK 活性化因子が存在する。両者はともに *in vitro* において JNK の活性化に必要な Thr と Tyr の両残基をリン酸化する dual-specificity kinase の特性をもつことから、それぞれが細胞内で JNK を活性化型に導くと考えられてきた。しかしながら、実際に細胞内において SEK1 と MKK7 がどのように JNK の活性化に寄与するか、さらに JNK に 2 種の活性化因子が存在する生理的な意義は不明であった。「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」と題する本論文においては、SEK1 と MKK7 を欠損する ES 細胞を用いて、細胞内における JNK の活性化が SEK1 と MKK7 により 2 重に制御されていることを明らかにし、また細胞骨格系の分子である filamin-A が JNK の活性化に際して SEK1 と MKK7 を結ぶ足場分子として機能する新たな可能性を提示している。

1. ストレスに応答する JNK の相乗的な活性化は SEK1 と MKK7 の両者を必要とする

まず、JNK の活性化における SEK1 と MKK7 の寄与を定量的に検討するために、SEK1 または MKK7 を欠損した細胞を用いて、GST-cJun を基質にキナーゼ活性を測定した。SEK1 及び MKK7 のどちらの欠損細胞においても、ストレス刺激に対する JNK の活性化は、野生型の細胞に比べて著しく減弱していた。また、MKK7 のみを発現する SEK1 欠損細胞に MKK7 を過剰発現させても JNK の活性化は認められず、SEK1 を導入することによってのみ応答性が回復した。同様に、MKK7 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。したがって、それぞれの欠損細胞における JNK 活性の低下は、細胞内の JNK 活性化因子の量的な減少によるものではないと考えられた。以上の結果から、JNK の相乗的な活性化には SEK1 または MKK7 の一方だけでは不十分であり、両者が存在してはじめて JNK は相乗的に活性化されること、また SEK1 と MKK7 は質的に異なる JNK キナーゼである可能性が示された。

2. SEK1 と MKK7 は異なる部位を連続的にリン酸化して JNK を活性化する

SEK1 と MKK7 による協調的な JNK の活性化機構を解明するために、JNK 上のリン酸化部位を解析した。JNK はその分子内の Thr-Pro-Tyr 配列内にある Thr と Tyr の両残基のリン酸化により活性化される。そこで、それぞれに特異的なリン酸化抗体を用いて、SEK1 および MKK7 欠損細胞の JNK リン酸化状態を検出した。MKK7 欠損細胞の Tyr 残基は野性型と同等にリン酸化され、一方の Thr 残基のリン酸化が抑制されることから、MKK7 は JNK の Thr 残基をリン酸化し、SEK1 は Tyr 残基をリン酸化すると考えられた。一方、SEK1 を欠損する細胞では、Tyr 残基のリン酸化の消失に加えて、MKK7 によるリン酸化が期待された Thr 残基のリン酸化も消失した。次ぎに JNK のリン酸化部位の変異体を作製し、リン酸化に与える影響を検討した。Thr を Ala 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 を Phe 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。以上の結果から、SEK1 はまず JNK の Tyr 残基を主にリン酸化し、その後 MKK7 は Tyr 残基がリン酸化された JNK を基質にその Thr 残基を効率よくリン酸化して JNK を活性化することが示された。

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

細胞内で SEK1 と MKK7 の両者をリクルートして JNK の効率的な活性化に関わる分子が想定され、MKK7 の結合因子として、アクチンの裏打ちタンパク質である filamin-A を同定した。filamin-A と SEK1 または MKK7 を共発現させた 293T 細胞から filamin-A を免疫沈降すると SEK1 または MKK7 が回収され、filamin-A は 2 種の活性化因子と相互作用し得ることが明らかにされた。さらに、filamin-A を欠損するヒトメラノーマ由来の M2 細胞と M2 細胞に filamin-A の遺伝子を導入した A7 細胞を用いて、ストレス刺激時の JNK 活性を測定した結果、M2 細胞では TNF α 刺激や浸透圧ストレスに対する JNK の活性化が減弱した。したがって、JNK が活性化される様々な局面において、filamin-A は JNK 経路の制御因子として機能することが示唆された。

本研究は、SEK1 と MKK7 という 2 種の JNK 上流キナーゼ (MAPKK) が異なる生化学的な特性をもち、両者が協調的に機能してはじめて JNK が相乗的に活性化されること、さらに SEK1 と MKK7 をリクルートして JNK の相乗的な活性化に関与する足場分子として新たに filamin-A を見出している。これらの研究成果は、細胞のストレス応答制御機構の理解に有用な知見を提供しており、博士 (薬学) の学位として十分な価値があるものと認められる。