

論文の内容の要旨

論文題目 セリン・スレオニンキナーゼ BREK の
神経系における生理機能の解析

指導教官 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月進学

病因・病理学専攻

博士後期課程

氏名 河 成鎮

細胞内シグナル伝達において、蛋白質リン酸化反応は中軸的な役割を果たす。神経機能においても、プロテインキナーゼの重要性に関しては多くの報告がある。例えば、 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)は、神経細胞内における Ca^{2+} シグナルの主要なメディエーターであり、神経伝達物質の合成と放出、神経伝達物質受容体やイオンチャネルの調節、さらには、シナプスの可塑的变化に対応する様々な遺伝子の発現制御など、多様な生理機能に関係している。また TrkA は神経栄養因子の受容体として、交感神経、感覚神経、中枢では前脳コリン作動性神経細胞の発達に重要な役割を果たしている。

近年のゲノムプロジェクトの進展によりゲノム上に存在するキナーゼの全容が明らかとなった。しかし、どのようなキナーゼによるリン酸化反応が様々な脳機能を担っているかの詳細は殆どわかっていない。従って、脳で高い発現を示す新規キナーゼの機能解析は神経機能の分子メカニズムに新たな視点を与えることが大いに期待される。本研究では神経機能におけるリン酸化反応の役割を分子生物学的に解析する一環として、脳特異的新規キナーゼの探索を行った。その結果、データベース検索により新規キナーゼ Aatyk2 (Apoptosis associated tyrosine kinase 2) を見出した。発現様式及びキナーゼ活性の検討結果に基づき、このキナーゼを BREK (Brain-Enriched Kinase) と命名し直し、分子・細胞及び個体レベルでの機能解析を進めた。

BREK/AATYK2 はヒトでは 1503a.a から成り、N 末端側に疎水性領域、キナーゼ領域を有している。BREK/AATYK2 は一次構造上、先に同定された AATYK1 及びデータベース上に存在する

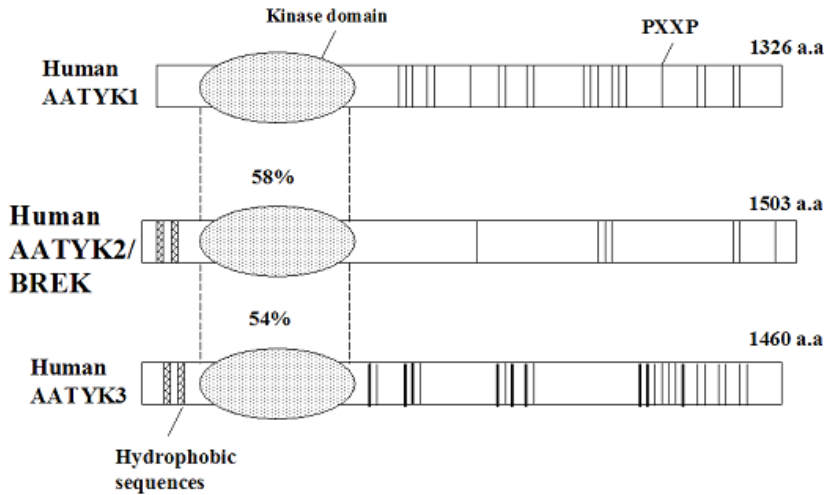


図1. AATYKファミリーキナーゼの一次構造の模式図 キナーゼ領域のアミノ酸配列の相同性をパーセンテージで示した。キナーゼ領域、疎水性領域、PXXPモチーフはそれぞれ、dotted oval、hatched box、実線にて示した。

AATYK3 と共に1つのキナーゼファミリーを形成する(図1)。AATYK2 及び AATYK3 は AATYK1 との相同性よりデータベース上で付けられた名称である。AATYK ファミリーに属する3つのキナーゼはいずれも神経系に発現が限局している。またそれらのキナーゼ領域は、アミノ酸配列上はチロシンキナーゼとセリン・スレオニンキナーゼの中間に位置する。このように AATYK ファミリーキナーゼはユニークな特徴を持つキナーゼではあるが、その生理機能については殆ど分っていない。本研究の進行中、BREK/AATYK2 が、*in vitro* で PP1C あるいは CDK5 と複合体を形成することが報告されたが、*in vivo* での会合及びその生理的意義については不明である。

AATYK1 は抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロット法によりチロシンキナーゼであると報告されている。しかし本研究では、AATYK1, BREK/AATYK2, AATYK3 のキナーゼドメインを用いた *in vitro* キナーゼアッセイおよびリン酸化アミノ酸分析により、これらのキナーゼは主にセリン残基が自己リン酸化されることを見出した。従って、これらのキナーゼはセリン・スレオニンキナーゼであることが示された(図2)。よって以降は、BREK/AATYK2 を BREK と記す。

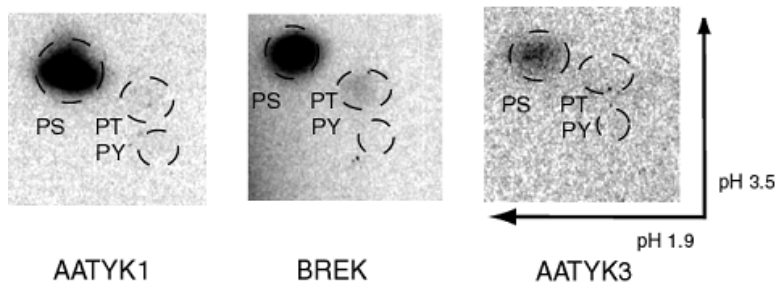


図2. 自己リン酸化AATYKファミリーキナーゼのリン酸化アミノ酸分析 キナーゼドメイン全体を含む部分蛋白質(AATYK1 a.a34-381, BREK a.a94-442, AATYK3 a.a91-442)をGST融合蛋白質として293T細胞に発現させた。精製後、GST部分をプロテアーゼにより分離してから、*in vitro* キナーゼ反応したキナーゼサンプルを用いて、リン酸化アミノ酸分析を行なった。PS: phosphoserine; PT: phosphothreonine; PY: phosphotyrosine

次に、BREK の発現プロファイルを解析した。まず、各組織に対するノーザンブロット法により BREK は脳特異的な発現を示す事を確かめた。さらに、マウス成体脳切片に対する *in situ* hybridization 法により BREK mRNA の脳内における発現を *aatyk1*, *aatyk3* と併せて詳細に検討し

た。その結果、*aatyk1* が広範な発現パターンを示すのに対し、*BREK*, *aatyk3* は特に前脳部分の神経細胞層で限局的に高い発現を示すことが明らかとなった。次に抗 *BREK* ウサギポリクローナル抗体を作製し、マウス脳における *BREK* 蛋白質の発現レベルおよびリン酸化レベルの経時的变化を調べた。その結果、*BREK* の発現レベル、リン酸化レベルともに生後 0-2 週間をピークとしており、この時期に *BREK* が最も活性化していることが示唆された。

続いて *BREK* の神経機能における役割を細胞レベルで解析するために、種々の神経系培養細胞における *BREK* の発現を調べた。その結果、ニューロン由来の PC12, B104, IMR32, SK-N-SH, Neuro2A, P19, NG108-15 細胞において *BREK* mRNA の発現が確認されたが、グリア由来の C6, CG4 細胞では発現がみられなかった。本研究ではさらなる解析を進める系として PC12 細胞を選択し、NGF シグナルにおける *BREK* の役割を検討した。まず NGF 刺激により早期 (5 分以内) に、内在性の *BREK* がリン酸化されることを見出した (図 3)。このリン酸化は *Trk* キナーゼの阻害剤である *k252a* により抑えられたことから、*BREK* が NGF 受容体である *TrkA* の下流でリン酸化されることが確認された。さらに *BREK* のリン酸化に至るシグナル経路を明らかにする目的で、種々のキナーゼ阻害剤の効果を検討した。その結果、PP2 (*Src* kinases 阻害剤), KN-93 (*CaMK* 阻害剤), PD98059 (*MEK1/2* 阻害剤), Wortmannin (*PI3* kinase 阻害剤)は効果が確認されないのに対し、Chelerythrine (*PKC* 阻害剤) が特異的に NGF 刺激に伴う *BREK* のリン酸化を抑制することが明らかとなった (図 3)。また、*novel*, *classical* *PKC* を活性化する *PDBu* 刺激により *BREK* のリン酸化が起こることからも (図 3)、NGF 刺激に伴う *BREK* のリン酸化は *PKC* 活性に依存していることが強く示唆された。PC12 細胞に発現する *PKC* アイソザイムのうち、*PKCε* は PC12 細胞を NGF 刺激した際における *Erk* 経路の活性化および神経突起伸張を促進することが報告されている。実際に、レトロウィルスにより導入した外来性の *BREK* は、内在性 *PKCε* と定常状態では細胞膜付近、分化後には成長円錐様構造において共局在した。

PC12 細胞が NGF 刺激により交感神経様に分化する際、初期段階 (1 時間以内) における *Erk* シグナル経路の活性化が神経突起の伸張開始に重要である。レトロウィルス発現系により *BREK* のキナーゼ不活型変異体を導入した PC12 細胞においては、NGF 刺激に伴う *Erk* 経路の活性化が増強されていた (図 4)。さらに、*BREK* のキナーゼ不活型変異体を導入した PC12 細胞においては、NGF 刺激後 2 日における神経突起の伸張が有意に増強されていた (図 5)。以上の結果から、*BREK* が NGF 刺激による神経突起伸張反応を抑制することが示された。

一方、NGF 刺激により分化した PC12 細胞において、*BREK* のキナーゼ活性は LPA 刺激に伴い活性化していた。レトロウィルス発現系を用いた同様の実験により、*BREK* の活性は LPA 刺激に伴う PC12 細胞の神経突起縮退を正に制御することが明らかとなった。

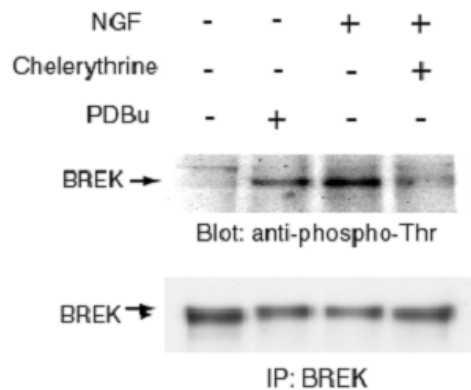


図3. BREKはNGF-PKCシグナルによりリン酸化される mock処理及びchelerythrine処理 (PKC 阻害剤, 10 μ M, 30分) したPC12細胞を、NGF (50 ng/ml, 10分) 及びPDBu (10 μ M, 30分) にて刺激した。抗BREK免疫沈降物に対して、抗リン酸化スレオニン抗体 (上段)、抗BREK抗体 (下段) でのウェスタンブロットを行なった。

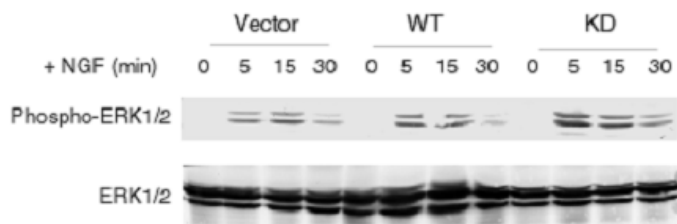


図4. キナーゼ不活型BREKの導入によりNGF依存性のERKリン酸化が促進される Vector, 野生型BREK (WT), 及びキナーゼ不活型BREK (KD) を、レトロウィルスを用いてPC12細胞に導入した。感染細胞を15 ng/ml NGFにて刺激し、ライセートに対し、抗リン酸化ERK1/2抗体 (上段)、抗ERK1/2抗体 (下段) でのウェスタンブロットを行なった。

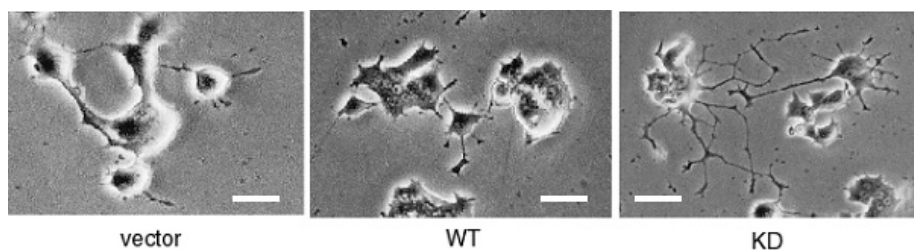


図5. キナーゼ不活型BREKの導入によりNGF依存性の神経突起の伸張が促進される Vector, 野生型BREK (WT), 及びキナーゼ不活型BREK (KD) を、レトロウィルスを用いてPC12細胞に導入した。感染細胞を50 ng/ml NGF存在下、2日間培養した。Bar = 50 μ m

更に本研究では、*BREK* 遺伝子座のキナーゼドメインをコードするエクソンをネオマイシン耐性遺伝子と置換することにより、*BREK* ノックアウトマウスを作製した。相同組み換え及び *BREK* 遺伝子の発現確認は、PCR、サザンブロット、ウェスタンブロット解析により行った。*BREK*^{-/-} マウスは、メンデルの法則よりも若干低い割合 (18%) で生まれるものの、見かけ上正常に生育する。このマウスについてまず Nissle, AChE 染色等により脳構造を野生型マウスと比較することを進めている。特に *BREK* の NGF シグナルへの関与が示唆されていることもあり、*TrkA* 欠損マウスで異常の知られている大脳基底核のコリン作動性神経細胞や種々の末梢神経節に着目している。また、ゴルジ染色、抗ニューロフィラメント抗体による免疫染色を行い、中枢、末梢神経系における神経線維の投射についての解析を進めるとともに、電気生理学的、行動学的解析を計画している。

本研究では脳特異的キナーゼ *BREK* について、生化学的特性及び発現プロファイルの解析を行うとともに、NGF-*TrkA* シグナルおよび LPA シグナルの新たな制御因子としての生理機能を明らかにした。今後、*TrkA*-ERK シグナル経路、LPA シグナル経路において *BREK* が作用する標的分子の同定や、他のシグナル系における *BREK* の役割解析を進め、*BREK* の作用メカニズムを解明していきたい。また PC12 細胞の系により推定された、神経突起の伸張、縮退両面における制御因子としての *BREK* の機能を、ノックアウトマウスの解析を通して検証していきたい。