

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 15 年度博士課程進学
氏名 金子 雅昭
指導教員名 豊島 近

論文題目

プロテインホスファターゼ耐性型 p38 変異体の単離と解析

はじめに

細胞を取り巻く環境中には高浸透圧、UV、熱ショックなどといった刺激が満ちており、それらは細胞にとって深刻な影響を与えうる。例えば、細胞外の浸透圧が細胞内より高くなると、脱水が生じ、細胞内の恒常性を維持できなくなる。しかし、そうなることを回避すべく細胞は、グリセロール等の可溶性低分子(適合溶質)を生合成し浸透圧差を是正しようとする。このように外界からの刺激に細胞が適応できるのは、刺激をシグナルの形で細胞内に伝達する機構が細胞に備わっているからである。

MAPK

MAPK(mitogen-activated protein kinase)経路は、真核生物一般に保存された、タンパク質のリン酸化を介したシグナル伝達機構である。MAPK 経路は一般的に、MAP キナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)、MAP キナーゼキナーゼ(MAPKK)、MAP キナーゼ(MAPK)の 3 つのキナーゼから構成されている。増殖因子、高浸透圧、UV、熱といった細胞外の刺激に応じて、細胞内で MAPKKK MAPKK MAPK の順に連鎖的にリン酸化反応が進む。リン酸化により活性化された MAPK は、細胞質から核内に入り、応答反応を担う遺伝子の転写を誘導し、応答反応を引き起こす。MAPK は、構造上の特徴として活性化ループに Thr(トレオニン)-X-Tyr(チロシン)配列を持ち、活性化にはこの Thr と Tyr の両残基がリン酸化されることが必要である。

哺乳類細胞におけるMAPKファミリーは大きく分けてERK(extracellular signal-regulated kinase)、JNK(c-Jun NH₂-terminal kinase)、p38、ERK5 の 4 つがある。ERKは増殖因子、細胞分化因子により活性化されるのに対し、p38とJNKはUV、熱、高浸透圧といった物理化学的ストレスあるいはサイトカインにより活性化される。ERK5 は増殖因子等や物理化学的ストレスどちらによっても活性化される。本研究で取り扱う p38 は、炎症性サイトカイン(IL-1 やTNFなど)の産生、免疫応答、細胞分化、生存、細胞死など極めて多

く生命現象に関わっている。p38には4つのアイソフォーム(α , β , γ , δ)が存在し、このうち α と β は組織普遍的に発現がみられる。近年、p38は炎症反応を統括する分子として注目されており、p38に阻害効果のある薬剤が精力的に開発されている。

MAPKを不活性化するプロテインホスファターゼ

MAPKは細胞の運命を決定づける因子である。したがって、応答反応後、その活性は速やかに不活性化される必要がある。プロテインホスファターゼは、MAPK経路を構成するプロテインキナーゼの脱リン酸化を介して、経路を負に制御することで過剰なシグナルを抑制する。MAPKに働くホスファターゼは、大別するとリン酸化 Tyr に作用するチロシンホスファターゼ(リン酸化 Tyr, Thr の両方に作用する DSP (dual specificity phosphatase) を含む)とリン酸化 Thr に作用するセリン/トレオニンホスファターゼがある。

哺乳類の2C型セリン/トレオニンホスファターゼファミリーは、p38、JNKを脱リン酸化する他、上流のMAPKKK(TAK1)、MAPKK(MKK4、MKK6)をも脱リン酸化することが知られている。哺乳類のMAPKに作用するチロシンホスファターゼとしては、PTP-SL/STEP(主に造血細胞で発現)やHePTP/LC-PTP(主に神経細胞で発現)があり、これらはERKとp38を脱リン酸化している。DSPは高い基質特異性を持つホスファターゼである。ERK、p38、JNKを脱リン酸化するCL100/MKP1やMKP4、ERKだけを脱リン酸化するMKP3、反対にp38とJNKだけを脱リン酸化するMKP5、M3/6などが例として挙げられる。

変異体を作製する意義、本研究の目的

機能獲得型(恒常的に活性を持つ)変異体は、経路の構成因子の同定などといったシグナル伝達経路の解析において有効なツールと成り得る。キナーゼに複数のアイソフォームが存在する場合、変異を導入してそれぞれ独立に活性化させることで、個々のアイソフォームの役割を明らかにすることもできる。

リン酸化によって活性化されるキナーゼの場合には、一般にセリンやトレオニンといった被リン酸化残基をグルタミン酸やアスパラギン酸といった酸性アミノ酸残基に置き換えることで、そのキナーゼにおける機能獲得型変異体を得ることができる場合が多い。しかしMAPKの場合においては、Thr-X-Tyr配列に対し同様の置換を行っても機能獲得型変異体を作り出すことはできないことが報告されている。また上流のキナーゼに無関係に機能しうる変異体を探索するという手法もある。しかしMAPKの基質は、転写因子やさらに下流のキナーゼ等、多岐にわたるため、この手法では本来の基質「スペクトル」とは異なったキナーゼが得られる可能性がある。以上のような様々なアプローチが、p38の機能獲得型変異体を得るために適用されてきたが、未だ有用なものが得られていない。そこで本研究ではリン酸化状態を維持しつづける変異体、すなわちプロテインホスファターゼに対し耐性を示す変異体の作出を試みた。最近、T細胞における免疫応答反応において、活性化に寄与するThr-X-Tyr以外の被リン酸化残基の存在が報告されるなど、p38自体の活性化とそれに続く応答には未知の部分が多く残されていると考えられる。それらを明らかにする上で、機能獲得型変異体が役立つことが期待される。

結果と考察

プロテインホスファターゼに耐性を示すHog1p変異体の単離

酵母における p38 のホモログは浸透圧応答経路の MAPK、Hog1p である。Hog1p は p38 と同様に 2C 型セリン/トレオニンホスファターゼ Ptc1p、およびチロシンホスファターゼ Ptp2/3p により脱リン酸化され不活性化される (Fig.1)。Hog1p の活性化に必要な 2 つのリン酸化残基のうち、Ptc1p はリン酸化 Thr を、Ptp2/3p はリン酸化 Tyr をそれぞれ標的とする。また Ptc1p と Ptp2/3p の両方を遺伝子破壊すると、Hog1p の過剰な活性化により致死となることが知られている。

以上を利用すると、一方のホスファターゼを遺伝子破壊した株においてのみ致死性を示す Hog1p 変異体を検索することで、他方のホスファターゼによる脱リン酸化に耐性を示すものが取得できるはずである (Fig.2、Ptc1p に対して耐性を持つ Hog1p 変異体の場合を示す)。そこでスクリーニングは次の手順で行った。

PCR による複製エラーを利用して変異を導入した *HOG1* ORF 群を、各ホスファターゼ破壊株中でプラスミドから発現させ、野生型の *HOG1* に比べ有意に生育不良にさせるものを選抜。

で得られた変異体が上流の MAPKK である Pbs2p に依存した活性を持つことを確認。

実際のスクリーニングの結果、Ptc1p に対して耐性を示すと考えられる Hog1p 変異体のみが取得された。変異体の DNA シークエンスを確認したところ、Hog1p 全長 415 アミノ酸残基のうち、¹⁴⁰Val、²⁰⁶Ile、あるいは³⁵⁹Pheに、それぞれ 1 アミノ酸置換変異(それぞれ V140A、I206T、F359L、F359S)を有することが判明した。これらの残基を p38 の構造に当てはめると、¹⁴⁰Val と ²⁰⁶Ile は活性化ループを挟む位置にあることが予想された。特に²⁰⁶Ile は p38 に限らず、ERK や JNK といった MAPK 一般においても保存されており、MAPK に保存された機能に関わるアミノ酸残基であることがうかがわれる。一方³⁵⁹Phe は Hog1p に特異的なアミノ酸残基であった。

これらの Hog1p 変異体は、スクリーニングの結果と一致して、Ptc1p と Ptp2/3p が存在する *in vivo* において、無刺激の状態でも Thr 残基のリン酸化が亢進していた。また浸透圧刺激時においても野生型に比べ高いリン酸化状態にあり、その後の脱リン酸化も野生型に比べ遅延していた。

p38 α 変異体の解析

Hog1p 変異体で変異の確認された残基¹⁴⁰Val と ²⁰⁶Ile は、p38 α においてはそれぞれ¹⁴⁶Ile、²¹²Ile である。そこで Hog1p における変異体 (V140A、I206T) と相同な変異を導入した p38 α 変異体 (それぞれ I146A、I212T) を作製した。培養細胞に発現させ、そのリン酸化状態を調べたところ、I212T については Thr 残基のリン酸化の亢進が顕著に見られた。また刺激応答後の脱リン酸化も遅延していた。

またプロテインホスファターゼに対する耐性も検討した。ここでは p38 に直接作用することが知られている 2C 型セリン/トレオニンホスファターゼ PP2C α について解析した。細胞内で共発現させたところ、野生型は脱リン酸化が進行したのに対し、変異体においては脱リン酸化の度合いは軽微だった。*in vitro* において精製 PP2C α を作用させても、やはり変異体はホスファターゼによる脱リン酸化に抵抗性を示した。

さらに p38 α の基質 ATF2 のリン酸化をモニターするルシフェラーゼアッセイにおいて、この変異体は野生型に比べ高い活性を有していた。この高いキナーゼ活性により、p38 変異体は細胞毒性を有することも確認された。

まとめ

酵母を用いた遺伝学的なアプローチにより 2C 型セリン/トレオニンホスファターゼ耐性型 Hog1p を取得した。この変異体は *in vivo* で Thr 残基のリン酸化が亢進していた。これと相同な変異を導入した p38 α 変異体においても、やはり Thr 残基のリン酸化が亢進していた。これは 2C 型セリン/トレオニンホスファターゼが変異体を脱リン酸化できないことに依ると示唆される。また p38 α 変異体は高いキナーゼ活性を有していた。また本研究では、スクリーニング条件に適合するチロシンホスファターゼ耐性型 Hog1p は取得されなかった。これはチロシンホスファターゼが 2C 型セリン/トレオニンホスファターゼとは異なった Hog1p の活性制御様式を取るためと考えられる。

これらの p38 α 変異体を利用して、p38 α の活性制御に 2C 型セリン/トレオニンホスファターゼの果たす役割を明らかにすると共に、p38 α 活性化の強度と持続時間によって細胞の応答がどのように制御されているのかを明らかにしていきたい。また、相同な変異を p38 の各アイソフォームに導入することによって、アイソフォーム毎の機能の違いを明らかにすることができると期待している。

