

論文内容の要旨

論文題目

Activation mechanism of MTK1 MAPKKK by the stress-inducible GADD45 genes

(ストレス誘導遺伝子 GADD45 による MTK1 MAPKKK の活性化機構)

氏 名 三宅 善嗣

生体を構成する細胞は、紫外線照射・浸透圧変化・酸化ストレス等の環境ストレスに絶えずさらされる可能性がある。これらの細胞外刺激により損傷を受けた細胞が、損傷の程度に依存して、損傷を修復する、あるいは積極的に細胞死（アポトーシス）を起こすという応答をすることで、発癌抑制等に作用し、個体全体としての秩序が保たれている。損傷の修復と細胞死の選択判断に深く関与しているのがストレス応答 MAP キナーゼ経路 (SAPK 経路) である。SAPK 経路は、細胞外シグナルを細胞核への確に伝達する役割を担い、その中心となる部分は MAPKK キナーゼ (MAPKKK), MAPK キナーゼ (MAPKK), MAP キナーゼ (MAPK) とよばれる 3 群のタンパク質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ) からなり、MAPKKK から MAPKK, MAPK へと至る連続したリン酸化反応を経てシグナルが伝達される。

哺乳類細胞は 2 つの SAPK 経路 (JNK および p38) を有する。両経路は、ストレス刺激以外に IL-1 や TGF- β 等のサイトカインによっても活性化される。MTK1 は SAPK 経路に属する MAPKKK の 1 つであり、出芽酵母の高浸透圧ストレス応答経路の MAPKKK である Ssk2/22 と高い相同性を持つことから、MTK1 はストレス応答 MAPKKK のプロトタイプであると考えられる。MTK1 のマウスホモログである MEKK4 のノックアウトマウスの解析から、MTK1/MEKK4 は免疫系における Th1 細胞の機能制御に必須であり、また、発生過程に

において神経組織の形成に重要な役割を果たすことが示唆されている。

MTK1 の N 末端領域は他の MAPKKK には見られない独特なアミノ酸配列を持つ。この領域に結合するタンパク質としてこれまでに、3 種類の GADD45 ファミリー分子 (GADD45 $\alpha/\beta/\gamma$) が同定されている。GADD45 遺伝子は様々な細胞外刺激により発現が誘導されることが知られている。哺乳類細胞において、GADD45 遺伝子を過剰発現させると MTK1 のキナーゼ活性が著しく上昇し、細胞死が誘導される。MTK1 による SAPK 経路の活性化は GADD45 遺伝子の発現誘導を介するため、ストレスを受けた細胞における遅延反応を担うと考えられる。

先行研究により、GADD45 分子が MTK1 の N 末端領域に結合すると MTK1 分子内の抑制的相互作用が解除され、MTK1 のキナーゼドメインが基質である MAPKK (MKK3/6) に結合して下流にシグナルを伝えることが示唆されているが、GADD45 分子による MTK1 活性化機構の詳細はこれまで明らかにされていなかった。そこで、本研究において、主に生化学的手法を用いて、GADD45 による MTK1 のキナーゼ活性制御の分子機構を解明した。

1. GADD45 の MTK1 への結合と MTK1 の活性化

まず、GADD45 β 分子において、MTK1 への結合および MTK1 活性化に重要な領域を特定した。約 10 アミノ酸の欠失を有する GADD45 β 変異体の発現プラスミドを系統的に作製し、酵母 2-ハイブリッド法と免疫共沈法により MTK1 と GADD45 β 変異体との結合を検討した。また、哺乳類培養細胞 (COS-7) に遺伝子導入し、*in vitro* キナーゼアッセイにより MTK1 のキナーゼ活性を調べた。その結果、GADD45 β 分子の N 末と C 末の一部を除く広範囲の領域が MTK1 の活性化に必要であることが示された。MTK1 に結合できない GADD45 β 変異体は MTK1 を活性化できないことから、MTK1 活性化には MTK1 への直接結合が不可欠であることが示唆された。

これまでに、N 末端側を欠失した MTK1 が構成的に活性化されるという知見が得られている。GADD45 結合領域を含む MTK1 の N 末端領域、キナーゼドメインを含む C 末端領域を哺乳類細胞内で別々に発現させて、*in vitro* で混合し、共沈実験を行ったところ、両者の相互作用が見られた。さらに GADD45 β を加えたところ、N-C 間の相互作用はほとんど見られなくなった。MTK1 に結合できない GADD45 β 変異体を混ぜ合わせても相互作用の阻害は認められなかった。よって、N 末端側は制御ドメインとして C 末端側キナーゼドメインに結合し、キナーゼ活性を抑制しているが、GADD45 β が MTK1 に結合すると N 末制御ドメイ

ンによる抑制が解除されることが示唆された。

2. MTK1 キナーゼドメインのリン酸化

多くのキナーゼにおいて、キナーゼドメイン内の活性化ループに存在する特定のアミノ酸残基 (Ser/Thr) のリン酸化が活性化に重要であることが知られている。そこで、MTK1 の活性化ループに存在する、リン酸化される可能性のある5つの Ser/Thr 残基を1つずつ Ala に置換した変異体に関して、まず、*in vitro* キナーゼアッセイによりキナーゼ活性を検討した。その結果、Thr-1493 と Thr-1504 が MTK1 のキナーゼ活性にとりわけ重要なアミノ酸であることが示された。次に、リン酸化特異的抗体を作製し、*in vivo* でこれら2残基がリン酸化されるか調べたところ、Thr-1493 のリン酸化が GADD45 β の発現に依存して起こることを見いだした。よって、GADD45 β が Thr-1493 のリン酸化を誘導するものと考えられる。また、Thr-1493 のリン酸化は MTK1 自身のキナーゼ活性にも依存することから、自己リン酸化によるものであることが示唆された。さらに、Thr-1493 の自己リン酸化は分子内反応ではなく複数の MTK1 分子間で起こる反応 (トランスリン酸化反応) である可能性を示す結果が得られた。

3. MTK1 の2量体化

哺乳類の SAPK 経路に属する MAPKKK には2量体化 (または多量体化) により活性化されるものが存在する。そこで、哺乳類細胞内での MTK1 の2量体形成の可能性を免疫共沈法により検討したところ、GADD45 β の共発現が MTK1 の2量体形成を著しく亢進させることを見いだした。系統的に作製した MTK1 の欠失変異体を用いた実験から、MTK1 の2量体化に必要な領域が 941aa-1272aa であることが示された。この部分にはタンパク質間の相互作用に重要な役割を果たすコイルドコイルモチーフが含まれており、コイルドコイルモチーフに変異を導入すると2量体形成が妨げられた。

4. MTK1 の自己リン酸化と2量体化の関係

MTK1 の2量体化と Thr-1493 の自己リン酸化はともに GADD45 依存的であることから、この2つの現象の関連性を検討した。コイルドコイルモチーフ内に変異を有し、GADD45

存在下でも2量体を形成できない MTK1 変異体では, Thr-1493 のリン酸化が著しく低下しており, また, *in vitro* におけるキナーゼ活性も同様に低下していたことから, MTK1 の2量体化, 自己リン酸化, 活性化の間には強い相関があることが示された。さらに, FKBP ドメインを MTK1 の N 末端に融合し, 強制的に MTK1 を2量体化させるシステムを用いた実験結果から, MTK1 の単純な2量体化のみでは MTK1 の活性化には十分ではなく, GADD45 の MTK1 への結合と, それに伴って起こるコイルドコイル領域を介した2量体化が MTK1 のキナーゼ活性の上昇に必要であることが示された。

以上の結果より, GADD45 ファミリー分子による MTK1 活性化機構として, 以下のモデルが導かれた。1) 非刺激状態の細胞内では, MTK1 は分子内抑制相互作用のため, 不活性状態にある。2) 細胞外刺激により発現誘導された GADD45 分子が MTK1 の N 末端側制御領域に結合する。3) MTK1 分子内部の抑制的相互作用が解除される。4) MTK1 分子が持つ2量体化ドメインが露出し, MTK1 分子どうしの2量体が形成される。5) 2量体化した MTK1 が Thr-1493 のトランスリン酸化を経て自身のキナーゼ活性を上昇させる。6) GADD45 の結合により露出した MTK1 のキナーゼドメインに MAPKK (MKK3/6) が結合し, MTK1 によるリン酸化を受ける。