

論文の内容の要旨

論文題目：紫外線応答における DICC1-DLK-JNK シグナル伝達機構の解明

氏名：三輪 崇志

【序論】

ストレス応答性 MAPK (mitogen-activated protein kinase)カスケードは、細胞内外の物理化学的ストレスによる刺激を細胞内情報伝達へと変換して生理的応答を行うシグナル伝達経路であり、おもに JNK 経路と p38 経路から構成されている。DLK (dual-leucine-zipper-bearing kinase)は、MAPK カスケードにおいて最上流を担う MAP3K ファミリーに属し、進化的に良く保存されている分子である。また、DLK は主として JNK 経路を特異的に活性化し、アポトーシスをはじめとする様々な細胞応答を引き起こす活性を持つことが知られている。よって、DLK を介した細胞内シグナル伝達は物理化学的ストレスに対する生理応答において重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、他の多くの MAP3K ファミリー分子については活性化刺激となる物理化学的ストレスの同定が進んでいる一方で、DLK の活性化刺激については現在のところ不明な点が多い。そのため、DLK の活性化機構についてもあまり解析が進んでいないのが現状である。本研究において私は、まず DLK の活性化の分子機構について解析を行い、その知見から DLK の活性を検出できる抗 DLK リン酸化抗体を作製し、これを用いて DLK 活性化刺激の同定を試みた。さらに、DLK は分子間相互作用を担うロイシンジッパーモチーフを2箇所を持つことから(Fig. 1)、結合分子の解析から得られる DLK 活性制御機構についての情報が有用であると考え、DLK の活性に影響を与える結合分子の同定を行った。本研究は、これ

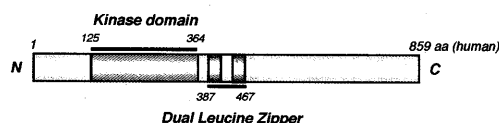


Fig.1 DLK タンパク質のドメイン構造

らの情報をもとに DLK の活性制御機構を明らかにし、JNK 経路を介した新たなストレス応答機構を解明することが目的である。

【方法と結果】

DLK は UV 刺激により活性化する

DLK の活性化が他のいくつかの MAP3K と同様にキナーゼ領域中の活性化ループに存在するセリン/スレオニン残基のリン酸化によって制御される可能性を想定し、MAP3K ファミリーの活性化ループに比較的良く保存されている Ser265、Thr266、Ser269 の必要性について検討した。それぞれの Ala 変異体を用いて解析を行ったところ、Ser269 が DLK の活性化に必要なことが判明した(Fig. 2a)。この結果に基づき、DLK の Ser269 のリン酸化を特異的に認識する抗体 (p-DLK 抗体) を作製し、p-DLK 抗体が野生型 DLK を認識し、キナーゼ不活性型 DLK (KR 変異体) を認識しないことを確認した。p-DLK 抗体を用いて細胞内に発現させた DLK の活性が各種ストレスによりどのように変化するかを、JNK の活性化に関与することが知られている複数の刺激を中心に検討した。その結果、DLK は紫外線 (UV-C / 波長 254nm) によって活性化することが明らかとなった(Fig. 2b)。UV による DLK の活性化と内在性 JNK の活性化との時間依存性がほぼ合致することから、UV による JNK 活性化に DLK が深く関与していることが示唆された。

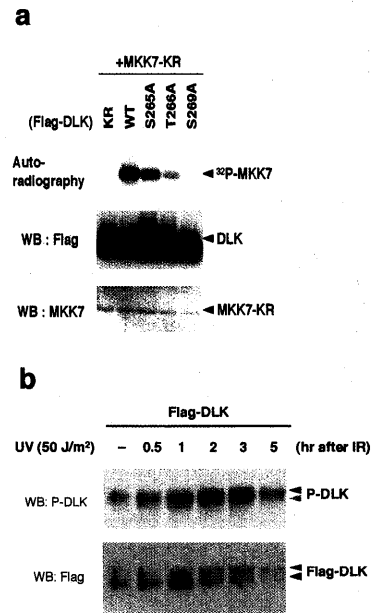


Fig.2 (a) DLK 活性化に必要なリン酸化部位
(b) UV による DLK の活性化

pull-down 法による DLK 結合分子 DICC1 の同定

DLK の活性化刺激として UV が同定されたことから、その活性化メカニズムを解明するためのアプローチとして、HEK293 細胞に過剰発現させた Flag-DLK の免疫沈降物を質量分析計により解析することで新たな DLK 結合分子の探索を試みた (産総研生物情報解析センター・蛋白質ネットワーク解析チームとの共同研究)。その結果、新規 DLK 結合分子として機能未知分子を同定し、DICC1 (DLK-interacting coiled-coil domain containing protein 1) と命名した。HEK293 細胞における DICC1、DLK の共発現系において免疫沈降実験を行った結果、両分子の結合が確認された。また同様に、DICC1 と各種 MAP3K 分子の結合について検討した結果、DICC1 は MAP3K ファミリー分子の中で DLK に対する結合特異性が高いことが示された(Fig. 3)。

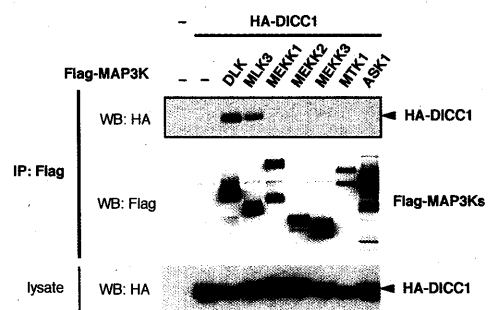


Fig.3 DICC1 の結合特異性

DICC1 は DLK の活性を抑制する

DICC1 が DLK と相互作用する分子であることが示されたことから、次に DICC1 が DLK の活性に及ぼす影響について解析を行った。DLK と DICC1 を共発現させた HEK293 細胞から DLK を免疫沈降し、そのキナーゼ活性を DLK の下流分子である MKK7 リコンビナントタンパク質を基質とした *in vitro* kinase assay により測定した。その結果、DICC1 存在下では定常状態における DLK の活性が抑制されることが明らかとなった(Fig. 4a)。更に、HEK293 細胞における DLK と DICC1 の共発現系においては、定常状態に加えて UV 刺激による DLK の活性化も抑制されていることが明らかとなった(Fig. 4b)。

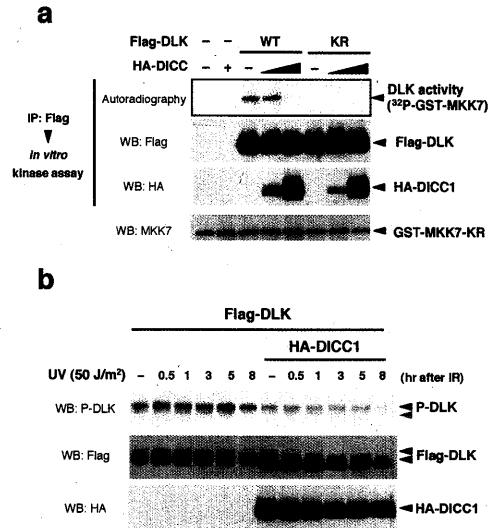


Fig.4 (a) DICC1 による DLK のキナーゼ活性の抑制
(b) UV による DLK リン酸化の DICC1 による抑制

DICC1 は UV 刺激により DLK から解離する

以上の結果は、DICC1 が定常状態での DLK 活性ならびに UV 刺激による DLK の活性化に対する抑制因子であることを示唆することから、定常状態で DLK の活性を抑制している DICC1 が、UV に応答して DLK から解離することによって DLK の活性化が引き起こされる可能性が考えられた。そこで、HEK293 細胞に発現させた DLK に結合する内在性 DICC1 の UV 刺激による結合解離について免疫沈降法を用いて検討した結果、DLK に結合する内在性 DICC1 は UV 刺激により解離することが明らかとなった(Fig. 5)。

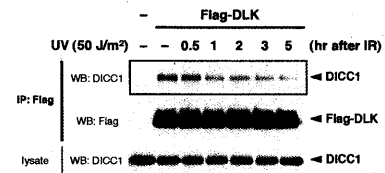


Fig.5 UV 刺激による DICC1 の解離

UV 刺激による JNK 活性化は DICC1 ノックダウンにより増強される

UV 刺激による JNK 活性化に対して DICC1 が抑制的に機能しているかを検討するため、siRNA を用いて HEK293 細胞における内在性 DICC1 のノックダウンを行い、UV に対する JNK および p38 の活性化を検討した。その結果、DICC1 ノックダウン細胞において、UV による p38 の活性化はほとんど影響を受けないのに対し、JNK 活性化は増強された(Fig. 6)。この結果は、DICC1 がおもに DLK の活性を抑制することによって、UV による JNK の活性化を負に制御していることを示しているものと考えられる。

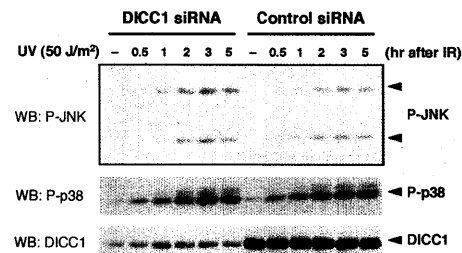


Fig.6 UV 応答に対する DICC1 ノックダウンの効果

【まとめと考察】

本研究において私は、DLK の Ser269 リン酸化が DLK 活性制御の重要なステップであることを明らかにし、このリン酸化を指標とした解析から DLK の活性化刺激として UV を同定した。また、DLK の新規結合分子として DICC1 を同定し、DICC1 が定常状態および UV 刺激時に DLK の活性抑制因子として機能することを示した。更に、DLK と DICC1 の複合体形成が、UV 刺激による JNK

活性化の重要な制御機構の一つであることを見出した。DICC1 は UV 刺激依存的に DLK より解離することと併せ、私は Fig. 7 に示す DICC1 を介した新たな DLK のシグナル伝達メカニズムを提示する。UV 刺激は、DNA 傷害や酸化ストレスなどの様々な物理化学的ストレスを介して細胞に傷害を与えられている。よって、DICC1-DLK 複合体が UV 以外のどのような刺激に反応するかを検討することによって、両者の解離機構の詳細が明らかになるものと考えている。

ノックアウトマウスの解析から、UV によるアポトーシスの誘導には JNK が必要であることが明らかにされており、JNK の活性を厳密に制御することは細胞の UV ストレス応答において重要な生物学的意義を持つ。DICC1 は UV に対する細胞応答において、JNK 経路の活性化の程度とタイミングを調節する分子としてその機構に寄与している可能性が考えられる。よって、本研究を端緒とする DICC1-DLK 複合体を介した UV 応答メカニズムの更なる解析は、物理化学的ストレスに対する細胞応答を担うシグナル伝達機構の理解に大きく寄与することが期待される。

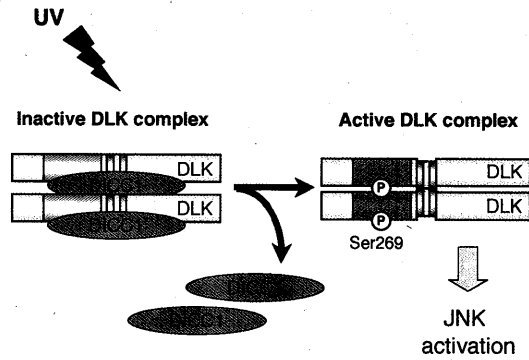


Fig.7 UV 刺激に反応する DLK-DICC1 を介したシグナル伝達メカニズム