

審査の結果の要旨

氏名 三輪 崇志

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推測される。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。

本研究では、DLK の活性化刺激および活性化の分子機構について解析を行った。その結果、DLK は紫外線 (UV) によって活性化すること、新規 DLK 結合分子として同定した DICC1 が DLK の抑制因子として機能し、UV 応答性の JNK シグナル伝達に関与することが示された。これら本研究によって得られた知見について以下にまとめる。

1. 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結果、Ser269 が DLK の活性化に必要であることが判明した。この結果に基づいて DLK の Ser269 のリン酸化を特異的に認識する抗体を作製し、これ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。UV による DLK の活性化は内在性 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。

2. 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。この結果、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。

3. 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。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。

4. 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に反応して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に結合している内在性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。

5. 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の活性化はあまり影響を受けないのに対し、JNK活性化は増強された。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。

以上より、本研究ではDLKのSer269リン酸化がDLKの活性化に必要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により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の結合解離が、UV刺激によるJNK活性化の制御機構の一つであることが示唆された。

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と考えられる。よって、本研究によって明らかとなったDICC1-DLK複合体を介したUV応答性のJNKシグナル伝達に対する知見は、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。以上より、本研究は博士(薬学)の学位に値するものと判定した。