

論文の内容の要旨

論文題目 MAP キナーゼ p38 α の動的機能制御機構の解明

氏名 徳永 裕二

【序論】

p38 α は広く真核生物に保存された MAP キナーゼの一種であり、様々なストレス刺激に応答して細胞死を誘導する他、LPS などの炎症性刺激に応答して炎症性サイトカインの産生を促進するなど、多様な生命現象を支配する重要なシグナル伝達分子である。p38 α の立体構造はタンパク質キナーゼ間に高度に保存された特徴を保持しており、ATP を結合する N ロープと基質リン酸化部位を結合する P+1 サイトを有する C ロープがヒンジにより連結されている。N, C ロープの間にはリン酸化により活性を制御する活性化ループが配置されている。p38 α は MAP キナーゼカスケード上流の特異的な MAPKK により活性化ループ上の TGY モチーフを二重リン酸化されると、N, C ロープ間がヒンジを中心として閉じた構造を形成できるようになり活性化される。活性化された p38 α はさらに下流の特異的な基質をリン酸化することにより、他の MAP キナーゼカスケードとは独立した経路でのシグナル伝達を達成する。先行報告の p38 α と基質 MK2 の相互作用に注目すると、p38 α は MK2 全長配列に対して解離定数約 2.5 nM にて結合する一方、C 末端 30 残基を欠失した MK2 に対する解離定数は全長の 1,000 倍以上であり親和性が顕著に低下する。一方 C 末端 30 残基のペプチドに対する解離定数は約 20 nM と高親和性を保持している。このように p38 α を含めて MAP キナーゼは、MAPKK および基質を活性中心とは異なる構造領域で認識することにより結合の特異性と親和性を保障している。この機構はドッキング相互作用と呼ばれる。一方、p38 α による基質リン酸化機構を詳細に理解するためには、ドッキング相互作用に加えて、活性部位である p38 α P+1 部位に対して基質リ

ためには、ドッキング相互作用に加えて、活性部位である p38 α P+1 部位に対して基質リン酸化部位が結合し、かつ ATP から基質の被リン酸化残基へのリン酸基転移反応が起こり得る閉構造を形成した機能的複合体が形成される機構、およびその構造状態を解明する必要がある。これまでに報告された唯一の MAP キナーゼ - 基質複合体構造である p38 α -MK2 複合体結晶構造では、MK2 はドッキング配列を介して p38 α の活性中心から離れた位置に結合している一方、MK2 のリン酸化残基 Thr222, Ser272 および Thr334 は p38 α の P+1 サイトには結合していない。したがって、機能的複合体の形成機構は依然として不明である。この原因は解析に用いられた p38 α が閉構造の形成に必要な活性化ループの二重リン酸化を受けていないこと、および ATP が結合していないことであると考えられる。そこで本研究においては、活性化構造を形成しうるリン酸化 p38 α を解析対象とし、溶液 NMR 法を駆使して ATP および基質との相互作用解析を行うことにより機能的複合体形成機構を解明することを目的とした。

【結果】

まず p38 α の立体構造に対する活性化ループのリン酸および ATP 結合の寄与を解析した。この結果、活性化ループのリン酸化のみでは p38 α の立体構造の変化は小さく、ATP の結合に伴い初めて構造全体におよぶ変化が誘起された。したがって、ATP 結合部位と P+1 サイトが近接した閉構造の形成には、活性化ループのリン酸化と ATP 結合の両方が必要であることが示唆された (Figure 1)。以下では、リン酸化 p38 α を単に p38 α と表記する。

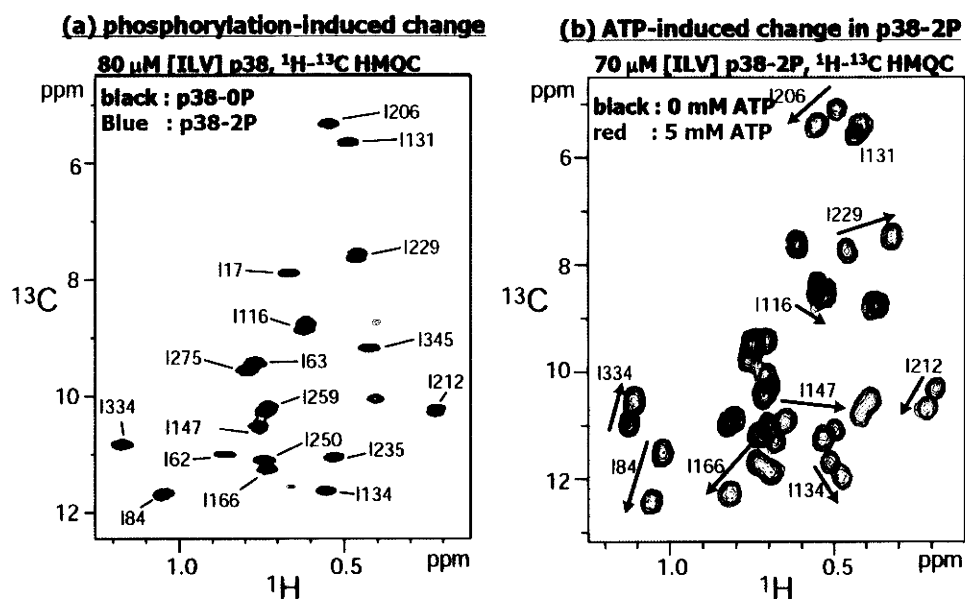


Figure 1. リン酸化および ATP 結合に伴う p38 α の 1 H- 13 C 相関スペクトルの変化 (a) ATP 非存在下、リン酸化前 (黒) とリン酸化後 (青) のスペクトルの重ね合わせ。 (b) リン酸化 p38 α について ATP 非存在下 (青) と ATP 存在下 (赤) のスペクトルの重ね合わせ。

次に p38 α の機能的複合体形成要件を解明する目的で、p38 α に対して基質 MK2 の被

リン酸化残基 Thr334 および C 末端ドッキング配列を含む 334/D ペプチドの添加実験を行った。この結果、ATP アナログの有無によらず p38 α のドッキング相互作用部位に 334/D ペプチド添加に伴う化学シフト変化が観測された一方、ATP アナログ結合状態の p38 α にのみ P+1 部位の化学シフト変化が観測された (Figure 2)。したがって、p38 α と 334/D ペプチドは ATP アナログの有無によらずドッキング相互作用を介して結合できる一方、基質リン酸化部位が p38 α の P+1 サイトに対して結合するためには、p38 α に対する ATP アナログの結合が必要であることが明らかとなった。即ち、p38 α - 基質 - ATP の機能的複合体の形成過程において、ATP アナログの結合と基質リン酸化部位の p38 α P+1 サイトへの結合の順序がこの順番に厳密に制御されることが初めて見出された。

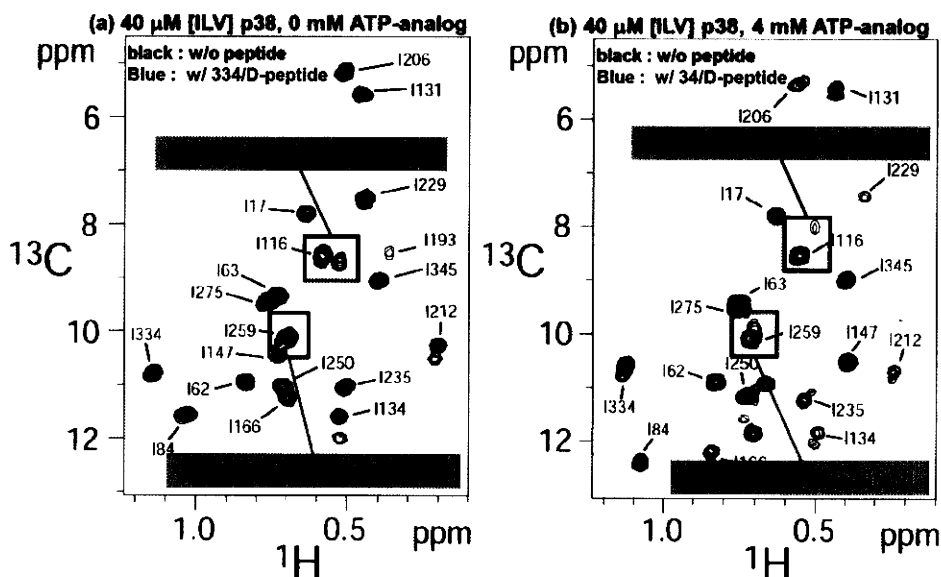


Figure 2. 334/D ペプチド添加に伴う p38 α の ^1H - ^{13}C 相関スペクトルの変化 (a) ATP アナログ非存在下、(b) ATP アナログ存在下。334/D ペプチド非添加条件を黒、添加条件を青のスペクトルにてそれぞれ示した。ドッキング相互作用部位の I116 のシグナルをマゼンタ、P+1 部位近傍の I259 のシグナルをシアンの四角にて囲った。

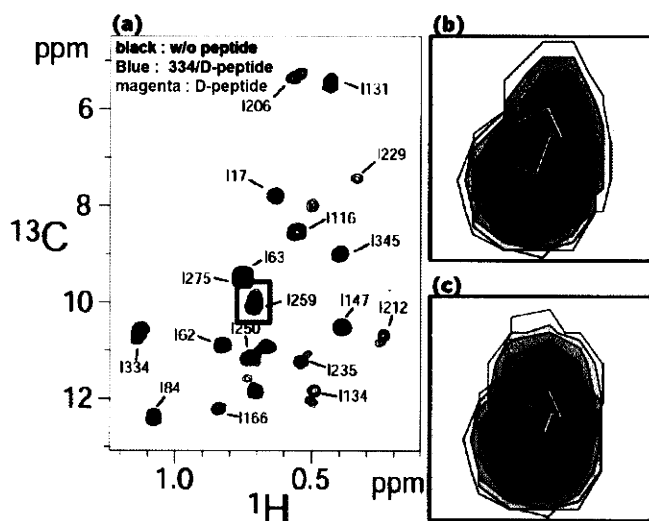


Figure 3. I259 における特徴的な化学シフト変化

(a) ATP アナログ結合状態の p38 α について、ペプチド非添加条件を黒、334/D ペプチド添加条件を青、D ペプチド添加条件をマゼンタのスペクトルにてそれぞれ示した。シアンの四角で囲った I259 のシグナルを含む領域を (b), (c) に拡大して示し、それぞれペプチド添加前後のシグナルの中心を矢印にてつないだ。

さらにこの解析過程において、被リン酸化残基を持たず MK2 のドッキング配列のみから構成される D ペプチドの結合が、p38 α の P+1 サイト近傍に対してアロステリックに化学シフト変化を誘起することが見出された (Figure 3)。このことから、ドッキング相互作用が P+1 サイトに対してアロステリックに、基質リン酸化部位の結合に適した構造変化を誘起する可能性を想定した。これを含めて、ドッキング相互作用が p38 α の機能的複合体の形成に至る ATP 結合および p38 α P+1 サイトに対する基質リン酸化部位の結合を増強するか否か、また機能的複合体中にて進行するリン酸基転移反応を促進するか否かについて網羅的かつ定量的に検証する目的にて、D ペプチドの有無の条件で p38 α の ATP (アナログ) に対する結合親和性解析、p38 α の基質リン酸化部位のみから構成される 334 ペプチドに対する結合親和性解析、および p38 α の 334 ペプチドリン酸化活性の解析を行った。この結果、ドッキング相互作用は p38 α の ATP (アナログ) に対する結合親和性を約 10 倍に、334 ペプチドに対する結合親和性を約 2 倍に、334 ペプチドリン酸化反応における代謝回転率を約 1.5 倍に増強した (Figure 4, Table 1)。一方、ATP の結合がドッキング相互作用の強さに与える影響を調べる目的で、ATP アナログの有無で p38 α の D ペプチドに対する結合親和性を ITC にて決定し両者を比較した。この結果、ATP アナログの結合に伴い p38 α の D ペプチドに対する結合親和性は約 1.5 倍に増強された (Table 2)。以上の結果から、ATP 結合とドッキング相互作用の間には協同性があることが示された。

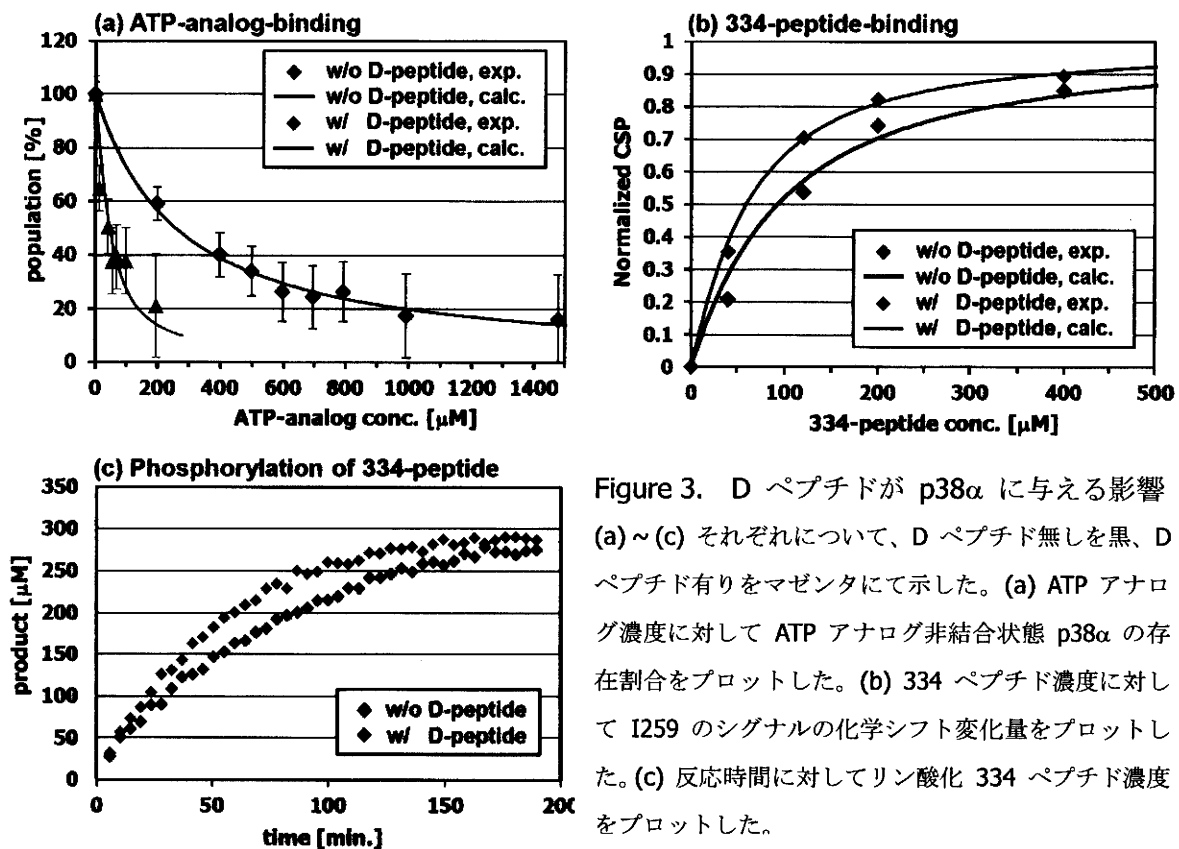


Figure 3. D ペプチドが p38 α に与える影響 (a) ~ (c) それぞれについて、D ペプチド無しを黒、D ペプチド有りをマゼンタにて示した。(a) ATP アナログ濃度に対して ATP アナログ非結合状態 p38 α の存在割合をプロットした。(b) 334 ペプチド濃度に対して I259 のシグナルの化学シフト変化量をプロットした。(c) 反応時間に対してリン酸化 334 ペプチド濃度をプロットした。

Table 1. D ペプチドの有無における p38 α の ATP アナログ親和性、334 ペプチド親和性および基質リン酸化活性

D-peptide	unbound	bound
K_d for ATP-analog [μM]	237	27
K_d for 334-peptide [μM]	73	39
k_{cat} of 334-peptide phosphorylation [/sec]	17.3	24
K_m of 334-peptide phosphorylation [μM]	420	410

上記で示された ATP 結合とドッキング相互作用の協同性が MK2 以外の基質や MAPKK に対しても一般に保持されるか否かを調べる目的で、MEF2A, MKK6, および MKK3b のドッキングペプチドを用意し、ATP アナログの有無における p38 α のドッキングペプチドに対する親和性解析、およびドッキングペプチドの有無における p38 α の ATP アナログに対する親和性解析を行った。この結果、ATP アナログの結合に伴い p38 α のドッキング配列に対する結合親和性は 10・70 倍に増強された (Table 2)。また定性的な結果ではあるものの、ドッキングペプチドとの結合に伴い p38 α の ATP アナログに対する結合親和性は顕著に増強された。データは本論文中に示す。これらの結果より、ATP アナログの結合とドッキング相互作用の協同性が広く MAP キナーゼと相互作用相手分子の間で保持されていることが示唆された。

Table 2. ATP アナログの有無における p38 α のドッキングペプチドに対する解離定数 [μ M]

ATP-analog	unbound	bound
D-peptide	0.15	0.1
MEF2A docking peptide	45	0.98
MKK6 docking peptide	33	0.45
MKK3b docking peptide	80	5.55

【結論】

リン酸化 p38 α を用いた p38 α - 基質 - ATP の機能的複合体形成機構の解析を行った。この結果、機能的複合体はリン酸化 p38 α に対してまず ATP が結合し、次に P+1 サイトに対して基質リン酸化部位が結合する過程によって形成されることが明らかとなった。この過程において、基質のドッキング相互作用が p38 α に対する ATP および基質リン酸化部位の結合を増強し、かつリン酸化反応の代謝回転率を増加させることが示された。ドッキング相互作用に伴い p38 α の ATP 結合部位および P+1 サイトにアロステリックな化学シフト変化が誘起されており、ドッキング相互作用に伴う分子内構造変化の伝播が上述の p38 α の活性制御に寄与している可能性が強く示唆された。以上の知見は、p38 α の機能的複合体の形成要件およびその過程に対するドッキング相互作用の正の寄与を、初めて明確かつ定量的に見出したものである。本知見は、様々なタンパク質が混在する細胞内環境において、MAP キナーゼ経路を介した特異的なシグナルが適切な強度、速度および持続時間で伝達されることにより正しい細胞応答を達成する機構の理解に寄与すると考えられる。