

審査結果の要旨

氏名 徳永 裕二

MAP キナーゼ p38 α の動的機能制御機構の解明と題する本論文は、MAP キナーゼの一種である p38 α が基質リン酸化を認識する機構に関して、NMR にて解析した成果を述べたものである。本論文は、全 5 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に実験材料および実験方法が記されている。第 3 章に実験結果がまとめられ、第 4 章では実験結果に対する考察と今後の展望について述べている。

第 3 章では、まず解析対象とした MAP キナーゼ p38 α の活性化に必要なリン酸化を施し、リン酸化および補酵素である ATP の結合が p38 α の立体構造に与える影響を解析している。次に、リン酸化 p38 α と基質由来ペプチドの相互作用解析を行い、基質リン酸化部位が p38 α の活性中心に結合するための条件を同定している。最後に、基質とのドッキング相互作用が p38 α の ATP 結合、基質リン酸化部位との結合、および基質へのリン酸基転移反応速度に与える影響を解析している。

MAP キナーゼ p38 α は活性中心における基質リン酸化部位との相互作用に加えて、ドッキング相互作用と呼ばれる活性中心から離れた部位を用いた相互作用により基質との特異的な高親和性結合を達成する。これまでに基質のドッキング部位が MAP キナーゼに結合した MAP キナーゼ - 基質複合体構造は報告されている一方、基質リン酸化部位が MAP キナーゼの活性中心に結合した機能的複合体構造は解明されておらず、その構造状態および形成機構は不明であった。この原因は、先行研究では MAP キナーゼが活性化に必要な活性化ループ上の二重リン酸化を受けておらず、ATP も結合していない状態を解析対象としている点にある。これに対し、本論文では活性化ループの二重リン酸化を受けた p38 α を解析対象とすることにより、機能的複合体の形成機構を解明することに成功していた。まず、MAPKK の一種である MKK6 により p38 α をリン酸化し、リン酸化および ATP 結合が p38 α の立体構造に与える影響を NMR スペクトルの変化に基づき解析していた。その結果、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 の結合に伴い構造全体におよぶ変化が誘起されていた。その結果から、ATP 結合部位と基質リン酸化部位の結合部位 (P+1 サイト) が近接しリン酸基転移反応が起こる閉構造の形成には、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を示していた。次に p38 α と基質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 ATP アナログ有無の条件で行っていた。その結果、P+1 サイト近傍の Ile229 に由来するシグナルの化学シフト変化が ATP アナログ存在下でのみ観測されたことから、基質リン酸化部位が p38 α の P+1 サイトに対して結合し機能的複合体を形成するためには、p38 α に対する ATP アナログの結合が必要であることを明らかと示していた。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 サイト近傍の Ile259 に由来するシグナルにアロステリックな化学シフト変化を誘起することを見出していた。この点に着目し、最後に、ドッキング相互作用がアロステリックな構造変化を介して p38 α の機能的複合体形成に至る ATP 結合および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を、D ペプチドの有無の条件での 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ていた。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 倍に増強することによりを明らかとしていた。一方、ATP アナログ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 アナログの有無での p38 α の D ペプチドに対する結合親和性解析を行い、両者を比較していた。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 倍に増強されていた。さらに、MK2 と比較して p38 α との親和性が 100 分の 1 から 1000 分の 1 である MEF2A, MKK6, および MKK3b のドッキングペプチドを用いて同様の解析を行った結果、ATP アナログの結合に伴い p38 α のこれらドッキングペプチドに対する結合親和性は 10 - 70 倍に増強されていた。それらの結果から、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を示していた。

第 4 章においては、まず、p38 α 活性化状態である閉構造の形成に対する活性化ループの二重リン酸化および ATP 結合の寄与について、2 箇所のリン酸化がこれまで考えられていたように明確な役割分担をするのではなく、閉構造形成に協同的に寄与することを議論している。次に、334/D ペプチドの結合実験から決定した ATP アナログおよび基質リン酸化部位の結合順序の合理性に関して議論している。最後に、ドッキング相互作用による p38 α の基質リン酸化反応経路の各段階の促進機構の生物学的な意義を議論している。ドッキング相互作用を持たない非特異的なタンパク質がリン酸化される場合を考えると、p38 α に対する ATP 結合、リン酸化部位の結合およびリン酸基転移反応効率が低く抑えられるため、ノイズの発生が抑制され、特異的なシグナル伝達が優先的に達成される機構を提唱している。

本研究では、これまで不明であった MAP キナーゼと基質の機能的複合体の形成機構に対して、リン酸化 p38 α を観測対象とした NMR 解析を適用した。その結果、機能的複合体形成に至る ATP および基質の結合順序、および、それらの結合およびリン酸基転移反応からなる基質リン酸化反応の各段階がドッキング相互作用により制御される様式を明らかとし、MAP キナーゼカスケードのシグナル純化機構を提唱している。

以上、本研究の成果は、MAP キナーゼ p38 α による基質リン酸化機構に対して新たな知見を加えるものであり、これを行った学位申請者は博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。