

氏名	鎌倉幸子
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2227号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	MAPKファミリー分子ERK5/BMK1の増殖因子による活性化と核へのシグナル伝達経路の解析
論文調査委員	(主査) 教授 西田栄介 教授 井口八郎 教授 米原伸

論文内容の要旨

ERK5/BMK1はMAPK/ERK1,2と同じく活性化リン酸化部位としてTEY配列を持ち、アミノ酸の一次配列上MAPK/ERK1,2に最も近い新規MAPKファミリー分子である。しかし他の既知のMAPキナーゼ分子はすべて長さが約400アミノ酸程度であるのに対し、ERK5は800アミノ酸と大きく、そのN端半分にキナーゼドメインを、そのC端半分に機能の全く不明な領域を有する特徴的なMAPキナーゼである。その活性化因子としてMEK5が同定されており、MEK5も配列上MAPKK/MEK1,2と最も近いことが知られている。これまでにERK5が、JNK/SAPKやp38と同様、酸化あるいは高浸透圧ストレスによって活性化することが報告されていたが、上流のシグナル因子や生理的機能についてはほとんど明らかにされていなかった。

本研究ではまずERK5を活性化する細胞外刺激について解析をおこなった。その結果、これまで知られていたH₂O₂や高浸透圧などのストレス刺激以外にもEGF、NGFといった増殖因子により、非常に強く活性化することを見出した。そこで、この増殖因子によるERK5の活性化がRasに依存するかを検討した。ドミナントネガティブ変異体のN17Rasを細胞に導入したところ、PC12細胞においてはほぼ完全に、またCOS7細胞においても部分的にEGFによるERK5の活性化が阻害された。これらのことから増殖因子によるERK5の活性化にRasが必要であることが示唆された。また、活性型変異体のV12RasをPC12細胞に共発現したところERK5が強く活性化することも明らかになった。

これまで、ERK5の標的についてはあまり解明されていなかったため、その候補として、Rasの下流で最もよく解明されているc-fosプロモーターのSRE (serum response element) について検討した。SRE上には、serum-response factor (SRF) と ternary complex factor (TCF) であるEtsファミリー転写因子(Elk1やSap1)が結合する。SRF二量体はSRF上に結合しTCFをリクルートしternary complex (3量体)を形成する。MAPキナーゼはternary complexの構成因子であるElk1やSap1の転写活性化ドメイン内をリン酸化し活性化することで、初期応答遺伝子であるc-fosの転写を促進することが知られている。このSREを用いたルシフェラーゼアッセイから、血清刺激による転写活性化をドミナントネガティブ変異体のMEK5が阻害すること、また活性型MEK5の発現によりSREに結合する転写因子のひとつSap1aを活性化することを見出した。このSap1aを基質にしたキナーゼアッセイ、さらに細胞ラベルによる解析から、*in vitro*, *in vivo*において、活性化したERK5がSap1aをリン酸化することが示された。

ERK5がSREに関与することが明らかになったことから、次に内在性Fosの発現誘導に対するERK5の関与を検討した。血清の無い状態でしばらく培養したNIH3T3細胞に血清刺激を与えると刺激後約2時間をピークにFosの発現誘導が起こる。細胞にドミナントネガティブ変異体のMEK5を発現させたところ、この内在性Fosの発現誘導が抑制された。

これらの結果から、受容体型チロシンキナーゼ→Ras→ERK5→Sap1a→c-Fosという、これまでMAPK/ERK1,2で知られていた経路とは別の、新しい核へのシグナル伝達経路の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

新規 MAPK ファミリー分子である ERK5/BMK1 とその上流の MAPKK ファミリー分子 MEK5 は、PCR によってクローニングされた経緯からその分子の存在が示されてはいたが、これまでその生理的意義あるいはシグナル伝達経路については、ほとんど解明されていない状態であった。申請者はその MEK5-ERK5 を哺乳類培養細胞に発現させ、そのシグナル伝達経路の解明を目的として、様々な細胞生物学的、生化学的解析を行った。

ERK5 は以前、H₂O₂ によって活性化するという報告がなされていたが、申請者は EGF や NGF といった増殖因子によっても ERK5 が強く活性化することを見出した。また活性型及びドミナントネガティブ変異体の Ras を用いた解析により、PC12 細胞において活性型 Ras との共発現によって ERK5 が活性化すること、また増殖因子による ERK5 の活性化に Ras が必要であることを見出した。増殖因子及び Ras はこれまで生体の様々な局面において重要な機能を担うことが示されてきており、これらの結果はそれらの一端を MAPK/ERK1, 2 だけでなく、ERK5 もまた担いうる可能性を示唆するものであり、非常に興味深いといえる。さらに申請者は、ERK5 の下流のターゲットについても解析を行った。レポーターアッセイの結果、MEK5-ERK5 が c-fos プロモーター上の SRE (serum response element) の転写活性化に関与することを示し、また ERK5 が、SRE 上で機能する Ets ファミリー転写因子である Sap1a を、*in vitro* 及び *in vivo* で、リン酸化し活性化し得ることを示した。さらに血清刺激による内在性 Fos の発現誘導においても、MEK5-ERK5 が必要であることを蛍光抗体染色を用いて示した。これらの結果は、ERK5 のターゲットを見出し、その細胞生物学的機能を示唆したものであり大変価値が高いと考えられる。

以上本申請論文は、それまでほとんど知見の無かった ERK5 について、受容体チロシンキナーゼから核へのシグナル伝達経路を仲介しうることを示したものである。このことは MAPK/ERK1, 2 とは別の、増殖因子のシグナルを伝える経路の存在を示すものであり、MAP キナーゼファミリー全体の理解を深める意味でも意義深く、博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものとして認められる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について試問した結果、合格と認めた。