

氏名	とりいさとる 鳥居 暁
学位(専攻分野)	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第59号
学位授与の日付	平成18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	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	Ras/ERK MAP キナーゼシグナル伝達経路調節因子 Sef の機能解析

論文調査委員 (主査)
教授 西田 栄介 教授 米原 伸 教授 根岸 学

論文内容の要旨

細胞は細胞外刺激に対して、様々な細胞応答を行う。多細胞生物においては、個々の細胞が互いに様々な細胞外刺激を出し合い、それに協調して応答することが、個体を維持管理する上で重要である。細胞外刺激を細胞膜から細胞内部に伝えるシグナル伝達経路が多様に存在することがわかっており、多くの研究がなされている。その中で、Ras/ERK MAP キナーゼシグナル伝達経路は増殖因子などの様々な細胞外刺激によって活性化し、細胞増殖、細胞分化、細胞運動、アポトーシスといった多様な細胞応答を制御することがわかっている。こういった細胞応答の決定には、ERK MAP キナーゼの活性化の持続時間と細胞内における機能する場の制御が重要な要因になっていると考えられている。そのため、Ras/ERK 経路の時空間的な制御を行う調節因子、阻害因子の研究が重要であることが示唆されている。

近年ゼブラフィッシュにおいて Ras/ERK 経路の阻害因子として同定され、脊椎動物で進化的に保存されている Sef の詳細な機能解析を、哺乳類培養細胞を用いて行った。Sef は活性化した MEK と結合し、その結合が Sef の Ras/ERK 経路の阻害活性には必要であった。さらに Sef が主にゴルジ体に局在し、増殖刺激により一部の Sef が細胞膜に移行することを明らかにした。そして刺激された細胞において、活性化した MEK および活性化した ERK と Sef がゴルジ体と細胞膜において共局在した。Sef は ERK のリン酸化は阻害せずに、MEK-ERK 複合体の解離を阻害することで活性型 ERK の核内移行を阻害した。この時、Sef は ERK の核内基質である Elk-1 のリン酸化と活性化を阻害したが、細胞質基質である RSK2 のリン酸化には影響を与えなかった。また内在性 Sef を siRNA によって減少させると、増殖刺激依存的な ERK と RSK2 のリン酸化は変化しないが、ERK の核内移行、Elk-1 の活性化、そして ERK の標的遺伝子である c-fos, egr-1, junB の発現量増加が促進した。これらの結果から、Sef は ERK を核ではなく細胞質で機能させることによって Ras/ERK 経路の空間的な調節因子として働くことが明らかになった。

近年、Sef のスプライシングアイソフォーム、Sef-S がマウス、ヒトにおいて報告されており、この Sef-S についても解析を行った。Sef-S を発現すると考えられる mRNA はヒトでは S1 型、マウスでは S2 型が報告されていた。クローニングの結果、ヒトにおいて3種類のスプライシングが起こっており、Sef, Sef-S1, Sef-S2 の3種類の mRNA があることがわかった。Sef-S は細胞質に局在し、活性型 MEK と結合した。しかしながら ERK の核内移行は阻害せず、むしろ増殖刺激依存的に Elk-1 の活性化を促進することがわかった。Sef-S によって Sef の活性型 MEK への結合が阻害されたことから、Sef-S が Sef に対してドミナントネガティブ因子として機能することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ERK MAP キナーゼは、様々な細胞外刺激によって活性化し、細胞増殖、細胞分化、細胞運動、アポトーシスなど多様な細胞応答の制御に関与する。こういった細胞応答の決定には、ERK MAP キナーゼの活性化の持続時間と細胞内における機能する場の制御が重要な要因になっていると考えられている。そのため ERK MAP キナーゼの時空間的な制御因子の

解析が重要だと考えられている。近年新たな Ras/ERK MAP キナーゼシグナル伝達経路の阻害因子としてゼブラフィッシュにおいて Sef が同定された。Sef はその後、ニワトリ、マウス、ヒトといった脊椎動物で同定されており、脊椎動物で進化的に保存されている重要な遺伝子であると考えられている。Sef がどのように Ras/ERK 経路を阻害するかについては諸説があり、その詳細な作用機構に関してはわかっていなかった。また Sef のスプライシングアイソフォームである Sef-S が同定されたが、その作用機構の解析は行われていなかった。そこで、申請者は哺乳類培養細胞を用いて、Sef およびそのスプライシングアイソフォームである Sef-S の Ras/ERK 経路における作用機構に関して解析を行った。

本論文において申請者はまず、Sef が活性型 MEK と結合し、その結合が Sef の Ras/ERK 経路の阻害活性に必要であることを示した。さらに細胞内局在を調べた結果、Sef はゴルジ体もしくは細胞膜において活性化した MEK と共局在することを示した。そして Sef は ERK のリン酸化を阻害しないが、MEK-ERK 複合体の解離を阻害し、それによって活性型 ERK の核内移行を阻害することを示した。また Sef は ERK の核内基質である Elk-1 のリン酸化と活性化を阻害するが、細胞質基質である RSK2 のリン酸化には影響を与えないことを示した。さらに Sef siRNA により、増殖刺激依存的な ERK と RSK2 のリン酸化は変化しないが、ERK の核内移行と Elk-1 の活性化、ERK の標的遺伝子の発現量増加が促進されることを示した。これらの結果から、申請者は、Sef が ERK を核ではなく細胞質で機能させることによって Ras/ERK 経路の空間的な調節因子として働くことを明らかにした。次に申請者は Sef のスプライシングアイソフォーム Sef-S の解析を行い、Sef-S は S1 と S2 の二種類の mRNA から翻訳されることを示した。さらに、Sef-S は細胞質に局在し活性型 MEK と結合することを示した。そして ERK の核内移行は阻害せず、むしろ増殖刺激依存的に Elk-1 の活性化を促進することを示した。Sef-S によって Sef の活性型 MEK への結合が阻害されることから、Sef-S が Sef に対してドミナントネガティブ因子として機能することを示した。

以上のように、本論文で述べられた成果は非常に重要であり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成18年1月23日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。