

氏名	たのうえ たく じ 田ノ上 拓 自
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2362号
学位授与の日付	平成13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	MAP kinase カスケードにおける分子間相互作用の解析

論文調査委員 (主査) 教授 西田 栄介 教授 柳田 充弘 教授 七田 芳則

### 論文内容の要旨

学位論文題目：MAP kinase カスケードにおける分子間相互作用の研究

MAP kinase カスケードは真核生物界で広く保存されているシグナル伝達経路の module の一つであり、細胞の機能において非常に重要な役割をはたす。MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), MAP kinase kinase (MAPKK), MAP kinase, の3段階のキナーゼによって構成される。MAP kinase は、MAPKK, MAPKAPK (MAP kinase activated protein kinase), 転写因子, MAPK-phosphatase などの多くの分子と相互作用をし、リン酸化, 脱リン酸化といったかたちでシグナルを受け渡す。しかし、細胞内には様々なシグナル伝達経路が存在し、かつ、MAP kinase カスケードにも ERK, p38, JNK/SAPK, ERK5, の4つのカスケードが存在する。これらのカスケードが細胞内で不必要なクコストークを防ぎつつ、正確に効率良くシグナルを伝達することが細胞の機能にとって不可欠であるが、そのための分子機構に関する研究は緒についたばかりである。

本研究において、MAP kinase と相互作用する分子群 (MAPKK, MAPKAPK, MAPK-phosphatase) の一次配列上に保存されている、MAP kinase 結合部位を同定し、かつその結合部位に対応する、MAP kinase 上の結合部位も同定した。MAP kinase 上の結合部位を CD domain と名付けた。CD domain は負の電荷を持つアミノ酸のクラスターから構成され、それに対応する、MAP kinase と相互作用する分子群上の MAP kinase 結合部位は、正の電荷を持つアミノ酸のクラスターによって特徴づけられる。また、いずれも酵素の活性中心からは離れた部分に存在する。よって、MAP kinase カスケードにおける分子間の結合は、静電結合を介するものであり、酵素の活性中心を介する一過性の相互作用とは異なる性質を持つと考えられる。この結合を docking interaction と呼ぶ。

Docking interaction が MAP kinase カスケードにおける、効率の良い酵素反応に必須なものであり、かつ酵素反応の特異性をも規定するものであることが示された。

さらに、MAP kinase 分子の docking site が groove 状の構造をしていることを見出し、docking groove と命名した。MAP kinase と相互作用する分子はこの docking groove を介して結合し、docking groove を構成するアミノ酸の種類および配置が結合の特異性および強さを規定しているものと考えられる。その例として、docking groove 内の電荷を持つアミノ酸の数と配置によって docking interaction の特異性が ERK2 と p38 の間で変換される例をいくつか示した。上流の活性化因子である MAPKK, 不活性化因子である MAPK-phosphatase, および基質である MAPKAPK は MAP kinase 上の共通の領域 (docking groove) に結合する。よって、docking groove を介する docking interaction が MAP kinase カスケードにおける、上流の分子から下流の分子へのシグナルの流れを規定していることが考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

MAP kinase カスケードには様々な分子群が存在し、おのおのが正確に、適切な相手に対してリン酸化, 脱リン酸化と

いった酵素反応を行うことが細胞の正常な機能において必要不可欠なことであり、その分子的機構を解析することは非常に重要な研究である。

MAP kinase カスケードにおける酵素反応の効率および特異性を規定する機構として、分子同士の結合の能力との相関が示唆されていたが、申請者は、MAP kinase と相互作用する分子群 (MAPKK, MAPKAPK, MAPK-phosphatase) 上の MAP kinase 結合部位を同定した。これらの結合部位はそれぞれの分子の酵素の活性領域とは離れた位置に存在することを示した。この結果は、MAP kinase カスケードにおいては、酵素の活性中心を介した一過性のものとは異なるかたちの結合が存在することを示すものであり、非常に興味深いものである。

さらに、申請者は、MAP kinase の二次元立体構造に着目し、MAP kinase 上の、上記の三者との結合部位を同定し、docking groove と名付けた。docking groove は MAP kinase の酵素の活性中心とは反対の位置に存在する。申請者は docking groove を構成するアミノ酸の中で、負の電荷を持ったアミノ酸が、MAPKK, MAPKAPK, MAPK-phosphatase 上の MAP kinase 結合部位に存在する正の電荷を持ったアミノ酸と直接結合することをみいだした。MAP kinase カスケードにおいて、静電結合が酵素同士の結合に非常に重要な役割を果たしていることを示した初めての例であり、価値が高い。

さらに、申請者は、このような静電結合が MAP kinase カスケードにおける酵素反応の特異性を規定する可能性があることを示した。MAP kinase カスケードにおける酵素反応の特異性の分子的基盤は大きな謎であったが、その解明の突破口となる研究結果であり、今後の研究の基礎となるものと考えられる。

活性化因子である MAPKK と基質である MAPKAPK と不活性化因子である MAPK-phosphatase がこの docking groove に結合することから、docking groove を介する結合が、MAP kinase カスケードにおけるシグナルのシリアルな受け渡しを規定しているものと考えられる。この結果は、細胞内情報伝達経路の研究分野において全く新しい考え方を提示するものであり、非常に価値が高い。

以上、本申請論文は、MAP kinase カスケードにおける酵素反応の効率および特異性を決定する分子的機構を解析したものであり、博士 (理学) の学位論文として十分価値があるものとして認められる。

平成13年2月5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。