

氏名	いけ だ あつ し 池 田 篤 史
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 459 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	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	JNK/SAPK 経路を活性化する新規プロテインキナーゼ LZK による細胞内シグナル伝達の解析

論文調査委員 (主査) 教授 川 寄 敏 祐 教授 伊 藤 信 行 教授 市 川 厚

### 論 文 内 容 の 要 旨

細胞は、外界からの刺激に应答して増殖、分化、アポトーシスなどさまざまな運命をたどる。これら細胞運命の決定は、受精卵から個体への発生、神経系や免疫系の機能調節、細胞の癌化など幅広い生命現象において重要な役割を果たしている。したがって、細胞はその進化の過程において外界からの刺激を正確かつ迅速に核へと伝えるさまざまなシグナル伝達経路を構築してきた。

MAP キナーゼ経路は、MAP キナーゼ (MAPK)、MAPK キナーゼ (MAPKK)、MAPKK キナーゼ (MAPKKK) の 3 つの分子群より構成されるプロテインキナーゼカスケードであり、酵母などの単細胞生物から哺乳動物にいたるまで進化的に保存されたシグナル伝達経路である。哺乳動物細胞の MAPK 経路は、主に増殖因子等の刺激により活性化される古典的 MAPK 経路 (ERK 経路) と IL-1 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインや、UV 照射、高浸透圧刺激といった物理化学的ストレスによって活性化される新規 MAPK 経路 (JNK/SAPK 経路および p38 経路) に大別される。どちらの経路においても MAPKKK は非常に多様性に富み、現在までに数多くの MAPKKK 分子が同定されている。近年、申請者の所属する研究室において MAPKKK 様の一次構造を有するプロテインキナーゼ遺伝子がクローニングされ、LZK (leucine zipper-bearing kinase) と命名された。申請者はこの LZK による細胞内シグナル伝達経路を解析するとともに、酵母 two-hybrid 法により LZK と細胞内で相互作用する分子を単離し、その LZK によるシグナル伝達経路における役割を検討した。

#### 第一章 LZK による JNK/SAPK 経路の活性化機構の解析

LZK は、その分子内にキナーゼ触媒ドメインと、2 個の隣接するロイシンジッパー様構造を有している。これらの構造的特徴は、MLK ファミリーとよばれる一群の MAPKKK ファミリーに属する分子に共通の特徴として知られており、LZK は MLK ファミリーの新規メンバーであると考えられた。申請者は、まず LZK が MAPK 経路および JNK/SAPK 経路のどちらを活性化するか検討し、LZK が MAPKK である MKK7 を活性化することで JNK/SAPK 経路を特異的に活性化することを明らかにした。次に、近年シグナル伝達研究で非常に注目を集めているスカフォールド分子が LZK による JNK/SAPK 経路の活性化に与える影響について検討した。スカフォールド分子とは、あるシグナル伝達経路を構成する複数の分子群と結合し、シグナル伝達の正確性やシグナル伝達効率を高める分子の総称である。JNK/SAPK 経路においては、JIP-1 とよばれる分子がスカフォールド分子として機能し得る事が報告されているが、申請者は JIP-1 が LZK と特異的に相互作用することを見出し、またこの相互作用を介して LZK による JNK 活性化が顕著に上昇することを明らかにした。

#### 第二章 LZK 分子内の機能性ドメインの解析

前述のように、LZK 分子内には 2 個の隣接したロイシンジッパー様構造からなる領域が存在する。そこで、この領域が LZK の機能において果たす役割を検討した。ロイシンジッパー構造はタンパク質間の相互作用に関与することが知られていることから、まず LZK がこの領域を介して二量体/多量体を形成する可能性について調べた。その結果、細胞内に発現した異なるエピトプタグを付加した 2 種の LZK が互いに免疫沈降時に共沈することから、LZK 分子が二量体あるいは多

量体を形成していると考えられた。そこで、LZK 分子を C 末端側から順次欠失した変異型 LZK およびロイシンジッパー様構造を欠失した変異型 LZK を細胞に発現し、それぞれの全長 LZK に対する結合能を検討したところ、予想通りロイシンジッパー様構造がこの二量体/多量体形成に必須であることがわかった。次に、これらの変異型 LZK が JNK/SAPK 経路を活性化しうるかどうかが検討したところ、ロイシンジッパー領域を欠失した変異体では JNK の活性化は見られず、二量体/多量体形成が JNK 活性化に必須であることが明らかになった。また、C 末端側約100アミノ酸残基を欠失した変異型 LZK でも JNK 活性化能が失われていた。この C 末端側領域についてさらに解析をすすめたところ、この領域が MAPKK である SEK1 の活性化に必須であることが明らかになった。

### 第三章 酵母 two-hybrid 法を用いた LZK 結合因子のクローニングおよび解析

細胞内における LZK によるシグナル伝達を調節する因子を単離する目的で、酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、2 個の陽性クローンを得た。そのうちの 1 つのクローンは、AOP-1 とよばれる既知の分子をコードしていた。AOP-1 はその一次構造上の特徴から、細胞内の酸化還元を司るチオレドキシンを酸化する酵素活性をもつことが予想されており、細胞内で生じた活性酸素を除去するはたらきをもつと考えられる。哺乳動物細胞中に発現した AOP-1 は LZK と免疫沈降時に共沈することから、これらの分子は実際に細胞内で相互作用し得ると考えられた。多くの細胞では、外界からの種々の刺激によりセカンドメッセンジャーとして過酸化水素が産生されることが知られている。そこで、過酸化水素刺激が AOP-1 と LZK の相互作用に対して与える影響を検討したところ、刺激後 2.5 から 5 分をピークとした一過性の相互作用の増強が観察された。このことから、LZK から JNK へのシグナル伝達経路が細胞内の活性酸素によって調節されている可能性が示唆された。

以上、本研究は新規プロテインキナーゼ LZK による細胞内シグナル伝達経路を詳細に解析したものであり、細胞制御の複雑な過程を解明するための重要な知見を得たものである。

## 論文審査の結果の要旨

細胞は外界からの刺激を正確かつ迅速に核へと伝えるさまざまなシグナル伝達系をもつ。MAP キナーゼ (MAPK) 経路は現在最もよく研究されている経路の一つであり、MAPKKK、MAPKK および MAPK のプロテインキナーゼカスケードより成る。最近、このカスケードには古典的 MAPK に加えて、JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) または SAPK (stress-activated kinase) および p38 の関与が明らかにされ、それぞれ、古典的 MAPK 経路、JNK/SAPK 経路および p38 経路と呼ばれている。

本研究は、セリン/トレオニンキナーゼおよびチロシンキナーゼの両方の一次構造上の特徴を併せ持つハイブリッド型のキナーゼ触媒ドメインをもち、そのすぐ C 末端側に 2 個の隣接するロイシンジッパー配列をもつ新規なプロテインキナーゼ LZK (leucine zipper-bearing kinase) について、その細胞内シグナル伝達における役割を調べた諸点を明らかにしたものである。

まず、LZK は MAPKK である MMK7 を直接リン酸化することにより JNK/SAPK 経路を選択的に活性化する一種の MAPKKK であることを明らかにした。次に、最近、シグナル伝達研究の分野で注目されているスカフォールド分子との関連を調べ、LZK がスカフォールド分子の一つである JIP-1 と結合すること、さらに LZK がそのキナーゼドメインを介して JIP-1 の PTB ドメイン (phospho-tyrosine binding domain) に結合することを明らかにした。また、この LZK と JIP-1 の相互作用により、LZK 単独の場合と比較して JNK/SAPK 経路の活性化が著しく増強されることを示した。

次に、LZK が細胞内で二量体あるいは多量体を形成していることを明らかにし、ついでこの二量体/多量体形成に分子内のロイシンジッパー配列が必須であることを示した。さらに、二量体/多量体形成能を欠く変異体 LZK は JNK 活性化能をもたないことを示し、二量体/多量体形成が JNK/SAPK 経路の活性化に不可欠のステップであることを明らかにした。また、C 末端約160アミノ酸残基が JNK/SAPK 経路の MAPKK である SEK-1 の活性化に必要なことを示した。

さらに、LZK シグナル伝達系の生理的役割を明らかにする目的で、LZK 分子の N 末端からキナーゼドメインの直後までをベイトとして酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、AOP-1 (antioxidant protein-1) をクローニングした。AOP-1 はチオレドキシネルオキシダーゼの一つであり、細胞内でセカンドメッセンジャーとして産生された過酸化水素

が AOP-1 と LZK との相互作用を調節し、それにより JNK/SAPK 経路活性化能が制御されている可能性を示した。

以上の研究は、新規プロテインキナーゼ LZK が JNK/SAPK 経路を介した細胞制御に関与することを初めて示したものであり、細胞内シグナル伝達経路の生理的意義を解明する上での重要な知見を得たものである。よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成13年2月26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。