

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 ERK 5/BMK 1 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

ERK 5/BMK 1 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、ERK 5 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 MEK 5 が同定されており、MEK 5 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 ERK 5 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 ERK 5 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 ERK 5 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 N17 Ras 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 ERK 5 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 ERK 5 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 V12 Ras を PC12 細胞に共発現したところ ERK 5 が強く活性化することも明らかになった。

これまで、ERK 5 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 MEK 5 が阻害すること、また活性型 MEK 5 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 ERK 5 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 ERK 5 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 MEK 5 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→ERK 5→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。