

氏 名	もり ぐち てつ お 森 口 徹 生
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1851 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 物 理 学 専 攻
学位論文題目	新規 MAP キナーゼキナーゼスーパーファミリー分子群の同定 と生化学的解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 西 田 栄 介	教 授 永 田 和 宏	教 授 米 原 伸
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

MAP キナーゼ (MARK) カスケードは, MAPK, MAPK キナーゼ (MAPKK), MAPKK キナーゼ (MAPKKK) からなるシグナル伝達カスケードである。最近, SAPK (stress-activated protein kinase) / JNK(c-Jun N-terminal kinase) 及び p38 という, MAPK スーパーファミリーに属するキナーゼが同定された。古典的 MAPK が増殖刺激に应答して活性化するのに対し, SAPK / JNK 及び p38 は高浸透圧やタンパク質合成阻害剤などのストレス刺激及び IL-1 や TNF- α といったサイトカイン刺激で活性化することが示された。したがって, SAPK / JNK 及び p38 は古典的 MAPK と異なる機構により活性化すると考えられたが, その詳細な活性化機構は不明であった。本論文では, 生化学的, 免疫化学的手法を用いて, 古典的 MAPK, SAPK / JNK 及び p38 シグナル伝達カスケードの三つのキナーゼカスケードについて解析が行われ, 特に SAPK / JNK 及び p38 両キナーゼの活性化因子について新規因子の同定を含めた詳しい検討がなされた。

古典的 MAPK カスケードについては, MKK1 および MKK2 に対する特異的抗体を作製し, 細胞内分布及び活性化の時間経過等を調べ, 両キナーゼが互いに redundant な機能を持つことを初めて明らかにした。

p38 カスケードについては, 酵母変異株の相補性などを利用した遺伝学的方法により, p38 を特異的に活性化する新規 MAPKK ファミリー分子 MKK6 及び MKK3b を同定・cDNA クローニングした。海外のグループより報告された MKK3 とあわせて三つの p38 特異的キナーゼの活性強度や分布等について解析し, MKK6 のキナーゼ活性が最も高いこと, MKK6 は限られた細胞にのみ発現しており, MKK3 及び MKK3b は ubiquitous であることを明らかにした。一方, 高浸透圧刺激した哺乳類培養細胞の抽出液から p38 の主要な活性化因子を精製し, 部分アミノ酸配列を決定した結果, それが MKK6 であることを明らかにした。さらに, 高浸透圧刺激だけでなく TNF α 刺激や H₂O₂ による刺激についても, MKK6 が主要な活性化因子であることを MKK6 特異的な抗体を作製することにより明らかにした。これらの結果

から、MKK6が発現している細胞においては主要な p38 活性化因子が MKK3 ではなく MKK6 であると結論した。また、最近見いだされた MAPKKK の一つである TAK1 が MKK6 及び MKK3 を *in vivo* 及び *in vitro* でリン酸化し活性化することを明らかにし、TAK1 → MKK6(MKK3) → p38 という新しい MAPK カスケードの存在を示した。

SAPK / JNK カスケードについては、高浸透圧刺激した哺乳類培養細胞抽出液中の SAPK / JNK 活性化活性を Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより分画し、未吸着画分に大きな活性を吸着画分に小さな活性を見出した。そして、SEK1 に対する抗体を作製することにより吸着画分の SAPK / JNK 活性化活性が SEK1 であることを見出した。未吸着画分の主要な SAPK / JNK 活性を担う因子は SEK1 以外の新規分子であること、さらにこの活性を精製すると大きく二つに分離することを明らかにした。一方、MAPKK との相同性を利用して新規 MAPKK ファミリー分子の cDNA クローニングを行い MKK7 と名付けた。そして、MKK7 が先に見出した SEK1 以外の SAPK / JNK 活性化因子の一つであることを MKK7 特異的抗体を作製することにより明らかにした。また、SEK1 および MKK7 とは異なる未同定の SAPK / JNK 活性化因子が存在することを、SEK1 および MKK7 に特異的抗体を用いた免疫化学的手法により示した。

次に、SAPK / JNK 活性化因子である SEK1 および MKK7 について、両キナーゼの相違について検討した。その結果、MKK7 は SAPK / JNK のみを活性化するのに対し、SEK1 / MKK4 は p38 も活性化するという基質特異性の違いを明らかにした。さらに、タンパク質合成阻害剤高浸透圧刺激に対しては SEK1 及び MKK7 の両キナーゼが活性化するが、TNF α 刺激に対しては MKK7 は活性化するが SEK1 は活性化しないことを明らかにした。これらの結果から、MKK7 と SEK1 の直接の活性化因子が異なること、さらにそれぞれのキナーゼの果たす役割が異なる可能性が考えられた。また、キナーゼ不能型 MKK7 を細胞に過剰発現すると、TNF α による SAPK / JNK の活性化を抑えることから、MKK7 は TNF α 刺激における細胞応答に重要な役割を果たしていることが示唆された。最近、ショウジョウバエの初期発生過程における背部融合に重要な機能を果たす二つのキナーゼ、MAPKK ファミリー分子 *hemipterous(hep)* と哺乳類の SAPK / JNK ホモログである DJNK が示された。MKK7 はショウジョウバエの *hep* と相同性が最も高い分子であり、MKK7 / Hep → SAPK / JNK というキナーゼカスケードがショウジョウバエから哺乳類まで種を超えて保存されていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

新規 MAPK ファミリー分子である SAPK / JNK 及び p38 は、ストレス刺激及びサイトカイン刺激で活性化するという特徴を持ち、その活性化経路の同定は非常に重要な問題である。これまで、古典的 MAPK カスケードとの類似性から PCR などを用いてホモログ分子を同定し、それを細胞に過剰発現することによりシグナルカスケードの構成因子を同定する方法は海外の様々な研究室で行われている。しかしながら、生化学的アプローチから MAPK ファミリー分子のシグナル伝達機構に関わる分子を同定することはほとんど試みられていなかった。申請者は、MAPKK ファミリー分子に対する種々の免疫沈降可能な特異的抗体を作製し、生化学、免疫化学的手法により *in vivo* における SAPK / JNK 及び p38 活性

化因子について検討した。

p38 の活性化因子として海外のグループより PCR を用いて単離された MKK3 の存在が知られていた。申請者は、酵母の系等を用いることで、MKK3 と異なる新規 p38 活性化因子である MKK3b 及び MKK6 の cDNA クローニングを行った。また、主要な p38 活性化因子を哺乳類培養細胞から精製し、そのアミノ酸配列を決定した結果、それが MKK3 でなく MKK6 であることを明らかにした。このようにシグナル伝達機構に関わる分子、しかも新規の分子を生化学的に見出し、その分子の同定・cDNA クローニングを行ったことは大変に価値が高いと考えられる。

さらに申請者は、SAPK / JNK 活性化因子についてもカラムクロマトグラフィーにより分画し解析した。そして、MAPKK のホモログとして遺伝子のみの報告があり、その機能が未知であった SEK1 の内在性分子が SAPK / JNK 活性化因子の一つであることを明らかにした。しかも、他にまだ未同定の活性化因子の存在を示した。この SEK1 以外の活性はカラムクロマトグラフィーによりさらに二つにわかれ、そのうちの一つが申請者が cDNA クローニングを行った MKK7 であることを明らかにした。SEK1 は TNF α 刺激で活性化せず、一方 MKK7 は顕著に活性化した。さらにキナーゼ不能型 MKK7 を用いることで、TNF α 刺激における SAPK / JNK 活性化に MKK7 が重要な働きをすることを示した。また、MKK7 のホモログがショウジョウバエにおいて存在し、このホモログ分子がショウジョウバエの初期胚発生において重要な機能を果たすことが知られている。このように、申請者は SAPK / JNK 活性化因子についても生化学的解釈により新規分子の存在を示し、そのうちの一つ (MKK7) の cDNA クローニングに成功し、しかもその分子が生体において重要な機能を持つ可能性を示した。この発見は、今後の SAPK / JNK の機能研究の進展において貢献するところが大きい。

以上本申請論文は、MAPKK ファミリー分子についての生化学的解析を行い、特に新規 MAPK ファミリー分子である SAPK / JNK および p38 という両キナーゼの主要な活性化因子として MKK6 と MKK7 という新規分子を同定したものであり、博士 (理学) の学位論文として十分に価値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。