

氏 名	しら 白 壁 恭 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1864 号
学位授与の日付	平 成 9 年 5 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 物 理 学 専 攻
学位論文題目	細胞内シグナル伝達経路における哺乳類 MAPKKK ファミリーの解析

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

論 文 内 容 の 要 旨

本論文において申請者は、哺乳類培養細胞における MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) について解析を行った。MAP キナーゼは細胞増殖や分化を誘導する種々の細胞外刺激によって共通に活性化するセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞内シグナル伝達経路において重要な役割を果たしていることが知られている。また、MAP キナーゼが幾つかの相同性のあるキナーゼと MAP キナーゼスーパーファミリーを形成していることが明かにされている。MAP キナーゼスーパーファミリーのそれぞれのメンバーは、異なった細胞外刺激によって活性化することから、それぞれ異なった細胞応答を制御していると考えられている。そのため、MAP キナーゼスーパーファミリー分子を含むシグナル伝達経路 (MAP キナーゼカスケード) を理解することで、細胞が自らの運命を決定する機構を明らかにすることができると考えられている。本研究は、クラシカルな MAP キナーゼの上流に位置している MAPKKK が複数存在することを示し、更に新規の MAPKKK ファミリー分子である TAK1 が TGF- β ファミリーやセラミドによるシグナル伝達経路において重要な役割を果たしていることを明らかにしたものである。

本論文では、まず、クラシカルな MAP キナーゼをリン酸化して活性化する MAP キナーゼキナーゼ (MAPKK) の活性化機構の解析を行った。上皮成長因子 (EGF) 刺激によって活性化した MAPKK が活性に自身のセリン/スレオニン残基のリン酸化を必要とすること及び、EGF 刺激によって MAPKK が主にセリン残基にリン酸化を受けることを明らかにし、MAPKK が直接上流に存在する MAPKKK によってセリン残基にリン酸化を受けて活性化することを示した。更に EGF 刺激した細胞の抽出液から、不活性型 MAPKK を活性化する活性として MAPKKK 活性を同定し、3段階のカラムクロマトグラフィーで部分精製した。第3段階のゲルろ過カラムにおいて、MAPKKK 活性が分子量約 700kDa と 250kDa の2つのピークとして検出され、MAPKK をリン酸化して活性化する MAPKKK が複数存在することが示唆された。また、MAPKKK 活性をもつことが報告されていた Raf-1 に対する抗体を用いて、ここで検出した MAPKKK 活性を Raf-1 が担っているか検討し、分子量約 700kDa の MAPKKK 活性のピークに対応して Raf-1 が溶出していること、分子量約 250kDa の MAPKKK ピークには Raf-1 が存在しないことを明らかにした。この結果、Raf-1 以外にも MAPKKK 活性を担う分子が存在することが明らかになった。

次に、新規 MAPKKK である TAK1、及び Two hybrid 法によって TAK1 結合蛋白質として同定された TAB1 に関する解析を行った。まず TAK1 が TGF- β スーパーファミリーの一員である TGF- β 1 及び骨形成因子-4 (BMP-4) 刺激によって活性化することを明らかにした。この活性化は TGF- β や BMP-4 の濃度依存的であった。また、抗 TAK1 抗体を用いて内在性の TAK1 の活性を測定し、内在性の TAK1 が TGF- β 刺激によって活性化すること、及び EGF 刺激では活性化しないことを明らかにした。また、TAK1 と TAB1 を哺乳類培養細胞内で同時に発現し、免疫沈降により、TAK1 と TAB1 が哺乳類培養細胞内で結合することを明らかにした。更に、TAB1 と同時に発現することにより TAK1 活性が上昇することを示し、TAB1 が TAK1 のに直接結合して活性化する活性化因子として機能することを明らかにした。更に優

勢不能型変異体 TAB1 が、TGF- β 刺激による TAK1 の活性化を抑制することを示し、TGF- β シグナル伝達経路において TAB1 $\rightarrow$ TAK1 というカスケードが存在することを明らかにした。

更に、TAK1 のセラミドシグナル伝達経路における役割について解析を行った。セラミドは細胞内シグナル伝達において、セカンドメッセンジャーとして機能していると考えられている脂質分子である。まず、細胞内のセラミド濃度を上昇させることが知られているサイトカイン刺激やストレス刺激によって TAK1 が活性化することを明らかにした。更に、細胞膜を通過しうるセラミド分子によって細胞を刺激することによって TAK1 が活性化することを示した。セラミドによる TAK1 の活性化がセラミド濃度依存的であることも示した。また、種々の脂質分子が TAK1 を活性化しうるか検討し、セラミドのみが特異的に TAK1 を活性化することを明らかにした。また、セラミドによる TAK1 の活性化が TAB1 非依存的であることも示した。最近、MAP キナーゼスーパーファミリーの一員である SAPK/JNK がセラミド刺激によって活性化すること、及びセラミドによる細胞死の誘導に SAPK/JNK の活性化が必要であることが報告され、セラミドシグナル伝達経路における SAPK/JNK の役割が重要視されている。しかし、セラミドがどのようなキナーゼカスケードを介して、SAPK/JNK を活性化しているか明らかにされていなかった。本研究において、活性型 TAK1 と同時に発現することにより SAPK/JNK 及び、SAPK/JNK の直接上流の MAPKK にである SEK1/MKK4 が活性化することを示した。更に、キナーゼ不能型 TAK1 を同時に発現することによって、セラミド刺激による SAPK/JNK の活性化が抑制されることを示した。以上の結果から、セラミドシグナル伝達経路において、TAK1 $\rightarrow$ SEK1/MKK4 $\rightarrow$ SAPK/JNK というキナーゼカスケードが存在することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

MAP キナーゼスーパーファミリーは種々の細胞外刺激により、細胞内で活性化するセリン/スレオニンキナーゼであり、それぞれの刺激に応じた細胞応答を引き起こす上で重要な役割を果たしていると考えられている。本申請論文により、申請者は、MAP キナーゼスーパーファミリーに属する MAP キナーゼや SAPK/JNK の活性化機構について特に MAPKKK を中心とした解析を行っている。本研究は、細胞内シグナル伝達経路の解明に重要な貢献をした研究であると評価できる。

まず申請者は、EGF 刺激によりクラシカルな MAP キナーゼが活性化する際に、上流で活性化する MAPKKK についての解析を行っている。まず、MAPKK の活性がリン酸化によって抑制されていることを明らかにし、MAPKK の上流に MAPKK をリン酸化して活性化する MAPKKK が存在することを示した。更に、不活性型 MAPKK を活性化する活性として、MAPKKK 活性を同定し、部分精製を行っている。また、MAPKKK 活性を有すると報告されている癌遺伝子産物 Raf-1 が、分子量の大きな複合体として機能していることや、Raf-1 以外の分子が MAPKKK 活性をもつことも示唆した。これらの研究はクラシカルな MAP キナーゼの活性化において、複数の MAPKKK が寄与してする可能性を示唆しており、シグナル伝達経路の理解を深めるものである。

また、申請者は新規 MAPKKK である TAK1 の解析を行っている。TAK1 が TGF- β 及び TGF- β ファミリーに属する BMP-4 の刺激によって活性化することを示した。これまで TGF- β シグナル伝達経路については受容体の活性化機構及び核内での遺伝子発現誘導に関する研究はなされていたが、細胞膜から核へいたるシグナル伝達経路についてはほとんど明らかにされていなかった。本研究により、TGF- β シグナル伝達経路においても、新規の MAP キナーゼカスケードが機能していることがはじめて示唆され、大きなインパクトを与えるものであった。更に、Two hybrid 法によって同定された新規蛋白質である TAB1 が、哺乳類培養細胞内で TAK1 に直接結合して活性化する活性化因子として機能することを明らかにした。更に、優勢不能型 TAB1 が、TGF- β による TAK1 の活性化を抑制することを示し、TGF- β シグナル伝達経路において TAB1 $\rightarrow$ TAK1 というカスケードが存在することを明らかにした。以上の研究は様々な分野の研究者から注目されていた TGF- β シグナル伝達経路の理解に、非常に大きな手がかりを与えるものであった。

更に、申請者は TAK1 がセラミドシグナル伝達経路においても機能していることを明らかにしている。細胞内でセラミドの濃度が上昇することが知られているサイトカイン刺激やストレス刺激によって TAK1 が活性化すること、及びセラミド自身の刺激によっても TAK1 が活性化することを示した。更に、種々の脂質分子についても TAK1 を活性化しうるか検討し、セラミドが特異的に TAK1 を活性化することを示した。更に、セラミドシグナル伝達経路において重要な役割を果

たしていると考えられている、MAP キナーゼスーパーファミリーに属する SAPK/JNK と TAK1 との関係について解析を行った。その結果、セラミド刺激による SAPK/JNK の活性化に TAK1 が必要十分であることを示し、セラミドシグナル伝達経路において、TAK1 → SEK1/MKK4 → SAPK/JNK という MAP キナーゼカスケードが機能していることを明らかにした。以上の研究は、セラミドシグナル伝達経路を明らかにする上で、大きな貢献をしている。

よって、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、主論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について諮問した結果、合格と判定した。