

新規 MAPK ホスファターゼ, MKP-5 および MKP-7 の構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

細胞内シグナル伝達系において、タンパクのリン酸化はシグナル伝達の ON/ OFF に関わっている。プロテインホスファターゼはリン酸化タンパクの脱リン酸化を触媒する酵素であり、細胞内シグナル伝達の調節において重要な役割を担っている。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードにおいては、主に連鎖的なタンパクのリン酸化によりシグナルが伝播する。このカスケードは、様々なプロテインホスファターゼが寄与するが、そのうち MAPK を特異的に脱リン酸化する MAPK phosphatase (MKP) はリン酸化スレオニンとリン酸化チロシンをともに脱リン酸化する。このようなプロテインホスファターゼを二重基質特異性プロテインホスファターゼ (Dual-specificity protein phosphatase : DSP) という。現在までに報告された多くのプロテインホスファターゼは、リン酸化セリン・スレオニンか、もしくはリン酸化チロシンのみを特異的に脱リン酸化する。この点において DSP はユニークなホスファターゼ分子である。本研究では、新規 DSP、MKP-5 および MKP-7 を単離し、それらの特性の解析し、さらに遺伝子発現および MAPK カスケードへの影響、細胞内での挙動を検討した。

第 1 章では、Expression-sequence-tag (EST) database を利用した新規 MAPK phosphatase (MKP) 遺伝子の単離とその分子のアミノ酸配列から得られた特徴を述べた。MKP-4 を Query として EST database 内を検索し、2 種の新規 MKP 遺伝子、MKP-5 と MKP-7 を得た。MKP-5 遺伝子はヒトが 482、マウスが 483 のアミノ酸残基をコードし、MKP-7 遺伝子はヒトが 665、マウスが 660 のアミノ酸残基をコードしていた。MKP-5 はその N 末端領域に、MKP-7 はその C 末端領域に、MKP としては特異な機能未知領域を有する分子であった。

第 2 章では、単離した MKP-5 および MKP-7 の遺伝子発現を検討した。ラットおよ

びマウスの各組織での MKP-5 および MKP-7 の遺伝子発現を解析した。MKP-5 では 3.5kb と 2.7kb の 2 種の転写産物が確認され、また、5.0kb のがん特異的転写産物を発現していた。MKP-7 では 4.1kb と 2.1kb の 2 種の転写産物が確認され、4.1kb は特に脳・腎臓・小腸・精巣での発現が高く、骨髄・胸腺・脾臓での発現が低いことがわかった。また、ヒト MKP-5 遺伝子は 1q41 に、ヒト MKP-7 遺伝子は 12p12 にマップされた。

第 3 章では、MKP-7 の MAPK phosphatase としての機能を検討した。MAPK カスケード活性化阻害能から、MKP-5 が $JNK = p38 > ERK$ 、MKP-7 が $JNK > p38 >> ERK$ という基質特異性を示した。また、MAPK に対する結合特異性を解析した結果、MKP-5 はその基質特異性と同様な結果を得たが、MKP-7 は高い基質特異性を有するのに対してその結合特異性には有意な差は見られなかった。MKP-7 はその変異体を用いた解析から、p38 に対する活性化抑制能が C 末端領域により自己阻害されていること、ERK に対して微弱ではあるがホスファターゼとして機能し得ることを明らかにした。

第 4 章では MKP-7 を中心として細胞内での挙動について検討した。MKP-5 分子は細胞内に広く分布していたが、MKP-7 は MKP-5 とは異なり細胞質に局在化していた。しかし、MKP-7 の機能未知な C 末端領域にはその細胞内局在を規定するモチーフ、核移行シグナルおよび核外移行シグナル、が存在しそれらが機能し、その結果 MKP-7 は核-細胞質間シャトルタンパクとして挙動することを明らかにした。また、MKP-7 は JNK および p38 を細胞質にトラップする役割を有していることを示した。

第 5 章では、MKP-7 分子の制御機構について検討した。MKP-7 は ERK 共発現時 PMA 刺激依存的に高分子量側へのバンドシフトを生じた。アルカリホスファターゼ処理によりシフトしたバンドが消失することから、このバンドは MKP-7 のリン酸化物であることが明らかとなった。さらに ERK 特異的 MAPK Kinase である MEK1/2 の活性阻害剤処理によりこのバンドシフトは生じなかった。アラニン置換変異導入によりセリン 446 がリン酸化部位であることを明らかにした。一方、JNK 共発現下においても MKP-7 は FBS、UV、PMA、EGF 刺激によりリン酸化物を生じたが、p38 共発現下では調べたいかなる刺激においてもリン酸化 MKP-7 は確認できなかった。

以上、本研究は新規二重基質特異性ホスファターゼ分子種の遺伝子発現、基質特異性、リン酸化修飾、核-細胞質間のシャトル機能を明らかにし、本酵素の情報伝達上の新たな生理的意義を解明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菊 池 九 二 三

副 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 矢 澤 道 生

副 査 教 授 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

新規 MAPK ホスファターゼ, MKP-5 および MKP-7 の構造と機能に関する研究

細胞内シグナル伝達系において、タンパクのリン酸化はシグナル伝達の ON/OFF に関わっている。プロテインホスファターゼはリン酸化タンパクの脱リン酸化を触媒する酵素であり、細胞内シグナル伝達の調節において重要な役割を担っている。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードにおいては、主に連鎖的なタンパクのリン酸化によりシグナルが伝播する。このカスケードは、様々なプロテインホスファターゼが寄与するが、そのうち MAPK を特異的に脱リン酸化する MAPK phosphatase (MKP) はリン酸化スレオニンとリン酸化チロシンをともに脱リン酸化する。このようなプロテインホスファターゼを二重基質特異性プロテインホスファターゼ (Dual-specificity protein phosphatase : DSP) という。現在までに報告された多くのプロテインホスファターゼは、リン酸化セリン・スレオニンか、もしくはリン酸化チロシンのみを特異的に脱リン酸化する。この点において DSP はユニークなホスファターゼ分子である。申請者は本研究において、新規 DSP、MKP-5 および MKP-7 を単離し、それらの特性の解析し、さらに遺伝子発現および MAPK カスケードへの影響、細胞内での挙動を解析した。本論文の要旨は、以下の5点に要約される。

1. Expression-sequence-tag (EST) database を利用した新規 MAPK phosphatase (MKP) 遺伝子の単離とその分子のアミノ酸配列から得られた特徴を述べた。MKP-4 を Query として EST database 内を検索し、2 種の新規 MKP 遺伝子、MKP-5 と MKP-7 を得た。MKP-5 遺伝子はヒトが 482、マウスが 483 のアミノ酸残基をコードし、MKP-7 遺

伝子はヒトが 665、マウスが 660 のアミノ酸残基をコードしていた。MKP-5 はその N 末端領域に、MKP-7 はその C 末端領域に、MKP としては特異な機能未知領域を有する分子であった。

2. 単離した MKP-5 および MKP-7 の遺伝子発現を検討した。ラットおよびマウスの各組織での MKP-5 および MKP-7 の遺伝子発現を解析した。MKP-5 では 3.5kb と 2.7kb の 2 種の転写産物が確認され、また、5.0kb のがん特異的転写産物を発現していた。MKP-7 では 4.1kb と 2.1kb の 2 種の転写産物が確認され、4.1kb は特に脳・腎臓・小腸・精巣での発現が高く、骨髄・胸腺・脾臓での発現が低いことがわかった。また、ヒト MKP-5 遺伝子は 1q41 に、ヒト MKP-7 遺伝子は 12p12 にマップされた。

3. MKP-7 の MAPK phosphatase としての機能を解析した。MAPK カスケード活性化阻害能から、MKP-5 が $JNK = p38 > ERK$ 、MKP-7 が $JNK > p38 \gg ERK$ という基質特異性を示した。また、MAPK に対する結合特異性を解析した結果、MKP-5 はその基質特異性と同様な結果を得たが、MKP-7 は高い基質特異性を有するのに対してその結合特異性には有意な差は見られなかった。MKP-7 はその変異体を用いた解析から、p38 に対する活性化抑制能が C 末端領域により自己阻害されていること、ERK に対して微弱ではあるがホスファターゼとして機能し得ることを明らかにした。

4. MKP-7 を中心として細胞内での挙動について解析した。MKP-5 分子は細胞内に広く分布していたが、MKP-7 は MKP-5 とは異なり細胞質に局在化していた。しかし、MKP-7 の機能未知な C 末端領域にはその細胞内局在を規定するモチーフ、核移行シグナルおよび核外移行シグナル、が存在しそれらが機能し、その結果 MKP-7 は核-細胞質間シャトルタンパクとして挙動することを明らかにした。また、MKP-7 は JNK および p38 を細胞質にトラップする役割を有していることを示した。

5. MKP-7 分子の制御機構について解析した。MKP-7 は ERK 共発現時 PMA 刺激依存的に高分子量側へのバンドシフトを生じた。アルカリホスファターゼ処理によりシフトしたバンドが消失することから、このバンドは MKP-7 のリン酸化物であることが明らかとなった。さらに ERK 特異的 MAPK Kinase である MEK1/2 の活性阻害剤処理によりこのバンドシフトは生じなかった。アラニン置換変異導入によりセリン 446 がリン酸化部位であること

を明らかにした。一方、JNK 共発現下においても MKP-7 は FBS、UV、PMA、EGF 刺激によりリン酸化物を生じたが、p38 共発現下では調べたいかなる刺激においてもリン酸化 MKP-7 は確認できなかった。

これを要するに、著者は、新規ホスファターゼ MKP-5 および MKP-7 についての新知見を得たものであり、細胞情報伝達の分子機構に貢献するところ大なるものがある。よって、著者は北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。