

## MAPK ホスファターゼ, MKP-7の機能と

### 生理的意義に関する研究

#### 学位論文内容の要旨

細胞内シグナル伝達経路は、外界からの様々な刺激を認識し、細胞内あるいは核内にシグナルとして伝達するための仕組みであり、その伝達系は精緻な制御により成り立っている。シグナル伝達調節機構の多くは、可逆的修飾であるタンパクのリン酸化/脱リン酸化により制御されている。リン酸化触媒酵素がプロテインキナーゼ、脱リン酸化触媒酵素がプロテインホスファターゼである。

MAPK カスケードは細胞の増殖・分化・ストレス応答・免疫応答・細胞死などの多様な細胞応答に関わる細胞内シグナル伝達系である。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードには主に細胞増殖に作用する ERK と、ストレス応答に関与する p38、JNK が存在する。MAPK の活性化はシグナルの強度、時間、細胞内のどこで活性化するかにより細胞応答が異なる。

JNK を特異的に脱リン酸化/不活性化する MAPK Phosphatase-7 (MKP-7) は、当研究室において単離された。MKP-7 は MKP ファミリーに共通なドメインに加え、C 末端側に伸張領域 (C-Terminal Stretch; CTS) を有している。この CTS には 2 つの核移行シグナル(NLS1/2)・核外移行シグナル(NES)・タンパクの分解に関与すると予測されている 2 つの PEST 配列(PEST1/2) モチーフが存在し、MKP-7 分子の細胞内局在と安定性を規定することが予想された。これまでに NLS1 および NES が機能性であり細胞質-核をシャトルすること、さらに PEST 2 配列内 446 番目の Ser が ERK 活性化依存的にリン酸化されることが報告された。

本研究では、MKP-7 の機能および MAPK カスケードにおける役割の解明を目的として、以下の第 1 章から第 4 章に述べる新たな知見を得た。

第 1 章では、MKP-7 の安定性について検討した。MKP-7 は、MKP ファミリーの中でも半減期の短いタンパク質であり、ユビキチン/プロテアソーム分解系により分解されることが明らかになった。MKP-7 の CTS の 2 つのアミノ酸領域 463-511 (領域 1) と 569-604 (領域 2) がこの分解に必要な領域であった。領域 1 と領域 2 はそれぞれ独立して MKP-7 の分解に関わっていた。MKP-7 の Ser446 のリン酸化は分解を抑制し MKP-7 タンパクの寿命を延長させた。以上の結果から、MKP-7 を介した ERK 活性化による JNK の不活性化機構の存在を見いだした。

第2章では、ERK カスケードへのMKP-7の影響を検討した。MKP-7はERKの活性化機構において一過性の強いERKの活性化を持続させることを見出した。これは、変異体を用いた実験から、MKP-7がERKと結合することで、活性化ERKの核移行を阻害し、ERKの不活性化を阻害しているためであると示唆された。ERKの持続的活性化にはMKP-7のMAPKドメインとCTSの2カ所における結合が必要であった。MKP-7による活性化ERKの核移行阻害は、ERKの転写活性を抑制することを明らかにした。以上のことから、MKP-7がERKの細胞質アンカーリングタンパク質の一つであることを明らかにした。

第3章では、ストレス応答シグナル伝達におけるMKP-7の機能制御について検討した。MKP-7は、ストレス刺激のうち高浸透圧刺激であるソルビトール処理により経時的に限定分解された。限定分解はカルパイン/システインプロテアーゼ阻害剤により抑制された。この限定分解により55kDaのMKP-7断片が産生されたが、その後経時的に分解された。このMKP-7限定分解産物はp38に対して脱リン酸化能を有した。従って、MKP-7限定分解産物の産生から消失までの一定時間p38の活性は抑制されることが示唆された。また、MKP-7が浸透圧刺激依存的に凝集体を形成すること、およびMKP-7に浸透圧依存的にアクチンが結合することを明らかにした。

第4章では、MKP-7がMAPKシグナルコンプレックスの構成因子として働いているかどうかを検討した。MKP-7はJNKの上流MAPKKであるMKK7とJNKを介した複合体を形成することが示唆された。MKP-7はMKK7と細胞の伸長末端において共局在していた。MKP-7は、p38の上流MAPKKであるMKK3とは活性化MKK3とのみ結合し、MKK6とは不活性化MKK6とのみ結合した。MAPKKとMKP-7の複合体にはp38は含まれなかった。活性化MKK3および不活性化MKK6との結合はMKP-7のCTSで結合していた。MKK6はMKP-7と共に凝集体に共局在したが、このMKP-7/MKK6凝集体はソルビトール刺激依存的に消失し、MKP-7およびMKK6は細胞質に均一に分布した。以上の結果から、MKP-7の新たな機能を示唆するMAPKシグナルコンプレックスへの関与を見出した。

以上、本研究はMKP-7の安定性の制御機構、アンカーリングタンパク質機能、ストレス応答による限定分解およびMAPKシグナルコンプレックスへの関与を明らかにし、MKP-7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 矢 澤 道 生  
副 査 教 授 坂 口 和 靖  
副 査 教 授 及 川 英 秋  
副 査 教 授 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

## MAPK ホスファターゼ, MKP-7の機能と 生理的意義に関する研究

本研究は、MAPK-7の機能を解析し、そのMAPKカスケードにおける役割を明らかにしたものである。

1. MKP-7は、ユビキチン/プロテアソーム分解系により分解され、この分解に、MKP-7の2つのアミノ酸領域463-511(領域1)と569-604(領域2)が必要な領域であった。MKP-7のSer446のリン酸化は分解を抑制しMKP-7タンパクの寿命を延長させた。
2. MKP-7はERKの活性化機構において一過性の強いERKの活性化を持続させた。MKP-7がERKと結合し、活性化ERKの核移行を阻害した。MKP-7による活性化ERKの核移行阻害は、ERKの転写活性を抑制した。
3. MKP-7は、ストレス刺激のうち高浸透圧刺激であるソルビトール処理により経時的に限定分解された。また、MKP-7が浸透圧刺激依存的に凝集体を形成すること、およびMKP-7に浸透圧依存的にアクチンが結合することを明らかにした。
4. MKP-7はJNKの上流MAPKKであるMKK7とJNKを介した複合体を形成することが示唆された。MKP-7はMKK7と細胞の伸長末端において共局在していた。MKP-7は、MKK3とはリン酸化MKK3とのみ結合し、MKK6とは脱リン酸化MKK6とのみ結合した。これらの結合はMKP-7のCTSを介した。

これを要するに、著者は、MKP-7の安定性の制御機構、アンカーリングタンパク質機能、ストレス応答による限定分解およびMAPKシグナルコンプレック

スへの関与を明らかにし、MKP-7の機能について新しい知見を加えた。よって、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与させる資格あるものと認める。