Daxx による Mitogen-activated protein kinase cascade 活性化機構

学位論文内容の要旨

Mitogen-activated protein(MAP)キナーゼ(MAPK)カスケードは真核細胞に普遍的に存在するセリン/スレオニンキナーゼカスケードで、様々な外界刺激を伝達する重要なシグナル伝達経路の一つである。

Daxx は、デスレセプターの一つである Fas と MAP キナーゼキナーゼキナーゼである apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)を結ぶアダプター分子として同定されたタンパク質で、ASK1 に結合することにより MAPK カスケードを活性化してアポトーシスを誘導することが知られている。

これまでに大廣らは、野生型ではなく変異型 p53 が Daxx と結合すること、細胞内に Daxx および ASK1 を強制発現させたとき、変異型 p53 が Daxx の発現量を減少させることを報告した(Mol Cell Biol, 2003)が、その詳細な発現制御機構は明らかにされていない。そこで本研究では、細胞内における Daxx の発現制御機構について明らかにするとともに、外界刺激により活性化される Daxx-ASK1-MAP キナーゼ系の調節メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

はじめに、変異型 p53 の発現が Daxx と ASK1 の結合にどのような影響を及ぼすのかについて免疫沈降実験にて確認した。それにより、Daxx と ASK1 の結合が認められたが、変異型 p53 の発現量に依存的に結合が阻害された。ASK1 の 709 番目のリジンをメチオニンに置換し、キナーゼ活性を消失させた ASK1-K709M は Daxx と結合し、その結合も変異型 p53 の発現によって阻害された。これらの結果により、Daxx は ASK1 と結合することにより安定性を高めるが、変異型 p53 が Daxx に結合することによって Daxx と ASK1 との結合を阻害することが示唆された。実際、細胞内で ASK1 の共発現によって、Daxx の発現量の増加が見られた。

ASK1 の過剰発現により Daxx の発現量が増加することから、実際に ASK1 の活性化により内在性の Daxx の発現量が増加するのかを調べた。TNF- α は強いアポトーシス作用を持つサイトカインの一種で、TNF レセプターに結合し ASK1 を活性化することが知られている。HeLa 細胞を TNF- α にて 18 時間処理し、Daxx の発現量を調べたところ、0.5 ng/ml から 10 ng/ml の濃度の TNF- α によって、内在性 Daxx の発現量の増加が見られた。

Daxx の ASK1 による発現量の増加の分子メカニズムについて調べるため、ASK1 および ASK1-K709M を Daxx とともに遺伝子導入し、細胞をプロテアソームインヒビターにて処理した後、ウェスタンブロットングにて Daxx の発現を調べた。ASK1 との共発現によって Daxx の発現量は増加したが、ASK1-K709M との共発現では Daxx の発現量の増加はみられなかった。しかし、プロテアソームインヒビターにて各細胞を処理したところ、ASK1 との共発現による Daxx の発現量の増加はみられなかった。これらのことより、Daxx は細胞内でユビキチン/プロテアソームによるタンパク

分解を受けること、そして ASK1 の Daxx に対するキナーゼ活性、つまり ASK1 による Daxx のリン酸化によってその分解は阻害されることが示唆された。

そこで Daxx のどの領域が ASK1 によるリン酸化によって安定化されるのかを調べるため、種々の Daxx 欠失変異体を作成し ASK1 および ASK1-K709M とともに遺伝子導入した後、ウェスタンブロットング法にて欠損変異体 Daxx の発現量を調べた。その結果 Daxx のアミノ酸 70 番目から 216 番目の領域(Daxx70-216)を含む欠失変異株は、コントロールおよび ASK1-K709M との共発現に比べ、ASK1 との共発現によって発現量の増加がみられた。以上のことより、Daxx70-216 が ASK1 によるリン酸化によって安定化されることが示唆された。

ASK1 が Daxx70-216 をリン酸化する可能性が示されたが、そのためには ASK1 が Daxx70-216 に結合する必要がある。しかし、SongらはASK1がDaxxのC末端側の領域に結合することを報告した (J Biol Chem, 2003)。そこで実際ASK1がDaxxのどこに結合するのかを調べるために免疫沈降実験を行った。Daxx 1-216を含む欠損変異体はASK1との結合が見られたが、Daxx1-216を含まない欠損変異体はASK1との結合が見られなかった。これらの結果から、ASK1はDaxxの1-216を含むN末端領域に結合する事が示された。

Daxx70-216 が直接 ASK1 によってリン酸化されるかを調べるため、大腸菌から得られたリコンビナントタンパク質 GST-Daxx70-216 を基質として ASK1 および ASK1-K709M による IP-kinase assay を行った。その結果、ASK1 は GST-Daxx70-216 をリン酸化したが、キナーゼ活性を失った ASK1-K709M は GST-Daxx70-216 をリン酸化しなかったことにより ASK1 が直接 Daxx70-216 をリン酸化することが示された。

Daxx70-216 が実際にプロテアソームによる分解制御を受けるのかを調べるため Daxx70-216, ASK1 および ASK1-K709M を細胞に発現させ、それぞれの細胞をプロテアソームインヒビターにて処理した後、ウェスタンブロットング法にて Daxx70-216 の発現を調べた。Daxx の全長と同様に Daxx70-216 の発現量は ASK1 との共発現によって増加がみられたが、ASK1-K709M と共発現した Daxx70-216 の発現量の増加はみられなかった。プロテアソームインヒビターにて各細胞を処理したところ、ASK1 との共発現による Daxx70-216 の発現量の増加はみられなかった。これらの結果は、Daxx70-216 の領域には ASK1 によって直接リン酸化される部位と、ユビキチンによってユビキチン化される部位が存在することが示され、Daxx70-216 が ASK1 によってリン酸化されることにより、ユビキチン化によるタンパク分解が阻害されていることが示唆された。

結語

- 1 変異型 p53 は Daxx と ASK1 の結合を阻害し、ASK1 による Daxx の発現量の増加を阻害することが明らかになった。
- 2 ASK1 は Daxx のアミノ酸 1 から 216 の N 末端領域に結合し、かつ 70 から 216 の領域をリン酸化することが明らかになった。
- 3 リン酸化された Daxx は、プロテアソームによる分解に対して抵抗性を示すことが明らかになった。
- 4 ASK1 を活性化するサイトカイン TNF- α によって、内因性 Daxx の発現量が増加した。

このような所見は、ASK1 が Daxx から伝達されたシグナルをその下流に伝達するだけでなく、Daxx をリン酸化し、その発現を安定化させることが示され、MAPK カスケードにおける ASK1 のポジティブフィードバック機構の存在が示唆され、細胞外からの刺激を増幅させアポトーシスを促進することが考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Daxx による Mitogen-activated protein kinase cascade 活性化機構

審査は、審査員全員が出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学
科目について口頭試問により行われた。

最初に、申請者により学位論文に関する以下の説明がなされた。

Mitogen-activated protein(MAP)キナーゼ(MAPK)カスケードは真核細胞に普遍的
に存在するセリン/スレオニンキナーゼカスケードで、様々な外界刺激を伝達する
重要なシグナル伝達経路の一つである。

Daxx はデスレセプターの一つである Fas と MAP キナーゼキナーゼキナーゼであ
る apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)を結ぶアダプター分子として同定され
たタンパク質で、ASK1 に結合することにより MAPK カスケードを活性化してア
ポトーシスを誘導することが知られている。

これまでに Ohiro らは、野生型ではなく変異型 p53 が Daxx と結合すること、ま
た細胞内に Daxx および ASK1 を強制発現させたとき、変異型 p53 が Daxx の発現
量を減少させることを報告した。そこで申請者は、細胞内における Daxx の発現制
御機構について明らかにするとともに、外界刺激により活性化される
Daxx-ASK1-MAP キナーゼ系の調節メカニズムを明らかにすることを目的として
研究を行った。

その結果、変異型 p53 が Daxx と ASK1 の結合を阻害し、ASK1 による Daxx の発
現量の増加を抑制することが明らかになった。また TNF- α の刺激によって内在性
Daxx の発現量が増加することを見だし、これは ASK1 が Daxx の N 末端アミノ
酸 1 から 216 の領域に結合・リン酸化することにより、通常は細胞内でユビキチン・
プロテアソーム系により分解される Daxx が細胞内で安定化することが明らかにな
った。

以上の結果により Daxx による ASK1 活性化機構には、MAPK カスケードにおいて ASK1 のポジティブフィードバック機構が存在することが示唆された。

引き続き、審査担当者からの質問が行われた。主な質問項目は、

1. アポトーシスにおける、Daxx とミトコンドリア系との関連について
2. Daxx と ASK1-KM との結合を調べた理由
3. mt-p53 と Daxx の結合は直接的なのか、それとも仲介するものがあるのかどうか
4. Fas の刺激によって内因性 Daxx の発現量は増加するのかどうか
5. Daxx 発現量の増加によって ASK1 の自己リン酸化を引き起こすのかどうか
6. Daxx の転写抑制能との関連性

いずれの質問に対しても、申請者から明確な回答を得られ、さらに関連分野に対する幅広い知識を有していることが示された。申請者から、今後の研究への展望も示され、学位取得後も研究を発展させていく可能性が高いことが明らかになり、学位授与に値するものと考えられた。