

Title	Scaffold Role of a Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase, SKRP1, for the JNK Signaling Pathway.
Sub Title	MAPキナーゼホスファターゼSKRP1のJNK経路におけるスカフォールド分子としての役割
Author	座間, 猛(Zama, Takeru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.9-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0009">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0009</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Scaffold Role of a Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase, SKRP1, for the JNK Signaling Pathway.

(MAPキナーゼホスファターゼSKRP1のJNK経路におけるスカフォールド分子としての役割)

座 間 猛

## 内容の要旨

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路は、真核生物に保存され、多彩な生理過程に重要な役割を果たす。その中心はMAPK、MAPK kinase (MAPKK)、及びMAPKK kinase (MAPKKKK) の3つのキナーゼより成り立つキナーゼカスケードであり、上流のキナーゼによるリン酸化が下流のキナーゼの活性化をもたらす。一方、セリン/スレオニンホスファターゼ、チロシンホスファターゼ、そしてそれらの活性を併せ持つデュアルホスファターゼを含むいくつかのホスファターゼが、上記キナーゼの活性化に関わる部位での脱リン酸化によりMAPK経路を不活化する。デュアルホスファターゼはチロシンホスファターゼの一種であり、あるものはMAPKを特異的に脱リン酸化し不活化することからMAPK phosphatase (MKP) と言われる。また、MAPK経路は各々を構成する一群のキナーゼカスケードを使い分けているものの、ある一つのキナーゼが異なるMAPK経路の上流で同時に機能している場合も多く、それ故、ある刺激に応答する個々の経路の特異性を保証する機構が必要である。その一つとしてスカフォールドタンパク (足場タンパク) によるシグナル分子複合体形成による伝達制御機構が近年注目されている。しかしながら、現在まで、如何にしてMKPがこれらのMAPKシグナル複合体に組み入れられ、あるいは特異的に相互作用するかということは明らかでない。我々は先の論文で新規のMKPであるSKRP1 (SAPK pathway-regulating phosphatase 1) がJNK MAPK経路を不活化することを報告したが、今回さらにJNK経路におけるSKRP1の関与の機構と意義を明らかにする上で解析を行った。SKRP1は*in vitro*においてJNKを脱リン酸化し、そのMAPKKであるMKK7と直接かつ特異的に結合した。キナーゼアッセイおよびレポーターアッセイにより、MKK7自身の活性およびその活性化の結果として起こるATF2の転写活性に基づいた遺伝子発現について、SKRP1はその発現量の増加に応じて抑制から増強へと変化する二相性の影響を及ぼした。また、MKK7のMAPKKKであるapoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) と特異的な結合を共沈実験により認めた。MAPKK MKK7とそのMAPKKKであるASK1との相互作用は、その双方と結合するSKRP1の発現により用量依存的に共沈の増大をもって認められた。かつ、これらに一致してASK1によるMKK7の特異的な活性化をもSKRP1依存的に増強された。以上は、SKRP1がスカフォールド分子として機能することを示唆し、またMKPがMAPKシグナル複合体の1構成要素として働くことを報告した最初の例である。

## 論文審査の要旨

MAPK phosphatase (MKP) に加え、スカフォールドタンパクによるMAPK経路のシグナル伝達制御が知られているが、現在まで、MAPKシグナル複合体におけるMKPの役割については明らかでない。スカフォールド分子は、1) あるシグナル伝達経路の構成要素のうちのいくつかと選択的に結合すること、2) キナーゼ間の物理的な橋渡しによりこれらにおけるシグナル伝達の効率を高めること、3) スカフォールド分子単独の過剰状態では逆に個々の構成要素の解離によりそのシグナル伝達経路の選択的な阻害をもたらすこと、などを特徴とするが、本研究では、新規MKPとして同定されたSKRP1について、上記スカフォールド分子としての特徴を検証した。

審査では、まず、SKRP1が細胞内にて酵素活性を有し、脱リン酸化酵素として機能し得るかとの質問があった。これに対し、細胞内に発現したSKRP1をそのタグに対する特異抗体にて免疫沈降後、pNPP (p-nitrophenylphosphate) を基質とした脱リン酸化酵素活性測定を行い、酵素活性を有することを認めたと回答した。さらに、SKRP1がその細胞内発現量依存的に、共発現したJNKを脱リン酸化すること、一方で優性不活性型SKRP1 C149SについてはJNKの脱リン酸化が認められなかったことも、このことを支持すると回答した。また、各々の系において異なる細胞種を用いていることに対しては、その刺激、導入遺伝子発現量を考慮した上で、最も適切な細胞種を用い再現しているが、他細胞種においても同様の結果を得ていると回答した。MAPK経路以外のキナーゼカスケードにおけるスカフォールド分子については、NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappaB) シグナルにおいて、NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) およびIKK (I $\kappa$ B kinase) と結合するIKAP (IKK-complex-associated protein) をあげた。SKRP1の loss of function についての質問に対しては、antisenseの安定発現株を用いた系においてTNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) 刺激後のJNKリン酸化を検討したが、その結果はRNAi (RNA interference) による knock down をも用いて詳細に検討する必要があると回答した。また、これを受け、胚性幹細胞 (ES細胞) における解析が有用であることを助言された。最後に、SKRP1が、MKK7によるJNK活性化を物理的に阻害し得るかどうかとの質問に対しては、MKK7上のSKRP1およびJNKの結合領域が異なることから、三者複合体形成については支持されるが、結晶構造解析を用いたより詳細な検討が必要であると回答した。

以上、本研究は、今後検討すべき課題が残されてはいるものの、MKPであるSKRP1が、JNK MAPK経路においてスカフォールド分子として機能し得ること、さらにJNK MAPKKであるMKK7と結合することを始めて示し、このことはMAPK経路におけるシグナルの特異的調節機構の解明につながるものとして非常に有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫  
医化学 末松 誠 先端医科学 河上 裕  
生理学 岡野 栄之 病理学 岡田 保典  
学力確認担当者：  
審査委員長：末松 誠

試問日：平成14年12月18日