

氏 名 (本籍)	と しま じゅん こ 十 島 純 子
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1 8 6 0 号
学位授与年月日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	プロテインキナーゼTESK1の14-3-3 β 蛋白質への 結合とそのインテグリンシグナル経路における役 割

(主 査)

論文審査委員	教授 渡 邊 建 彦	教授 竹 島 浩
	教授 田 村 眞 理	

論文内容要旨

Testicular protein kinase 1 (TESK1) は精巣に高発現しているプロテインキナーゼであり、N末端側半分にプロテインキナーゼドメイン、C末端側半分に非触媒領域を持つ構造的特徴を持つ。TESK1はアクチン脱重合因子コフィリンをリン酸化し、不活性化することにより、アクチンの重合を促進する機能を持つ。しかしTESK1の細胞内における機能やその制御機構はまだ明らかになっていない。本研究において私はTESK1の細胞内機能を解明するため、酵母ツーハイブリッドシステムを用いて、TESK1のC末端側半分に結合する蛋白質のスクリーニングを行った。その結果14-3-3 β をTESK1結合蛋白質として単離する事に成功した。TESK1と14-3-3 β の結合はインビトロのpull-downアッセイや培養細胞内での共発現、共沈実験によっても確かめられた。これらの相互作用はプロテインホスファターゼであるCIP (calf intestinal alkaline phosphatase) 処理により、著しく抑制されることより、リン酸化依存的であることが分かった。さらに、私はTESK1のC末端領域に14-3-3結合モチーフ(RxxSxP)が存在することを認め、この中の439番目のSer残基をAlaに置換することにより相互作用が完全に抑制されること、また439番目のSerがリン酸化されたペプチドを加える事により、結合が競合的に阻害されることを示した。これらの結果から、TESK1の14-3-3 β への相互作用は、TESK1の非触媒領域内の439番目のSerのリン酸化、脱リン酸化により制御されていることが示唆された。また、C末端非触媒領域への14-3-3 β の結合がTESK1のコフィリンに対するリン酸化活性を抑制することを明らかにした。これらの結果より、C末端非触媒領域内のSer-439のリン酸化依存的に14-3-3 β と結合し、活性を制御していると考えられる。次に、細胞接着時のアクチン骨格再構築におけるTESK1の役割について調べたところ、インテグリンレセプターのリガンドの一つであるフィブロネクチンへの細胞の接着により、内在性のTESK1の活性が約2.5倍上昇することが明らかになった。この際の内在性コフィリンのリン酸化レベルについて調べたところ、TESK1の活性と平行して上昇することが分かった。さらに、キナーゼ活性失活型変異体のTESK1を発現した細胞において、細胞接着により誘導される細胞の広がり著しく抑制されることが分かった。これらの結果より、TESK1はインテグリン刺激によるアクチン骨格の再構築に関与している事が示唆された。そこで、TESK1と14-3-3 β の相互作用について調べたところ、TESK1と14-3-3 β の結合はインテグリン刺激による細胞接着時には一時的に低下することが分かり、この変化はTESK1の活性上昇と逆相関していることから、14-3-3 β がインテグリンシグナルによるTESK1の活性調節に関与している可能性が示唆された。またTESK1および14-3-3 β の細胞内局在を調べたところ、非刺激時には細胞質全体に局在するのに対し、フィブロネクチン刺激時には細胞の

膜周辺において両者の局在が一致する事が分かった。またこの時のリン酸化コフィリンの局在を調べたところ同様に膜周辺部に見られ、この部位において14-3-3 β と局在が一致する事が明らかとなった。これらの結果からインテグリン刺激依存的に TESK 1 の局在は14-3-3 β により膜周辺部へと誘導され、そこにおいて TESK 1 は14-3-3 β から結合が離れ、活性化され、コフィリンをリン酸化していると考えられる。本研究において、私は TESK 1 がインテグリンの下流因子として機能しており、その活性と局在の調節に14-3-3 β が働いていることを明らかにした。最近、14-3-3蛋白質はインテグリンレセプターに直接結合すること、14-3-3蛋白質を細胞に過剰発現すると細胞の運動性や spreading が促進されることが報告されており、これらのことはインテグリンシグナルにおいて14-3-3 β と TESK 1 が重要な働きをしていることを強く示唆している。本研究における最も重要な成果は、細胞接着時のシグナルとして、インテグリン→14-3-3 β →TESK 1→コフィリン→アクチン骨格といった、今まで知られていない全く新しいシグナル経路の存在を明らかにしたことにある。

審査結果の要旨

細胞骨格を形成する主要成分であるアクチンは、細胞運動、細胞接着、形態変化などのさまざまな機能を制御している。アクチンの重合、脱重合は、アクチン結合タンパク質により協調的に調節されている。そのうちの一つにアクチン脱重合因子であるコフィリンがある。LIM motif-containing protein kinase (LIMK) およびその family である Testicular protein kinase 1 (TESK1) は、このコフィリンをリン酸化することでアクチン骨格の再構築に関与していることが知られている。本研究は TESK1 の活性制御機構について分子生物学的手法、生化学的手法を用いて調べたものであり、下記のような興味深い成果が得られている。

- 1) TESK1 の C 末領域に結合する蛋白質を酵母ツーハイブリッドシステムを用いてスクリーニングし、TESK1 結合蛋白質として 14-3-3 β を単離した。
- 2) TESK1 と 14-3-3 β の結合は *in vivo*, *in vitro* の培養細胞内でも確認され、その相互作用は TESK1 の 439 番目の Ser のリン酸化、脱リン酸化により制御されている。
- 3) 14-3-3 β の TESK1 への結合が TESK1 のコフィリンに対するリン酸化活性を抑制する。
- 4) 内在性の TESK1 の活性がフィブロネクチンへの細胞の接着により約 2.5 倍上昇すること、また、この際の内在性コフィリンのリン酸化レベルも TESK1 の活性と平行して上昇することから TESK1 の活性がインテグリンによって調節されていることが明らかとなった。
- 5) TESK1 と 14-3-3 β の結合がインテグリン刺激による細胞接着時に一時的に低下することから、14-3-3 β がインテグリンシグナルによる TESK1 の活性調節に関与している可能性が示唆された。
- 6) TESK1, 14-3-3 β ともに非刺激時には細胞質全体に局在するのに対し、インテグリン刺激時には細胞の膜周辺において両者の局在が一致することが分かった。この時のリン酸化コフィリンの局在も同様に膜周辺部に見られ、14-3-3 β と局在が一致した。
- 7) 細胞接着により誘導される細胞の広がりには TESK1 のキナーゼ活性失活型変異体を発現した細胞において著しく抑制されることから TESK1 はインテグリン刺激による細胞の広がりに関与していることが示唆された。

以上の結果から TESK1 がインテグリンの下流因子として機能しており、その活性と局在の調節に 14-3-3 β が働いていることが明らかとなった。アクチン骨格の制御機構の研究は細胞の基本的な生理作用の解明であると同時に医学研究という観点からも非常に重要性が高まってきている研究分野の一つである。アクチン骨格を制御する細胞内情報伝達機構の中で、これまで解明されていなかった新たなシグナル経路の存在を明らかにしたという点で本研究は意義深いものであり、学位論文に値するものと判断する。