

氏 名 石谷 閑

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1435 号

学位授与の日付 平成 23 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 MAPK 様キナーゼである Nemo-like kinase の活性制御  
機構の解析

論文審査委員 主 査 教授 上野 直人  
教授 高田 慎治  
准教授 田中 実  
特任准教授 伊藤 素行 名古屋大学  
特任准教授 石谷 太 九州大学

MAPK(mitogen-activated protein kinase)ファミリーの Ser/Thr キナーゼは、様々な重要な生命現象を制御している。一般的な MAPK は、その活性化ループに存在する Thr-Xxx-Tyr (TXY) モチーフの Thr と Tyr を上流の MAPK キナーゼによってリン酸化されることによって、そのキナーゼ活性を活性化し、さらにホモダイマーを形成して核内に移行する。一方で、異なるメカニズムで活性化する MAPK も報告されている。例えば、JNK2 $\alpha$ 2 は上流の刺激無しにホモダイマーを形成し、そのダイマー内で相互に TXY モチーフの Thr と Tyr を自己リン酸化することで、そのキナーゼ活性を活性化して、核内に移行する。

Nemo-like kinase (NLK)は、MAPK に構造的に類似した Ser/Thr キナーゼである。NLK は様々な転写因子をリン酸化することで、多様なシグナル伝達経路を制御する。最近、ラット PC12 細胞において、神経成長因子 NGF のシグナルが NLK の「キナーゼ活性の活性化」と「細胞質から核及び細胞辺縁部への局在変化」を促進し、活性化された NLK が神経突起伸長に貢献することが報告されている。また、PC12 細胞に NLK を過剰発現すると、NLK がそのキナーゼ活性依存的に突起伸長を促すことも見いだされている。しかしながら、これらの過程において、NLK のキナーゼ活性と細胞内局在を制御する分子機構についてはほとんど解明されていない。興味深いことに、MAPK の TXY モチーフに該当する部位が NLK では Thr(286)-Gln(287)-Glu(288)となっている。このことから、Thr-286 のリン酸化が NLK の活性化に重要である可能性が期待できる。しかし、Thr-286 をリン酸化するキナーゼは未だに同定されていない。これまでに、NLK の Thr-286 を Val に置換した変異体 NLK、NLK T286V が自己リン酸化活性を失っていることがわかっており、このことから、Thr-286 のリン酸化が NLK 自身によるものである可能性が期待できる。本論文では、NLK がホモダイマーを形成することで自身の Thr-286 をリン酸化し、結果としてそのキナーゼ活性を活性化して核移行することを報告する。

以前の研究では NLK T286V が自己リン酸化活性を失っていることはわかっていたが、NLK T286V がキナーゼ活性をも失っているか否かは解析されていなかった。そこでまず、これを検討したところ、NLK T286V がキナーゼ活性をもたないことが判明した。次に NLK が Thr-286 を自己リン酸化するかどうかを検討するために、NLK の Thr-286 のリン酸化を認識するペプチド抗体 (抗 pNLK 抗体) を作成した。抗 pNLK 抗体は HEK293 細胞に過剰発現して得た NLK WT (野生型 NLK) を強く認識し、NLK K155M (ATP 結合部位に変異を導入してキナーゼ活性を失わせた変異型 NLK) を弱く認識した。このことから、NLK が Thr-286 を自己リン酸化する可能性が示された。続いて、NLK の自己リン酸化が NLK の活性化において重要かどうかを検討するために、自己リン酸化した NLK と脱リン酸化処理した NLK のキナーゼ活性を比較したところ、自己リン酸化させた NLK が強いキナーゼ活性を持ち、脱リン酸化した NLK にはほとんど活性が無いことがわかった。以上の結果から、NLK の自己リン酸化が自身のキナーゼ活性を活性化する可能性が示唆された。

次に、「NLK が intermolecular manner で自身の Thr-286 をリン酸化する」という仮説を立て、これを証明するための実験を行った。まず、GFP タグ付きの NLK (GFP-NLK) と Flag タグ付きの NLK (Flag-NLK) をそれぞれ動物細胞に発現させたのちに精製し、GFP-NLK が Flag-NLK を *in vitro* において直接リン酸化するかを検討した。その結果、

GFP-NLK が Flag-NLK の Thr-286 をそのキナーゼ活性依存的にリン酸化することが明らかになった。つづいて、NLK が intermolecular manner で自身をリン酸化するためにホモダイマーを形成しているかどうかを、共免疫沈降実験とゲル濾過クロマトグラフィーにより検討した。その結果、NLK がホモダイマーを形成することが明らかになった。また、NLK K155M も NLK T286V もホモダイマーを形成できたことから、NLK のホモダイマー形成はキナーゼ活性や自己リン酸化活性に依存しないことが分かった。一方で、線虫 NLK ホモログ *lit-1* の機能欠失変異株の一つにおいて起きている変異と同様の変異を導入した変異型 NLK、NLK C425Y はホモダイマーを形成できず、巨大なヘテロ複合体を形成していることがわかった。以前の研究から、NLK C425Y がそのキナーゼ活性と自己リン酸化活性の双方を失っていることが報告されており、このことと上記の結果をあわせて考えると、「NLK のホモダイマー形成が引き金となり、NLK の intermolecular manner による自身の Thr-286 のリン酸化が起き、NLK が活性化する」という可能性が考えられる。

前述のように、細胞内在性の NLK の活性化と核への局在が相関することがこれまでに報告されている。そこで、NLK の核局在とダイマー形成や自己リン酸化との関係を検討した。HeLa 細胞を用いて NLK 各種変異体の細胞内局在を検討したところ、NLK K155M、NLK T286V は NLK WT 同様、核に強く局在し、対照的に NLK C425Y は核に局在せず、核周辺領域に局在することがわかった。これらの結果から、「NLK のホモダイマー形成が NLK の核局在に必須である」と考えられる。

次に、細胞内在性の NLK についての解析を、NLK を強く発現する細胞株である PC12 細胞を用いて行った。まず、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、内在性 NLK が未処理の PC12 細胞においては巨大な複合体として存在し、NGF シグナルに応じてホモダイマーを形成することが分かった。次に内在性 NLK の局在を調べたところ、未処理の PC12 細胞においては核周辺領域のゴルジ体周辺に局在し、NGF 刺激後、核内および細胞辺縁部に局在することが明らかになった。加えて、NGF 刺激に応じて内在性 NLK の Thr-286 のリン酸化が増加することも明らかになった。これらの結果は、NGF シグナルが NLK のホモダイマー形成を促進することで NLK の局在変化や自己リン酸化能の活性化を誘導することを示唆する。

最後に、NLK の PC12 細胞における細胞突起誘導能を指標に、NLK の Thr-286 のリン酸化やホモダイマー形成の生物学的意義について調べた。PC12 細胞において NLK WT を過剰発現すると細胞突起形成が誘導されたが、NLK T286V や NLK C425Y を過剰発現しても細胞突起形成が誘導されなかった。したがって、NLK の Thr-286 のリン酸化とホモダイマー形成は NLK による細胞突起の誘導に必須であることが示された。

以上の結果から、NLK のホモダイマー形成が NLK の活性化における重要なイベントであることが示された。

In light of her profound interest in the cellular signaling pathways that regulate vertebrate development, Ms. Shizuka Ishitani addressed a question on how the activity of Nemo-like kinase (NLK) is regulated. NLK is an evolutionarily conserved MAPK-like kinase that phosphorylates several transcription factors and fine-tunes the activities of the several cellular signaling pathways, such as Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and Notch signaling. However, the molecular mechanisms that regulate NLK activity have been poorly understood.

She first showed that NLK undergoes intermolecular autophosphorylation at Thr-286 on its activation-loop and autoactivates via the autophosphorylation. Analyses using an antibody recognizing Thr-286-phosphorylated NLK revealed that NLK phosphorylates itself at Thr-286. Mutation of NLK at Thr-286 extinguished not only the autophosphorylation activity but also the kinase activity. Dephosphorylation of NLK dramatically reduced the kinase activity.

She also observed that homo-dimerization of NLK is required for its activation. Gel-filtration assay displayed that NLK forms the homo-dimers and this homo-dimerization is independent of the kinase and autophosphorylation activities. Furthermore, a mutation at Cys-425, which corresponds to the defect in the *Caenorhabditis elegans* NLK homologue *lit-1*, prevented NLK dimerization, rendering NLK defective in both nuclear localization and kinase activity.

Additionally, she further demonstrated the NLK homo-dimerization and autophosphorylation in physiological conditions. Inactive endogenous NLK were detected in huge complexes and the external addition of Nerve Growth Factor (NGF), which has been previously identified as an NLK activator, induced dimerization and Thr-286 autophosphorylation of the endogenous NLK proteins in rat PC12 cells. Correspondingly, both dimerization and Thr-286 phosphorylation of NLK were found to be essential for induction of neurite-like cellular processes by NLK in PC12 cells.

These findings, a part of which has already been published in *Molecular Biology of the Cell*, 2011, suggest that dimerization is an initial key event required for the functional activation of NLK and also provide an enhanced understanding of the mechanisms of NLK activation. Recent studies have shown that NLK plays important roles in vertebrate tissue development and several human pathogenesis. Therefore, these findings might contribute to elucidate the molecular mechanisms of these events. Taken together, we adjudge that the ability of Ms. Ishitani as a research scientist is satisfactory for conferring doctor degree on her.