

氏名(本籍)	やな がわ とおる 榎 川 徹 (千葉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2,140号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Phosphorylation of A170 Stress Protein by Casein Kinase II-like Activity in Macrophages (カゼインキナーゼⅡ様の活性によるA170ストレスタンパク質のリン酸化)
主査	筑波大学教授 医学博士 三輪 正直
副査	筑波大学教授 医学博士 林 英生
副査	筑波大学教授 医学博士 渡邊 照男
副査	筑波大学教授 薬学博士 後藤 勝年
副査	筑波大学教授 医学博士 岡戸 信男

論文の内容の要旨

(目的)

生体は様々な外界からのストレスを受け、それらに対して種々の機構で応答し、防御している。とくに活性酸素や光線などによるストレスは酸化ストレスとして細胞レベル、固定レベルから環境レベルにいたるまで日常生活に密接に関わっており、それらに対する防御系の破綻は疾患となって生体に影響をおよぼしている。酸化ストレスに対する生体の応答という観点より、申請者らは酸化ストレス誘導性タンパク質のクローニングと構造、機能の解明をおこなってきた。今回、このなかで特にA170酸化ストレスタンパク質の構造、機能の解明をおこなうため、A170がリン酸化を受ける可能性に着目し、リン酸化酵素(キナーゼ)の解析をおこなった。

(対象と方法)

A170がリン酸化を受けることをゲル内リン酸化法により調べるために、基質として、T7tag, His tagをつけたA170全長、N末、N末のアンチセンスを含む各融合タンパク質を調製した。一方、A170の細胞内でのリン酸化を調べるため、マクロファージを³²P正リン酸で標識したのち、A170抗体で免疫沈降し、オートラジオグラフィを行った。マクロファージ溶解液中のA170をリン酸化するキナーゼを検索するため、A170全長の融合タンパクをゲル中に包埋し、ゲル内リン酸化をおこなった。同時に既知のキナーゼとしてMAPキナーゼ(ERK2)、プロテインキナーゼA(PKA)及びカゼインキナーゼⅡ(CKⅡ)を対照として用いた。プロテインキナーゼC(PKC)についてはin vitro assayで活性を調べた。さらにGTPやヘパリンを用いて薬理学的特性を調べた。また、A170キナーゼとの気質特異性を比較するために、アルファ・カゼイン、ミエリン塩基性タンパク質を基質にして各キナーゼでゲル内リン酸化をおこなった。更に、イムノブロットングにより抗CKⅡ $\alpha\alpha'$ サブユニット抗体でマクロファージ溶解液中にある抗原を検知した。またTNF, LPS, EGF, Paraquat等の刺激剤で細胞内A170キナーゼ活性の変化をみた。

(結果と考察)

³²P取り込み実験によりA170はマクロファージ細胞内で実際にリン酸化されていることが証明された。また、ゲル内リン酸化法で、A170を特異的にリン酸化する40kDa及び44kDaのリン酸化酵素をマクロファージ溶解液に見いだした。更に、A170は、CKⅡ, PKA, ERK2によってもリン酸化されることを見いだした。

A170キナーゼの性質を基質特異性の点から検討した。すべてのキナーゼは、アルファ・カゼインをリン酸化した。A170キナーゼとCKⅡはミエリン塩基性タンパクをリン酸化しなかった。コントロールのPKAはGTPやヘパリンにより活性の変化がみられなかったが、A170キナーゼは1 mMのGTPや50nMのヘパリンでも活性が阻害された。抗CKⅡ $\alpha\alpha'$ サブユニット抗体でマクロファージ溶解液中にある抗原をイムノブロッティングにより調べたところ、マクロファージ溶解液中にCKⅡ $\alpha\alpha'$ サブユニットに相当する40kDaと44kDaのバンドを検出した。また、A170タンパク質のストレス応答におけるシグナル伝達系の関与をみるため、各種刺激剤で細胞内A170キナーゼ活性の変化をみたところ、いずれも活性の変化はみられなかった。以上のことからA170を主としてリン酸化する40kDa及び44kDaのリン酸化酵素はCKⅡであると推測された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、ストレス応答に関するA170酸化ストレスタンパク質が各種リン酸化酵素によってリン酸化されること、又、そのリン酸化酵素はCKⅡ様であることを初めて確認したものであり、A170がシグナル伝達系にかかわる重要な物質であることを示唆した価値の高いものである。

今後の課題として、1) A170のリン酸化部位の固定、2) リン酸化反応をおこすシグナルの同定、3) A170の代謝回転の解析などをおこなうことが必要と思われる。その結果、A170のリン酸化とストレス応答の関係の意義がより明確になると考えられる。これらのアプローチにより、A170酸化ストレスタンパク質の機能が明らかになり、生体におけるストレス応答系の解明につながるものとして期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。