琉球大学学術リポジトリ

肺胞上皮細胞のフラジェリン刺激による上皮成長因子受容体のセリン1047のリン酸化は、MAPキナーゼ活性化プロテインキナーゼ2によって起こる

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学 公開日: 2014-08-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 野口, 信弘, Noguchi, Nobuhiro メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/28995

平成２５年　３月２２日
（別紙様式第７号）
論　文　審　査　結　果　の　要　旨

報告番号	課程博 ＊　第　号 論文博	氏名	野口　信弘
論文審査委員	審査日　平成　25年　3月　15日		
	主査教授　松下　正之　印		
	副査教授　藤田　次郎　印		
	副査教授　（沖縄科学技術大学院大学）　[illegible]　印		

（論文題目）

Phosphorylation of epidermal growth factor receptor at serine 1047 by MAP kinase-activated protein kinase-2 in cultured lung epithelial cells treated with flagellin

（肺胞上皮細胞のフラジェリン刺激による上皮成長因子受容体のセリン 1047 のリン酸化は、MAP キナーゼ活性化プロテインキナーゼ 2 によって起こる）

（論文審査結果の要旨）

上記論文に関して、研究の背景と目的、研究内容、および研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。

1. 研究の背景と目的

サイトカインの一つである tumor necrosis factor α（TNFα）は、炎症に関与することが知られている。2007 年に、TNFα は p38 MAP キナーゼ系を活性化し、上皮成長因子受容体（EGFR）の 1047 番目のセリン残基（Ser1047）のリン酸化を引き起こすことが報告された。現在、Ser1047 のリン酸化は EGFR の一過性のエンドサイトーシスを誘導すると考えられている。しかし、Ser1047 をリン酸化するプロテインキナーゼは不明である。

レジオネラは鞭毛を有し、その構成タンパク質であるフラジェリンは Toll-like receptor 5（TLR5）を刺激することが知られている。最近、著者らは II 型肺胞上皮細胞様の特徴を有する A549 細胞をフラジェリンで刺激すると、p38 MAP キナーゼが活性化されること、及び、24 時間以降に上皮間葉移行（EMT）に関与する遺伝子発現が起こることを報告した。今回、短時間のフラジェリン刺激により EGFR の Ser1047 がリン酸化されることを見いだした。そこで、このリン酸化に関与するプロテインキナーゼの同定を試みた。

2. 研究内容

TLR5 を刺激するアミノ酸配列は、全てのフラジェリンに保存されている。今回、*Bacillus subtilis* から精製したフラジェリンを実験に用いた。それぞれのリン酸化は、免疫ブロット法により検討した。フラジェリン刺激による Ser1047 のリン酸化は 30 分から認められ 2 時間以上持続した。EGFR の活性化の指標である Tyr1173 のリン酸化は認められなかった。Ser1047 のリン酸化は p38 MAP キナーゼの阻害剤である SB203580 の添加により消失した。Ser1047 の付近のアミノ酸配列から、p38 MAP キナーゼの下流のプロテインキナーゼの中の MAP キナーゼ活性化プロテインキナーゼ 2（MAPKAPK2）がリン酸化する可能性が示唆された。フラジェリンの刺激により MAPKAPK2 は 30 分以内に活性化された。MAPKAPK2 の阻害剤(MK2a inhibitor)の添加により、フラジェリン刺激による Ser1047 のリン酸化は消失した。TNF α 刺激では、フラジェリン刺激とは異なり Tyr1173 のリン酸化も認められた。SB203580 と MK2a inhibitor は TNF α 刺激による Ser1047 のリン酸化を消失させたが、Tyr1173 のリン酸化は阻害しなかった。次に、大腸菌の発現系を用いてグルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ（GST）と融合させた MAPKAPK2（GST-MAPKAPK2）を精製し、*in vitro* で活性化させた。また、HEK293T 細胞に EGFR を発現させ、免疫沈降法により分離した。分離した EGFR は、活性化させた GST-MAPKAPK2 により Ser1047 がリン酸化された。この結果から、MAPKAPK2 が *in vitro* で EGFR の Ser1047 をリン酸化することが明らかになった。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は、フラジェリンおよび TNF α で刺激された細胞での EGFR の Ser1047 のリン酸化に、MAPKAPK2 が関与している可能性を検討した初めての研究である。本研究の結果は、MAPKAPK2 が細胞内で直接に EGFR の Ser1047 をリン酸化することを強く示唆している。今後、このリン酸化が EGFR のエンドサイトーシスを引き起こすかを検討することにより、炎症反応における EGFR の Ser1047 のリン酸化の病態生理学的意義が明らかになるものと期待される。

本研究成果は、鞭毛を有する細菌による炎症に、フラジェリンおよび TNF α が関与する可能性とその分子機構を解明する上で重要であり、かつ、国際的にも高い学術的水準のものであると評価された。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものと判断した。

備　考　1　用紙の規格は、Ａ４とし縦にして左横書きとすること。
　　2　要旨は800字～1200字以内にまとめること。
　　3　＊印は記入しないこと。