

1. 研究題目

MAPキナーゼの活性化機構

Activation mechanism of MAP kinase cascade

2. 代表研究者

後藤由季子、京都大学ウイルス研究所遺伝子動態調節部門、助手

Yukiko Gotoh, Institute for Virus Research, Kyoto University, Research associate

3. 英文サマリー

We purified the activity to activate MAPKK (MAPKK kinase) from *Xenopus* mature oocytes and obtained at least three peaks of MAPKK kinase. One of the peaks was Mos, and another might be a new kinase. The activation of MAP kinase by the addition of Ras to *Xenopus* oocyte extracts was dependent of the activation of Raf and 45kDa MAPKK. The activation of MAPKK by MAPKK kinases was mediated by phosphorylation of Ser218 and Ser222 on MAPKK.

4. 邦文本文

4-1. 研究目的

MAPキナーゼは、増殖開始、神経分化、免疫細胞活性化などの様々な細胞内シグナル伝達で共通に機能する分子である。MAPキナーゼは、MAPKK (MAPキナーゼキナーゼ) により、リン酸化されて活性化される。MAPKK/MAPキナーゼのセットは、癌遺伝子Rasの下流で活性化することが示されている。本研究は、(1) MAPKK/MAPキナーゼの活性化機構を調べる上で、MAPKKの活性化に必要なリン酸化部位を探索するとともに、'MAPKK活性化因子'の同定を試みること、(2) 他のシグナル伝達分子(特にガン遺伝子ras, raf)との関連を調べ、細胞内シグナル伝達を理解する手掛かりを得ること、(3) MAPKK/MAPキナーゼのセットが酵母で保存されているか否かを調べ、シグナル伝達システムの進化的側面を検討することを目的とし、以下の成果を得た。

4-2. 研究経過および成果

(1) MAPKKの活性化に必要なリン酸化部位を決定した。キナーゼドメイン7と8の間にある進化的に保存されたセリン残基 (Ser218とSer222) について、各をアラニン残基に置換した突然変異体(S218A-MAPKK,S222A-MAPKK)を大腸菌に発現したところ、いずれの突然変異体もpeakAMAPKKキナーゼでリン酸化も活性化もされなかった。Rafの免疫沈降物をMAPKKキナーゼとして用いた場合も、S218A-MAPKK,S222A-MAPKKのどちらもが活性化されなかった。しかしながら、出芽酵母のMAPKKキナーゼであるSTE11を用いた場合には、S222A-MAPKKは活性化されなかったが、S218A-MAPKKは活性化された。また、Ser218とSer222のそれぞれを酸性アミノ酸に置換した突然変異体(S218E-MAPKK,S222E-MAPKK)を作製したところ、S218E-MAPKKは野生型MAPKKと同程度の活性を有していたが、S222E-MAPKKは野生型の10倍以上の活性を有していた。以上より、Ser222が活性化に必要な主要なリン酸化部位であり、Ser218のリン酸化が補助的な役割を果たしていることが示唆された。

次に、MAPKK活性化因子 (MAPKKキナーゼ) の精製をXenopus 卵を材料に行った。Qセファロースカラムクロマトグラフィーにより、MAPKKキナーゼ活性は再現的に3つのピーク (peak A,B,C) として回収された。peak B MAPKKキナーゼは、さらに精製を進めたところ、抗mos抗体で反応するバンドと全く同じ溶出パターンを示した。そこで大腸菌にMosを発現させ、Xenopus 未成熟卵抽出液に加えたところ、抽出液中のMAPKKとMAPキナーゼが活性化し、MosがMAPKKの上流の因子であることが示された。またこのときMosの免疫沈降物が直接にMAPKKを活性化したので、MosがMAPKKキナーゼであること、peak B MAPKKキナーゼがMosであったことが示唆された。peakA MAPKKは、抗原性等の理由から新規のMAPKKキナーゼであることが予想され、現在完全精製とcDNAクローニングを試みている。

(2) 原癌遺伝子Rasは、Xenopus 卵無細胞系に加えるとMAPキナーゼを活性化することが示されている。第二に、この系において、RasとMAPキナーゼを結ぶMAPKKキナーゼとMAPKKがいかなる分子であるかを検討した。無細胞系にRasを加えたときにRafが活性化していること、また優性不能型Rafの存在下ではRasを加えてもMAPキナーゼが活性化しないことから、Rafがこの系におけるMAPKKキナーゼである可能性が高いと考えられる。また、45kDaMAPKKを免疫吸収すると、Rasを加えてもMAPキナーゼが活性化しなかったため、この場合45kDaMAPKKを介在してMAPキナーゼを活性化していることが示された。以上より、Ras,Raf,MAPKK,MAPキナーゼというカスケードがこの系で機能していることが示唆された。

(3) 分裂酵母のspk1とbyr1は、それぞれMAPキナーゼとMAPKKと一次構造上相同性の高い分子である。spk1が、機能的にMAPキナーゼに近いのかを検討した。spk1の欠損株は胞子形成能を失うが、spk1欠損株にMAPキナーゼを導入した株では、胞子形成能が回復した。また、spk1はbyr1依存的にチロシンリン酸化を受けることもわかった。したがって、spk1が、構造だけでなく機能的にもMAPキナーゼに近く、byr1の下流で活性化していることが示唆された。よって、MAPKK/MAPキナーゼのセットは酵母から人まで保存されていると考えられる。

4-3. 発表論文リスト

1. Matsuda, S., Gotoh, Y. & Nishida, E. Phosphorylation of Xenopus MAP kinase kinase by MAP kinase kinase and MAP kinase. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 3277-3281.
2. Kosako, H., Nishida, E. & Gotoh, Y. cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. (1993) *EMBO J.* 12, 787-794.
3. Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K. & Levin, D.E. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 3067-3075.
4. Nishida, E. & Gotoh, Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. (1993) *Trends Biochem. Sci.* 18, 128-131.
5. Gotoh, Y., Nishida, E., Shimanuki, M., Toda, T., Imai, Y. & Yamamoto, M. Schizosaccharomyces pombe Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to Xenopus mitogen-activated protein kinase. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 6427-6431.
6. Kosako, H., Gotoh, Y. & Nishida, E. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in Xenopus oocyte maturation. (1994) *EMBO J.* 13, 2131-2138.
7. Gotoh, Y., Matsuda, S., Takenaka, K., Hattori, S., Iwamatsu, A., Ishikawa, M., Kosako, H. & Nishida, E. Characterization of recombinant Xenopus MAP kinase kinases mutated at potential phosphorylation sites. (1994) *Oncogene* 9, in press.