

JNK/SAPK 経路を活性化する新規プロテインキナーゼ
LZK による細胞内シグナル伝達の解析

2001

池田 篤史

JNK/SAPK 経路を活性化する新規プロテインキナーゼ
LZK による細胞内シグナル伝達の解析

2001

池田 篤史

目次

| | |
|---|----|
| 序論 | 1 |
| 第一章 LZK による JNK/SAPK 経路の活性化機構の解析 | 5 |
| 第一節 LZK により活性化される MAPK 経路の同定 | 5 |
| 第二節 LZK とスカフォールド分子 JIP-1 の相互作用の解析 | 9 |
| 第三節 LZK によるシグナル伝達における JIP-1 の役割 | 12 |
| 第四節 考察と総括 | 14 |
| 第五節 実験方法 | 16 |
| 第二章 LZK 分子内の機能性ドメインの解析 | 19 |
| 第一節 LZK 二量体/多量体形成における ロイシンジッパー様領域の役割 | 20 |
| 第二節 二量体/多量体形成の JNK/SAPK 経路活性化における役割 | 23 |
| 第三節 LZK 分子の C 末端領域の機能解析 | 25 |
| 第四節 考察と総括 | 27 |
| 第五節 実験方法 | 29 |
| 第三章 酵母 two-hybrid 法を用いた LZK 結合因子のクローニングおよび解析 | 31 |
| 第一節 酵母 two-hybrid 法による LZK 結合因子のスクリーニング | 31 |
| 第二節 LZK 結合因子 AOP-1 と LZK の相互作用の解析 | 33 |
| 第三節 考察と総括 | 39 |
| 第四節 実験方法 | 42 |
| 結論 | 44 |
| 謝辞 | 45 |
| 引用文献 | 46 |

序論

細胞は、外界からの刺激に応答して増殖、分化、アポトーシスなどさまざまな運命をたどる。これら細胞運命の決定は、受精卵から個体への発生、神経系や免疫系の機能調節、細胞の癌化など幅広い生命現象において重要な役割を果たしている。したがって、細胞はその進化の過程において外界からの刺激を正確かつ迅速に核へと伝えるさまざまなシグナル伝達経路を構築してきた。このようなシグナル伝達経路のうち、現在もっともよく研究されている経路の一つとしてMAPキナーゼ (MAPK) 経路があげられる⁽¹⁴⁾。歴史的には、MAPキナーゼは培養細胞に増殖因子を添加した際に活性化されるプロテインキナーゼとして同定された⁽⁵⁻⁹⁾。その後の研究により、MAPKはキナーゼドメイン中に存在するTEYという配列中のスレオニン残基およびチロシン残基の両方をリン酸化されることで活性化されることが明らかにされた⁽¹⁰⁾。さらに、MAPKのスレオニンおよびチロシンの両方をリン酸化する dual specificity protein kinase 活性を有するMAPKキナーゼ (MAPKK) が存在すること、またそのMAPKK自体がセリン/スレオニンのリン酸化を受けることで活性化されるプロテインキナーゼであり、細胞内にMAPKKをリン酸化するMAPKKキナーゼ (MAPKKK)、MAPKK、およびMAPKより構成されるプロテインキナーゼカスケードが存在することが明らかになった⁽¹¹⁻¹³⁾。さらに、MAPKKによるリン酸化によって活性化されたMAPKは細胞質から核内に移行し、転写因子等の標的分子群をリン酸化することでその活性を調節し、さまざまな遺伝子の転写を特異的に制御することで外界刺激に対して遺伝子の転写を介した細胞全体としての応答を惹起することが知られている。このようなMAPKKK、MAPKK、MAPKよりなる経路はMAPK経路と称され、酵母から哺乳動物細胞にいたるまで進化的に高度に保存された主要な細胞内シグナル伝達経路である。

最近になって上述の細胞増殖因子によって活性化されるMAPKに近縁分子が存在することが明らかになった。これらのMAPK近縁分子にはJNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) またはSAPK (stress-activated protein kinase) とp38が挙げられる⁽¹⁴⁻¹⁸⁾。増殖因子により活性化されるMAPKを古典的MAPKあるいはERK (Extracellular signal-regulated kinase) と呼ぶと、このERKの構造的特徴はTEYよりなるMAPKKによりリン酸化を受ける配列をもつことである。しかし、MAPK近縁分子であるJNKはTEY配列の代わりにTPY配列を、p38はTGY配列をもっている。これらMAPK近縁分子はERK同様にTXY配列中のスレオニンとチロシンをMAPKKによりリン酸化されることで活性化されることが明らかになっており、ERKに加えてJNK、p38といった近縁分子を含めて現在ではMAPKスーパーファミリーと総称されている。

ERKが主に細胞増殖因子によって活性化されるのに対し、JNKやp38はIL-1、TNF- α

といった炎症性サイトカインや、UV照射、高浸透圧刺激などの物理化学的ストレスによって活性化されることがわかっている (Fig. 0)。JNK や p38 といった新規 MAPK の上流にも ERK 経路と同様に MAPKK や MAPKKK が存在していることが明らかになっているが、これら新規 MAPK 経路の MAPKKK は特に多様性に富み、MEKK1⁽¹⁹⁾、TAK1⁽²⁰⁾、ASK1⁽²¹⁾、および MLK ファミリーのプロテインキナーゼ⁽²²⁻²⁷⁾ など、現在までに数多くの分子が単離されている。このような状況のもと、我々の研究室ではヒト小脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、MAPKKK 様の一次構造をもつプロテインキナーゼ遺伝子のクローニングに成功した⁽²⁸⁾。この cDNA によりコードされるタンパク質は、N 末端側にセリン/スレオニンキナーゼおよびチロシンキナーゼの両方の一次構造上の特徴をあわせもったハイブリッド型のキナーゼ触媒ドメインをもち、さらにそのすぐ C 末端側には 2 個の隣接するロイシンジッパー様の配列よりなる領域が存在していた。これらの特徴は MLK ファミリーとよばれる MAPKKK 分子群に共通にみられるものであり、このプロテインキナーゼが MLK ファミリーに属する新規なメンバーであることが予想された。そこで、この分子に LZK (leucine zipper-bearing kinase) と名付け、その細胞内シグナル伝達における役割を詳細に検討した。

第一章では、まず LZK が MAPK スーパーファミリー中のどの分子を含む経路を活性化するかについて検討した。その結果、LZK は MAPKK である MKK7 を直接リン酸化することで活性化し、結果的に JNK/SAPK 経路を選択的に活性化することを明らかにした。次

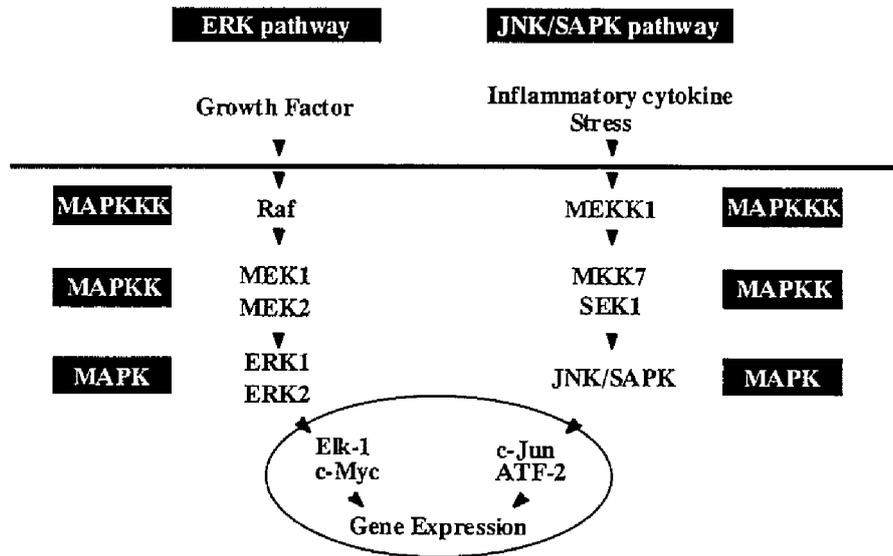


Fig. 0 Schematic diagram of two major MAPK pathways in mammalian cells. Both MAPK pathways consist of three classes of protein kinases, MAPK, MAPKK and MAPKKK. ERK pathway is activated mainly by growth factors, whereas JNK/SAPK pathway is activated when cells are exposed to inflammatory cytokines or stresses.

に、近年シグナル伝達研究の分野で非常に大きな注目を集めているスカフォールド分子がLZKによるJNK/SAPK経路活性化において果たす役割を検討した。スカフォールド分子とは、あるシグナル伝達経路を構成する複数の分子群と結合し、シグナル伝達の正確性やシグナル伝達効率を高める分子の総称である⁽²⁹⁾。JNK/SAPK経路においては、JIP-1^(30, 31)とよばれる分子がスカフォールド分子として機能し得ることが報告されているが、LZKがこのJIP-1と結合することを明らかにし、さらにその結合領域を共免疫沈降法により検討したところ、LZKがそのキナーゼドメインを介してJIP-1のPTBドメイン (phosphotyrosine binding domain) に結合することを明らかにした。また、このLZKとJIP-1の相互作用により、LZK単独の場合と比較してLZKのJNK/SAPK経路の活性化能が著しく増強されることが明らかになった。これらの結果は、LZKがJNK/SAPK経路を特異的に活性化するMAPKKKであり、そのJNK/SAPK経路活性化の効率がスカフォールド分子であるJIP-1との相互作用を介して増強されることを明らかにしたものである。

次に、第二章ではLZK分子内に存在する機能性ドメインの同定および解析を行った。前述のように、LZK分子内には2個の隣接したロイシンジッパー様構造からなる領域が存在する。ロイシンジッパー構造はタンパク質間の相互作用に関与することが知られていること、またMAPKKKのなかには二量体/多量体形成がその活性化に必須であるものが存在する^(32, 33)ことが知られていることから、まずLZKがこの領域を介して二量体あるいは多量体を形成する可能性について検討した。その結果、細胞内に発現した2種の異なるエピトープタグを付加したLZKが免疫沈降時に共沈することから、LZKが細胞内で二量体あるいは多量体を形成していることが明らかになった。そこで次にLZKのさまざまな欠失変異体の全長LZKとの結合能を検討したところ、予想通りロイシンジッパー様領域が二量体/多量体形成に必須であることが明らかになった。さらにこの二量体/多量体形成がLZKのMAPKKKとしての機能において果たす役割について検討したところ、二量体/多量体形成能を欠く変異型LZKはJNK活性化能をもたないことがわかった。したがって、二量体/多量体形成がLZKによるJNK/SAPK経路の活性化に不可欠のステップであることが明らかになった。また、C末端約160アミノ酸残基を欠失した変異型LZKでもJNK活性化能が失われていた。そこで、この変異体のMAPKK活性化能を検討したところ、このC末端領域がJNK/SAPK経路のMAPKKであるSEK1の活性化に必要であることが明らかになった。

第三章では、酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、LZKと細胞内で相互作用する分子を単離し、LZKによるシグナル伝達においてその分子が果たす役割について検討した。まず、LZK分子のN末端からキナーゼドメインの直後までをベイトとして酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、2個の陽性クローンを得た。そのうちのひとつのクローンはAOP-1 (antioxidant protein-1) とよばれる既知のタンパク質をコードしていた⁽³⁴⁾。細胞内に発現したAOP-1はLZKと免疫沈降時に共沈することか

ら、これらの分子は細胞内で実際に相互作用し得ることが明らかになった。AOP-1はその一次構造上の特徴からチオレドキシソルホキシダーゼのひとつであると考えられている。すなわち、AOP-1は細胞にとって有害な活性酸素種のひとつである過酸化水素をチオレドキシソルホキシダーゼ依存的に還元除去するはたらきをもつ分子であると考えられる。そこで、細胞にAOP-1とLZKを発現し、過酸化水素による刺激がこれらの分子の相互作用に与える影響を調べたところ、刺激後約2.5分から5分をピークとした相互作用の一過性の増強が認められた。最近になって細胞内で微量に産生される過酸化水素がシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとしてはたらくことが明らかになりつつある³⁵⁻³⁸⁾。細胞内でセカンドメッセンジャーとして産生された過酸化水素によりAOP-1とLZKの相互作用が調節され、その結果LZKのJNK/SAPK経路活性化能が制御されている可能性がある。

以上より、本研究は新規プロテインキナーゼLZKによる細胞内シグナル伝達経路を詳細に解析したものであり、MAPK経路のひとつであるJNK/SAPK経路を介した細胞制御の複雑な過程を解明するための重要な知見を得たものである。

第一章 LZK による JNK/SAPK 経路の活性化機構の解析

細胞は外界からの刺激に応答して様々な運命をたどる。このような細胞運命の決定において中心的な役割を果たすのが細胞内シグナル伝達系である。細胞外からの刺激を核へと伝達する主要なシグナル伝達経路として、MAPK 経路の存在が知られている⁽¹⁻⁴⁾。MAPK 経路は MAPKKK、MAPKK、MAPK の3つのクラスのプロテインキナーゼ群により構成されるカスケード状のシグナル伝達経路であり、哺乳動物細胞では少なくとも3種の MAPK 経路が存在することが知られている。つまり、主に増殖因子刺激により活性化される ERK 経路（または古典的 MAPK 経路）と、炎症性サイトカインや物理化学的ストレスにより活性化される JNK/SAPK 経路や p38 経路（新規 MAPK 経路とも総称される）である⁽¹⁴⁻¹⁸⁾。どちらの経路においても MAPKKK が最も多様性に富み、これまでにさまざまな MAPKKK 分子がクローニングされている。MLK ファミリーとよばれる一群のプロテインキナーゼ群は、最近になりその存在が知られるようになった新しい MAPKKK 群である。このファミリーに属するプロテインキナーゼのうちいくつかは、主に新規 MAPK 経路において MAPKKK としてはたらくことが知られている⁽²²⁻²⁷⁾。筆者の所属する研究室では、ヒト小脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることで新規なプロテインキナーゼ遺伝子のクローニングに成功した⁽²⁸⁾。この遺伝子にコードされるタンパク質は分子量約 108kDa であり、N 末端側にセリン/スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの両方の一次構造上の特徴をあわせもったハイブリッド型のキナーゼ触媒領域をもち、さらにそのすぐ C 末端側には2個の隣接するロイシンジッパー様の構造よりなる領域が存在していた。これらの構造的特徴は MLK ファミリーに属する分子に共通のものであり、LZK は MLK ファミリーに属する新規プロテインキナーゼであると考えられた。

そこで第一章では、LZK が JNK/SAPK 経路あるいは ERK 経路において MAPKKK 活性をもつことを予想し、LZK による MAPK 経路活性化メカニズムの検討を行った。

第一節 LZK により活性化される MAPK 経路の同定

1. LZK により活性化される MAPK の同定

LZK によるシグナル伝達メカニズムを解析するために、まず LZK により活性化される MAPK の同定を行った。COS7 細胞に野生型の LZK (LZK WT) あるいはキナーゼ活性をもたない変異型 LZK である LZK Δ KD をそれぞれ JNK あるいは ERK と共発現した。トランスフェクション 24 時間後にそれぞれの MAPK を免疫沈降により回収し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存

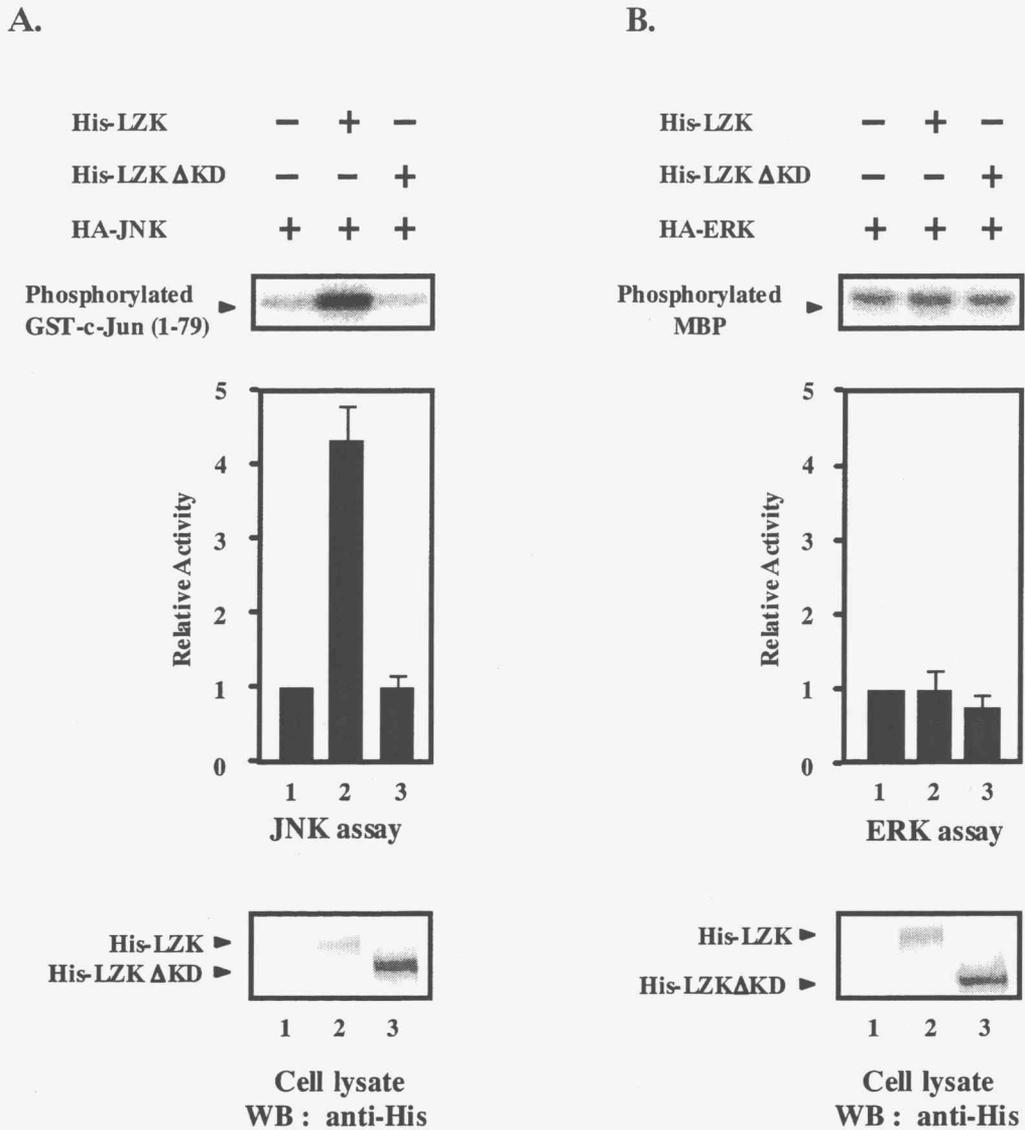


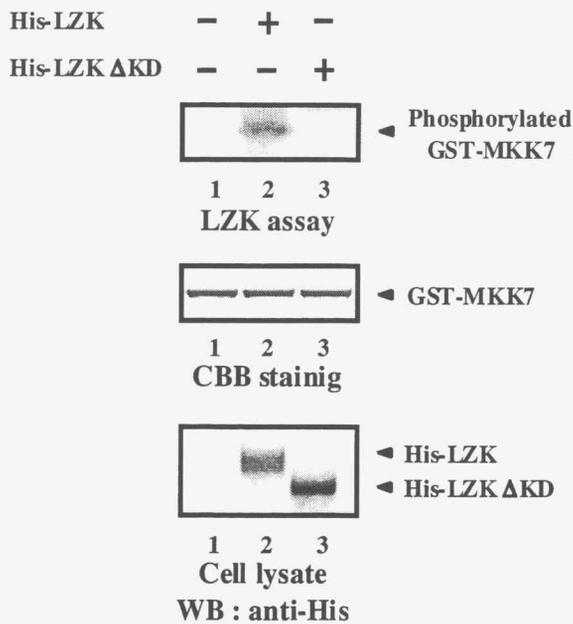
Fig. 1-1 LZK activates JNK but not ERK. A, His-tagged LZK or its kinase negative mutant, LZK ΔKD, was co-transfected with HA-tagged JNK in COS7 cells. After 24 h, HA-JNK was immunoprecipitated from each cell lysate, and kinase activity was measured by in vitro kinase assay using GST-c-Jun as a substrate. B, COS7 cells were co-transfected with LZK or LZK ΔKD and HA-tagged ERK. After 24 h, HA-ERK was immunoprecipitated and kinase activity was measured by in vitro kinase assay using myelin basic protein (MBP) as a substrate. Representative autoradiograms obtained on the in vitro kinase assay are shown (top). The amount of His-LZK or His-LZK ΔKD in each lysate was determined by Western blotting with anti-His antibodies (bottom). Bar graphs show the mean fold increase in substrate phosphorylation relative to the empty vector control. The mean values for three independent experiments are shown with standard deviations.

在下でGST-c-Jun (1-79) (JNKアッセイ) またはMBP (ERKアッセイ) を基質として30°C、20分間 *in vitro* キナーゼ反応を行った。反応物をSDS-PAGEで電気泳動後、BAS2000を用いてリン酸化された基質を可視化・定量した。その結果、野生型LZKとの共発現によりJNK活性がコントロールの約4倍から5倍程度まで上昇した (Fig. 1-1A)。しかし、野生型のLZKは同様の条件下でERKを全く活性化しなかった (Fig. 1-1B)。このことからLZKはJNK/SAPK経路を選択的に活性化することが明らかになった。また、キナーゼ活性をもたない変異型LZKであるLZK Δ KDはJNKを活性化しなかったことから、LZKによるJNK/SAPK経路活性化にはそのキナーゼ活性が必須であることが明らかになった。

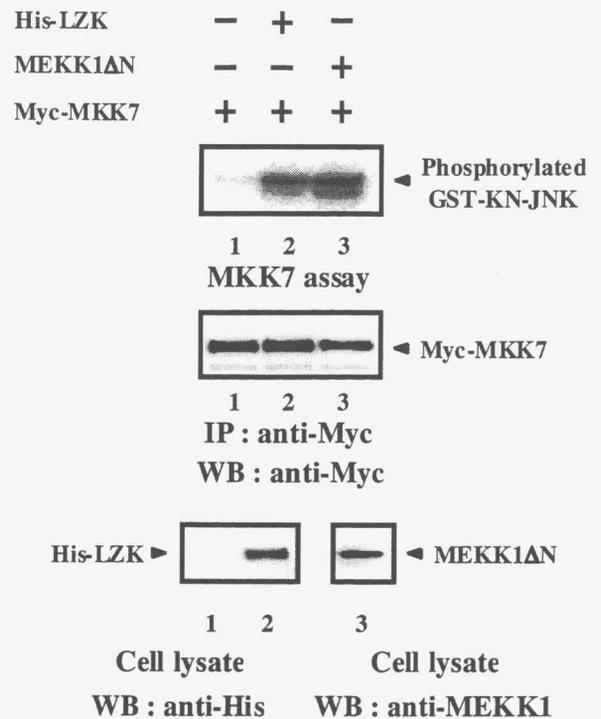
2. LZKによるMKK7活性化

前項の実験より、LZKがJNK/SAPK経路を活性化することが明らかになった。LZKはそのキナーゼドメインにおいて既知のMAPKKKであるTAK1やRafとある程度の相同性を示す。また、これまでに解析されてきたMLKファミリーに属するキナーゼ分子は主にJNK/SAPK経路においてMAPKKKとしてはたらくことが報告されている⁽²²⁻²⁷⁾。これらのことから、LZKがJNK/SAPK経路においてMAPKKKとしてはたらくことが予想された。そこで、LZKがJNK/SAPK経路のMAPKKであるMKK7をリン酸化・活性化するかどうか検討した。まず、LZKが*in vitro*でMKK7をリン酸化することを確認した。COS7細胞に野生型あるいはキナーゼ活性を欠く変異型LZKを発現し、免疫沈降により回収したものをそれぞれ酵素源として用い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下でGST-MKK7を基質とした*in vitro*キナーゼアッセイを行いLZKのMAPKKK活性を測定した。その結果、野生型のLZKのみが特異的にGST-MKK7をリン酸化した (Fig. 1-2A)。次に、LZKが細胞内でMKK7を活性化することを確認した。COS7細胞にMKK7と野生型のLZK、あるいはすでにMAPKKKとしてMKK7を強く活性化することが知られているMEKK1 Δ N (MEKK1の構成的活性型変異体) を発現し、MKK7を免疫沈降により回収した。これを酵素源とし、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下でGST-KN-JNK (キナーゼ活性をもたない変異型JNK) を基質とした*in vitro*キナーゼアッセイを行い、MKK7活性を測定した。その結果、LZKとの共発現によりMKK7活性はコントロールの約7倍に上昇した (Fig. 1-2B, C)。これはポジティブコントロールとして用いたMEKK1 Δ Nと共発現した際のMKK7活性の約65%にあたり、LZKがMAPKKKとして機能するのに十分な程度MKK7を活性化し得ることがわかった。

A.



B.



C.

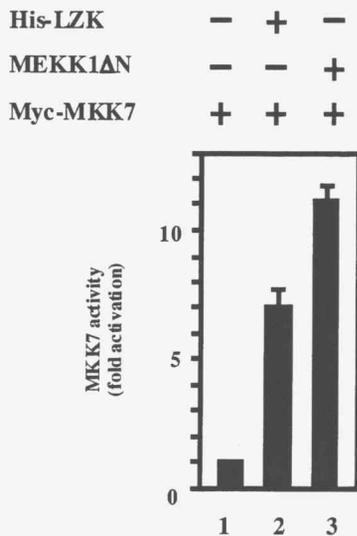


Fig. 1-2 LZK phosphorylates and activates MKK7 when co-expressed in COS7 cells. A, His-tagged LZK or LZK ΔKD was expressed in COS7 cells. After 24 h post-transfection, LZK or LZK ΔKD was immunoprecipitated from each cell lysate and kinase activity of LZK was measured by in vitro kinase assay using GST-MKK7 as a substrate. A representative autoradiogram is shown (top). The amount of GST-MKK7 included in each reaction mixture as a substrate was essentially identical (middle). The expression of LZK or LZK ΔKD was determined by Western blot with anti-His antibodies (bottom). B, His-tagged LZK or MEKK1ΔN was co-expressed with Myc-tagged MKK7 in COS7 cells. At 24 h post-transfection, Myc-MKK7 was immunoprecipitated

from each cell lysate and MKK7 activity was measured by in vitro kinase assay using GST-KN-JNK as a substrate. A representative autoradiogram of three independent experiments is shown (top). The amount of immunoprecipitated Myc-tagged MKK7 was determined by Western blotting with anti-Myc antibodies (middle), and the amounts of His-LZK and MEKK1ΔN expressed in COS7 cells were determined by Western blotting with anti-His or anti-MEKK1 antibodies, respectively (bottom). Representative results of three independent experiments are shown. C, The amount of phosphorylated GST-KN-JNK in MKK7 assay was measured by Fuji BAS2000 and shown as mean ±S.E. from three independent experiments.

第二節 LZK とスカフォールド分子 JIP-1 の相互作用の解析

1. LZK 分子内のスカフォールド分子 JIP-1 結合領域の同定

第二節では、LZK による JNK/SAPK 経路の活性化におけるスカフォールド分子 JIP-1 の役割について検討した。スカフォールド分子とは、あるシグナル伝達経路を構成する複数の分子と相互作用し、その経路のシグナル伝達の正確性や伝達効率を高める機能をもつ分子である⁽²⁹⁾。JNK/SAPK 経路においては JIP-1 とよばれる分子がスカフォールド分子として機能することがすでに報告されている⁽³¹⁾。すなわち、JIP-1 は JNK/SAPK 経路を構成する MAPK である JNK、MAPKK である MKK7、そして MAPKKK であり、また MLK ファミリーのメンバーでもある MLK3 とそれぞれ独立に相互作用し、その結果 MLK3→MKK7→JNK というシグナル伝達の効率を上昇させることが知られている。そこで、LZK による JNK/SAPK 経路の活性化においても JIP-1 が関与するかどうか検討した。まずはじめに、LZK が JIP-1 と相互作用するかどうか、共免疫沈降法により解析した。COS7 細胞に His-tag を付加した LZK、Flag-tag を付加した JIP-1 を共発現し、anti-Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。この免疫沈降物中に存在する、JIP-1 と共沈した LZK を検出する目的で、anti-His 抗体による Western blot を行った。その結果、LZK および JIP-1 の両方を発現している場合のみ JIP-1 に共沈した LZK のバンドが検出された

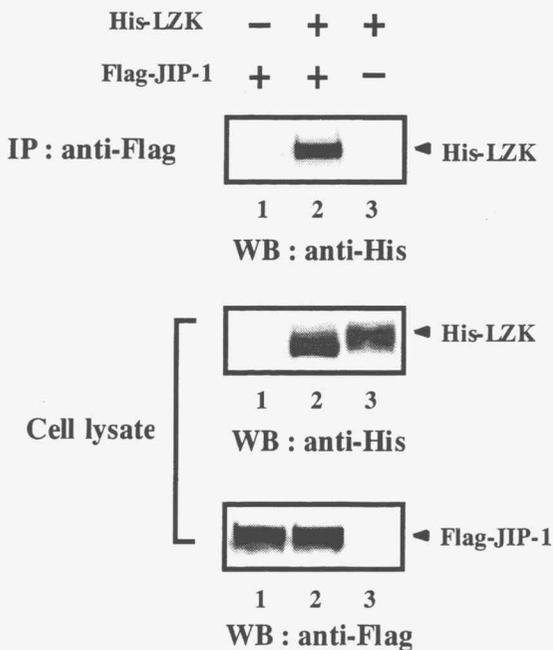
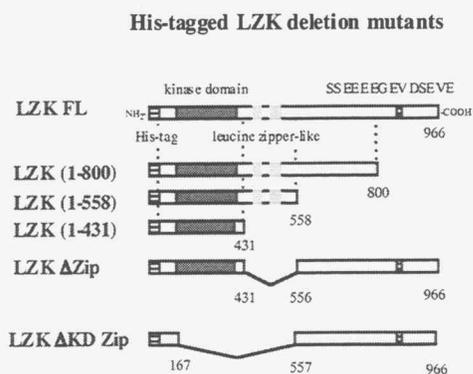


Fig. 1-3 LZK associates with JIP-1 when co-expressed in COS7 cells. COS7 cells were co-transfected with His-tagged LZK and/or Flag-tagged JIP-1. At 24-48 h post-transfection, the cells were lysed in lysis buffer. The JIP-1 protein was immunoprecipitated from each cell lysate using anti-Flag antibodies and protein G-Sepharose beads. The presence of His-LZK in the JIP-1 immunoprecipitates was examined by Western blotting with anti-His antibodies (top). In a parallel experiment, the presence of His-LZK and/or Flag-JIP-1 in cell lysates was examined by Western blotting with anti-His or anti-Flag antibodies, respectively (middle and bottom).

(Fig. 1-3)。このことから、細胞内で LZK と JIP-1 が相互作用することが明らかになった。そこで次に LZK 分子内の JIP-1 との相互作用に必要な領域を同定するために、Fig. 1-4 に示すような種々の変異型 LZK の JIP-1 との相互作用の有無を検討した。その結果、キナーゼドメインを欠失した変異体のみ JIP-1 結合能を失ったことから、JIP-1 との結合には LZK のキナーゼドメインが必要であることが明らかになった。

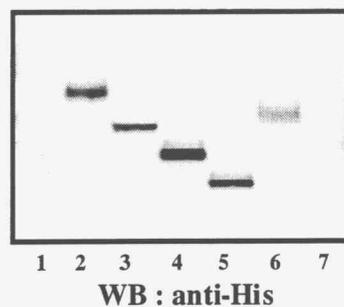
A.



B.

| | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| His-LZK FL | - | + | - | - | - | - | - |
| His-LZK (1-800) | - | - | + | - | - | - | - |
| His-LZK (1-558) | - | - | - | + | - | - | - |
| His-LZK (1-431) | - | - | - | - | + | - | - |
| His-LZK ΔZip | - | - | - | - | - | + | - |
| His-LZK ΔKD Zip | - | - | - | - | - | - | + |
| Flag-JIP-1 | + | + | + | + | + | + | + |

IP : anti Flag



Cell lysate

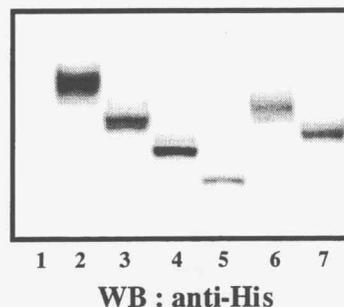


Fig. 1-4 LZK associates with JIP-1 via its kinase catalytic domain. A, His-tagged LZK and the deletion mutants of it used in this experiment are schematically presented. B, Each deletion mutant was co-expressed with Flag-tagged JIP-1 in COS7 cells, and JIP-1 was immunoprecipitated from each cell lysate. The presence of LZK in JIP-1 immunoprecipitates was examined by Western blotting with anti-His antibodies (upper). In a parallel experiment, a whole cell lysate of each transfectant was subjected to SDS-PAGE and LZK was immunodetected with anti-His antibodies (lower).

2. JIP-1 分子内の LZK 結合領域の同定

次に、前項とは反対にスcaffold分子 JIP-1 の LZK 結合領域を検討した。前述のように、JIP-1 は MAPKKK である MLK3、MAPKK である MKK7、そして MAPK である JNK と独立に結合する。この結合を介して MLK3 → MKK7 → JNK というシグナル伝達

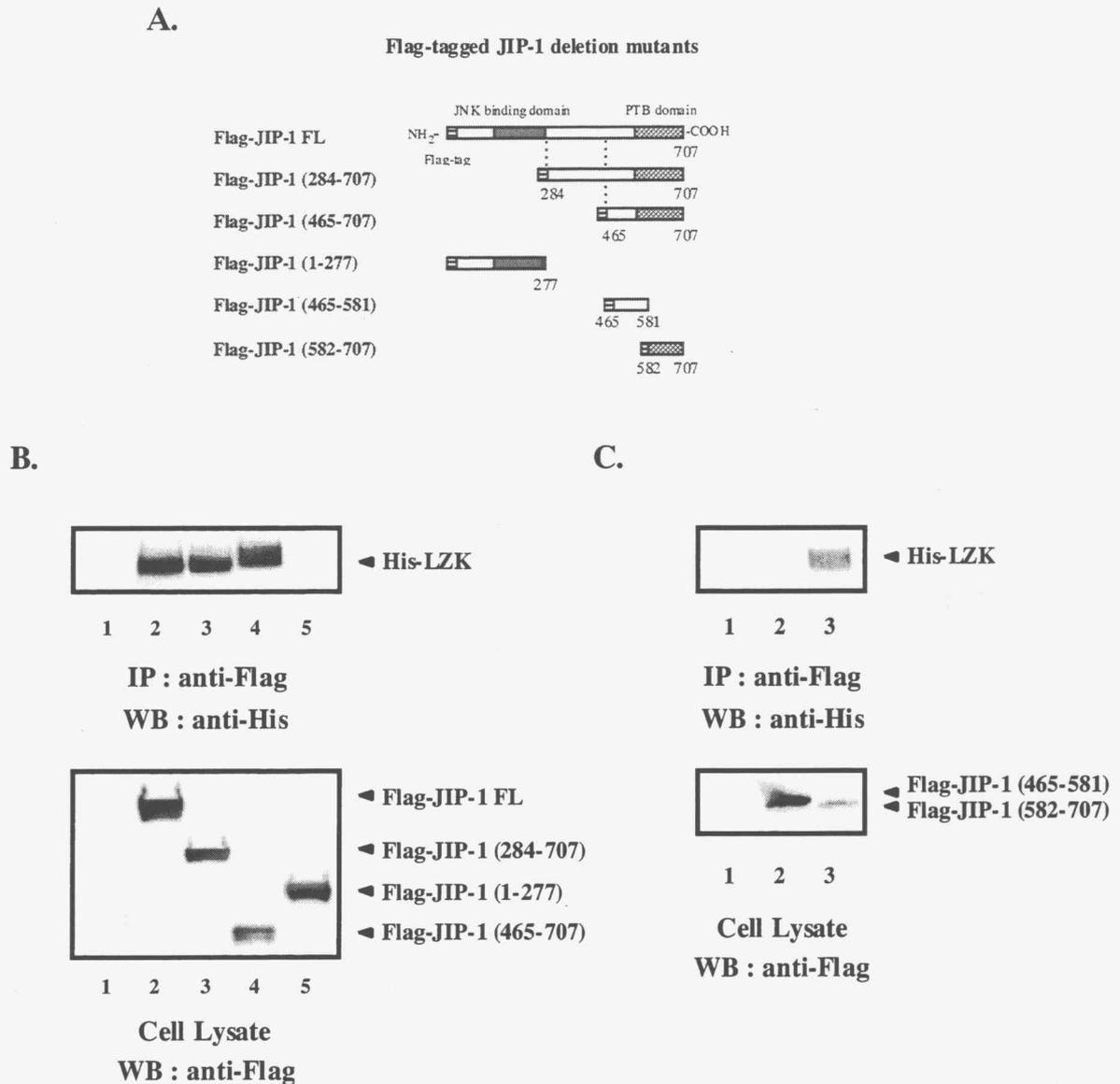


Fig. 1-5 LZK associates with JIP-1 via its kinase catalytic domain. A, His-tagged LZK and the deletion mutants of it used in this experiment are schematically presented. B, each deletion mutant was co-expressed with His-tagged LZK in COS7 cells, and JIP-1 was immunoprecipitated from each cell lysate. The presence of LZK in JIP-1 immunoprecipitates was examined by Western blotting with anti-His antibodies (upper). In a parallel experiment, a whole cell lysate of each transfectant was subjected to SDS-PAGE and JIP-1 was immunodetected with anti-Flag antibodies (lower).

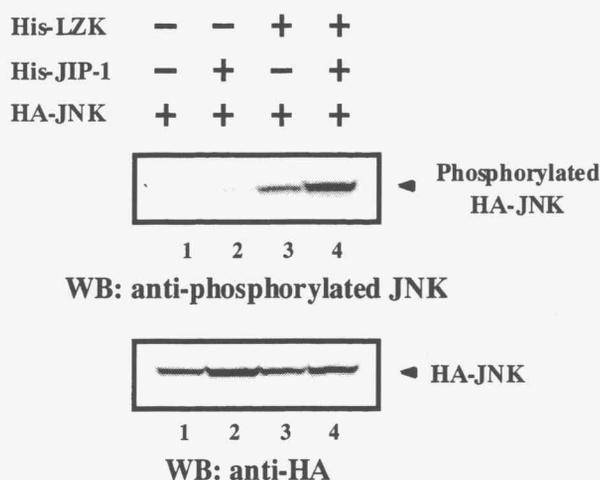
が増強されるが、JIP-1 分子上に存在する MLK3、MKK7、JNK の結合領域は分子内で C 末端側から順に並んでおり、このような結合領域の順序がカスケード状の反応が効率良く起こるために重要であると考えられる⁽³¹⁾。そこで、LZK からの JNK/SAPK 経路活性化シグナルが JIP-1 により増強されるためには、MLK3 同様に MKK7 結合領域よりも C 末端側の領域に LZK が結合する必要があると考えられる。そこで、JIP-1 分子内の LZK 結合領域を同定する目的で、JIP-1 を N 末端側から順次欠失した変異型 JIP-1 の発現コンストラクトを作成し、それぞれの LZK 結合性を共免疫沈降法により解析した。その結果、LZK は JIP-1 の C 末端より約 240 残基よりなる変異体と相互作用したことから、この領域に LZK 結合ドメインが含まれると考えられた (Fig. 1-5B)。この領域は、すでに知られている MKK7 との結合領域よりもさらに C 末端側にあたることから、LZK は上述の結合領域の順序を満たしていることがわかった⁽³¹⁾。また、JIP-1 分子の C 末端付近はリン酸化チロシン残基を認識して結合すると考えられている PTB ドメイン (phosphotyrosine binding domain) とよばれるドメイン構造をとっていることが知られている⁽³⁹⁾。LZK はこの PTB ドメインを含む領域と結合することから、LZK が PTB ドメインにより認識されている可能性が考えられた。そこで、さらに JIP-1 分子中の LZK 結合領域を絞り込むため、465 番目以降の残基を二つの領域に分割した変異型 JIP-1 発現コンストラクトを作成し、これらの変異体と LZK との結合能を検討した。その結果、LZK は JIP-1 の 582 番目以降と結合することが明らかになった (Fig. 1-5C)。この領域は PTB ドメインと考えられる領域とほぼ同一であり、LZK が JIP-1 の PTB ドメインと結合することが強く示唆された。しかし、LZK 分子の JIP-1 結合領域内には PTB ドメインにより認識されるコンセンサス配列が存在しないことから、JIP-1 の PTB ドメインによる LZK の認識機構は今後の解析が必要であると考えられる。

第三節 LZK によるシグナル伝達における JIP-1 の役割

上述のように、LZK はそのキナーゼドメインを介して JIP-1 の PTB ドメインと結合すると考えられた。JIP-1 分子内の LZK 結合ドメインは、MLK3 との結合ドメインと考えられる領域に含まれており、LZK と MLK3 は JIP-1 に同一のメカニズムで結合している可能性が示唆された。JIP-1 は MLK3 と相互作用することで MLK3 の JNK 活性化能を増強することが知られている⁽³¹⁾。そこで、筆者は LZK の JNK/SAPK 経路活性化能が JIP-1 との相互作用により影響されるかどうかに興味をもち、以下の解析を行った。まず、JIP-1 存在下あるいは非存在下で LZK と JNK を共発現し、細胞内で LZK により活性化された JNK の量をリン酸化 JNK (活性型 JNK) 特異的な抗体を用いた Western blot により定量した。また同時に、anti-HA 抗体で Western blot を行うことで発現した JNK の総量を定量し、各サンプルにおけるリン酸化 JNK 量の実測値を JNK の総量の実測値で割ることによりノーマ

ライズした結果を JNK 活性化の指標とし、この値をグラフに示した (Fig. 1-6)。その結果、JIP-1 非存在下においても LZK は JNK を活性化するものの、JIP-1 との共発現によって LZK の JNK 活性化能がさらに増強されることが確認された。したがって、LZK と JIP-1 との相互作用は LZK による JNK/SAPK 経路の活性化を正に調節するものであることが明らかになった。

A.



B.

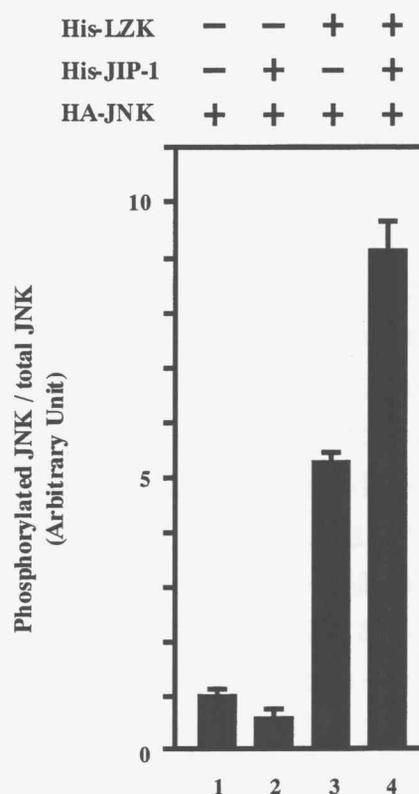


Fig. 1-6 JIP-1 enhances LZK-induced JNK activation. A, COS7 cells were co-transfected with HA-JNK and His-tagged LZK and/or JIP-1. After 24 h, the cells were lysed by the addition of SDS-PAGE sample buffer, and then the amount of dually phosphorylated JNK was determined by Western blotting with anti-phosphorylated JNK antibodies (upper). The same lysates were subjected to SDS-PAGE and then immunoblotted with anti-HA antibodies to determine the total amount of overexpressed JNK in each transfection (lower). B, The extent of JNK activation was represented as a graph. To determine the extent of JNK activation under each condition, the immunoreactivity to anti-phosphorylated JNK antibodies was normalized to the total amounts of JNK in the lysates. Data represent the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第四節 考察と総括

第一節ではLZKがJNK/SAPK経路のMAPKKであるMKK7を直接リン酸化することで活性化し、その結果としてJNKを活性化するということを明らかにした。つまり、LZKがJNK/SAPK経路のMAPKKとして機能するプロテインキナーゼであることが明らかになった。この結果はこれまでに報告されているように、MUK/DLK、MLK2、MLK3といったMLKファミリーに属するキナーゼが新規MAPK経路を選択的に活性化するという事実とよく一致するものである^(22, 24, 26)。MUK/DLKはJNK/SAPK経路の2種のMAPKKのうち、MKK7に高い基質特異性をもっており、SEK1はリン酸化しないという報告がある⁽⁴⁰⁾。しかし、LZKは後述するようである条件下ではSEK1を活性化し得ることから、LZKとMUK/DLKは下流のMAPKKの基質特異性に若干の差があるかも知れない。

次に第二節ではLZKがキナーゼドメインを介してスカフォールド分子JIP-1のPTBドメインと相互作用することを明らかにした。ヒトLZKはmRNAレベルで膵臓に非常に高い発現が認められるが⁽²⁸⁾、免疫組織染色の結果から膵臓内でもLangerhans島に特に高発現していることがわかっている。JIP-1もまた膵Langerhans島に強く発現しており⁽⁴¹⁾、膵Langerhans島細胞においてLZKとJIP-1が相互作用し、その結果JNK/SAPK経路が正に調節を受けている可能性がある。LZK、JIP-1はまた臓器レベルでは脳にも強く発現していることがわかっている^(28, 42)。JIP-1の細胞レベルでの局在の研究の結果、JIP-1タンパク質は神経細胞の樹状突起の先端付近に多く存在しているということが明らかになっている^(39, 43)。LZKもまた神経細胞株に発現していることがわかっているが、現時点ではLZKの神経細胞内での局在は不明である。LZKが神経細胞内でJIP-1と相互作用し、樹状突起の先端部で局所的なJNK活性化を誘導し、その結果JNKが通常とは異なる局在をとることで局所的に未知の基質をリン酸化している可能性も考えられ、JIP-1のanchorタンパク質としての役割にも興味をもたれる。

本研究ではスカフォールド分子としてJIP-1のみをとりあげたが、実際にはこれまでにJNK/SAPK経路におけるスカフォールド分子としてJIP-1ホモログのJIP-2⁽⁴³⁾およびJIP-3⁽⁴⁴⁾や、さらにはJNKBP1⁽⁴⁵⁾、 β -arrestin⁽⁴⁶⁾といった多様な分子が存在することが知られている。JIP-2やJIP-3はMLKファミリーのキナーゼと相互作用し得ることが報告されており、これらのスカフォールド分子とLZKとの関連にも興味をもたれる。また最近、JIP-1のPTBドメインと相互作用する分子としてp190RhoGEFとよばれる分子が単離された⁽³⁹⁾。この分子は低分子量Gタンパク質の一種であるRhoのGDP/GTP交換因子であり、Rhoを活性化するタンパク質のひとつである。このタンパク質中に存在する、JIP-1のPTBドメインにより認識される配列はリン酸化チロシンを含まず、フェニルアラニンを含む配列であることが報告されている。しかし、LZKのJIP-1結合領域であるキナーゼドメイン内にはリン酸化チロシンを含む認識配列、フェニルアラニンを含む認識配列のどちらも存在せ

ず、LZKとJIP-1のPTBドメインの結合における認識機構の解析は今後の課題である。最近、発生過程における神経細胞の移動を促すと考えられているreelinタンパク質の受容体であるApoER2の細胞内ドメインにJIP-1が結合するという報告があった⁽⁴⁷⁾。このように、JIP-1がLZK、MKK7、JNKを含むスカフォールド複合体を細胞膜直下にアンカーする役割をになっている可能性があり、今後さらなる解析が待たれる。

第三節では、JIP-1がLZKによるJNK/SAPK経路の活性化を増強することを明らかにした。本研究により得られた結果はJIP-1がスカフォールド分子としてLZKからJNKへのシグナル伝達反応の足場を提供することで、この経路のシグナル伝達効率を上昇させる因子であることを強く示唆するものである。しかし、スカフォールド分子が関連する経路のシグナル伝達効率を上昇させるには、そのスカフォールド分子の至適細胞内濃度が存在することが知られている⁽⁴⁸⁾。たとえばJIP-1によるLZKからJNKへのシグナル伝達を例にとると、JIP-1が至適細胞内濃度を大きく超えて過剰量存在した場合、JIP-1はLZK、MKK7、JNKの3者と同時に結合できず、LZKのみと結合しているJIP-1やMKK7とのみ結合しているJIP-1、あるいはJNKとのみ結合しているJIP-1などが生じることになり、結果的にシグナル伝達経路は負に調節されると考えられる。今回の実験ではLZK、JNK、JIP-1を強制発現した系を用いたが、JIP-1の細胞内濃度が至適濃度に近いものかどうかは不明であり、実際の生理的条件下ではJIP-1によるLZKからJNKへのシグナル伝達の増強はより強力なものである可能性がある。このように、スカフォールド分子とそのシグナル伝達経路を構成する分子群の細胞内濃度は厳密に制御される必要があるため、LZKやJNK、JIP-1などの量が細胞内でどのように調節されているかという観点での研究が今後重要になるであろう。

第五節 実験方法

1. LZK およびその変異体の哺乳動物発現コンストラクトの構築

His タグを付加した全長 LZK の発現コンストラクトは、pcDNA3.1 ベクターに Xba I、Not I サイトを用いて His タグを N 末端に付加した全長 LZK cDNA を組み込むことで作成した。C 末端側より順次欠失した変異型 LZK の発現コンストラクトは以下に示したような手順で作成した。LZK (1-800) 発現コンストラクトおよび LZK (1-558) 発現コンストラクトは pcDNA His-LZK をそれぞれ Nhe I と Aor51HI あるいは Nhe I と BamHI で消化し、pcDNA ベクターに組み込むことで作成した。LZK (1-431) 発現コンストラクトは、pcDNA His-LZK を鋳型として PCR 法により His タグ以下 LZK の 431 番目の残基までの領域をコードする cDNA 断片を 3' 末端にストップコドンが付加した形で増幅し、これを pcDNA ベクターに組み込むことで作成した。PCR 法に用いたプライマーペアの配列は、5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'(sense primer) および 5'-GATTGGATCCTAT-TCTCTCCATTCAGCCTGAGACT-3' (antisense primer) である。また、ロイシンジッパー領域のみを欠失した変異型 LZK 発現コンストラクトである pcDNA His-LZK ΔZip は、pcDNA His-LZK を鋳型として PCR 法により His タグ以下 LZK の 431 番目の残基までの領域をコードする cDNA 断片を増幅し、これを Nhe I および BamHI で消化した pcDNA His-LZK に挿入することで作成した。PCR 法に用いたプライマーペアの配列は、5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'(sense primer) および 5'-GATTGGATCCCTTCTCTCCATTCAGCCTGAGACT-3'(antisense primer) である。キナーゼドメインとロイシンジッパー領域の両方を欠失した変異型 LZK の発現コンストラクトである pcDNA His-LZK ΔKD Zip は、pcDNA His-LZK ΔZip を作成した際と同一の断片を Nhe I および BamHI で消化した pcDNA His-LZK に挿入することで作成した。EF1α プロモーターにより発現が制御される発現ベクターである pEF をベースとした発現コンストラクトである pEF His-LZK は、His タグを付加した全長 LZK cDNA を pEF ベクターに挿入することで作成した。また、キナーゼ活性をもたない変異型 LZK 発現コンストラクトである pEF His-LZK ΔKD は pEF His-LZK から LZK のキナーゼドメイン前半に相当する 189 番目から 321 番目までのアミノ酸をコードする領域を HapII-Ehe I 断片を除くことで欠失させることで作成した。なお、pEF ベクターは横浜市立大学医学部の大野茂男教授より恵与された。

2. JIP-1 およびその変異体の哺乳動物発現コンストラクトの構築

生後 8 日齢のマウス脳から精製した total RNA より、oligo-dT プライマーによる逆転写を行い、この逆転写反応物を鋳型として PCR 法により JIP-1 全長 cDNA を得た。PCR

法に用いたプライマーペアの配列は、5'-GGTAGATCTAGGCCCCCAGACCCTGCAGA-ACCCACCTCCA-3' (sense primer) および 5'-TTCTCTAGATTACTACTCCAAGTAGATATCTTCTGTAGG-3' (antisense primer) である。Flag タグを付加した全長 JIP-1 発現コンストラクト pEF Flag-JIP-1 は PCR 法により得た JIP-1 全長 cDNA を pEF His ベクターに挿入し、その His タグをコードする領域を Flag タグのものに置き換えることで作成した。JIP-1 の欠失変異体の発現コンストラクトは、以下に示したような手順で作成した。まず、pEF Flag-JIP-1 を鋳型として、JIP-1 の各変異体に相当する領域をコードする cDNA 断片を増幅し、これを pEF Flag ベクターの Xba I および Not I 消化断片に挿入することで作成した。PCR 法に用いたプライマーの配列は、5'-GGTTCTAGAAGGCCCCCAGACCCTGCAGAACCCACCTCCA-3' (sense primer for JIP-1(284-707))、5'-CCGCTCTAGATCCTCAGTGCTGAGTCCTTT-3' (sense primer for JIP-1(465-707) and JIP-1 (465-581))、および 5'-ACATCTAGACTCTGTGC-TGCTATGCAAAGAT-3' (sense primer for JIP-1(582-707))、5'-TTCTCTAGATTACTACTC-CAAGTAGATATCTTCTGTAGG-3' (antisense primer for JIP-1(284-707)、JIP-1(465-707) and JIP-1(465-581))、5'-AATGCGGCCCGCCTAGACATC-ATTGCCCTTGTGATAA-3' (antisense primer for JIP-1 (465-581)) である。また、JIP-1 (1-277) 発現コンストラクトは、pEF Flag-JIP-1 を EcoRI および BglII で消化したものを pEF Flag ベクターに組み込むことで作成した。

3. 試薬、抗体およびプラスミド

キナーゼアッセイの基質として用いた GST-c-Jun (1-79) は Santa Cruz Biotechnologies から、MBP (myelin basic protein) は Upstate Biotechnologies からそれぞれ購入した。Anti-RGSHis 抗体は QIAGEN から、anti-Myc、anti-HA、anti-MEKK1 抗体は Santa Cruz Biotechnologies から、anti-Flag 抗体は Sigma から、anti-phosphorylated JNK 抗体は Promega よりそれぞれ購入した。哺乳動物発現コンストラクト pSR α HA-JNK、pSR α HA-ERK、pSR α Myc-MKK7、pEF MEKK1 Δ N および大腸菌発現コンストラクト pGEX-KN-JNK、pGEX-MKK7 はすべて京都大学大学院理学研究科の西田栄介教授より恵与された^(20, 49, 50)。

4. GST 融合タンパク質の精製

GST-KN-JNK あるいは GST-MKK7 の発現コンストラクトを保持する大腸菌を 5ml の LB 培地で 37°C で一晚培養後、500ml の 2 × YTG 培地に移し OD₆₀₀=0.6 になるまで培養を続けた後 0.4mM の IPTG で 25°C、6 時間目的タンパク質の合成を誘導した。大腸菌を可溶化後、目的タンパク質を glutathione-sepharose 樹脂に結合し、洗浄後 10mM の還元

型 glutathione を含む 50mM Tris/HCl, pH 8.0 で溶出した。溶出したタンパク質は 20mM Tris/HCl, pH 7.5、1mM EGTA、1mM dithiothreitol に対して一晩透析し、定量後 -20°C で保存した。

5. 細胞およびトランスフェクション

COS7 細胞は、10% fetal calf serum を含む DMEM 培地中で培養した。COS7 細胞へのトランスフェクションにはリポフェクトアミン法を用いた。

6. In vitro キナーゼアッセイ

COS7 細胞にプラスミドをトランスフェクション後、24 時間後に細胞を lysis buffer A (20mM Hepes, pH 7.5, 25mM β -glycerophosphate, 150mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$, 2mM EGTA, 50mM sodium fluoride, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM dithiothreitol, 1mM sodium vanadate and 20 μ g/ml aprotinin) で可溶化した。可溶化物を遠心後、上清に含まれる目的タンパク質を抗体と結合した Protein G-sepharose 樹脂を用いて 4°C で 2 時間免疫沈降し、0.05% Tween20 を含む TBS (20mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.9% NaCl) で 3 回、kinase reaction buffer (20mM Tris/HCl, pH 7.5, 25mM β -glycerophosphate and 2mM EGTA) で 1 回洗浄し、これを酵素源とした。ここに、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下で適当な基質 (3 μ g GST-c-Jun (1-79) (JNK アッセイ)、3 μ g MBP (ERK アッセイ)、1.2 μ g GST-MKK7 (LZK アッセイ)) を加え、30°C で 20 分間 in vitro キナーゼ反応を行った。SDS-PAGE sample buffer を加えることで反応を停止し、SDS-PAGE によりタンパク質を泳動後リン酸化されたタンパク質を BAS2000 で解析した。

7. 共免疫沈降法によるタンパク質間の相互作用の検出

COS7 細胞にプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に lysis buffer B (20mM Tris/HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EGTA, 25mM β -glycerophosphate, 50mM sodium fluoride, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1mM sodium vanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 10 μ g/ml leupeptin) で細胞を可溶化した。可溶化物を遠心後、上清に含まれる目的タンパク質を抗体と結合した Protein G-sepharose 樹脂を用いて 4°C で 2 時間免疫沈降し、lysis buffer B で 3 回洗浄した。その後、SDS-PAGE sample buffer を加えることで樹脂に結合したタンパク質を溶出し、SDS-PAGE 後 Western blot により共沈したタンパク質の有無を検討した。

第二章 LZK 分子内の機能性ドメインの解析

LZK の分子内には、セリン/スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの両方の一次構造上の特徴をあわせもったハイブリッド型のキナーゼドメインと、2 個の隣接するロイシンジッパー様モチーフよりなる領域が存在している。これらの構造的特徴は MLK ファミリーに属するプロテインキナーゼに共通にみられるものである。また、LZK は MLK ファミリーに属するキナーゼ分子のなかでも MUK/DLK と特に高い相同性を示し、キナーゼドメインおよびロイシンジッパー様領域でのアミノ酸配列の相同性は 86.4% であった。LZK と MUK/DLK はまたそれぞれの C 末端付近に SSEEVEGEVDSEVE という、14 アミノ酸からなる機能未知の配列を共有していた⁽²⁸⁾。第一章では LZK のキナーゼドメインが JNK/SAPK 経路の活性化や JIP-1 との相互作用に必要であることを明らかにしたが、第二章ではこのキナーゼドメインにつづくロイシンジッパー様領域および 14 アミノ酸よりなる保存配列を含む C 末端領域が LZK によるシグナル伝達において果たす役割について検討した。ロイシンジッパーモチーフは 7 アミノ酸残基ごとにロイシンあるいはイソロイシンやバリンといった疎水性のアミノ酸が配列したモチーフであり、ジッパー内の疎水性アミノ酸どうしが疎水性相互作用をすることでタンパク質間相互作用に重要なはたらきをもつと考えられている。また MAPKKK には二量体/多量体形成が自身の活性化に必須であるものが存在することが知られている^(32,33)。そこでまず LZK がロイシンジッパー様領域を介して二量体あるいは多量体を形成することを確認し、この二量体/多量体形成が LZK の MAPKKK としての機能において果たす役割について検討した。また、現在に至るまでその機能が不明であった 14 アミノ酸よりなる保存配列を含む C 末端領域を欠失した変異型 LZK によるシグナル伝達を解析することで、この C 末端領域の機能を検討した。

第一節 LZK 二量体/多量体形成におけるロイシンジッパー様領域の役割

1. LZK による二量体/多量体形成

LZK 分子内に存在するロイシンジッパー様領域の機能が二量体/多量体形成であると仮定し、まずはじめに LZK が二量体あるいは多量体を形成するかどうか検討した。COS7 細胞に His タグを付加した LZK および HA タグを付加した LZK の両者を発現し、この細胞を可溶化し、anti-His 抗体により His-LZK を免疫沈降した。この免疫沈降物中に含まれる HA-LZK を anti-HA 抗体による Western blot により検出した。その結果、His-LZK に結合することで免疫沈降時に共沈した HA-LZK のバンドが検出された (Fig. 2-1)。また、免疫沈降に用いた抗体と Western blot に用いた抗体を入れ替えた実験でも同様の結果が得られた。以上より、LZK は細胞内で二量体、あるいは多量体を形成していると考えられた。

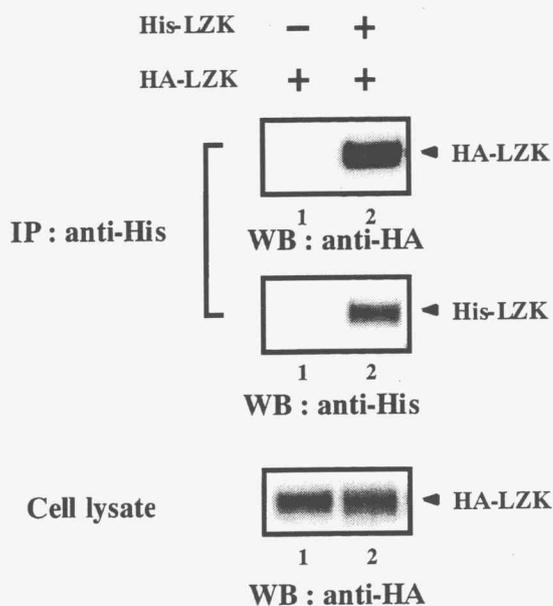
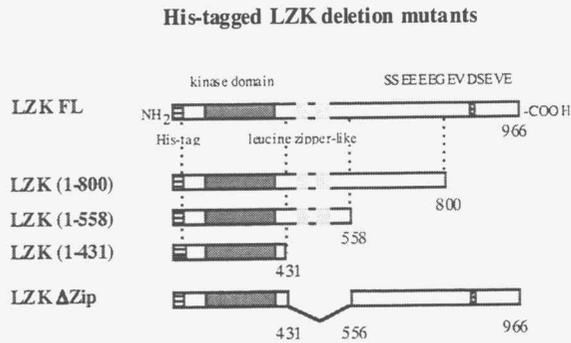


Fig. 2-1 LZK forms dimers/oligomers in cells. HA-LZK was expressed with or without His-LZK in COS7 cells, and His-LZK was immunoprecipitated from each cell lysate. The presence of HA-LZK and His-LZK in the immunoprecipitate was examined by Western blotting with anti-HA or anti-His antibodies, respectively (top and middle). The expression of HA-LZK in cells was examined by Western blotting (bottom).

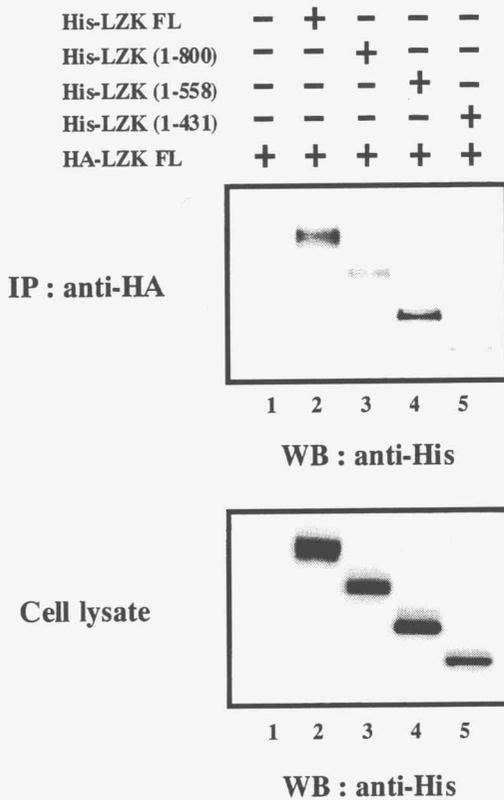
2. 二量体/多量体形成におけるロイシンジッパー様領域の役割

細胞内でLZKが二量体あるいは多量体を形成することが明らかになったので、次にこの二量体/多量体形成においてロイシンジッパー様領域が必要であるかどうか検討するため、第一章で述べた種々の変異型LZKを用いて、これらの変異体が全長LZKとの二量体/多量体形成能を保持しているかどうかを共免疫沈降法により解析した。まず、C末端側から順次欠失した変異型LZKを用いて、全長LZKとの二量体/多量体形成能を検討した。その結果、ロイシンジッパー様領域を含んでいるLZK (1-800) およびLZK (1-558) は全長LZKと効率良く共沈したのに対し、ロイシンジッパー様領域以降をすべて欠失した変異体であるLZK (1-431) では全長LZKとの結合能が非常に低下していた (Fig. 2-2B)。このことから、LZKの二量体/多量体形成にはそのロイシンジッパー様領域が必要であることが示唆された。しかし、LZK (1-431) はロイシンジッパー様領域を含むC末端側を大きく欠失しており、ロイシンジッパー様領域以外にもC末端側の構造がLZKの二量体/多量体形成に必要な可能性が残されていた。そこで次に、このロイシンジッパー様領域のみを欠失し、ロイシンジッパー様領域よりもC末端側は保持している変異体であるLZK Δ Zipを用いて同様に全長LZKとの結合能を検討した。その結果、LZK Δ Zipは全長LZKとの結合能が非常に低下していた (Fig. 2-2C)。これらより、LZKは分子内のロイシンジッパー様領域を介してホモ二量体/多量体を形成することが明らかになった。

A.



B.



C.

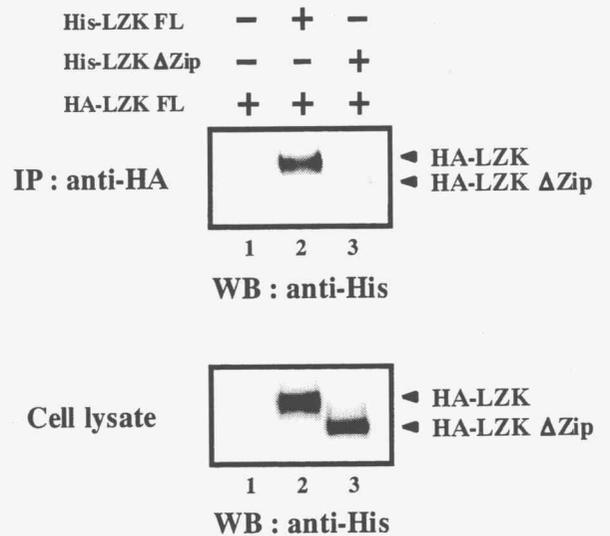


Fig. 2-2 LZK forms dimers/oligomers through its dual leucine zipper-like motif. A, His-tagged LZK and its deletion mutants used in this study are schematically presented. B, Serial C-terminal deletion mutant of LZK was co-expressed with HA-LZK, followed by immunoprecipitation and Western blotting as in Fig. 2-1. C, His-LZK FL or His-LZK ΔZip was co-expressed with HA-LZK, followed by immunoprecipitation and Western blotting as in Fig. 2-1.

第二節 二量体/多量体形成の JNK/SAPK 経路活性化における役割

第一節より、LZK が細胞内でロイシンジッパー領域を介して二量体あるいは多量体を形成していることが明らかになった。これまでに、ASK1 や MLK3 などいくつかの MAPKKK は、二量体形成がその活性化に必須であるという報告がある^(32,33)。二量体形成によるキナーゼ活性化のメカニズムについてはなお不明の点が多いものの、二量体あるいは多量体の形成が、ある種のプロテインキナーゼの活性化における重要なステップであることは間違いない。したがって、LZK においてもその二量体/多量体形成が LZK 自体の活性化に必須である可能性が考えられた。そこで、前節で用いた種々の変異型 LZK が細胞内で JNK を活性化し得るかどうか検討した。

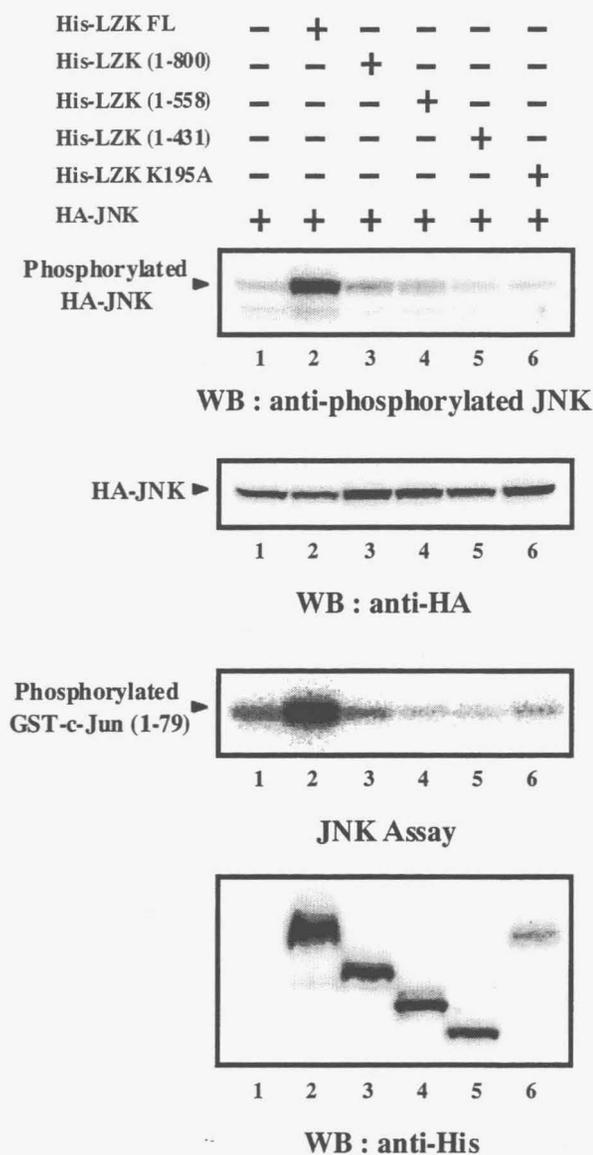
1. C 末端欠失変異型 LZK による JNK 活性化

前節で用いた C 末端欠失変異型 LZK がそれぞれの程度の JNK 活性化能をもっているか検討する目的で、COS7 細胞に各変異型 LZK と JNK を共発現し、細胞を SDS-PAGE sample buffer で可溶化し、電気泳動後に anti-phosphorylated JNK を用いた Western blot を行うことで JNK の活性化の程度を測定した (Fig. 2-3A)。また、この実験と並行して、同様に各変異型 LZK と JNK を共発現した細胞より JNK を免疫沈降し、GST-c-Jun (1-79) を基質とした *in vitro* キナーゼアッセイを行うことで実際の JNK 活性を測定した。この実験条件において、全長 LZK は JNK を強く活性化したが、キナーゼ活性失活型の変異体である LZK K195A (キナーゼ活性に必須の 195 番目のリジン残基をアラニンに置換した変異体) は予想通り JNK 活性化能をもたなかった。このような条件下で、ロイシンジッパー様領域を欠く変異体である LZK (1-431) は JNK を活性化できなかった (Fig. 2-3A, lane 5)。しかしロイシンジッパー様領域を保持している LZK (1-558) や LZK (1-800) においても JNK の活性化が認められなかったことから、LZK による JNK 活性化には LZK 分子内の C 末端側約 160 アミノ酸残基よりなる領域が最低限必要であると考えられた。この領域には前述のように LZK と MUK/DLK の間で保存されている、SSEEEEGEVDSEVE という 14 アミノ酸よりなる配列が存在している。この配列の機能はこれまで不明であったが、第三節で述べるように本研究における一連の実験でこの配列を含む領域のひとつの機能が明らかになった。

2. ロイシンジッパー様領域を欠失した変異型 LZK の JNK 活性化能

上述のように、LZK による JNK 活性化にはその C 末端 160 アミノ酸よりなる領域が必要であることがわかった。そこで、この C 末端領域の影響を受けない条件下で LZK

A.



B.

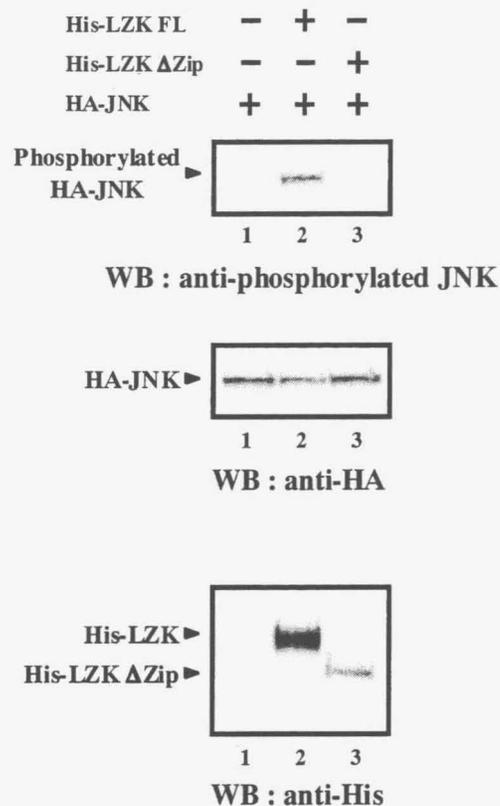


Fig. 2-3 Dual leucine zipper like motif is essential for LZK to activate JNK. A, Serial deletion mutant of LZK was co-expressed with HA-JNK, and at 24 h post-transfection, the cells were lysed by the addition of SDS-PAGE sample buffer, and then the amount of dually phosphorylated JNK was examined by Western blotting with anti-phosphorylated JNK antibodies (top). After the antibodies have been stripped off the membrane, the same membrane was reprobbed with anti-HA antibodies to examine the total amount of overexpressed JNK in each transfection (second from the top). The JNK activity was also measured by in vitro kinase assay with GST-c-Jun (1-79) as a substrate (third from the top). In a parallel experiment, the amount of LZK in each lysate was determined by Western blotting with anti-His antibodies (bottom). The representative results of three independent experiments are shown. B, His-LZK FL or His-LZK ΔZip was co-expressed with HA-JNK in cells, followed by Western blotting as in A.

のロイシンジッパー様領域を介した二量体/多量体形成がJNK活性化において果たす役割を検討するために、ロイシンジッパー領域をのみを欠失し、以降のC末端領域は保持している変異体であるLZK ΔZipのJNK活性化能をanti-phosphorylated JNKによるWestern blotにより解析した (Fig. 2-3B)。その結果、LZK ΔZipはJNK活性化能をもたないことがわかった。このことから、LZKによるJNK活性化には、まずロイシンジッパー様領域を介した二量体/多量体の形成が必須であり、さらにC末端の約160アミノ酸残基の領域も必要であることがわかった。

第三節 LZK分子のC末端領域の機能解析

第二節では、LZKによるJNK活性化には分子内のロイシンジッパー様領域を介した二量体/多量体形成に加えてC末端約160アミノ酸の領域が必要であることを示した。そこで第三節ではこのLZKのC末端領域のJNK活性化における役割を検討した。第一章で述べたように、LZKはJNK/SAPK経路においてMAPKKKとしての機能をもつ。そこで、C末端領域を欠く変異体であるLZK (1-800)がJNK活性化能をもたない原因として、この変異体ではMAPKK活性化能が低下しているという可能性が考えられた。JNK/SAPK経路においては、これまでにMKK7およびSEK1という2種類のMAPKKの存在が知られている。現在までに報告されている結果からはLZK同様MLKファミリーに属するMUK/DLKは主にMKK7を活性化することがわかっている⁽⁴⁰⁾。LZKもまた第一章で述べたようにMKK7を効率よく活性化するが、LZKのSEK1活性化能については不明であった。そこで第三節では、野生型あるいはC末端領域欠失変異型のLZKとSEK1またはMKK7を細胞に共発現し、この細胞より免疫沈降したMAPKKの活性をGST-KN-JNKを基質としたin vitroキナーゼアッセイにより測定することで野生型LZKおよびC末端領域欠失変異体LZK (1-800)のMAPKK活性化能を検討した。同時に、ポジティブコントロールとしてMKK7、SEK1をともに強く活性化することが知られているMEKK1ΔNを用いて、これと比較することでLZKのMKK7、SEK1の活性化能について検討した。その結果、全長LZKはポジティブコントロールであるMEKK1ΔN同様にMKK7、SEK1の両方のMAPKKを活性化した (Fig. 2-4)。しかし、C末端領域欠失変異体であるLZK (1-800)はMKK7を全長LZKと同程度活性化したものの、SEK1の活性化能のみが選択的に著しく低下していた。このことから、14アミノ酸よりなる保存配列を含むLZKのC末端領域はMKK7の活性化には関与しないものの、JNK/SAPKs経路のもうひとつのMAPKKであるSEK1の活性化に必要であることが明らかになった。

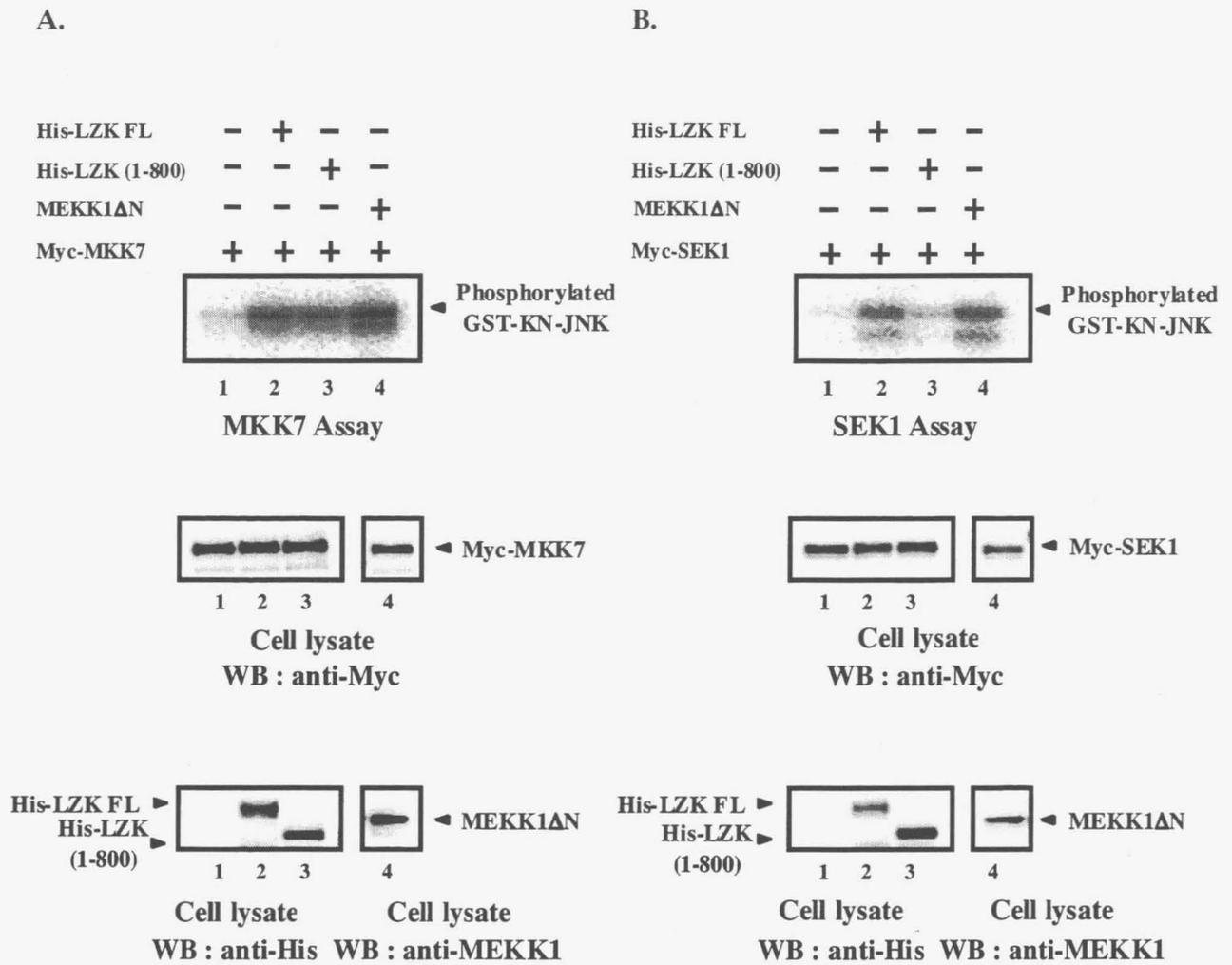


Fig. 2-4 C-terminal region of LZK is indispensable for the activation of SEK1, but not that of MKK7. A, His-tagged LZK FL, LZK (1-800), or MEKK1ΔN was co-expressed with Myc-MKK7. At 24 h post-transfection, the cells were lysed and Myc-MKK7 was immunoprecipitated from the cell lysate, and then the kinase activity of MKK7 was determined by in vitro MAP kinase kinase assay using GST-KN-JNK as a substrate (top). The amounts of overexpressed Myc-MKK7, His-LZKs, and MEKK1ΔN were determined by Western blotting (middle and bottom). B, His-tagged LZK FL, LZK (1-800), or MEKK1ΔN was co-expressed with Myc-SEK1 in cells. SEK1 activity, and the amounts of Myc-SEK1, His-LZKs and MEKK1ΔN were determined as in A.

第四節 考察と総括

第二章においては、LZK 分子内に存在する機能性ドメインについての解析を行った。まず第一節では、LZK のロイシンジッパー様領域の機能について検討し、この領域が LZK の二量体/多量体の形成に必須であることを明らかにした。LZK 同様 MLK ファミリーに属する MUK/DLK は、分子間の S-S 結合により架橋された二量体を形成することが知られている⁽⁵¹⁾。しかし、LZK が S-S 結合を含む二量体を形成しているとの実験結果は得られておらず、また本章における解析では LZK が二量体/多量体のどちらを形成しているのかという点についても不明であり、今後の研究の課題である。最近、LZK が細胞内で MUK/DLK と互いのロイシンジッパー様領域を介して相互作用するという報告があった⁽⁵²⁾。しかし、この相互作用は MUK/DLK がホモ二量体を形成する際と比較して非常に弱いものであり、また LZK が脾臓をはじめ比較的広い臓器分布を示すのに対し MUK/DLK は脳に限局された発現様式を示すことから、生理的条件下では LZK は MUK/DLK とのヘテロ二量体よりもホモ二量体を形成する傾向にあることが予想される。第一章に示したように、LZK は JNK/SAPK 経路の MAPKKK である。これまでに同定されている MAPKKK のうちのいくつかは、活性化に二量体/多量体形成を必要とすることが知られている。たとえば、JNK/SAPK 経路の MAPKKK である ASK1 や MLK3 といった分子は JNK 活性化に二量体形成を必要とするとの報告がある^(32,33)。したがって、LZK による二量体/多量体形成もまた LZK 自身の活性化に必要である可能性が高いと考えられた。そこで第二節では、LZK による二量体/多量体形成がその JNK/SAPK 経路における MAPKKK としての機能に与える影響について検討した。その結果、LZK による JNK 活性化には、ロイシンジッパー様領域および C 末端の 160 アミノ酸残基からなる領域の両方が必要であることがまず明らかになった。そこで次に C 末端領域の影響を無視してロイシンジッパー様領域の役割を検討するために、ロイシンジッパー様領域のみを欠失した変異型 LZK の JNK 活性化能を解析したところ、この変異体は JNK を活性化できなかった。したがって、LZK による JNK/SAPK 経路の活性化には二量体/多量体形成が必須であることが明らかになった。プロテインキナーゼの活性化において二量体形成が必要である理由として、二量体を形成している相手の分子によってリン酸化されることで活性化されるという活性化機構の存在が予想される。プロテインキナーゼの活性化にはキナーゼドメイン内に存在するある特異的な残基がリン酸化されることが必要であることが多いが、二量体形成による活性化機構においては、互いのキナーゼ分子がそれぞれ二量体形成相手のキナーゼ分子の活性化に必要な残基をリン酸化することで相互に活性化すると考えられる。他のプロテインキナーゼとの配列の比較から、LZK においては 316 番目のスレオニン残基のリン

酸化が活性化に重要であると予想される⁽⁵³⁾。現在のところこのスレオニン残基が二量体/多量体形成のパートナーによってリン酸化されるという証拠はないが、この点は今後の研究により明らかにしていくべき課題のひとつであると考えられる。第三節では、LZKのC末端領域の役割について検討した。この領域の機能は現在まで不明であったが、第二節に示したようにC末端領域を欠失した変異型LZKがJNKを活性化することが出来なかったことから、LZKのC末端領域がJNK活性化に必須の領域であることが明らかになった。C末端領域を欠失した変異型LZKのMAPKK活性化能を検討したところ、MKK7活性化能は保持していたにもかかわらずSEK1活性化能が著しく低下していたことから、このC末端領域がJNK/SAPK経路のMAPKKのひとつであるSEK1の活性化に必須であることが明らかになった。このC末端領域内には前述のように14アミノ酸よりなるMUK/DLKとの間で保存されている配列が存在する。また、この配列以外にも比較的良好に保存されたアミノ酸配列がいくつか存在しており、このC末端領域がSEK1活性化に必要なドメインを形成している可能性があるかもしれない。C末端を欠失した変異型LZKはMKK7を活性化するにも関わらずJNKを活性化しなかったが、これは実験に用いた条件の違いが原因であると考えられる。すなわち、Fig. 2-3では内在性のMKK7に依存しているのに対し、Fig. 2-4の実験では強制発現したMKK7の活性を測定している。このMKK7量の相違がこのような異なる実験結果の原

Functional Domains in LZK

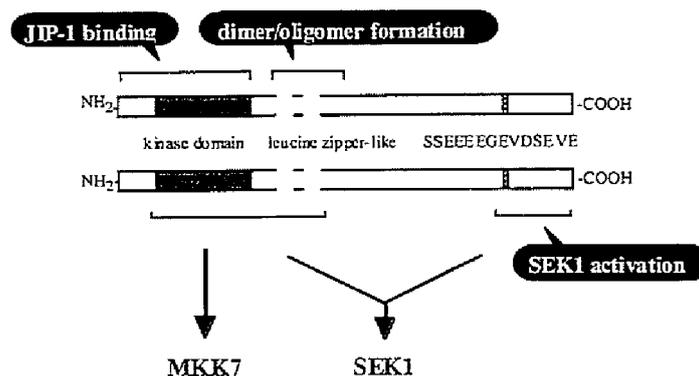


Fig. 2-5 Schematic representation of the functional domains in LZK. The three functional domains in LZK are shown. LZK contains a JIP-1 binding region at its N-terminus, a region for dimer/oligomer formation in the middle, and a region essential for SEK1 activation at its C-terminus.

因であると考えられる。実際、LZK(1-800)はMKK7を同時に発現した場合にはJNKを活性化するという結果も得られている。

以上のように第二章ではLZK分子内に存在する機能性ドメインについて解析を行った結果、Fig. 2-5に示すような各ドメインの役割が明らかになった。LZK分子にはN末端側よりキナーゼドメイン、ロイシンジッパー様領域、C末端SEK1活性化領域が存在する。キナーゼドメインはMAPKKのリン酸化およびスカフォールド分子JIP-1との相互作用に必須である。ロイシンジッパー様領域は二量体/多量体形成に必須であり、この二量体/多量体形成はLZKのMAPKKKとしての機能に必要なものである。C末端領域はMKK7の活性化には関与しないものの、JNK/SAPK経路のもうひとつのMAPKKであるSEK1の活性化に必須である。LZKのMAPKKKとしての機能の発現には以上のような種々の機能性ドメインが協調的にはたらく必要があり、様々な機構により複雑に制御された過程であることが明らかになった。

第五節 実験方法

1. 試薬およびプラスミド

HA エピトープタグを付加したLZKの哺乳動物発現コンストラクトは、pcDNA His-LZKのHisタグをコードする領域をHAタグをコードするDNA断片に置き換えることで作成した。また、LZKの活性に必須である、ATPと結合すると考えられる195番目のリジン残基をアラニンに置換した、活性消失型⁽⁵⁴⁾のLZK変異体発現コンストラクトpcDNA His-LZK (K195A)は部位特異的突然変異を導入し、リジンをコードするAAGコドンのアラニンをコードするGCGに変換することで作成した。部位特異的突然変異の導入にはSTRATAGENEのsite directed mutagenesis kitを用いて行った。突然変異導入を行う際に用いたオリゴDNAの配列は、5'-GAGGTGGCCATCGCGAAAGTGAGA-3'である。なお、変異を導入するための、LZK cDNAの配列とは異なる部位を下線で示した。哺乳動物発現コンストラクトpSR α Myc-SEK1は京都大学大学院理学研究科の西田栄介教授より、大腸菌発現コンストラクトpGEX c-Jun (1-79)は大阪大学大学院医学系研究科附属バイオメディカル教育研究センターの日比正彦助教授よりそれぞれ恵与された。His-LZKおよびその変異体、Myc-MKK7、HA-JNK、MEKK1 Δ Nの哺乳動物発現コンストラクトについては第一章に示したものをを用いた。

2. トランスフェクション、免疫沈降および In vitro MAPKK アッセイ

COS7 細胞は、10% fetal calf serum を含む DMEM 培地中で培養した。COS7 細胞へのトランスフェクションにはリポフェクトアミン法を用いた。トランスフェクション 24 時間後に、細胞を lysis buffer A (20mM HEPES, pH 7.5, 25mM β -glycerophosphate, 150mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$, 2mM EGTA, 50mM sodium fluoride, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM dithiothreitol, 1mM sodium vanadate and 20 μ g/ml aprotinin) で可溶化した。可溶化物を遠心後、上清に含まれる目的タンパク質を抗体と結合した Protein G-sepharose 樹脂を用いて 4°C で 2 時間免疫沈降し、0.05% Tween20 を含む TBS (20mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.9% NaCl) で 3 回、kinase reaction buffer (20mM Tris/HCl, pH 7.5, 25mM β -glycerophosphate and 2mM EGTA) で 1 回洗浄し、これを酵素源とした。ここに、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下で基質として 5 μ g の GST-KN-JNK を加え、30°C で 20 分間 in vitro キナーゼ反応を行った。SDS-PAGE sample buffer を加えることで反応を停止し、SDS-PAGE によりタンパク質を泳動後、リン酸化されたタンパク質を BAS2000 で解析した。

第三章 酵母 two-hybrid 法を用いた LZK 結合因子のクローニングおよび解析

LZK は MAPKKK として細胞内で JNK/SAPK 経路を活性化する。しかし、LZK 自体の活性制御機構はこれまでのところ全く明らかになっていない。JNK/SAPK 経路を活性化する外界刺激には炎症性サイトカインや物理化学的ストレスなどさまざまなものが知られているが、LZK がどのような刺激により活性化されるかという点についても未だ明らかではない。LZK は細胞に強制発現するだけで活性型 MAPKKK として機能するが、JNK/SAPK 経路の活性化はアポトーシスを含めさまざまな細胞運命の決定に関わっており⁽¹⁴⁻¹⁸⁾、生理的条件下では細胞内における LZK 活性のオン/オフの調節が厳密に行われていることが予想される。このことから、細胞内には LZK と結合することで LZK を不活性に保つ阻害タンパク質が存在している可能性が考えられる。実際に、LZK と最も相同性の高いプロテインキナーゼである MUK/DLK には細胞内で結合し、その活性を阻害する MBIP とよばれる分子が存在することが知られている⁽⁵⁵⁾。また、第一章に示したように LZK はスカフォールド分子 JIP-1 と相互作用することで MAPKKK としての活性を正に調節されている。JIP-1 以外のスカフォールド分子を含め、LZK の活性を正に調節する未知の分子が存在する可能性もある。さらに、第一章で LZK が JNK/SAPK 経路の MAPKKK として MAPKK をリン酸化する活性をもつことを明らかにしたが、LZK が MAPKK 以外の分子を基質としてリン酸化することで、その未知の分子の機能制御を行っている可能性もある。このような LZK の活性を正負に制御する機構の解析や、LZK により機能制御を受ける分子を探索することは、LZK の生理的機能を考察する上で非常に重要であると考えられる。そこで第三章では、LZK の活性制御因子や LZK により機能制御を受ける分子を単離する目的で、酵母 two-hybrid 法を用いた LZK 結合因子のクローニングを行い、その結果クローニングされた AOP-1 とよばれる分子について解析を行った。

第一節 酵母 two-hybrid 法による LZK 結合因子のスクリーニング

1. 酵母 two-hybrid 法によるスクリーニング

酵母 two-hybrid 法は、あるタンパク質が直接相互作用する分子を酵母を用いたスクリーニングにより単離するために開発された実験系である⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾。本研究においては LZK と相互作用する分子を単離することを目的としたスクリーニングを行った。まずはじめに酵母の転写因子である GAL4 の DNA 結合領域と、LZK 分子の N 末端からキナーゼドメインおよびロイシンジッパー様領域までを含む領域（アミノ酸残基 1-558 番）と

の融合タンパク質（ベイトタンパク質）を酵母内で発現するコンストラクトを作成し、酵母をトランスフォームした。次に、GAL4の転写活性化領域との融合タンパク質として酵母内で発現する、ヒト膵臓由来 cDNA 発現ライブラリーで、すでにベイトタンパク質を発現している酵母株を二次トランスフォームした。ライブラリーに由来する cDNA がベイトとして用いた LZK(1-558) と相互作用する分子をコードしていた場合には GAL4 の DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインが物理的に接近し、その結果 GAL4 結合配列をもつ転写プロモーターからの転写活性化が起こる。スクリーニングに用いた酵母株は、GAL4 により活性化されるプロモーターの下流にレポーター遺伝子として β -galactosidase 遺伝子およびヒスチジン合成酵素遺伝子 (HIS3) を連結した遺伝子を保持しており、これらの活性を指標としたスクリーニングが可能である。今回の実験では、ヒト膵臓 cDNA ライブラリーに含まれる 2.54×10^6 個のクローンをスクリーニングし、その結果 2 個の陽性クローンを得た。

2. 陽性クローンの解析

スクリーニングの結果得られた陽性クローンにおいて、ライブラリー由来の cDNA の配列を検討するため、目的のプラスミドを保持している酵母の細胞壁を zymolyase 処理によって破壊し、この抽出物を鋳型として PCR 法を用いて cDNA 部分を増幅した。この増幅断片の塩基配列を DNA シークエンサーを用いて検討したところ、2 個の陽性 cDNA クローンはそれぞれ AOP-1 (antioxidant protein-1)⁽³⁴⁾、P8⁽³⁹⁾ とよばれる既知のタンパク質の一部をコードしていることがわかった。これらふたつのうち、AOP-1 とよばれる分子は分子量約 28kDa のタンパク質であり、その一次構造上の特徴から細胞内の過酸化水素を除去する活性をもつ、チオレドキシソルホキシダーゼとよばれる分子群のひとつであると考えられている (Fig. 3-1A)。チオレドキシソルホキシダーゼ分子には、分子内に保存された 2 個のシステイン残基が存在することが知られているが、スクリーニングにより得られた cDNA 断片は AOP-1 の C 末端から 35 アミノ酸残基をコードする領域であり、この領域には前述の 2 個の保存されたシステイン残基のうち C 末端側に存在するシステイン残基が含まれていた。チオレドキシソルホキシダーゼは進化的に高度に保存された分子種であり、細菌から高等動物にいたるまで 50 種以上が存在することが明らかになっている⁽⁶⁰⁾。チオレドキシソルホキシダーゼはチオレドキシソルホキシダーゼ依存性の過酸化還元酵素であり、その生理的機能として細胞内で生じる活性酸素の除去が考えられている。すなわち、主としてミトコンドリアにおける酸化リン酸化反応にともなう副産物として生じる過酸化水素 H_2O_2 を還元除去することで、このような反応性の高い活性酸素種によって細胞を構成するタンパク質、脂質、および核酸が酸化による損傷を受けるのを防止する役割をになっていると考えられている

⁽⁶¹⁾。また、最近過酸化水素が細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとしてはたらく可能性が示唆されている。過酸化水素のこのような機能は、TNF α 、IL-1、TGF β 、EGF、PDGF など各種サイトカイン/増殖因子による刺激により、細胞内で過酸化水素の産生が誘導される⁽³⁵⁻³⁸⁾ことや、このようにして産生される過酸化水素を抗酸化剤やチオレドキシニペルオキシダーゼにより強制的に除去すると JNK や転写因子 NF- κ B の活性化といった応答が阻害される⁽⁶²⁻⁶⁴⁾ことなどから想定されている。これらの事実から、AOP-1 が LZK と相互作用することで活性酸素刺激と JNK/SAPK 経路のクロストークが制御されている可能性も考えられる。そこで、以降の実験では LZK と AOP-1 の相互作用の解析を中心に検討をすすめた。

第二節 LZK 結合因子 AOP-1 と LZK の相互作用の解析

前節で述べたように、酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングで得られた陽性クローンの cDNA のひとつがチオレドキシニペルオキシダーゼの一つである AOP-1 をコードしていた (Fig. 3-1A)。酵母 two-hybrid 法による相互作用の検討は、実際には LZK、AOP-1 のどちらも分子の一部を GAL4 の一部との融合タンパク質として発現させたものであり、また酵母の核内という実際に LZK や AOP-1 が存在している生理的な環境とは異なる条件下で行ったものである。したがって、生理的条件下でこれら 2 つの分子が相互作用することを証明するためには、哺乳動物細胞に発現したこれらの分子が実際に細胞内で相互作用し得ることを証明しなければならない。そこで、AOP-1 の哺乳動物発現コンストラクトを作成し、これを用いて COS7 細胞内での LZK と AOP-1 の相互作用を共免疫沈降法により解析した。また、酵母 two-hybrid 法により得たクローンが AOP-1 の C 末端側のみを含んでいたことから、LZK は AOP-1 の C 末端領域を認識して相互作用することが予想された。この領域のアミノ酸配列はチオレドキシニペルオキシダーゼ分子群中で比較的良好に保存されており⁽⁶⁵⁾、AOP-1 以外のチオレドキシニペルオキシダーゼが LZK と相互作用する可能性が考えられた。そこで、AOP-1 と類似した構造をもち、過酸化水素による NF- κ B の活性化を負に調節するという報告のある AOE (antioxidant enzyme) 372⁽⁶⁶⁾とよばれる分子についても AOP-1 同様に LZK との相互作用の解析を行った。さらに、前述のように AOP-1 は細胞内で過酸化水素を除去する機能をもつと考えられていることから、AOP-1 が過酸化水素をセカンドメッセンジャーとした刺激と LZK によるシグナル伝達を結びつける鍵となる分子である可能性が考えられる。そこで、LZK と AOP-1 の相互作用に対する過酸化水素刺激の影響を検討した。

A.

```

ATGGCGGCTGCTGTAGGACGGTTGCTCCGAGCGTCGGTTGCCCGACATGTGAGTGCCATT
M A A A V G R L L R A S V A R H V S A I
CCTTGGGGCATTCTGCCACTGCAGCCCTCAGGCCTGCTGCATGTGAAGAACGAGCTTG
P W G I S A T A A L R P A A C G R T S L
ACAAATTTATGTGTTCTGGTCCAGTCAAGCAAATATTTCAGCACCCAGTTCCTCATGC
T N L L C S G S S Q A K L F S T S S S C
CATGCACCTGCTGTACCCAGCATGCACCCATTTTAAGGGTACAGCCGTTGTCAATGGA
H A P A V T Q H A P Y F K G T A V V N G
GAGTTCAAAGACCTAAGCCTTGATGACTTTAAGGGGAAATATTTGGTGCTTTTCTTCTAT
E F K D L S L D D F K G K Y L V L F F Y
CCTTTGGATTTCACCTTTGTGT*CTCTACAGAAATGTTGCTTTTAGTGACAAAGCTAAC
P L D F T F V C P T E I V A F S D K A N
GAATTCACGATGTGAAGTGTGAAGTGTGCGAGTCTCAGTGGATTCCCACTTTAGCCAT
E F H D V N C E V V A V S V D S H F S H
CTTGCCTGGATAAATACACCAAGAAAGAAATGGTGGTTGGGCCACATGAACATCGCACTC
L A W I N T P R K N G G L G H M N I A L
TTGTCAGACTTAACTAAGCAGATTTCCCAGACTACGGTGTGCTGTTAGAAGTTCTGGT
L S D L T K Q I S R D Y G V L L E G S G
CTTGCCTAAGAGTCTCTTCATAATTGACCCCAATGGAGTCATCAAGCATTGAGCGTC
L A L R G L F I I D P N G V I K H L S V
AACGATCTCCAGTGGGCCGAAGCGTGAAGAAACCTCCGCTTGGTGAAGCGTTCCAG
N D L P V G R S V E E T L R L V K A F Q
TATGTAGAAACACATGGAGAAGTCTGCCAGCGAACTGGACACCGGATTCTCTACGATC
Y V E T H G E V C P A N W T P D S P T I
AAGCCAAAGTCCAGCTGCTTCCAAAGAGTACTTTTCAGAAGGTAAATCAGTAG
K P S P A A S K E Y F Q K V N Q *

```

B.

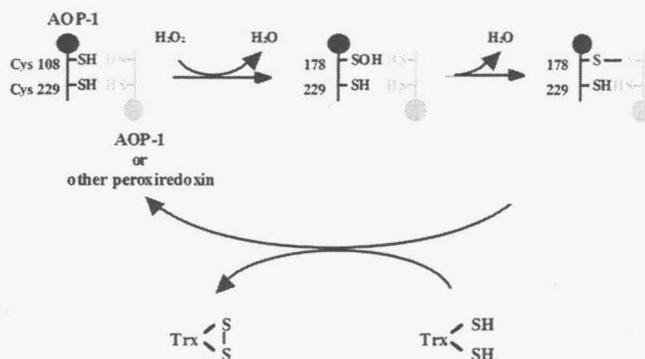


Fig. 3-1 cDNA sequence, deduced amino acid sequence, and mechanism of action of AOP-1.

A, cDNA and deduced amino acid sequences of AOP-1. The two most highly conserved blocks among thioredoxin-dependent peroxidases are shaded. The two invariant cysteine residues are marked by the asterisks. Arrow indicates the junction of the cDNA and GAL4 AD sequence in the plasmid obtained by the two-hybrid screening. B, The likely mechanism by which thioredoxin-dependent peroxidase AOP-1 reduces H₂O₂. H₂O₂ induces formation of transient intermolecular disulfide linkage between AOP-1 and dimerizing partner. Thioredoxin immediately reduces this disulfide linkage.

1. AOP-1 および AOE372 と LZK の相互作用の解析

LZK が実際に哺乳動物細胞内という生理的環境下で AOP-1 あるいは類似した分子である AOE372 と相互作用し得るかどうかを、免疫沈降時における共沈を指標に解析した。まずヒト膵臓 total RNA より RT-PCR 法により AOP-1 および AOE372 それぞれの全長 cDNA を増幅した。これらの cDNA を pEF Flag ベクターに組み込むことで、AOP-1、AOE372 をそれぞれ N 末端に Flag タグを付加した形で発現するためのコンストラクトを構築した。これらの発現コンストラクトを用いて、COS7 細胞に His-LZK と Flag-AOP-1 あるいは Flag-AOE372 を共発現し、この細胞を可溶化後 anti-His 抗体を用いて LZK を免疫沈降した。この免疫沈降物を電気泳動後 anti-Flag 抗体による Western blot を

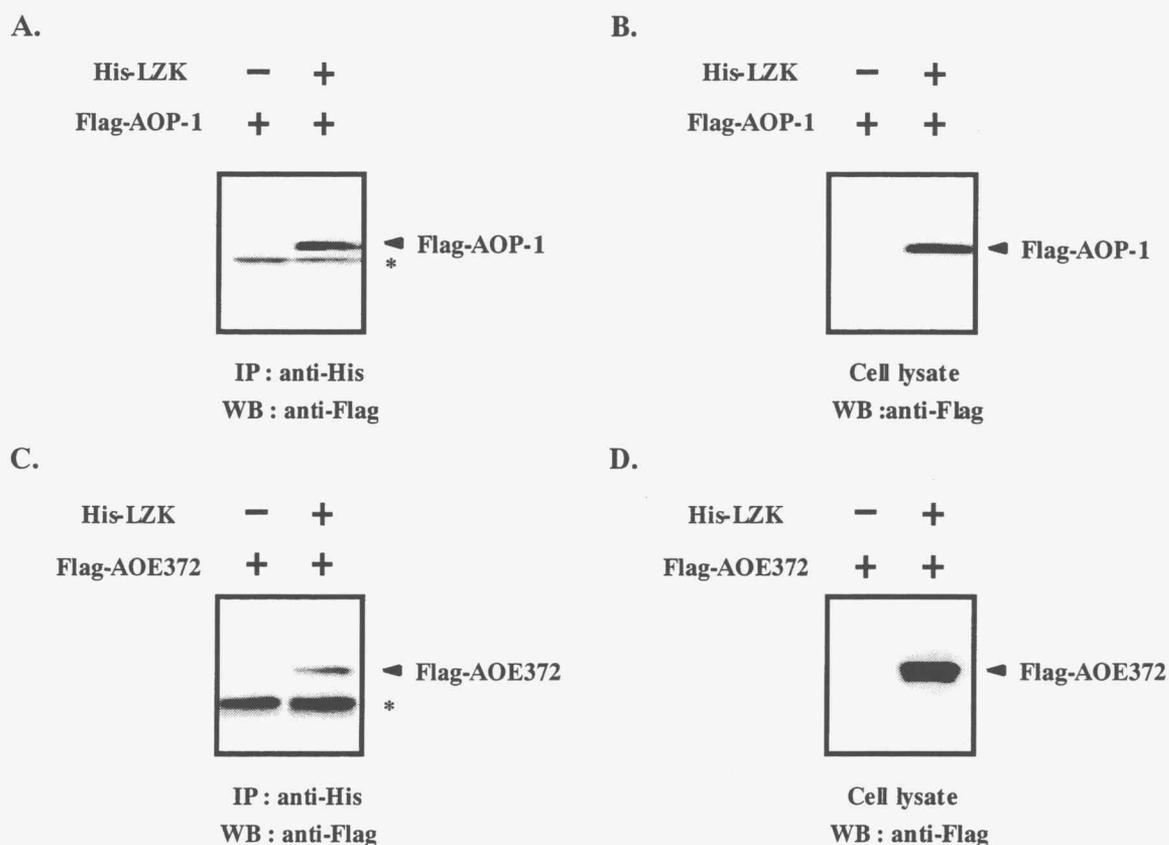


Fig. 3-2 AOP-1 and AOE-372 associates with LZK in cells. A, His-tagged LZK and Flag-tagged AOP-1 were co-expressed in COS7 cells. At 24 h post-transfection, the cells were lysed in lysis buffer. The LZK protein was immunoprecipitated from cell lysate using anti-His antibodies and protein G-Sepharose beads. The presence of Flag-AOP-1 in the LZK immunoprecipitates was examined by Western blotting with anti-Flag antibodies. Asterisk indicates the immunoglobulin light chain used in immunoprecipitation. B, The presence of Flag-AOP-1 in cell lysates was examined by Western blotting with anti-Flag antibodies. C and D, COS7 cells were co-transfected with His-LZK and Flag-AOE372 and processed as in A and B, respectively.

行い、免疫沈降物中に含まれる LZK と共沈した AOP-1 および AOE372 を検出した。Fig. 3-2 に示すように、AOP-1、AOE372 はともに LZK と共沈することが明らかになった。すなわち、AOP-1 および AOE372 はどちらも細胞内で LZK と相互作用することが明らかになった。AOP-1 と AOE372 を比較すると、AOP-1 の方が発現量が少ないにも関わらず LZK との共沈量が多く、LZK は AOP-1 とより高い効率で相互作用すると考えられた。

2. LZK と AOP-1 の相互作用に必要な領域の検討

LZK と AOP-1 の相互作用に必要な領域を検討するため、LZK およびその変異体と AOP-1 との結合能を先の実験と同様に免疫沈降時の共沈を指標として検討した。酵母 two-hybrid 法で用いたベイトには LZK の N 末端からロイシンジッパーの C 末端側までが含まれている。そこでこの領域に含まれる機能性ドメインとして、キナーゼドメインおよびロイシンジッパー様領域に着目し、これらのドメインを欠失した変異型 LZK

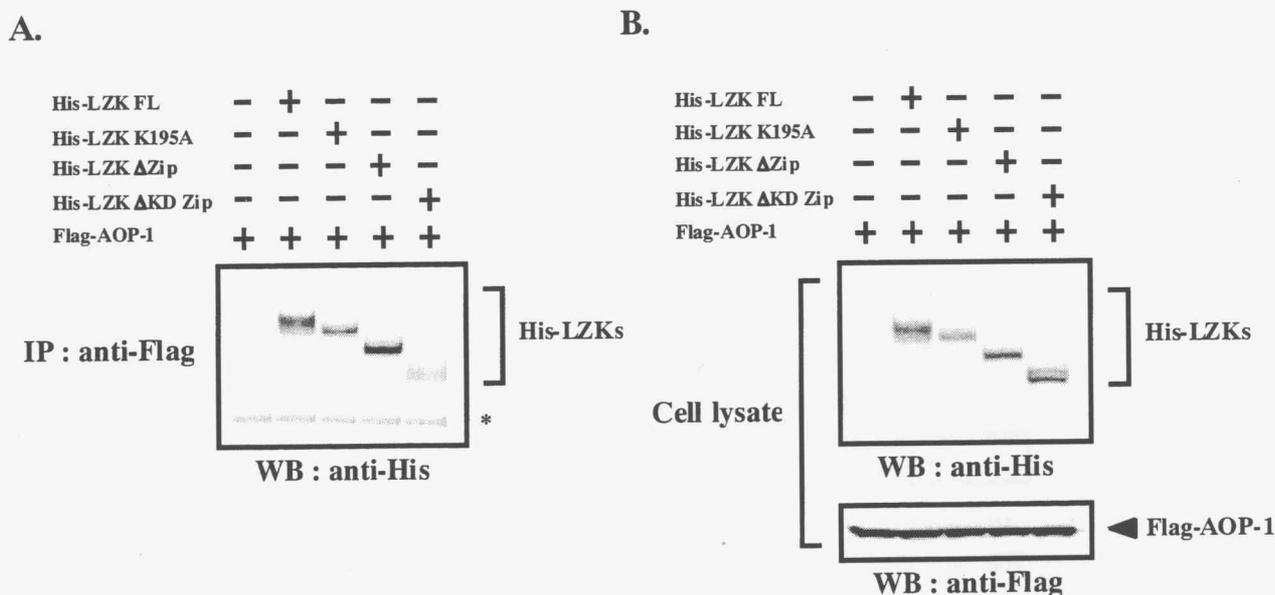


Fig. 3-3 The leucine zipper-like motif and kinase activity of LZK is not required for the association with AOP-1. A, His-tagged LZK or its deletion mutant and Flag-AOP-1 were co-expressed in COS7 cells. At 24 h post-transfection, the cells were lysed in lysis buffer. The AOP-1 protein was immunoprecipitated from each cell lysate using anti-Flag antibodies and protein G-Sepharose beads. The presence of His-LZK in the AOP-1 immunoprecipitates was examined by Western blotting with anti-His antibodies. B, The presence of His-LZK or its mutant and Flag-AOP-1 in each cell lysate was examined by Western blotting with anti-His or anti-Flag antibodies.

と AOP-1 の相互作用を検討した (Fig. 3-3)。また同時に、LZK と AOP-1 の相互作用に LZK のキナーゼ活性が必要であるかどうか検討するため、LZK のキナーゼ活性消失型の変異体である LZK K195A について AOP-1 との相互作用を検討した。その結果、ロイシンジッパー様領域を欠失した LZK Δ Zip は全長 LZK 同様強い AOP-1 結合能を示したのに対し、キナーゼドメインとロイシンジッパー様領域の両方を欠失した変異体である LZK Δ KD Zip は AOP-1 結合能を有するもののやや低下していた。このことから、AOP-1 は LZK のキナーゼドメイン周辺、あるいはキナーゼドメインよりもさらに N 末端側の構造を認識している可能性が高いと考えられた。また、キナーゼ活性消失型変異体 LZK K195A は全長 LZK 同様の AOP-1 結合能を示し、LZK と AOP-1 の相互作用には LZK のキナーゼ活性は必要ではないことが明らかになった。

3. LZK と AOP-1 の相互作用に対する過酸化水素の影響

前述のように、AOP-1 は細胞内で過酸化水素を除去するはたらきを担っていると考えられている。また、最近いくつかの細胞株や初代培養細胞において、細胞内で産生される微量の過酸化水素が JNK/SAPK 経路の活性化や転写因子 NF- κ B の活性化においてセカンドメッセンジャーとして機能していることが明らかになりつつある⁽³⁵⁻³⁸⁾。このことから、AOP-1 や AOE372 といったチオレドキシニペルオキシダーゼ分子群が過酸化水素のセカンドメッセンジャーとしてのはたらきを阻害するという可能性が考えられる。これを支持する結果として、実際に AOE372 が過酸化水素による NF- κ B の活性化を抑制するという報告がなされている⁽⁶⁶⁾。また少なくともある種の細胞においては、TNF α や IL-1 といった炎症性サイトカインによる JNK/SAPK 経路の活性化が N-acetyl-L-cysteine などの活性酸素除去剤により阻害されるという結果も報告されている⁽⁶²⁾。このような事実と、LZK が JNK/SAPK 経路の MAPKKK であることを考えあわせると、セカンドメッセンジャーとしての過酸化水素により AOP-1 や AOE372 を介して LZK の機能が制御されることで JNK/SAPK 経路の活性が調節されている可能性や、逆に LZK が相互作用を介してこれらのチオレドキシニペルオキシダーゼの活性を調節している可能性が考えられる。そこでまず、LZK と AOP-1 の相互作用に対する過酸化水素刺激の影響について検討した。293 細胞に LZK、AOP-1 の両者を発現し、トランスフェクション 24 時間後に細胞を 1mM の過酸化水素で一定時間刺激した。その後細胞を可溶化し、抽出物より AOP-1 を免疫沈降し、この免疫沈降物中に存在する AOP-1 と共沈した LZK の量を Western blot により解析した。その結果、刺激後 2.5 分から 5 分をピークとした、一過性の共沈の増強が認められた (Fig. 3-4)。このことは、過酸化水素刺激により AOP-1 と LZK の相互作用が一過性に増強されることを意味している。この結果から、

過酸化水素の刺激に応答してLZK、AOP-1が互いになんらかの活性制御を行っている可能性が考えられた。そこで次に、AOP-1がLZKによるJNK/SAPK経路の活性化能にあたえる影響について検討した。COS7細胞にAOP-1存在下および非存在下でLZKとJNKを発現し、細胞を可溶化後Western blotにより活性化されたJNK量を検討した(Fig. 3-5)。その結果、過酸化水素刺激を行わない条件下においてはAOP-1はLZKのJNK活性化能に影響を与えないことが明らかになった。すなわち、少なくとも無刺激状態においてはAOP-1はLZKと相互作用するものの、その活性には影響を与えないことが明らかになった。

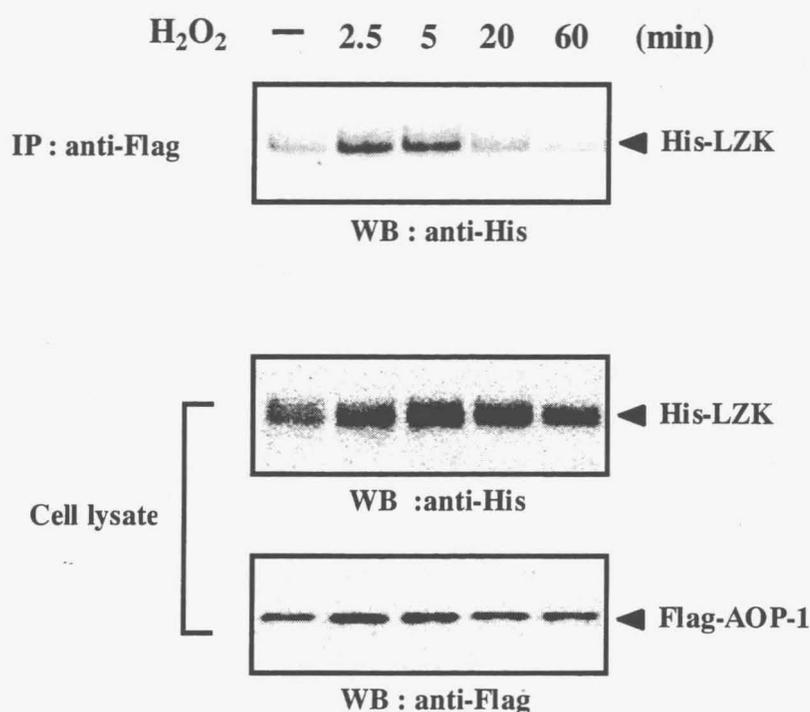


Fig. 3-4 Enhancement of association between LZK and AOP-1 by H₂O₂ treatment. His-LZK and Flag-AOP-1 were co-expressed in 293 cells. At 24 h post-transfection, the cells were treated with 1mM H₂O₂ for various times, and then lysed in lysis buffer. AOP-1 protein was immunoprecipitated from cell lysate using anti-Flag antibodies and protein G-Sepharose beads. The presence of His-LZK in the AOP-1 immunoprecipitates was examined by Western blotting with anti-His antibodies (top). The quantity of His-LZK and Flag-AOP-1 in each cell lysate was determined by Western blotting using anti-His and anti-Flag antibodies, respectively.

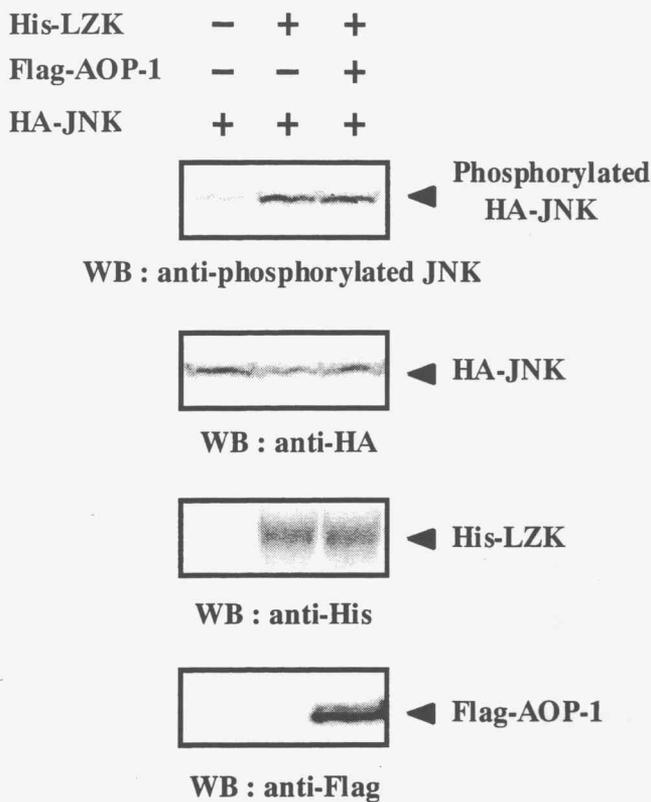


Fig. 3-5 Co-expression of AOP-1 has no effect on LZK-induced JNK activation. His-LZK and HA-JNK were co-expressed with or without Flag-AOP-1. At 24 h post-transfection, the cells were lysed by the addition of SDS-PAGE sample buffer, and then the amount of dually phosphorylated JNK was examined by Western blotting with anti-phosphorylated JNK antibodies (top). To examine the total amount of overexpressed JNK in each transfection, the same samples were examined by Western blotting with anti-HA antibodies (second from the top). In a parallel experiment, the amount of LZK and AOP-1 in each lysate was determined by Western blotting with anti-His and anti-Flag antibodies, respectively (third from the top and bottom).

第三節 考察と総括

第三章では、まず第一節でLZKによるシグナル伝達に関与する、上流、下流、またはスカフォールド分子といったシグナル伝達制御因子を単離する目的で、LZKと相互作用する分子を酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングした。その結果、2個の陽性クローンを得たが、このうちのひとつはAOP-1とよばれる既知の分子のcDNAの一部をコードしていた。AOP-1は分子内にチオレドキシニペルオキシダーゼ分子に保存されている2個のシステイン残基を有し、細胞内に生じた過酸化水素を還元除去するはたらきをもつと考えられている分子である。酵母 two-hybrid 法により得られたクローンはAOP-1コーディング配列のうちC末端から35アミノ酸残基をコードする部分のみを含んでいた (Fig. 3-1A)。このことから、LZKはAOP-1のC末端付近の配列を認識して相互作用すると考えられた。また、このLZKと相互作用する領域には、チオレドキシニペルオキシダーゼ分子群で保存されている2個のシステイン残基のうち、よりC末端側に位置するものを含んでいた。チオレドキシニペルオキシダーゼは細胞内で主に分子間でホモあるいはヘテロ二量体として存在していると考えられている⁽⁶⁶⁾。一般的にチオレドキシニペルオキシダーゼによる過酸化水素の還元除去の際には、2個の保存され

ているシステインのうち、まずN末端側のシステインが過酸化水素により直接酸化され、次にこの酸化により形成された-SOH基がただちに二量体に含まれるもうひとつのペルオキシダーゼ分子のC末端側のシステインのチオール基と反応し、二量体を形成しているふたつの分子が一時的に分子間S-S結合により架橋される (Fig. 3-1B)。その後、この分子間S-S結合はチオレドキシンにより還元され、結果的に過酸化水素の還元除去と酸化型チオレドキシンの生成が起こる⁽⁶⁷⁾。このような反応メカニズムを考慮すると、LZKにより認識されるAOP-1分子内のC末端側の保存されたシステイン残基がLZKとの相互作用によってマスクされることでAOP-1二量体の分子間S-S結合の生成が阻害され、結果的にLZKとの相互作用がAOP-1のペルオキシダーゼ活性に対して負の調節機構となる可能性がある。

次に第二節では、培養細胞を用いて、生理的条件下で実際にAOP-1あるいはAOP-1に類似した分子であるAOE372がLZKと相互作用し得るかどうか検討した。COS7細胞を用いた共免疫沈降法による解析の結果、AOP-1、AOE372ともに細胞内でもLZKと相互作用することが明らかになった。さらにLZKとAOP-1の相互作用に必要なLZK分子内の領域を検討した結果、ロイシンジッパー様領域を欠失した変異体ではAOP-1結合能は全長LZKと同様であったのに対し、キナーゼドメインとロイシンジッパー様領域の両方を欠失した変異体でAOP-1結合能が低下していたことから、AOP-1との結合にはLZKのキナーゼドメイン周辺あるいはキナーゼドメインよりもN末端側の構造が重要であると考えられた。

AOP-1を含む哺乳動物のチオレドキシンペルオキシダーゼ分子群は、別名peroxiredoxin (Prx) ファミリーとよばれ、抗体との反応性やタンパク質の一次構造によりPrxIからPrxIVまでの4つのサブファミリーに分類されている⁽⁶⁴⁾。PrxIおよびPrxIIは主に細胞質に存在するが、PrxIIIはミトコンドリアに、PrxIVは細胞外に分泌されるタンパク質であることが報告されている^(64, 65, 68)。AOP-1はこのうちPrxIIIに属し、実際にAOP-1のウシホモログであるSP22タンパク質が細胞内でミトコンドリアに局在していることがわかっている⁽⁶⁸⁾。LZKは細胞に発現すると主に細胞質に存在するが、充分量のAOP-1存在下や過酸化水素刺激に対する応答として、AOP-1との相互作用によりLZKの細胞内局在が影響を受ける可能性がある。また、AOP-1同様LZKと相互作用することを示したAOE372は、PrxIVに属し、細胞外に分泌されるという報告がある⁽⁶⁵⁾。分泌タンパク質は細胞内では小胞体に多く存在することが知られており、実際にAOE372が小胞体に局在しているという実験結果も報告されている。しかし、本研究で用いた実験条件では、AOE372のN末端にFlagタグが付加されており、このFlagタグに対する抗体を用いてAOE372タンパク質を検出したため、分泌のためのシグナル配列が切断された、成熟した分泌型タンパク質は検出されていない可能性がある。LZKとAOE372の細胞内での局在についても今後の検討が必要であるだろう。

さらに、AOP-1が細胞内で産生した過酸化水素を除去するはたらきを担っていると考えられること、またJNK/SAPK経路が過酸化水素により活性化されるという報告が数多くなされていることから、LZKとAOP-1が相互作用を介して互いに活性調節を行っている可能性が考えられた。293細胞に発現したLZKとAOP-1の相互作用に対する過酸化水素刺激の影響を検討したところ、過酸化水素による刺激後2.5分から5分をピークとした相互作用の増強が認められた。先にも述べたように、AOP-1分子内におけるLZKにより認識される領域はチオレドキシニペルオキシダーゼ分子群で保存されている2個のシステイン残基のうちC末端側に存在するシステインを含んでいた。このシステイン残基のチオール基は過酸化水素の還元除去を触媒する際にペルオキシダーゼ二量体のパートナー分子のN末端側のシステインのチオール基との間で一時的に分子間S-S結合を形成することが知られている。先述のように、LZKとの相互作用によってこのシステイン残基がマスクされることでAOP-1活性が阻害される可能性があるが、これとは別の可能性として、過酸化水素刺激によりみられるLZKとAOP-1との相互作用の一過性の増強は、LZKとAOP-1との間に一時的に分子間S-S結合が形成され、次にこれがチオレドキシニにより還元されるという現象を観察している可能性も考えられる。以上のように、AOP-1を介してLZKによるJNK/SAPK経路の活性化と活性酸素のシグナル伝達経路がクロストークしていることが予想された。そこで、LZKによるJNK/SAPK経路活性化に対するAOP-1の影響を検討したところ、少なくとも無刺激状態ではAOP-1はLZKによるJNK活性化能に影響をもたなかった。このことから、少なくとも定常状態の相互作用ではAOP-1はLZKの活性に影響しないと考えられた。しかし、過酸化水素により刺激を受けた状態でAOP-1がLZKの活性になんらかの影響をもつ可能性も考えられ、また逆にAOP-1による過酸化水素の還元除去活性に対してLZKが制御因子としてはたらいっている可能性も考えられる。LZK同様に新規MAPK経路を活性化するMAPKKKであるASK1は、細胞内でチオレドキシニと相互作用することが知られている⁽⁶⁹⁾。還元型のチオレドキシニはASK1に対する活性阻害因子として機能するが、活性酸素の刺激によりチオレドキシニが酸化型に変換されるとASK1とチオレドキシニの結合が解離し、その結果ASK1が二量体/多量体を形成し活性化されることが知られている^(32,70)。第二章に示したように、LZKもまた活性化に二量体/多量体の形成を必要とする。またAOP-1を含めたチオレドキシニペルオキシダーゼが過酸化水素を還元除去する際にはチオレドキシニの酸化が起こる。このような事実から、ASK1活性化と密接に関連した機構によりLZKの活性が制御されている可能性が考えられる。LZKの生理的機能を明らかにするためには、このような活性酸素を介したJNK/SAPK経路の活性化における役割という観点からの解析がさらに必要であるだろう。

第四節 実験方法

1. 酵母 two-hybrid 法に用いたベイトコンストラクトの構築

LZK 分子を GAL4 の DNA 結合領域との融合タンパク質として酵母細胞内で発現するコンストラクトを作成するため、まず pEF His-LZK を鋳型として PCR を行い、LZK の N 末端から 558 番目のアミノ酸残基までをコードする cDNA 断片を得た。PCR に用いたプライマーの配列は、5'-GTTGAATTCATGGCCAACTTTCAGGAGCACCC-3' (sense primer) および 5'-ACAGGATCCTTACCCTTCTGATCTCAACAAGTCTG-3' (antisense primer) である。この cDNA 断片を酵母 GAL4 DNA 結合領域融合タンパク質発現ベクターである pAS2-1 の EcoRI、BamHI サイトに組み込むことでベイトコンストラクトを構築した。なお、このベイトコンストラクトは選択マーカーとして Trp 合成酵素遺伝子 (TRP1) を保持しており、Trp を欠くプレート上で培養することによりトランスフォームした酵母を選択した。

2. 酵母 two-hybrid 法による LZK 結合因子のスクリーニング

まず、酵母株 Y190 をベイトコンストラクトによりトランスフォームし、SD/-Trp プレート上で培養することでベイトプラスミドを保持している酵母を得た。次に、レポーター遺伝子として用いる β -galactosidase がベイトの発現により非特異的に誘導されないことを β -galactosidase アッセイにより確認した後、トランスフォームした酵母の核抽出物を調製し、電気泳動後 anti-GAL4 BD 抗体 (Santa Cruz) による Western Blot を行うことで酵母の核内にベイトタンパク質が発現していることを確認した。このようにして取得した酵母株を、GAL4 転写活性化ドメインとの融合タンパク質として発現する、ヒト膵臓由来の cDNA ライブラリー (CLONTECH) で二次トランスフォーメーションした。このライブラリープラスミドは選択マーカーとして Leu 合成酵素遺伝子 (LEU2) を保持しており、SD/-His/-Leu/-Trp プレート上で酵母を培養することでベイト、ライブラリー両方のコンストラクトを保持しており、なおかつベイトとライブラリー由来のタンパク質が酵母核内で相互作用することでレポーター遺伝子の His 合成酵素 (His3p) が発現誘導されるクローンを得た。なお、実際のスクリーニング時には非特異的に低レベルで発現する His3p の活性を阻害する目的で、His3p の競合的阻害剤である 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) を 15mM 含むプレート上で酵母を培養した。このようにして得られた陽性クローン候補を回収し、 β -galactosidase アッセイを行うことで偽陽性クローンを除き、陽性クローンを得た。

3. 陽性クローンの解析

陽性クローン酵母を培養プレート上より回収し、2.5mg/ml zymolyase 溶液で 37°C で 5 分間処理した後氷上で急冷し、これを鋳型として KOD Dash DNA polymerase (TOYOBO) を用いた direct PCR 法により陽性クローンが保持しているライブラリー由来のプラスミドによりコードされている cDNA 断片を増幅した。なお、PCR に用いたプライマーの塩基配列は 5'-ATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3' (sense primer) および 5'-CTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3' (antisense primer) である。このようにして得た cDNA 断片の塩基配列を決定した。

4. AOP-1 および AOE372 の哺乳動物発現コンストラクトの作成

AOP-1 および AOE372 の cDNA 配列をデータベースより検索し、これに基づいて全長 cDNA を増幅するためのプライマーペアを設計し、ヒト臍臓 total RNA (Promega) より RT-PCR 法により AOP-1、AOE372 それぞれの全長 cDNA 断片を得た。これらの断片を pEF Flag ベクターに組み込むことで Flag タグを N 末端に付加した状態で発現する AOP-1、AOE372 の哺乳動物発現コンストラクトを作成した。PCR に用いたプライマーの塩基配列は、5'-CCCTCTAGAATGGCGGCTGCTGTAGGACG-3' (sense primer for AOP-1)、5'-CCCGGATCCCTACTGATTTACCTTCTGAAAGTAC-3' (antisense primer for AOP-1)、5'-CCCTCTAGAATGGAGGCGCTGCCGCT-3' (sense primer for AOE372)、5'-CCCGGATCCTCAATTCAGTTTATCGAAATACT-3' (antisense primer for AOE372) である。

5. 細胞、トランスフェクション、および過酸化水素による刺激

293 細胞は、10% fetal calf serum を含む DMEM 培地中で培養した。トランスフェクションにはリポフェクトアミン法を用いた。過酸化水素による刺激は、トランスフェクション 24 時間後に培地を交換し、同時に 1mM の過酸化水素を培地中に添加した。

6. AOP-1 による LZK の JNK 活性化能に対する影響の検討

COS7 細胞に AOP-1 存在下あるいは非存在下で LZK と JNK を共発現し、トランスフェクション 24 時間後に SDS-PAGE sample buffer で細胞を可溶化し、電気泳動後 anti-phosphorylated JNK 抗体による Western blot を行い、活性化 JNK の量を測定した。また同時に anti-HA、anti-His、および anti-Flag 抗体を用いた Western blot を行い、JNK、LZK および AOP-1 の発現量をそれぞれ確認した。

結論

1. LZK が JNK/SAPK 経路の MAPKK である MKK7 をリン酸化することで活性化する、JNK/SAPK 経路に特異的な MAPKKK であることを明らかにした。
2. LZK はキナーゼドメインを介して JNK/SAPK 経路のスcaffold 分子 JIP-1 の PTB ドメインと相互作用し、この相互作用により LZK から JNK に至るシグナル伝達が増強されることを明らかにした。
3. LZK は分子内のロイシンジッパー様領域を介して細胞内で二量体あるいは多量体を形成することを明らかにした。
4. LZK の二量体/多量体形成は JNK/SAPK 経路の活性化に必須であることを明らかにした。
5. LZK の C 末端領域は MKK7 の活性化には関与しないが、SEK1 の活性化に必要であることを明らかにした。
6. 酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングの結果、LZK と相互作用する分子としてチオレドキシニペルオキシダーゼのひとつである AOP-1 とよばれる分子を単離した。
7. LZK と AOP-1 あるいは AOP-1 と類似した分子である AOE372 が細胞内で相互作用することを確認した。
8. LZK と AOP-1 の相互作用が過酸化水素刺激により一過性に増強されることを明らかにした。

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えていただき、終始直接の御指導と御鞭撻をいただきました京都大学大学院薬学研究科川寄敏祐教授に深く感謝の意を表します。また、熱心な御指導をいただきました京都大学大学院薬学研究科岡昌吾助教授、上村和秀博士、京都大学大学院生命科学研究科小堤保則教授に謹んで感謝いたします。さらに、本研究に用いた種々の発現コンストラクトを恵与くださいました京都大学大学院理学研究科西田栄介教授、横浜市立大学医学部大野茂男教授、大阪大学大学院医学系研究科附属バイオメディカル教育研究センター日比正彦助教授、ならびに貴重な御助言をいただきました京都大学大学院理学研究科森口徹生博士に深く感謝いたします。

また、本研究にさまざま御助力をいただきました京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野ならびに京都大学大学院生命科学研究科システム機能学分野のみなさまに心から感謝いたします。

本研究の一部は日本学術振興会より援助を受けたものであり、ここに感謝いたします。

最後に、今日に至るまで私の進む道を理解し、絶えず温かく見守ってくださいましたすべての友人のみなさま、家族、両親、そして妻に心から感謝いたします。

引用文献

1. Nishida, E., and Gotoh, Y. (1993). *Trends Biochem. Sci.* **18**: 128-131.
2. Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**: 14843.
3. Karin, M., and Hunter, T. (1995). *Curr. Biol.* **5**: 747-757.
4. Treisman, R. (1996). *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 205-215.
5. Ray, L. B., and Sturgill, T. W. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1502-1506.
6. Hoshi, M., Nishida, E., and Sakai, H. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 5396-5401.
7. Ray, L. B. a. S., T. W. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 12721-12727.
8. Gotoh, Y., Nishida, E., Yamashita, T., Hoshi, M., Kawakami, M., and Sakai, H. (1990). *Eur. J. Biochem.* **193**: 661-669.
9. Boulton, T., G., and Cobb, M., H. (1991). *Cell Reg.* **2**: 357-371.
10. Payne, D., Rossomando, A., Martino, P., Erickson, A., Her, J., Shabanowitz, J. Hunt, D., Weber, M., and Sturgill, T. W. (1991). *EMBO J.* **10**: 885-892.
11. Kosako, H., Nishida, E., and Gotoh, Y. (1993). *EMBO J.* **12**: 787-794.
12. Kyriakis, J., App, H., Zhang, X., Banerjee, P., Brautigan, D., Rapp, U., and Avruch, J. (1992). *Nature* **358**: 417-421.
13. Dent, P., Haser, W., Haystead, T., Vincent, L., Robert, T., and Sturgill, T. (1992). *Science* **257**: 1404-1407.
14. Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, R. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. (1994). *Nature* **369**: 156-160.
15. Déijard, B., Hibi, M., Wu, I.-H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994). *Cell* **76**: 1025-1037.
16. Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitchm R. J. (1994). *Science* **265**: 808-811.
17. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., et al. (1994). *Nature* **372**: 739-746.
18. Davis, R. J. (2000). *Cell* **103**: 239-252.
19. Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Déijard, B., Davis, R. J., Johnson, G. L., and Karin, M. (1994). *Science* **266**: 1719-1723.
20. Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., and Matsumoto, K. (1995). *Science* **270**: 2008-2011.

21. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997). *Science* **275**: 90-94.
22. Hirai, S.-I., Izawa, M., Osada, S., Spyrou, G., and Ohno, S. (1996). *Oncogene* **12**: 641-650.
23. Fan, G., Merritt, S. E., Kortjenann, M., Shaw, P. E., and Holzman, L. B. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**: 24788-24793.
24. Hirai, S.-I., Katoh, M., Terada, M., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Rana, A., Avruch, J., and Ohno, S. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**: 15167-15173.
25. Rana, A., Gallo, K., Godowski, P., Hirai, S., Ohno, S., Zon, L., Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**: 19025-19028.
26. Tibbles, L. A., Ing, Y. L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J. R., and Lassam, N. J. (1996). *EMBO J.* **15**: 7026-7035.
27. Teramoto, H., Coso, O. A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**: 27225-27228.
28. Sakuma, H., Ikeda, A., Oka, S., Kozutsumi, Y., Zanetta, J.-P., and Kawasaki, T. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**: 28622-28629.
29. Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1998). *Trends Biochem. Sci.* **23**: 481-485.
30. Elion, E. A. (1998). *Science* **281**: 1625-1626.
31. Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., and Davis, R. J. (1998). *Science* **281**: 1671-1674
32. Gotoh, Y., and Cooper, J. A. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**: 17477-17482.
33. Leung, I. W.-L., and Lassam, N. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**: 32408-32415.
34. Tsuji, K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Obinata, M. (1995). *Biochem. J.* **307**: 377-381.
35. Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1997). *Science* **275**: 1649-1652.
36. Larrick, J. W., and Wright, S. C. (1990). *FASEB J.* **4**: 3215-3223.
37. Sundaresan, M., Yu, Z.-X., Ferrans, V. J., Irani, K., and Finkel, T. (1995). *Science* **270**: 296-299.
38. Devary, Y., Gottlieb, R. A., Smeal, T., and Karin, M. (1992). *Cell* **71**: 1081-1091.
39. Meyer, D., Liu, A., and Margolis, B. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**: 35113-35118.
40. Merritt, S. E., Mata, M., Nihalani, D., Zhu, C., Hu, X., and Holzman, L. B. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**: 10195-10202.
41. Bonny, C., Nicod, P., and Waeber, G. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**: 1843-1846.

42. Dickens, M., Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L., and Davis, R. J. (1997). *Science* **277**: 693-696.
43. Yasuda, J., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sharma, M., and Davis, R. J. (1999). *Mol. Cell. Biol.* **19**: 7245-7254.
44. Kelkar, N., Gupta, S., Dickens, M., and Davis, R. J. (2000). *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1030-1043.
45. Koyano, S., Ito, M., Takamatsu, N., Shiba, T., Yamamoto, K.-I., and Yoshioka, K. (1999). *FEBS Lett.* **457**: 385-388.
46. McDonald, P. H., Chow, C.-W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F.-T., Davis, R. J., and Lefkowitz, R. J. (2000). *Science* **290**: 1574-1577.
47. Stockinger, W., Brandes, C., Fasching, D., Hermann, M., Gotthardt, M., Herz, J., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**: 25625-25632.
48. Levchenko, A., Bruck, J., and Sternberg, P. W. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5818-5823.
49. Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). *EMBO J.* **16**: 7045-7053.
50. Toyoshima, F., Moriguchi, T., and Nishida, E. (1997). *J. Cell Biol.* **139**: 1005-1015.
51. Mata, M., Merritt, S. E., Fan, G., Yu, G. G., and Holzman, L. B. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**: 16888-16896.
52. Nihalani, D., Merritt, S. E., and Holzman, L. B. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**: 7273-7279.
53. Kishimoto, K., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**: 7359-7364.
54. Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988). *Science* **241**: 42-52.
55. Fukuyama, K., Yoshida, M., Yamashita, A., Deyama, Y., Baba, M., Suzuki, A., Mohri, H., Ikezawa, Z., Nakajima, H., Hirai, S., and Ohno, S. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**: 21247-21254.
56. Fritz, C. C., and Green, M. R. (1992). *Curr. Biol.* **2**: 403-405.
57. Fields, S., and Sternglanz, R. (1994). *Trends Genet.* **10**: 286-292.
58. Guarente, L. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1639-1641.
59. Mallo, G. V., Fieldler, F., Calvo, E. L., Ortiz, E. M., Vasseur, S., Keim, V., Morisset, J., and Iovanna, J. L. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**: 32360-32369.
60. Chae, H. Z., Robinson, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S., G. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7017-7021.
61. Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (2000). *Am. J. Phys. Lung Cell Mol. Phys.* **279**: L1005-L1028.

62. Lo, Y. Y. C., Wong, J. M. S., and Cruz, T. F. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**: 15703-15707.
63. Oka, S.-I., Kamata, H., Kamata, K., Yagisawa, H., and Hirata, H. (2000). *FEBS Lett.* **472**: 196-202.
64. Kang, S. W., Chae, H. Z., Seo, M. S., Kim, K., Baines, I. C., and Rhee, S. G. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**: 6297-6302.
65. Matsumoto, A., Okado, A., Fujii, T., Fujii, J., Egashira, M., Niikawa, N., and Taniguchi, N. (1999). *FEBS Lett.* **443**: 246-250.
66. Jin, D.-Y., Chae, H. Z., Rhee, S. G., and Jeang, K.-T. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**: 30952-30961.
67. Ross, S. J., Findlay, V. J., Malakasi, P., and Morgan, B.A. (2000). *Mol. Biol. Cell* **11**: 2631-2642.
68. Araki, M., Nanri, H., Ejima, K., Murasato, Y., Fujiwara, T., Nakashima, Y., and Ikeda, M. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**: 2271-2278.
69. Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998). *EMBO J.* **17**: 2596-2606.
70. Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., and Kyriakis, J. M. (2000). *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2198-2208.