

平成16年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな	さいとう はるお					
研究代表者氏名	齋藤 春雄		所属研究機関・部局・職		東京大学・医科学研究所・教授	
研究課題名	和文	環境ストレス応答 MAP キナーゼ経路制御機構の研究				
	英文	Regulatory mechanisms of the environmental stress-responsive MAP kinase signal pathway				
研究経費	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円	18,300	22,400	15,500	15,500	15,500	87,200
研究組織（研究代表者及び研究分担者）						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
齋藤 春雄	東京大学・医科学研究所・教授	細胞情報伝達機構	研究全体の遂行・総括			
武川 睦寛	東京大学・医科学研究所・助教授	細胞情報伝達機構	ヒトのストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路の機能及び制御機構の解明			
館林 和夫	東京大学・医科学研究所・助手	細胞情報伝達機構	酵母のストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路の機能及び制御機構の解明			
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>ストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路は、出芽酵母からヒトに至るすべての真核細胞によく保存された、極めて重要なシグナル伝達機構であり、様々な細胞環境ストレス（紫外線や浸透圧ショックなど）によって活性化され、細胞のストレス応答を制御する。酵母のストレス応答 MAPK(Hog1)は高浸透圧環境下での生育に必須であり、ヒトのストレス応答 MAPK (p38 及び JNK) は DNA 損傷や様々な炎症性サイトカインによって活性化され、DNA 損傷細胞のアポトーシスや免疫細胞の活性化、サイトカイン産生に重要である。本研究の当初申請では、申請者が世界に先駆けて見いだした酵母やヒト細胞におけるストレス応答 MAPK 情報伝達経路の様々な伝達因子を活用して、ストレス応答 MAP キナーゼ経路の制御機構の解明を目指した。具体的には、</p>						
<p>1) <u>酵母ストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路の機能と制御機構の解明。</u></p> <p>1-1) 酵母 Hog1 経路の活性化および負の制御の分子機構を明らかにする。</p> <p>1-2) Hog1 経路の MAPKK である Pbs2 が足場蛋白質として機能する分子機構の詳細を解明する。</p> <p>2) <u>ヒトストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路の機能と制御機構の解明。</u></p> <p>2-1) ヒトストレス応答 MAPKKK である MTK1 の活性化および負の制御の分子機構を解明する。</p> <p>2-2) 環境ストレスによるストレス応答 MAPK カスケード活性化の分子機構を明らかにする。</p>						

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1. 酵母ストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路の機能と制御機構の解明。

1-1. 酵母ストレス応答 MAP キナーゼ経路の MAPKK である Pbs2 の、足場蛋白質としての分子機能を解明する目的で、その N 末端制御領域の機能的構造解析を行った。その結果、Pbs2 の N 末端には、Pbs2 を活性化する MAPKKK である Ssk2 および Ssk22 に特異的なドッキングサイトがあり、MAPKKK-MAPKK 相互作用の特異性を決定していることが分かった。また、Pbs2 のドッキングサイト近傍に核外移行シグナルが、C 末端に核局在化シグナルがあることを見いだした。このことは、Pbs2 の核・細胞質間循環が機能上重要であることを示唆する。

1-2. 我々が見いだした酵母の二種の浸透圧センサー Sln1 と Sho1 の作用機序を調べた。Sln1 センサーは、細胞壁の欠損や抗生物質 (nystatin) による細胞体積変化に敏感に反応することなどから、浸透圧変化そのものではなく、浸透圧変化により引き起こされた原形質分離を認識していることがわかった。一方、Sho1 浸透圧センサーは、これらの処理には全く反応しないのみならず、細胞周期の特定期間のみで活性化がみられた。興味あることに、Sho1 による Hog1 の活性化には、浸透圧変化と同時にグルコースセンサーからのシグナルが必要であることが分かった。現在、この系に異常をきたした変異株を集めて、関与する遺伝子を同定している。

1-3. Sln1 浸透圧センサーの下流にある Ypd1 タンパク質、Ssk1 レスポンスレギュレータ、および Ssk2/Ssk22 MAPKKK の間の機能的相互作用を解析した結果、Ssk1 の変異株で Ypd1 との結合が出来なくなったもの、あるいは Ypd1 との結合は正常だが Ypd1 によるリン酸化を受けなくなったもの、などは、構成的に Ssk2/Ssk22 を活性化することが分かった。この結果は、以前我々が Ssk1 欠失変異株などの表現型から推測した分子機構を直接裏付ける結果である。今後、これらの変異体の生化学的解析を行うことにより、Ssk1 による Ssk2/Ssk22 活性化の、より詳細な機構に迫る計画である。また、Ssk2 の N 末端制御領域は 1200 アミノ酸を超えるが、その機能には不明な点が多いので、系統的な欠失変異株などを作成してその機能解析を行っている。Ssk2/Ssk22 は MTK1 などヒトのストレス MAPKKK と類似した点が多いので、Ssk1 による Ssk2/Ssk22k 活性化機構の詳細に関する知識は、ヒトのストレス応答経路の研究にも利するところが多いと期待できる。

2. ヒトストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路の機能と制御機構の解明。

2-1. 2-ハイブリッド法および 3-ハイブリッド法によって、ヒトストレス応答 MAP キナーゼ経路の MAPKKK の一つである MTK1 (酵母 Ssk2 のホモログ) の活性化機構を解析した。その結果、MTK1 の N 末端制御領域には、MTK1 の活性化因子である Gadd45 の結合部位と、キナーゼ活性を自己阻害するドメインとが存在し、Gadd45 が結合すると自己阻害が解除されることが分かった。つぎに、Gadd45 による MTK1 の活性化機構をより詳細に解析するため、Gadd45 の系統的欠失変異株を作り、その機能的影響を調べたところ、MTK1 に結合できなくなった変異は (当然であるが) 全て MTK1 活性可能を失っていたが、結合能があるにもかかわらず活性化できなくなった Gadd45 変異タンパク質が見いだされた。そのようなものは、MTK1 に結合してもその 2 量体化を誘起することが出来なかった。また逆に、MTK1 の変異株で Gadd45 の非存在下でも構成的に活性のあるようなものは、Gadd45 が結合しなくても二量体化することが分かった。したがって、MTK1 活性化には Gadd45 によって誘起される二量体化が重要であると結論された。現在、MTK1 二量体化の機構、及びそれに付随して起きると考えられる自己リン酸化の制御機構を解析している。

2-2. 上記(1-1)に略記したように、酵母における MAPKKK と MAPKK との間のドッキング結合の存在を初めて見いだしたが、ドッキング相互作用の一般性を検証するために、ヒトのストレス MAPKK にドッキングドメインがあるかどうか解析した。その結果、ヒトストレス応答 MAP キナーゼ経路の MAPKK である MKK3 や MKK6 の C 末端に、ストレス MAPKKK MTK1 に特異的に結合する部位があることを発見した。MKK3/6 内の MTK1 ドッキングサイトを欠失した変異株や点変異株では、MTK1 との結合が全くみられず、同時に MTK1 による活性化も起きない。ドッキングサイトに相当するペプチドは、MTK1-MKK3/6 の結合を強く阻害した。また、他の MAPKK、すなわち MKK4、MKK7、MEK1 にも同様な MAPKKK 特異的ドッキングサイトを見いだした。したがって、MAPKKK-MAPKK ドッキング相互作用が種を越えること、またストレス応答のみならず増殖因子などへの応答にも重要であることがわかった。

2-3. TGF β は、様々な機能を発現するが、ストレス応答 MAP キナーゼである p38 を活性化することも知られていた。我々は、TGF β が Smad 経路によって GADD45B の発現を誘導し、その結果 MTK1 活性化され、究極的に p38 の活性化に至ることを証明した。これは、Smad を介さないとする従来の予想を覆すものである。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

浸透圧センサーがいかにして浸透圧変化を検出するかについては、全く手掛かりが掴めていなかったが、我々の研究結果から、少なくとも Sln1 センサーは浸透圧変化による膨圧変化を直接検出していることが分かった。同時に、酵母の第二浸透圧センサー Sho1 は、Sln1 とはまったく異なった作用機構を持つことが確定的になった。今後、これら二つの浸透圧センサーの作用機構を更に解析することで、全く新しいコンセプトを生み出すことが出来ると考えられる。

Hog1 MAPK の活性化に、Sho1 浸透圧センサーからのシグナルと同時にグルコースセンサーからのシグナルが必要なことが分かった。グルコースセンサーは、代謝制御において極めて重要な機能を果たすが、上流 (グルコースセンサー) と下流 (グルコース輸送や代謝の制御) との間に複雑なフィードバックがあるため、解析が遅れていた。本研究の結果をもちいれば、グルコースシグナルの生起とその伝達を、グルコース代謝によるフィードバックと切り離して解析することが可能になる。このことによって、当初予想しなかった研究分野ではあるが、まったく新規な発見につながる可能性がある。

ヒトのストレス MAPKK である MKK3、MKK4、MKK6、MKK7 などには、ストレス MAPKKK との特異的結合に必要なドッキングドメインがあることを見いだした。また、同様なドッキングドメインが古典的 MAPK 経路の MAPKK である MEK1 にもあることが分かった。さらに、合成ペプチドを用いてドッキングドメインを介した MAPKK と MAPKKK を強力に阻害出来ることを見いだした。これは極めて新規な発見であり、またこのことを利用すれば、MAPKK の特異的活性化阻害剤が開発できると考えられる。

新規の発見というわけではないが、本研究計画の特徴の一つであるところの、ヒトと酵母における相同なストレス応答経路を並行して研究するという方針は、予想以上に相互を刺激してよい結果を生み出している。酵母における MAPKKK-MAPKK ドッキング相互作用に関する知見に触発された、ヒトにおける同様のドッキング相互作用の発見などが、その好例である。また、MTK1 で見いだした二量体化についても、Ssk2/Ssk22 で同様の現象があるか、検討する予定である。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

発表論文

1. Takekawa M, Tatebayashi K, and Saito H. Docking sites that determine the specificities of mammalian MAPKKs for MAPKKKs. 準備中 (2004)
2. Chi H, Lu B, Takekawa M, Davis RJ, and Flavell RA. GADD45 β /GADD45 γ and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT4-independent IFN γ production in T cells. **EMBO J.** 23: 1576-1586 (2004)
3. Krueger NX, Reddy RS, Johnson K, Bateman J, Kaufmann N, Scalice D, Van Vactor D, and Saito H. Function of the ectodomain and cytoplasmic tyrosine phosphatase domains of receptor PTPase Dlar *in vivo*. **Mol. Cell. Biol.** 23: 6909-6921 (2003)
4. Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, PiaJ-H, Yagita H, Okumura K, Doi T. and Nakano H. NF- κ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. **EMBO J.** 22: 3898-3909 (2003)
5. Mitsuhashi S, Shima H, Tanuma N, Matsuura N, Takekawa M, Urano T, Kataoka T, Ubukata M, and Kikuchi K. Usage of tautomycetin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1) reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in COS-7 cells. **J. Biol. Chem.** 278: 82-88 (2003)
6. Tatebayashi K, Takekawa M, and Saito H. A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway. **EMBO J.** 22: 3624-3634 (2003)
7. Reiser V, Raitt DC, and Saito H. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. **J. Cell Biol.** 161: 1035-1040 (2003).
8. Mita H, Tsutsui J, Takekawa M, Witten EA, and Saito H. Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal domain and GADD45 binding. **Mol. Cell. Biol.** 22: 4544-4555 (2002)
9. Takekawa M, Tatebayashi K, Itoh F, Adachi M, Imai K, and Saito H. Smad-dependent GADD45 β expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- β . **EMBO J.** 21: 6473-6482 (2002)

国際会議、学会等における発表

平成14年

Gordon Conference (Oxford, UK) 口頭発表(斎藤)
日本分子生物学会年会 口頭発表(斎藤); ポスター発表(4題)

平成15年

日本プロテインホスファターゼ研究会 口頭発表(武川)
日本分子生物学会年会 ポスター発表(4題)

平成16年

日本薬理学会 口頭発表(斎藤)
5th UK-Japan Cell Cycle Workshop (Nara, Japan) 口頭発表(斎藤)