

環境ストレス応答 MAP キナーゼ経路制御機構の研究

Regulatory mechanisms of the environmental stress-responsive MAP kinase signal pathway

齋藤 春雄 (Haruo Saito)

東京大学・医科学研究所・教授



研究の概要

地球規模での環境汚染は生物圏に深刻な影響を与えている。紫外線や高浸透圧（塩害、乾燥）といった多種多様な「環境ストレス」に適応する細胞機構を解明するため、「ストレス応答 MAP キナーゼ（SAPK）経路」に着目し、基礎生物学のみならず医学、農学など隣接諸分野への敷衍をも目指した。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

生物学／生物科学・機能生物化学／細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景・動機

ストレス応答 MAPK 情報伝達経路は、様々な環境ストレスによって活性化され、細胞のストレス応答を制御する、極めて重要なシグナル伝達機構である。

ヒトのストレス応答 MAPK（p38 および JNK）情報伝達系は、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るもので、損傷を受けた細胞のアポトーシスや免疫細胞によるサイトカイン産生などを制御する、生体防御にとって大きな意味を持つシグナル伝達機構であり、この経路の機能異常が癌や自己免疫疾患に関与することも知られている。

また、酵母の浸透圧ストレスによって活性化される Hog1 MAPK は、ストレス応答 MAPK の分子機構を解析するうえで優れたモデル系である。以前、細胞表面の浸透圧センサーから Hog1 MAPK にいたる HOG シグナル伝達経路のほぼ全貌を世界に先駆けて解明することに成功した。更に酵母変異株を用いた機能的クローニングにより、哺乳類ストレス応答経路の新たな MAPKKK である MTK1 を発見した。

本研究構想では、これらの成果を基に、酵母とヒト細胞のストレス応答 MAP キナーゼ経路の制御機構の多角的解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) 酵母 HOG 経路の活性化制御の分子機構を明らかにする。

(2) 酵母 HOG 経路における足場蛋白質の機能の分子機構の詳細を解明する。

(3) ヒト MTK1 MAPKKK の活性制御因子

を同定し、その分子機構を解明する。

(4) 環境ストレスによるヒト p38 MAPK カスケード活性化の情報伝達機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 高浸透圧応答に異常をもつ酵母変異株の単離とその解析を通じて、HOG 経路の活性化機構を探る。

(2) 酵母細胞内でのタンパク質相互作用を共沈法や蛍光顕微鏡法で解析する。

(3) 2-ハイブリッド法や質量分析法などを用いて、MTK1 に結合するタンパク質を同定し、それらの MTK1 活性制御機能を解析する。

(4) ヒト培養細胞を用い、ストレス応答 MAPK 経路に関わるタンパク質の相互作用を共沈法や蛍光顕微鏡法によって解析する。また、様々な変異のストレスシグナル伝達に及ぼす効果を解析する。

平成14年度に購入したジェネティックアナライザーは、多数におよぶ変異株の塩基配列変化の解析など、本研究全般にわたって活用した。

4. 研究の主な成果

(1) 酵母の高浸透圧ストレス MAPK 経路（HOG MAPK 経路）の上流には、機能的に重複する二つの経路（SLN1 経路と SHO1 経路）がある。SLN1 経路の浸透圧センサーである Sln1 は浸透圧変化により引き起こされた膨圧の減少を認識しているということを明らかにした（発表論文 6）。

[4. 研究の主な成果 (続き)]

SLN1 経路とは対照的に、SHO1 経路は全く膨圧変化に反応しない。この経路における浸透圧センサーは当初 Sho1 であると考えられたが、高浸透圧感受性変異株の大規模な解析の結果、高度に多糖化されたムチン様膜タンパク質 Hkr1 および Msb2 が浸透圧センサー機能を持つことを明らかにした。Hkr1/Msb2 が Sho1 と相互作用することで、HOG 経路を活性化する。ムチンのシグナル機能は哺乳類細胞でも注目されているが、そのシグナル機能をこのように明確に決定したのは初めてであり、その意義は大きい。

(2) HOG 経路の MAPKK である Pbs2 は、Hog1 キナーゼをリン酸化して活性化するキナーゼ機能に加え、Sho1、Ssk2、Stell1、Hog1 などと結合して複合体形成のコアとなる足場機能をも備えている。Pbs2 の機能的構造解析を行った結果、Pbs2 の N 末端には Ssk2 MAPKKK との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わかった (発表論文 5)。

また、SHO1 経路のシグナル制御機構の解明を進め、Stell1、Sho1、および Cdc42 などとの結合性を持つ足場タンパク質 Ste50 が、もう一つの足場タンパク質 Pbs2 と共にシグナル伝達複合体の形成を制御することを明らかにした (発表論文 2)。

(3) MTK1 の N 末端制御領域には MTK1 活性化因子 Gadd45 の結合部位が存在する。MTK1 に Gadd45 が結合すると、まず MTK1 分子の N 末にある抑制領域と C 末にあるキナーゼ領域との結合が解除される。次に MTK1 分子の中程にある coiled-coil 領域を介して MTK1 の二量体化が起きる。更に二量体化した MTK1 分子間での trans-リン酸化反応で、活性化ループ内の Thr-1493 がリン酸化され、MTK1 キナーゼの酵素活性が大幅に亢進する (発表論文 1)。MAPKKK 活性化機構のこのように詳細な解明は、きわめて独自のものである。

(4) 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 末端には、DVD サイトと名付けた、MAPKKK に特異的に結合するドッキング部位があることを見出した。MKK3/6 の DVD サイトを欠失した変異株や点変異株では、MTK1 との結合が全く見られず、同時に MTK1 による活性化も起きない。また、他の MAPKK、すなわち MKK4/7 および MEK1/2 にも、同様な MAPKKK 特異的な DVD サイトを見出した (発表論文 3)。MAPKKK と MAPKK との特異的ドッキング相互作用は MAPK カスケードの新規な制御機構であり、その解明はシグナル伝達の研究に大きく寄与するものである。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

(1) 酵母の浸透圧ストレス MAPK 経路 (HOG 経路) のシグナル制御機構に関しては、当初より我々の研究室が世界をリードして来た。HOG 経路の詳細が明らかになるにつれ、欧米のトップレベルの研究室が多数参入しているが、当該分野における我々の優位と独自性は依然として維持されている。

(2) ヒトのストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路の解明においても、MAPKKK-MAPKK に特異的なドッキング相互作用の発見とその機能解析、MTK1 MAPKKK 活性化機構の詳細な解明など、世界に先駆けた研究成果を出し続けており、国内外で高い評価を受けている。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1) Miyake Z, Takekawa M, Ge Q, & **Saito H**. Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated *trans* autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol. Cell. Biol.* 27: 2765-2776 (2007)

2) Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E & **Saito H**. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.* 25: 3033-3044 (2006)

3) Takekawa M, Tatebayashi K, & **Saito H**. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Molecular Cell.* 18: 295-306 (2005)

4) Nam H. J, Poy F, **Saito H**, & Frederick C.A. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *J. Exp. Med.* 201: 441-452 (2005)

5) Tatebayashi K, Takekawa M, & **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)

6) Reiser V, Raitt D. C, & **Saito H**. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.* 161: 1035-1040 (2003)

7) Takekawa M, Tatebayashi K, Itoh F, Adachi M, Imai K. & **Saito H**. Smad-dependent GADD45 β expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- β . *EMBO J.* 21: 6473-6482 (2002)

ホームページ

www.ims.u-tokyo.ac.jp/MolCellSignal