

学位論文

アフリカツメガエル卵成熟過程における  
MAPキナーゼ活性化経路の解析

平成7年12月 博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科  
生物化学専攻

松田 達志

①

## 学位論文

アフリカツメガエル卵成熟過程における  
MAPキナーゼ活性化経路の解析

平成7年12月 博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科  
生物化学専攻

松田達志

# 目次

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 略語                                 | 2  |
| 序論                                 | 3  |
| 結果                                 | 4  |
| § 1. MAPキナーゼ活性化因子の検出               | 14 |
| § 2. MAPキナーゼ活性化活性の細胞周期依存的変動        | 14 |
| § 3. MAPキナーゼ活性化因子の精製               | 18 |
| § 4. プロテインホスファターゼ2A処理によるMAPKK活性の失活 | 18 |
| § 5. MPFキナーゼカスケードにおけるMAPKKの位置付け    | 21 |
| § 6. 抗MAPKK抗体の作製                   | 23 |
| § 7. MAPKKの活性調節機構                  | 26 |
| § 8. MAPKK活性化因子の検索                 | 26 |
| § 9. MAPKKのMAPKK-KとMAPキナーゼによるリン酸化  | 28 |
| § 10. 卵成熟過程に伴うMAPKK-K活性の変動         | 36 |
| § 11. 卵成熟過程におけるMos及びRaf-1の活性変動     | 39 |
| § 12. 細胞質に存在するMAPKK-K活性の分画         | 39 |
| § 13. Peak Bに存在するMAPKK-K分子の同定      | 43 |
| § 14. Peak Aに存在するMAPKK-K分子の同定      | 46 |
| § 15. MAPキナーゼ活性化カスケードへのMosの寄与の評価   | 48 |
| 考察                                 |    |
| § 1. MAPキナーゼ活性化因子(MAPKK)の同定        | 50 |
| § 2. MAPKK活性化因子の同定                 | 52 |
| § 3. MAPキナーゼによるMAPKKのリン酸化          | 55 |
| 謝辞                                 | 57 |
| 参考文献                               | 58 |



## 略語

- DEAE: diethylaminoethyl  
DTT: dithiothreitol  
EGF: epidermal growth factor  
EGTA: ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid  
FGF: fibroblast growth factor  
GST: glutathione *S*-transferase  
Hepes: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid  
IPTG: isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MAPKK: MAPK kinase  
MAPKK-K: MAPKK-kinase  
MBP: myelin basic protein  
Mes: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid  
MPF: M-phase promoting factor  
NGF: nerve growth factor  
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis  
PDGF: platelet-derived growth factor  
PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride  
PP2A: protein phosphatase 2A  
SDS: sodium dodecyl sulfate  
TCA: trichloroacetic acid  
Tris: 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol  
TPA: 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate

## 序論

### § はじめに

生体内において、個々の細胞は周囲の状況に応じた増殖・分化過程の厳密な制御を受けている。細胞は脂質二重膜よりなる細胞膜によって、外界から隔てられた細胞内環境を維持しており、細胞内においても、遺伝情報の保存された核は核膜によって細胞質から隔絶されている。したがって、増殖・分化の過程を理解するためには、細胞膜で受け取った外界からのシグナルを細胞内に伝達し、最終的に核内に存在するDNAから遺伝子の発現を引き起こすメカニズム＝細胞内シグナル伝達機構の理解が必要となる。

### § MAPキナーゼの刺激応答の広範性

MAPキナーゼ (mitogen-activated protein kinase) は当初、静止期に導入した培養細胞に上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF)、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor; PDGF)、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor; FGF)、インシュリン、発癌プロモーターであるホルボールエステル 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) などの様々な増殖刺激を加えた際に、共通に活性化するセリン/スレオニンキナーゼとして見い出された (Cobb et al., 1991; Sturgill and Wu, 1991; Nishida and Gotoh, 1992)。その後、神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) を加えることで神経細胞様に分化することの知られるPC12細胞において、NGF添加に伴ってMAPキナーゼの活性化が起こることが明らかにされ (Gotoh et al., 1990; Miyasaka et al., 1990)、MAPキナーゼが増殖過程のみでなく分化過程のシグナル伝達経路においても重要な役割を果たすことが示唆された。

これらの増殖・分化刺激に伴い、癌原遺伝子産物であるRasの活性化がやはり共通に起こることが知られている。*Xenopus*卵より調製した無細胞系を用いた実験により、活性型のRasがMAPキナーゼの活性化を引き起こすことが示された (Hattori et al., 1992; Shibuya et al., 1992; Itoh et al., 1992)。また、培養細胞に活性型Rasを発現させることでMAPキナーゼの活性化が引き起こされ、一方内在性のRasの活性化を抑制することにより種々の刺激に伴うMAPキナーゼの活性化を抑制しうる、という内容の報告もなされている (Leevers and Marshall, 1992; Thomas et al.,



1992; Wood et al., 1992; de Vries-Smith et al., 1992)。これらの実験結果は、少なくともある種の刺激のもとでは、Rasの活性化を通じてMAPキナーゼの活性化が引き起こされる、ということを示している。Rasが細胞癌化のプロセスに深く関与していることから、MAPキナーゼの発癌過程への関与が示唆される。

そのほか、現在までにさまざまな系においてMAPキナーゼの活性化が観察されている。免疫系においては、T細胞の抗原受容体を抗原刺激した際 (Hanekom et al., 1989; Nel et al., 1990a; Nel et al., 1990b) や、B細胞の表面抗原のクロスリンクした際 (Casillas et al., 1991) に、各々の細胞の増殖に先立ってMAPキナーゼの活性化が見られることが報告されている。さらにIL-1 (Bird et al., 1991) や細胞遊走活性を持つfMLPで血球系の細胞を刺激した時 (Thompson et al., 1993) にもMAPキナーゼの活性化が観察されており、炎症反応との関連が報告されている。神経系においては、海馬由来の神経細胞を用いた実験により、NMDA型グルタミン酸受容体の刺激によりMAPキナーゼが活性化することが見出された (Bading and Greengard, 1991)。海馬におけるNMDA型グルタミン酸受容体を介したシグナルは、脳神経系の機能の中でも特に長期記憶増強において重要な役割を果たしていると考えられており、MAPキナーゼが脳神経系において多く発現が見られることから、神経細胞におけるMAPキナーゼの機能に注目が集まっている。ほかにも、クロマフィン細胞における開口放出過程 (Ely et al., 1990) や、種々のサイトカイン、アンジオテンシン、成長ホルモンなどの生理活性物質による細胞応答過程においてもMAPキナーゼの活性化が観察されている。また、当研究室の後藤等により、*Xenopus*の卵成熟過程においてMAPキナーゼが活性化することが見出されている (Gotoh et al., 1991a)。以上のようにMAPキナーゼは種々の系において非常に広範な刺激応答性を示す分子であり、細胞内シグナル伝達系において中心的な役割を担うことが示唆されている。

MAPキナーゼは、通常は不活性型として細胞質に存在しており、外界刺激により活性化されると核内へと移行するのが観察される (Chen et al., 1992; Lenormand et al., 1993; Gonzalez et al., 1993)。活性化したMAPキナーゼは、核内で転写因子をリン酸化することで遺伝子発現を調節していると考えられている (Davis, 1993)。最近、線維芽細胞にアンチセンスmRNAの発現やキナーゼ不能型MAPキナーゼの過剰発現をもたらすことにより、内在性のMAPキナーゼの活性を阻害する実験が行われた (Pages et al., 1993)。その結果、転写因子複合体AP-1の標的であるコラーゲンプロモーターの活性化が抑えられ、かつDNA合成の開始を抑える

ことができるという報告がなされた。すなわち、増殖刺激の核内へのシグナル伝達においてMAPキナーゼの存在が必須であることが示唆された。

## § MAPキナーゼの普遍性

MAPキナーゼは、スレオニン残基とチロシン残基の両方の残基がリン酸化されて活性型になる非常にユニークな分子である (Anderson et al., 1990; Payne et al., 1991)。哺乳類MAPキナーゼ (ERK1、ERK2) 及び *Xenopus* MAPキナーゼのクローニングが行われ (Boulton et al., 1990; Boulton et al., 1991; Gotoh et al., 1991) そのアミノ酸配列が明らかとなり、*Xenopus* MAPキナーゼと ERK1、ERK2 とではアミノ酸配列にしてそれぞれ 84%、97% 同一であることが見い出された。また、活性化に必須なスレオニン残基とチロシン残基を含む領域は完全に保存されていた。さらに、得られたアミノ酸配列から出芽酵母に存在する FUS3、KSS1、及び分裂酵母に存在する *spk1* 等が MAPキナーゼの酵母ホモログであることが明らかとなり (Elion et al., 1990; Courchesne et al., 1989; Toda et al., 1991)、これらの分子中においても先の活性化に必須な領域は完全に保存されていることが見い出された。その後も、ショウジョウバエ、植物等様々な種において MAPキナーゼホモログがクローニングされたが (Biggs, III and Zipursky, 1992; Wu et al., 1994; Lackner et al., 1994; Mizoguchi et al., 1994)、活性化に必要なリン酸化部位はすべて保存されていた。このことから、MAPキナーゼが種を越えて保存されているだけでなく、その上流に位置して MAPキナーゼを活性化する因子もまた共通に保存されている可能性が示唆された。

## § 研究の目的

MAPキナーゼは、非常に広範な刺激によって共通に活性化する分子であり、また酵母から哺乳類に至るまで高度に保存された分子である、という二点から、細胞内シグナル伝達機構において中心的な役割を果たす分子であると考えられる。MAPキナーゼの活性化経路の理解が細胞内シグナル伝達機構の基本的な骨組みの理解に繋がるものと考え、MAPキナーゼ活性化経路の解析を行った。本研究においては、生化学的な取り扱いに適しており、かつ細胞周期の同調が容易で活性変動の解析が可能である *Xenopus* の卵成熟過程の系を用いて MAPキナーゼ活性化経路の解析を行った。その結果、*Xenopus* 成熟卵から MAPキナーゼを活







## 方法

### <材料>

本研究で用いた卵について簡単に説明する。未成熟卵は第一減数分裂のG2/M境界で停止しており、プロゲステロン添加により卵成熟過程が進行し、第二減数分裂のM期で再び停止して成熟卵(=未受精卵)となる。成熟卵は性腺刺激ホルモンであるゴナドトロピンを雌の腹腔内に注射することで排卵される。成熟卵は、精子の添加もしくは電気刺激、カルシウムイオノフォア処理等の人工的な処理により、分裂間期に移行して細胞周期が再び回り始める。

### <方法>

#### § 卵抽出液の調製

成熟卵(=未受精卵)は雌のに400 Uのゴナトロピン(帝国臓器)を注射して、12時間後に0.6 % NaCl中に回収した。システイン塩酸塩により卵のゼリー層を除去した後、10倍容のH-buffer(20 mM Tris-HCl・pH 7.5, 60 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mM NaF, 10 mM EGTA, 10 mM  $MgCl_2$ , 6 mM DTT, 1 mM sodium vanadate, 1 mM PMSF, 20  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A)を加えて氷上でホモジナイズを行い、4℃で5,000 x g、10分間の遠心、引き続いて300,000 x g、30分間の遠心を行い抽出液を得た。

未成熟卵は雌の卵巣を摘出しコラゲナーゼ処理により結合組織を除去した後、大きさによってステージVIのものを選別することで得た。卵成熟過程は得られた未成熟卵に最終濃度10  $\mu$ Mのプロゲステロンを添加することで誘起した。抽出液は成熟卵と同様に調製した。なお、免疫沈降を行う際に用いた抽出液は、特に断わりの無い限り5,000 x g、10分間の遠心に続いて16,000 x g、30分間の遠心により得た上清を用いた。

#### § 無細胞抽出液の調製

0.1 x MMR (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ , 0.1 mM EDTA, 5 mM Hepes・pH 7.8)中で*Xenopus*未受精卵に精子を添加し、10分後にシステイン塩酸塩によりゼリー層を除去した。精子添加後60分

の卵を間期卵とした。間期卵、成熟卵もしくは未成熟卵をそれぞれEX-buffer (0.1 M potassium acetate, 60 mM EGTA, 2.5 mM magnesium acetate, pH 7.2)で数回洗った後、19,000 x g、10分間の遠心により卵を破碎し、ATP再生系(最終濃度 1 mM ATP、1 mM  $MgCl_2$ 、10 mM creatine phosphate、80  $\mu g/ml$  phosphocreatine kinase)を加えたものを無細胞抽出液とした。MPFやMAPKKを添加する際には、さらに100,000 x g、25分間の遠心を行い得られた上清を間期無細胞抽出液として用いた。無細胞抽出液をさらに300,000 x g、30分間の遠心にかけて上清を細胞質画分、沈殿を1% Triton X100により可溶化した画分を膜画分とした。

### § 組み換えMAPキナーゼの調製

MAPキナーゼのN末端側にTMITPSSGNSの配列を付加したコンストラクトを作製し大腸菌に発現させた。インクルージョンボディとして回収された画分を8 M尿素で可溶化した後、phenyl-Sepharoseとpolylysine-Sepharoseの二段階のカラムクロマトグラフィーにかけることで組み換えMAPキナーゼを得た。

キナーゼ不能型MAPキナーゼは、MAPキナーゼのATP結合部位と考えられる57番目のリジンをアスパラギン酸に置換した上で、N末端側にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合したコンストラクトを作製し大腸菌に発現させた。可溶性画分をGSH-Sepharoseを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにかけることでキナーゼ不能型MAPキナーゼを得た。

### § MBPゲル内リン酸化法(ゲル内キナーゼアッセイ法)

最終濃度0.5 mg/mlのミエリン塩基性タンパク質(MBP)を固め込んだポリアクリルアミドゲル上でサンプルのSDS-PAGEを行い、泳動されたサンプルを6 M Guanidinium chlorideで変性させた後、Tween 40を含むバッファーで再生させた。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP/ $MgCl_2$ を加えて30℃でインキュベートした後、オートラジオグラフィー(あるいはBAS2000)によって、キナーゼ活性を担うポリペプチドの同定とその活性を測定した。

### § MAPKKの精製

成熟卵抽出液をbuffer A (20 mM Tris-HCl · pH 8.0, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 20  $\mu g/ml$  aprotinin, 2 mM



DTT、1 mM sodium vanadate) で平衡化したDEAE-cellulose (60 ml) にかけた。素通り画分とbuffer Aによる洗い画分を併せた後、pHを7.0に調整してから、buffer B (20 mM Tris-HCl · pH 7.0、12.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate、2 mM EGTA、1 mM PMSF、20  $\mu$ g/ml aprotinin、2 mM DTT、1 mM sodium vanadate) で平衡化したheparin-Sepharose (15 ml) にかけた。buffer Bでカラムを洗った後、450 mlの0-400 mM NaCl直線勾配により吸着タンパク質を溶出した。活性画分を集めて、buffer C (30 mM potassium phosphate · pH 7.0、12.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate、0.1 mM EGTA、1 mM PMSF、20  $\mu$ g/ml aprotinin、2 mM DTT、1 mM sodium vanadate) で平衡化したヒドロキシアパタイト (4 ml) にかけた。buffer Cでカラムを洗った後60 mlの30-200 mMのリン酸直線勾配により吸着タンパク質を溶出した。活性画分を集めて、buffer D (20 mM Mes · pH 6.5、12.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate、2 mM EGTA、1 mM PMSF、20  $\mu$ g/ml aprotinin、2 mM DTT、1 mM sodium vanadate) に対して透析を行った後、buffer Dで平衡化したMono S HR5/5にかけた。カラムをbuffer Dで洗った後、15 mlの0-400 mM NaCl直線勾配により吸着タンパク質を溶出した。

タイムコース等で用いた粗MAPKK画分の調製は次のように行った。卵抽出液をbuffer Aで平衡化したDEAE-celluloseにかけた後、buffer Aでカラムを洗い、素通り画分と洗いの画分を併せてMAPKK画分とした。

## § マイクロインジェクション

精製MAPKK及びMPFの未成熟卵へのマイクロインジェクションはmodified Barth's medium (88 mM NaCl、1 mM KCl、0.41 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.82 mM  $\text{MgSO}_4$ 、2.4 mM  $\text{NaHCO}_3$ 、10 mM Hepes · pH 7.4)中21℃で行った。器具は、IM-1 microinjection apparatus (Narishige, Tokyo)を用いた。*Xenopus*のMPFは成熟卵より $\text{p}13^{\text{suc1}}$ アフィニティーカラムを用いて精製した (Labbe et al., 1989)。

## § プロテインホスファターゼ2A処理

プロテインホスファターゼ2A (PP2A) の触媒サブユニットは、豚脳抽出液より70 %硫酸沈殿と80 %エタノール沈殿処理を行った後、DEAE-Sepharcel、heparin-Sepharose、Sephadex G-75の三段階のカラムクロマトグラフィーにより精製した (Schlender et al., 1986)。脱リン酸化反応は、サンプルに最終濃度1  $\mu$ g/mlとなるようにPP2A触媒サブユニットを加え、30℃でインキュベートすることにより進行させ、一定時間後に最終濃度



10  $\mu$ M のオカダ酸を加えることで停止させた。

## § 抗MAPKK抗体の作製

*Xenopus* MAPKK の N 末端の部分アミノ酸配列に対する PKKKPTPIQLNP NPEG の 16 アミノ酸残基よりなるペプチドを合成し、このペプチドを BSA にコンジュゲートしたものを抗原としてウサギを免疫した。抗原ペプチドを AF-aminotoyopearl に結合させて作製したカラムによってアフィニティー精製を行った。MAPKK の免疫沈降には抗血清を用い、ウエスタンブロットにはアフィニティー精製抗体を用いた。

免疫沈降は次の方法で行った。プロテイン A セファロースビーズと抗 MAPKK 抗血清を 1:2 (vol:vol) の比で混合し 4°C で 30 分間振とうした。抗 MAPKK 抗体の結合したプロテイン A セファロースを 0.05 % Teew 20 を含む TBS (TBST) で三回洗った後、卵抽出液に対して 1/10 容添加して 4°C で 3 時間振とうした。ビーズを TBST で三回洗った後、組み換え MAP キナーゼをリン酸化する活性を測定した。 [ $^{32}$ P] 正リン酸ラベルした卵から免疫沈降した MAPKK は、TBST による洗いの後サンプル処理を行い、SDS-PAGE を行ってからオートラジオグラフィーで取り込まれた  $^{32}$ P を検出した。

イムノブロットで用いた組織抽出液に関しては、雄の *Xenopus* の各臓器を用いた。三倍容の H-buffer を加えホモジナイズした後、16,000 x g、30 分間の遠心により得た上清を組織抽出液とした。

## § [ $^{32}$ P] 正リン酸ラベル

未成熟卵を 0.5 mCi/ml [ $^{32}$ P] 正リン酸を含む OR2 (82.5 mM NaCl、2.5 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、35 mM Hepes・pH 7.8) 中で 2 時間インキュベートした後に、10  $\mu$ M のプロゲステロンで卵成熟を進行させ 7 時間後に卵抽出液を調製した。

## § MAPKK 活性化活性の測定

MAPKK をリン酸化する活性を調べるために、最終濃度 20  $\mu$ g/ml の脱リン酸化 MAPKK とサンプルを 100  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (5  $\mu$ Ci)、10 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下 30°C で 15 分間インキュベートした。SDS-PAGE 後にオートラジオグラフィーもしくは BAS2000 により MAPKK に取り込まれた  $^{32}$ P を測定した。なお、脱リン酸化 MAPKK は、*Xenopus* 成熟卵より精製した MAPKK

に最終濃度1  $\mu\text{g/ml}$ のPP2Aを加え30℃で30分間インキュベートした後、最終濃度10  $\mu\text{M}$ のオキサ酸を加えることで調製した。

一方、MAPKKを活性化する活性を調べる際には、非放射性のATPを用いてインキュベートした後に、再活性化されたMAPKKの活性を1) 組み換えMAPキナーゼをリン酸化する活性、2) キナーゼ不能型MAPキナーゼをリン酸化する活性、3) 組み換えMAPキナーゼの獲得したMBPキナーゼ活性、の三点について測定することで評価した。

## § MAPKK活性化活性の部分精製

脱ゼリー操作を行った*Xenopus*成熟卵35 mlを出発材料として卵抽出液を調製し、buffer E (20 mM Hepes · pH 7.5、25 mM  $\beta$ -glycerophosphate、2 mM EGTA、0.01 % Brij 35、10 % glycerol、1 mM PMSF、20  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin、2 mM DTT、1 mM sodium vanadate) で平衡化しておいたDEAE-cellulose (50 ml) にかけた。ついで、150 mlの0.1 M NaClを含むbuffer Eでカラムを洗い、100 mlの0.3 M NaClを含むbuffer Eで吸着したタンパク質を溶出した。この0.3 M NaCl溶出画分を、0.3 M NaClを含むbuffer Eで平衡化したphenyl-Sepharose (10 ml) にかけた。30 mlのbuffer Eでカラムを洗い、10 mlの2 % Brij 35を含むbuffer Eで吸着したタンパク質を溶出した。2 % Brij 35による溶出画分を0.1 M NaClを含むbuffer Eで平衡化したSephacryl S-300 (2.8 cm X 50 cm; 300 ml) でゲルろ過を行った。6 mlずつ分画を行い、MAPKKをリン酸化する活性と、MAPKKを活性化する活性の両者を測定した。

## § ショ糖密度勾配遠心

phenyl-Sepharoseカラムにおける2 % Brij溶出画分 (300  $\mu\text{l}$ ) を12 mlの5-20 %の直線ショ糖密度勾配 (20 mM Hepes · pH 7.5、25 mM  $\beta$ -glycerophosphate、2 mM EGTA、0.01 % Brij 35、1 mM PMSF、20  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin、2 mM DTT、1 mM sodium vanadate) に重層し、RPS 40T (日立) のスイングローターを用い、4℃で36,000 rpm、19時間遠心した。400  $\mu\text{l}$  ずつ分取しその一部を用いてMAPKK活性化活性を測定した。マーカーとして、フェリチン、カタラーゼ、IgG、BSA、オボアルブミンを用いた。

## § ホスホアミノ酸分析



リン酸化MAPKKをゲルから切り出し、6 N HCl中で2時間、110℃で加水分解した。ホスホアミノ酸はセルコース薄層板上でpH 1.9とpH 3.5の二次元で泳動して分離した(Boyle et al., 1991)。

## § MAPKK-Kの精製

*Xenopus*MAPKKの配列のN末端側にGSTを融合させたコンストラクトを作製し、大腸菌に発現させた上でGSH-Sepharoseを用いたアフィニティーカラムを用いて精製した。また、カラムクロマトグラフィーの各画分のアッセイ及び免疫沈降の際のMAPKK-Kアッセイには、*Xenopus*MAPKKのN末端側にヘキサヒスチジンを融合させたタンパク質(His-MAPKK)を大腸菌より精製して用いた。

未成熟卵もしくは脱ゼリー操作を行った成熟卵20 mlを出発材料として、あらかじめ100 mM NaClを含むbuffer Eで平衡化したQ-Sepharose (20 ml) にかけて、200 mlの100 -500 mM NaCl直線濃度勾配法により吸着タンパク質を溶出した。各画分に3 µgのHis-MAPKKと3 µgのキナーゼ不能型MAPキナーゼを加え、最終濃度100 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (5 µCi) 及び10 mM MgCl<sub>2</sub>存在下、30℃、50分間インキュベートした。各サンプルをSDS-PAGE後、BAS2000によりキナーゼ不能型MAPキナーゼに取り込まれた放射活性を定量し、MAPKK-K活性とした。免疫沈降物中のMAPKK-K活性も同様に測定した。

Q-Sepharoseにより得られたPeak B (25 ml) を、buffer F (10 mM potassium phosphate · pH 7.0、12.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate、0.1 mM EGTA、0.01 % Brij 35、10 % glycerol、1 mM PMSF、20 µg/ml aprotinin、2 mM DTT、1 mM sodium vanadate) で平衡化したヒドロキシアパタイト (Bio-Gel HTP、5 ml) カラムクロマトグラフィーにより分画した。吸着タンパク質の溶出はbuffer Fとbuffer G (300 mM potassium phosphate · pH 7.0、12.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate、0.1 mM EGTA、0.01 % Brij 35、10 % glycerol、1 mM PMSF、20 µg/ml aprotinin、2 mM DTT、1 mM sodium vanadate) による50 mlのリン酸バッファー直線濃度勾配により行った。さらにヒドロキシアパタイトのピーク画分 (5 ml) をマイクロコン30により濃縮した上で (200 µl)、100 mM NaClを含むbuffer Eで平衡化したSuperose 6 HR16/30により分画した。

一方、Q-Sepharoseにより得られたPeak A (25 ml)を70 % 飽和硫酸により濃縮した後 (2 ml)、100 mM NaClを含むbuffer Eで平衡化したSuperdex 200 pg (Hi-Load 16/60) により分画した。Superdex 200におけるピーク画分 (6 ml) を、あらかじめ200 mM NaClを含むbuffer Eで平衡化したMono



Q HR5/5 にか、20 mlの200-450 mM NaCl直線濃度勾配法により吸着タンパク質の分画を行った。

なお、免疫沈降に用いた抗Raf-1抗体は国立精神神経センターの服部成介博士からの供与であり、イムノプロットに用いた抗Raf-1抗体は協和発酵のKM630を用いた。HSP90のイムノプロットは東京都臨床医学総合研究所・宮田愛彦博士から供与された抗HSP90抗体を用いた。抗GST抗体はMBL社より、抗Mos抗体及び抗B-Raf抗体はSanta Cruze社よりそれぞれ購入した。

## 結果

### § 1. MAPキナーゼ活性化因子の検出

*Xenopus*成熟卵を材料に、MAPキナーゼを活性化する因子を検索した。基質として大腸菌に発現させた組み換え・不活性型MAPキナーゼを用い、*Xenopus*卵抽出液を DEAE-cellulose で展開した各画分と ATP 存在下インキュベートした後、組み換えMAPキナーゼの獲得した MBP キナーゼ活性をゲル内キナーゼアッセイ法で検出した。なお、用いた組み換えMAPキナーゼは*Xenopus*MAPキナーゼの配列のアミノ末端側に10アミノ酸(TMITPSSGNS)が付加されており、SDS-PAGEで内在性のMAPキナーゼより高分子量側に泳動されることを確認した(図1参照)。図1のオートラジオグラフィーが示すように、基質としての組み換えMAPキナーゼを加えない場合には(-rMAPK)、矢頭で示される内在性のMAPキナーゼの活性しか観察されないのに対して(図1右側)、各画分に組み換えMAPキナーゼを加えてインキュベートした場合には(+rMAPK)、未吸着画分(FT)において黒三角で示される組み換えMAPキナーゼの顕著な活性化が観察された(図1左側)。したがって、この未吸着画分にMAPキナーゼを活性化する因子が存在することが示唆された。

### § 2. MAPキナーゼ活性化活性の細胞周期依存的変動

卵成熟過程および受精後の過程においてMAPキナーゼ活性の変動が観察される(Gotoh et al., 1991a)ことから、両過程におけるMAPキナーゼ活性化活性の測定を行った。*Xenopus*未成熟卵にプロゲステロンを加えて卵成熟過程を進行させ、一定時間毎に抽出液を調製した。卵抽出液を DEAE-cellulose にかけ、未吸着画分をMAPキナーゼ活性化因子画分、吸着画分をMAPキナーゼ画分として、MBPゲル内キナーゼアッセイ法によりそれぞれの活性を検出した。図2Aのオートラジオグラフィーが示すように、未成熟卵においては全く検出されなかったMAPキナーゼ活性化活性が卵成熟の進行に伴い顕著に上昇するのが観察された(図2A、黒三角)。このMAPキナーゼ活性化活性の時間変動は、同時に測定した内在性のMAPキナーゼ活性(図2A、矢頭)の時間変動にやや先行していた。また受精後の過程においては、図2Bのオートラジオグラフィーが示すように、M期(0 min)から間期(80 min)に至るにつれMAPキナーゼ

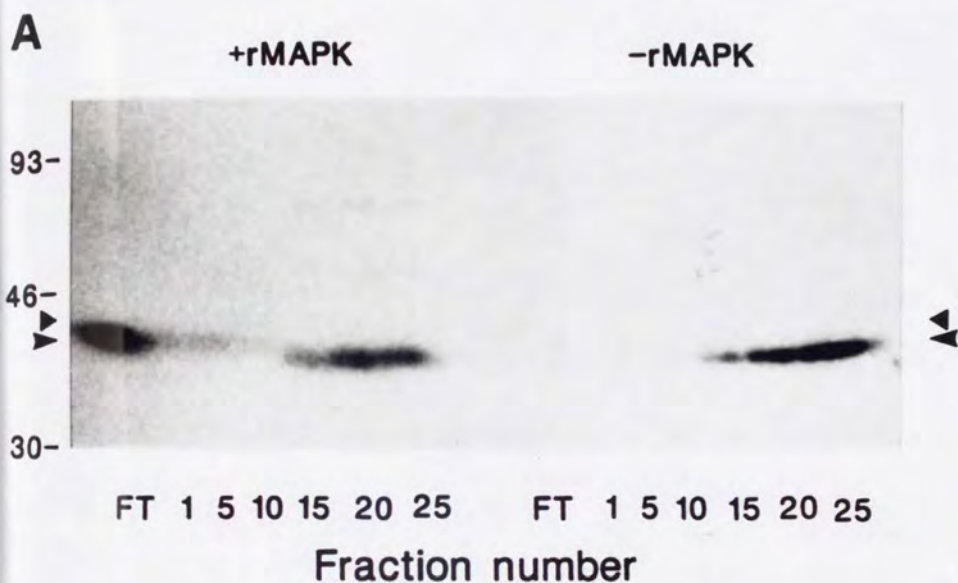


図1 MAPキナーゼ活性化因子の同定

*Xenopus*成熟卵より調製した抽出液 (6 ml) を、buffer A で平衡化したDEAE-cellulose (2 ml) にかけた。6 mlのbuffer Aでカラムを洗い、素通し画分と併せて12 mlを未吸着画分 (FT) とした。40 mlの0-400 mM NaCl直線勾配で展開した後 (1 mlずつ40分画)、組み換えMAPキナーゼ (最終濃度10  $\mu$ g/ml)存在下 (-rMAPK) で50  $\mu$ M ATP、10 mM  $MgCl_2$ とインキュベートした。反応後、MBPゲル内キナーゼアッセイ法で内在性のMAPキナーゼ活性 (矢頭) と組み換えMAPキナーゼ (黒三角) の活性を検出した。成熟卵抽出液に見いだされたMAPキナーゼ活性化活性のうち、95 %以上がFT画分に回収された。



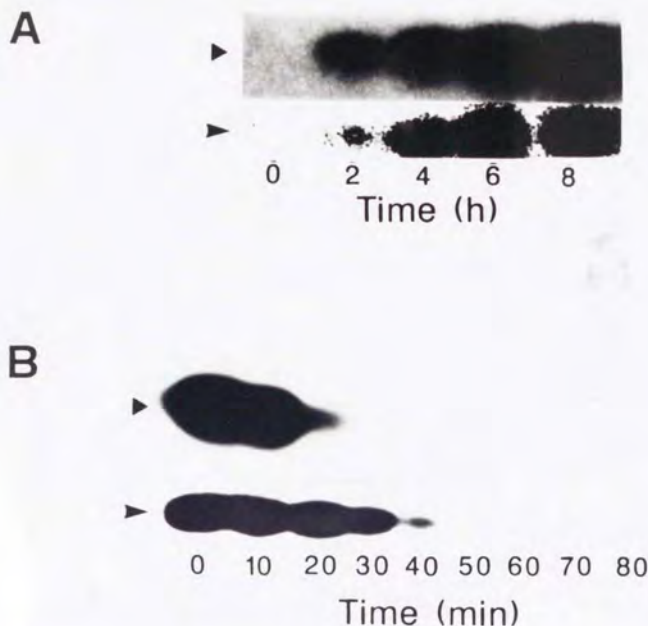


図2 MAPキナーゼ活性化因子とMAPキナーゼの活性変動

(A) 卵成熟過程における活性変動。未成熟卵にプロゲステロン (最終濃度10  $\mu$ M) を加えてから一定時間毎に卵抽出液を調製し、DEAE-celluloseクロマトグラフィーによりMAPキナーゼ活性化因子画分 (未吸着画分) とMAPキナーゼ画分 (吸着画分) に分画した。未吸着画分を組み換えMAPキナーゼとATP存在下で反応させてから、組み換えMAPキナーゼの獲得した活性をMBPゲル内キナーゼアッセイ法で測定することにより、MAPキナーゼ活性化活性 (黒三角) を検出した。MAPキナーゼ活性 (矢頭) は吸着画分をMBPゲル内キナーゼアッセイ法で測定することにより検出した。

(B) 受精後の活性変動。成熟卵を受精させ、受精後一定時間毎に卵抽出液を調製した。MAPキナーゼ活性化活性 (黒三角) とMAPキナーゼ活性 (矢頭) を(A)と同じ方法で測定した。

活性化活性の急激な低下が観察された(図2B、黒三角)。この場合も内在性のMAPキナーゼ活性の低下(図2B、矢頭)にやや先行して、MAPキナーゼ活性化活性の変動が見られた。以上よりMAPキナーゼ活性ばかりでなく、MAPキナーゼ活性化活性も細胞周期に伴って変化することが明らかとなった。また、MAPキナーゼ活性化活性の変動が常にMAPキナーゼの活性変動に先行していることから、このMAPキナーゼ活性化活性が実際に細胞内で直接の上流としてMAPキナーゼの活性調節を担っていることが示唆された。

### § 3. MAPキナーゼ活性化因子の精製

MAPキナーゼ活性化活性を担う因子を当研究室の小迫と共同で精製した。DEAE-cellulose、heparin-Sepharose、ヒドロキシアパタイト、およびMono Sの四段階のカラムクロマトグラフィーにより、MAPキナーゼ活性化活性を担う因子として45 kDaの単一のポリペプチドが精製された(図3、黒三角)。精製45 kDa活性化因子は、Sephadex G-100を用いたゲルろ過において見かけの分子量~55Kの位置に溶出することが見い出され(図省略)、モノマーとして機能することが示唆された。精製過程のアーティファクトとしてモノマーになった可能性も考慮して、成熟卵抽出液を同様にゲルろ過で分析した。その場合にもMAPキナーゼ活性化活性は見かけの分子量~55Kに溶出したことから(図省略)、45 kDaMAPキナーゼ活性化因子が細胞内においてモノマーとして存在することが示された。種々の実験(主に当研究室の小迫により行われた)から、この活性化因子がタンパク質キナーゼであることが示された。そこで以下、この45 kDaMAPキナーゼ活性化因子をMAPキナーゼキナーゼ、MAPKK、と呼ぶ。

### § 4. プロテインホスファターゼ2A処理によるMAPKK活性の失活

M期事象は、M期開始因子でありそれ自身がセリン/スレオニンキナーゼであるMPF(=p34<sup>cdc2</sup>/サイクリンB複合体)に始まるリン酸化カスケードにより引き起こされると考えられており、M期に活性化するMAPKKもまたリン酸化により活性調節を受けている可能性が考えられた。そこでセリン/スレオニンホスファターゼであるプロテインホスファターゼ2A (PP2A) で精製MAPKKを処理した。PP2Aを加えてから一定時間毎に反応液の一部をとり、PP2Aの阻害剤であるオカダ酸を加えた後MAPKK

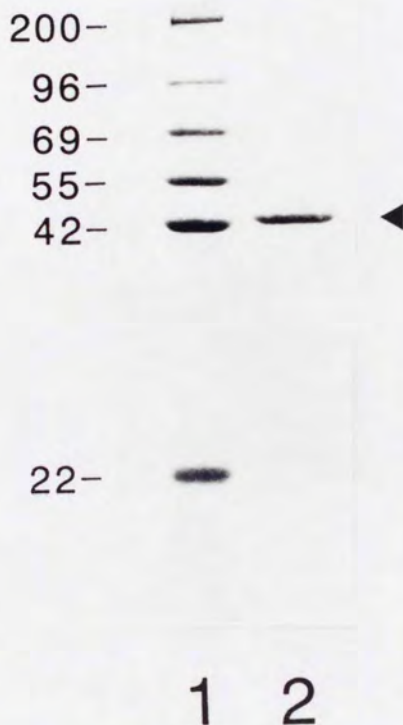


図3 45 kDaMAPキナーゼ活性化因子 (MAPKK) の精製

*Xenopus*成熟卵抽出液 (500 ml) から、DEAE-cellulose、heparin-Sepharose、ヒドロキシアパタイト、Mono Sの四段階のカラムクロマトグラフィーを行い、最終精製標品 (Mono Sのピーク画分、0.18 M NaCl溶出画分) をSDS-PAGEで分析した。ほぼ単一バンド (クマシー染色、黒三角) にまで精製された (右レーン)。左レーンは分子量マーカータンパク質。



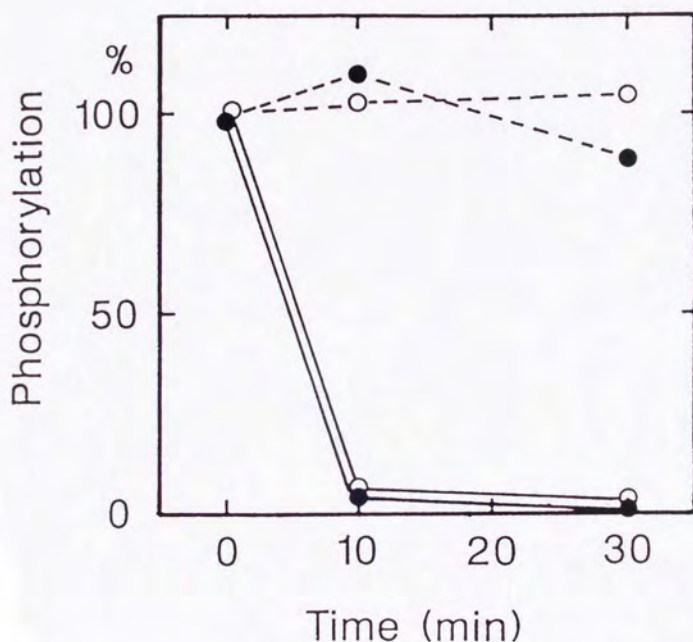


図4 PP2A処理によるMAPKK活性の低下

精製MAPKKをPP2A触媒サブユニット (最終濃度1  $\mu\text{g/ml}$ ) と30℃でインキュベートし、PP2Aのインヒビターであるオクタ酸を最終濃度10  $\mu\text{M}$ になるように加え反応を止めた後、MAPキナーゼをリン酸化する活性(○)と活性化する活性(●)を測定した(実線)。点線は対照実験として精製MAPKKをPP2Aとインキュベートする際にあらかじめオクタ酸を加えた場合の結果を表わす。

活性を測定した。図4のグラフに示すように、PP2A処理に伴い組み換えMAPキナーゼをリン酸化する活性(○)と活性化する活性(●)の両者がともに顕著に低下した。あらかじめオカダ酸を加えた上でインキュベートした場合には、図の点線で示されるようにMAPKK活性の低下は見られなかった。したがって、MAPKK活性の低下は、PP2Aフラクション中に混入したプロテアーゼ等により引き起こされたアーティファクトではなく、PP2Aの持つホスファターゼ活性によるものであることが確認された。すなわち、MAPKKはその活性化にリン酸化を必要とすることが明らかとなった。

## § 5. MPFキナーゼカスケードにおけるMAPKKの位置付け

MAPKKが実際に細胞内で機能しうるかを、*Xenopus*未成熟卵へのマイクロインジェクション及び*Xenopus*卵間期無細胞抽出液への添加の二つの系を用いて調べた。成熟卵より精製したMAPKKを未成熟卵へマイクロインジェクションした後、一定時間毎に卵抽出液を調製し、内在性のMAPキナーゼ活性をMBPゲル内リン酸化法により検出した。図5Aのオートラジオグラフィーが示すように、未成熟卵中にはほとんど見られないMAPキナーゼ活性(矢頭)が、MAPKKのマイクロインジェクション後5分で顕著な活性化を示し始め、10分でピークに達した。その後やや活性の低下は見られるものの120分まで活性が観察された。また、精子の添加により間期に移行させた*Xenopus*卵から無細胞抽出液を調製し、そこに成熟卵から精製したMAPKKを加えてインキュベートした後、MBPゲル内リン酸化法によりMAPキナーゼ活性を測定した。図5Bのオートラジオグラフィーが示すようにMAPキナーゼ活性(矢頭)の顕著な上昇が観察された。精製MAPKK自身はMBPゲル内リン酸化法でリン酸化活性を示さないこと、およびバッファーのみを未成熟卵にインジェクトした場合や無細胞系に添加した場合にはMAPキナーゼの活性上昇は見られなかったことから、MAPKKの作用で内在性のMAPキナーゼが活性化されたことが示された。

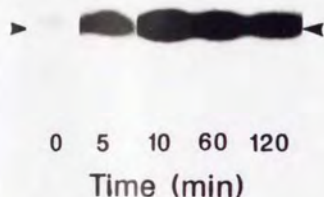
当研究室の後藤等により、MAPキナーゼがM期開始因子であるMPFの下流で活性化することが明らかとなっている(Gotoh et al., 1991b)。MAPキナーゼ活性化因子であるMAPKKがMPFとどのような関係にあるかを調べるために、MPFの添加に伴うMAPKKの活性変動を測定した。まず、精製*Xenopus*MPFを*Xenopus*未成熟卵にマイクロインジェクションした後、一定時間毎に卵抽出液を調製してDEAE-celluloseにかけ、未吸着画分を



## Microinjection

## Cell-free System

A



B

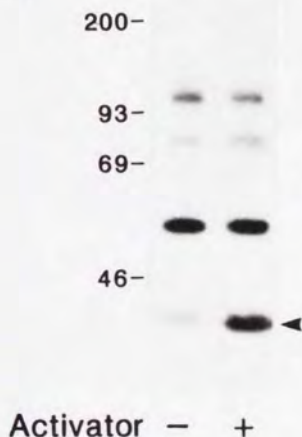


図5 精製MAPKKによるMAPキナーゼの活性化

(A) 未成熟卵への精製MAPKKのマイクロインジェクション。精製MAPKKを未成熟卵へインジェクション後、示された時間に卵抽出液を調製し、抽出液中のMAPキナーゼ活性(矢頭)をMBPゲル内キナーゼアッセイ法により測定した。

(B) 間期無細胞系へのMAPKKの添加。最終濃度10  $\mu\text{g/ml}$ の精製MAPKK存在下(Activator +) 及び非存在下(Activator -) で間期無細胞系を25 $^{\circ}\text{C}$ 、15分間インキュベートした後、SDSサンプルバッファーを加えて反応を止めた。抽出液のMAPキナーゼ活性をMBPゲル内キナーゼアッセイ法で測定した。矢頭は内在性のMAPキナーゼを示す。

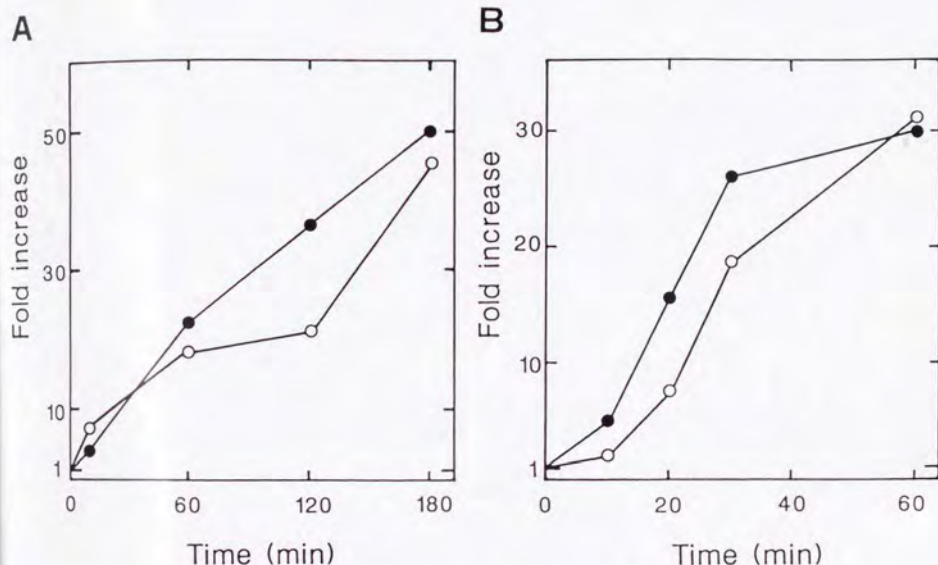


図6 MPFによるMAPKKの活性化

(A) 未成熟卵への精製*Xenopus*MPFのマイクロインジェクション。精製MPFを未成熟卵にインジェクション後、卵抽出液を調製しDEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーにより粗分画を行った。図2と同様の方法でMAPKK活性(●)とMAPキナーゼ活性(○)を検出し放射活性を定量化した。この実験においては、注入した精製MPFは成熟卵に存在するMPFの約5% (ヒストンH1キナーゼ活性を指標として評価) に相当した。

(B) 間期無細胞系への精製*Xenopus*MPFの添加。成熟卵に存在するMPFの約20%に相当する量を間期無細胞系に添加後、25℃でインキュベートした。(A)と同様の方法でMAPKK活性(●)とMAPキナーゼ活性(○)を測定した。



MAPKK画分、吸着画分をMAPキナーゼ画分としてそれぞれの活性を測定した。MPFのインジェクション後、MAPKK活性(●)、MAPキナーゼ活性(○)は共に顕著に上昇した(図6A)。次に、間期無細胞抽出液に精製MPFを添加した後、一定時間毎に抽出液の一部をとりDEAE-celluloseで分画後、MAPKKとMAPキナーゼの活性を測定した。MPF添加後MAPKKの活性(図6B、●)が上昇し、それにやや遅れてMAPキナーゼの活性化(図6B、○)が観察された。以上、二種の系を用いた実験により、MAPKKがMPFの下流で活性化されることが明らかとなった。

そこでMPFが直接MAPKKをリン酸化し活性化する可能性を検討した。PP2A処理により失活させたMAPKKをMPFとATP存在下インキュベートすることで再活性化することを試みたが、有意な再活性化は観察されなかった(図省略)。すなわちMPFの下流のカスケードにおいて、MPFとMAPKKとの間には少なくとも一つ以上の因子が存在することが示唆された。

## § 6. 抗MAPKK抗体の作製

MAPKKの解析を進めるために、抗MAPKK抗体を作製した。精製したMAPKKのN末端アミノ酸配列をもとに、16アミノ酸残基からなるペプチドを合成し、ウサギに免疫して抗MAPKK抗体を得た。抗体の特異性を調べるために、成熟卵抽出液及び精製*Xenopus* MAPKKに対してイムノブロッティングを行った(図7A)。作製した抗MAPKK抗体は、45 kDaの精製MAPKKを認識し(図7A、レーン2、黒三角)、成熟卵抽出液においても45 kDaのMAPKKのみを特異的に認識した(図7A、レーン1)。抗MAPKK抗体を抗原ペプチドとインキュベートした後にイムノブロッティングを行うと、45 kDa MAPKKとの反応性は消失した(図省略)。また、この抗体を用いて成熟卵抽出液より免疫沈降を行い、ATP存在下組み換えMAPキナーゼとインキュベートしたところ、MAPキナーゼの顕著な活性化が見られた(図8参照)。抗原ペプチド存在下での免疫沈降物中にはMAPKK活性が見られなかった(図省略)。以上の結果から、この抗体は45 kDa MAPKKに特異的であることが示された。

*Xenopus*の各臓器抽出液に対して抗MAPKK抗体によるイムノブロッティングを行った(図7B)。抗MAPKK抗体はいずれの臓器抽出液中においても45 kDa MAPKKを特異的に認識した。また発現量に差は見られるものの(特に脳において高い発現が観察された)、ほぼ全ての臓器でMAPKKの発現が見られた。このことはMAPKK/MAPキナーゼが生体内の様々な局面で機能していることを示唆するものと考えられる。

**A**

1 2

**B**

Tissue distribution of MAPK activator

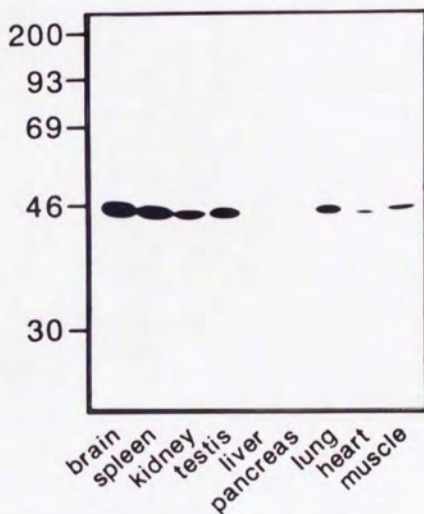


図7 抗MAPKK抗体の作製

(A) 成熟卵抽出液 (レーン1) 及び精製MAPKK (レーン2) に対して抗MAPKK抗体を用いたイムノプロットを行った。黒三角は45 kDa MAPKKの泳動位置を示す。

(B) アフィニティー精製した抗MAPKK抗体により *Xenopus* の各組織抽出液 (各々10 µg) に対してイムノプロットを行った。



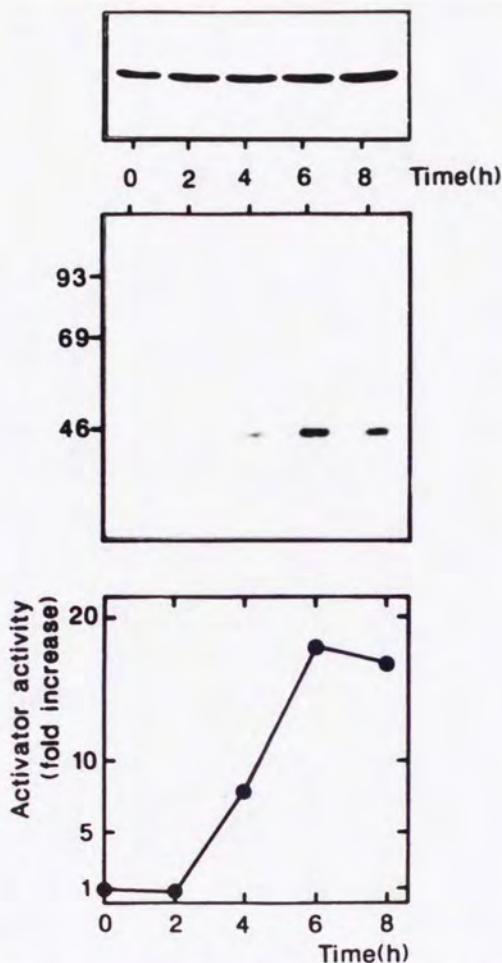


図8 卵成熟に伴うMAPKKの活性化とリン酸化

未成熟卵にプロゲステロン(最終濃度 $10\mu\text{M}$ )を添加して卵成熟を進行させ、一定時間毎に卵抽出液を調製した。各々の時間におけるMAPKKのタンパク量を抗MAPKK抗体によるイムノブロットにより検出した(上段)。同時に、抗MAPKK抗体による免疫沈降を行い、MAPKK活性の変動を測定した(下段)。 $0.5\text{ mCi/ml}$  [ $^{32}\text{P}$ ]正リン酸により3時間ラベルした未成熟卵に同様にプロゲステロンを添加して卵成熟を進行させ、一定時間毎に卵抽出液を調製した。抗MAPKK抗体により卵抽出液中のMAPKKを免疫沈降した後、SDS-PAGEを行いオートラジオグラフィーによりMAPKKに取り込まれた放射活性を検出した(中段)。

## § 7. MAPKKの活性調節機構

抗MAPKK抗体を用いて卵成熟過程におけるMAPKKの解析を行った。プロゲステロンにより卵成熟過程を進行させ、一定時間毎に抽出液を調製しイムノプロットングを行ったところ、MAPKKは卵成熟過程においてタンパク量が変化しないことが見いだされた(図8上図)。次に、卵抽出液から抗MAPKK抗体によりMAPKKを免疫沈降し、組み換えMAPキナーゼとATP存在下インキュベートした後にMBPゲル内キナーゼアッセイ法によりMAPキナーゼの活性を測定することでMAPKK活性を測定した。卵成熟に伴いMAPKKの顕著な活性化が見られた(図8下図)。あらかじめ $^{32}$ P正リン酸ラベルしておいた未成熟卵にプロゲステロンを作用させて卵成熟を進行させた後、抗MAPKK抗体によりMAPKKを免疫沈降しSDS-PAGEの後オートラジオグラフィーをとった(図8中図)。その結果、MAPKKは未成熟卵ではほとんどリン酸化されていないのに対し、卵成熟が進みM期(6h)に至るにつれて顕著にリン酸化されることが明らかとなった。またそのリン酸化の程度はMAPKKの活性化と完全に対応していた(図8中・下図)。以上の結果と、PP2A処理によりMAPKK活性が失活するという結果(図4)から、MAPKKはリン酸化により活性化することが示された。

## § 8. MAPKK活性化因子の検索

MAPKKがリン酸化により活性化されることが明らかとなったので、次に*Xenopus*成熟卵を材料に、MAPKKをリン酸化し活性化する因子、MAPKK-キナーゼ(以下MAPKK-K)の検索を行った。MAPKK-K活性として、1) MAPKKをリン酸化する活性と、2) MAPKKの持つ「MAPキナーゼを活性化する活性」を上昇させる活性、の二点に注目して分画を行った。2)についてはMAPKKの同定の際に用いた手法と同様に、MBPゲル内キナーゼアッセイ法による組み換えMAPキナーゼの活性測定及び組み換えMAPキナーゼをリン酸化する活性の測定により、「MAPキナーゼを活性化する活性」を評価した。基質としてPP2Aで脱リン酸化したMAPKKを用い、*Xenopus*成熟卵抽出液をDEAE-celluloseにより分画した画分とATP存在下インキュベートした。基質非存在下のインキュベーションを対照とした。反応液中にさらに組み換えMAPキナーゼを加えインキュベーションし、組み換えMAPキナーゼの活性化の程度をMBPゲル内キナーゼアッセイ法により定量した。図9Aの白いバーは脱リン酸化したMAPKKを加えない場合の活性で、内在性のMAPKK活性を表わしている。黒いバーが外からMAPKKを加えた場合の活性であり、黒いバー



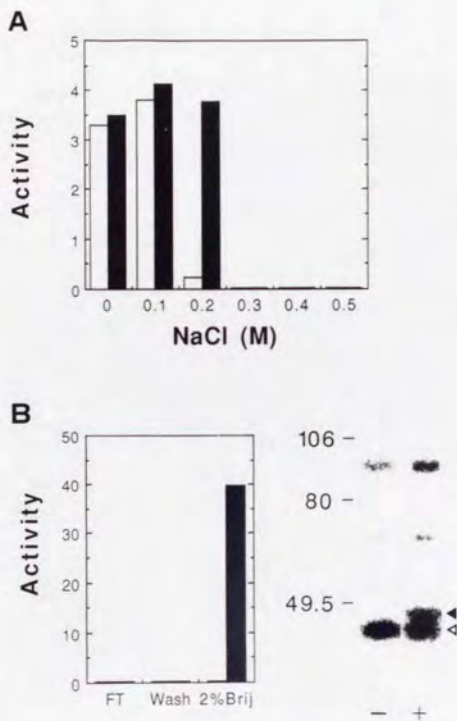


図9 MAPKK活性化活性の検出

(A) DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーによる分画。*Xenopus*成熟卵 (1 ml) より抽出液を調製し (50 ml)、DEAE-cellulose (2 ml) カラムにかけた。カラムを 10 ml の buffer E で洗い、素通り画分と併せて 0 M NaCl 画分とした (60 ml)。吸着したタンパク質は、3 ml の各 NaCl 濃度の buffer E により、段階的に溶出した。各画分をあらかじめ PP2A 処理により不活性型にした 20  $\mu$ g/ml の MAPKK 存在下 (■) あるいは非存在下 (□) で 100  $\mu$ M ATP、10 mM  $MgCl_2$  と 30℃、15 分間インキュベートした。反応終了後、組み換え MAP キナーゼ (20  $\mu$ g/ml) を加えてさらにインキュベートを行い、MBP ゲル内キナーゼアッセイ法により組み換え MAP キナーゼの活性を測定し定量した (■及び□)。この■と□の差が MAPKK 活性化活性に相当する。

(B) phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィーによる分画。DEAE-cellulose クロマトグラフィーにおける活性画分 (0.1-0.3 M) を phenyl-Sepharose カラムにかけて、素通り画分 (FT)、0 M NaCl による洗い画分 (Wash)、2% Brij 35 による溶出画分 (2% Brij) を得た。各画分について (A) と同様な活性測定を行った (図 9B、左図)。右図に 2% Brij 画分における MBP ゲル内キナーゼアッセイ法のオートラジオグラフィーを示す。黒三角と白三角はそれぞれ組み換え MAP キナーゼと内在性の MAP キナーゼの位置を示す (左レーン、MAPKK 非存在下 (-); 右レーン、MAPKK 存在下 (+))。

と白いバーの差が外から加えたMAPKKが活性化された程度を表わしている(外から加えたMAPKKは脱リン酸化処理されているため、MAPKK活性化因子とインキュベーションしない限り活性を全く持たない)。図9Aに示すように、MAPKKを活性化する活性はDEAE-celluloseカラムから0.2 M NaClで溶出された。

MAPKK活性化活性の分画を進めるために、DEAE-celluloseの活性画分をphenyl-Sepharoseにかけた(図9B、左図)。MAPKK活性化活性は、素通し画分(FT)、0 M NaClでの洗い画分(Wash)には見い出されず、2 % Brij35溶出画分にのみ見い出された(2 % Brij)。2 % Brij画分におけるMBPゲル内キナーゼアッセイ法のオートラジオグラフィーを示した(図9B、右図)。MAPKKを加えない時には(-レーン)、白三角で表わされた内在性のMAPキナーゼ活性しか検出されないのに対し、外から脱リン酸化したMAPKKを加えた時には(+レーン)、黒三角で示す組み換えMAPキナーゼの活性化が検出された。このことは2 % Brij画分にMAPKK活性化活性が分画されたことを示す。

## §9. MAPKKのMAPKK-KとMAPキナーゼによるリン酸化

DEAE-celluloseとphenyl-Sepharoseの二段階のカラムクロマトグラフィーで部分精製されたMAPKK活性化活性を、Sephacryl S-300カラムによるゲルろ過で分画した。ゲルろ過によって得られた各画分と脱リン酸化したMAPKKを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下インキュベートして、MAPKKに取り込まれた放射活性を定量化した(図10A)。MAPKKをリン酸化する活性は、見かけの分子量が約400 kDaの位置と約40 kDaの位置の二点においてピークを示した。以降、前者をピーク1、後者をピーク2と呼ぶ。次に同じ画分を用いて、MAPKKを再活性化する活性を三種類の方法により測定した。第一に、組み換えMAPキナーゼをリン酸化する活性を外から脱リン酸化したMAPKKを加えた場合(図10B、●)と加えない場合(図10B、○)で比較した。●と○の差がMAPKKの再活性化の程度を表わしている。ピーク1がMAPKKを再活性化する活性を持つのにに対し、ピーク2は持たなかった。第二に、キナーゼ不能型の組み換えMAPキナーゼを基質としてリン酸化活性を測定した。図11Aはオートラジオグラフィーを表わし、外から加えたMAPKKが存在する場合にのみ(下段、+)、ピーク1の位置において矢印で示したキナーゼ不能型組み換えMAPキナーゼへのリン酸化が見られた。第三に、組み換えMAPキナーゼの活性化をMBPゲル内キナーゼアッセイ法により検出した。図11Bはオートラジ



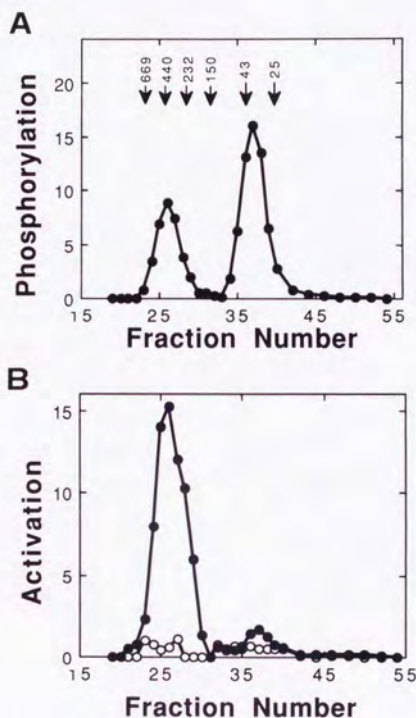


図10 Sephacryl S-300 による分画 (I)

phenyl-SepharoseにおけるMAPKK活性化活性画分(2% Brij画分)をSephacryl S-300 (300 ml) によるゲルろ過で分画した。

(A) MAPKKをリン酸化する活性。各画分を100  $\mu$ M  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP (5  $\mu$ Ci) と10 mM  $\text{MgCl}_2$ 存在下、脱リン酸化したMAPKK (最終濃度20  $\mu$ g/ml) と30℃、15分間インキュベートした。SDS-PAGEの後BAS2000によりMAPKKに取り込まれた放射活性を定量した。分子量マーカーの溶出位置を矢印で示す。

(B) MAPKKを活性化する活性。各画分と脱リン酸化したMAPKK (最終濃度20  $\mu$ g/ml) を100  $\mu$ M ATP と10 mM  $\text{MgCl}_2$ 存在下、30℃、15分間インキュベートした後、組み換えMAPキナーゼ (20  $\mu$ g/ml) 及び5  $\mu$ Ci  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPを添加し、さらに15分間インキュベートした後SDS-PAGEを行い、組み換えMAPキナーゼに取り込まれた放射活性をBAS2000により定量した (●)。○は対照。

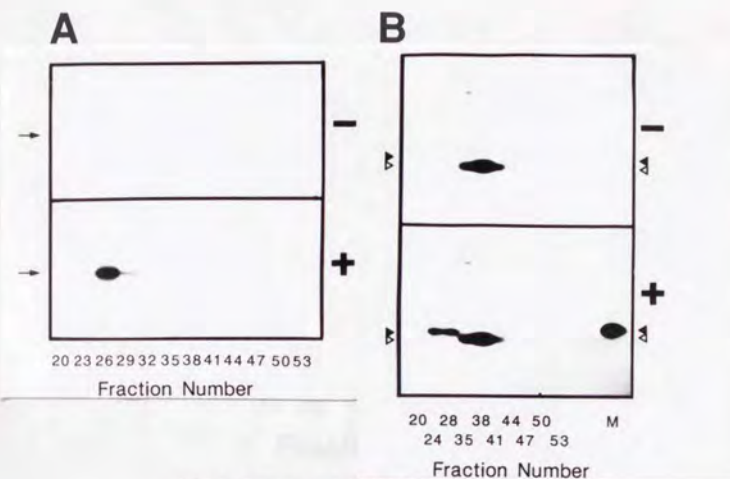


図11 Sephacryl S-300 による分画 (II)

図10に示したSephacryl S-300の各画分のMAPKK活性化活性をさらに二通りの方法で測定した。

(A) 各画分を脱リン酸化したMAPKK (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在下 (+, 下段) あるいは非存在下 (-, 上段) で100  $\mu\text{M}$  ATPと10 mM  $\text{MgCl}_2$  存在下インキュベートした後に、図10(B)と同様の方法でキナーゼ不能型MAPキナーゼをリン酸化する活性としてMAPKKの獲得した活性を測定した。オートラジオグラフィーを示す。矢印はキナーゼ不能型MAPキナーゼの泳動位置を示す。

(B) 各画分を脱リン酸化したMAPKK存在下 (+, 下段) あるいは非存在下 (-, 上段) で野性型組み換えMAPキナーゼ、ATP、 $\text{MgCl}_2$ とともに30℃、30分間インキュベートした。そのサンプルをMBPゲル内キナーゼアッセイ法で分析した。黒三角、白三角はそれぞれ組み換えMAPキナーゼ及び内在性のMAPキナーゼの位置を示す。M: 活性型のMAPKKと組み換えMAPキナーゼをATP存在下インキュベートしたものをコントロールとして泳動した。



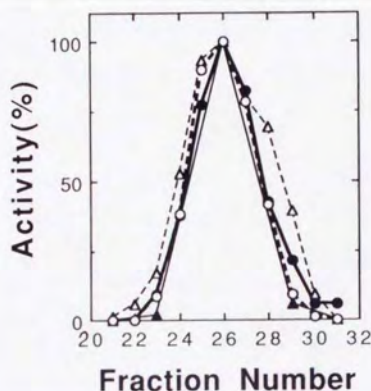


図12 Sephacryl S-300のピーク1におけるMAPKK活性化活性と  
MAPKKリン酸化活性の溶出の一致

Sephacryl S-300の各画分 (ピーク1 周辺、本文参照) の活性を定量化して示した。

●、MAPKKをリン酸化する活性；△、外から加えたMAPKKに依存した野性型組み換えMAPキナーゼのリン酸化；▲、外から加えたMAPKKに依存したキナーゼ不能型MAPキナーゼのリン酸化；○、各画分によって活性化されたMAPKK (外から加えた脱リン酸化MAPKK) が野性型組み換えMAPキナーゼを活性化する活性をMBPゲル内キナーゼアッセイ法で定量したもの。すなわち、△、▲および○はMAPKK活性化活性を表わす。

オグラフィーを表わし、この場合も外から加えたMAPKKとピーク1が共存する場合にのみ、黒三角で示される組み換えMAPキナーゼの活性化が見られた。

以上の結果を数量化し、ピーク1付近についてグラフ化したのが図12である。MAPKKをリン酸化する活性と、三種類の方法で検出されるMAPKKを活性化する活性はピーク1においてほぼ完全に一致して溶出しており、ピーク1に存在する因子がMAPKKのリン酸化と活性化を引き起こすMAPKK-Kとして働きうることが示唆された。一方、ピーク2はMAPKKをリン酸化する活性のみを有していた。図11Bにおいて白三角で示される内在性のMAPキナーゼ活性の溶出が、ピーク2のMAPKKリン酸化活性の溶出と完全に一致していることからピーク2がMAPキナーゼであることが示唆された(後述)。

phenyl-Sepharoseで得られたMAPKK-K画分を5-20%ショ糖密度勾配遠心法により分画した。各々の画分によるMAPKKの活性化を、組み換えMAPキナーゼへのリン酸の取り込みにより評価した。図13の●は外から脱リン酸化したMAPKKを加えた場合の、○は加えない場合のMAPキナーゼへのリン酸の取り込みを示し、●と○の差がMAPKK活性化活性、すなわちMAPKK-K活性を表わす。MAPKK-K活性は高分子領域に沈降し、マーカー分子との比較からS値は約9.2であることが見い出された。ゲルろ過の結果と併せて、分子量は250-350 Kと推測された。

ゲルろ過において分画されたピーク1とピーク2を各々DEAE-celluloseにより再度展開した(図14)。ピーク1のMAPKKをリン酸化する活性(●)と、MAPKKを活性化する活性(▲)は約0.15 Mをピークとしてほぼ完全に一致して溶出され(図14A)、ピーク1に存在する因子がMAPKK-Kとして機能することが確認された。ピーク2をDEAE-celluloseで分画して、MAPKKをリン酸化する活性(●)とMAPキナーゼ活性(○)を測定した(図14B)。両者はほぼ完全に一致して溶出されており、ピーク2に存在するMAPKKをリン酸化する活性がMAPキナーゼであることが示された。

脱リン酸化したMAPKKを、ピーク1、ピーク2及び成熟卵から精製した*Xenopus* MAPキナーゼによりリン酸化した(図15A)。MAPKKのみ(図15、レーン7)、あるいは各画分のみ(図15、レーン1、3および5)ではリン酸化バンドが見い出せないことから、45 kDa MAPKKがそれぞれの画分に含まれるキナーゼによってリン酸化されることが確認された。またこの実験において精製MAPキナーゼがMAPKKをリン酸化することも確認された。さらに、リン酸化されたMAPKKをゲルから切り出してホスホアミノ酸分析を行った。同時に、 $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸ラベルした成熟卵からMAPKKを免疫沈降し、SDS-PAGEを行った後に同じくゲルから切り出



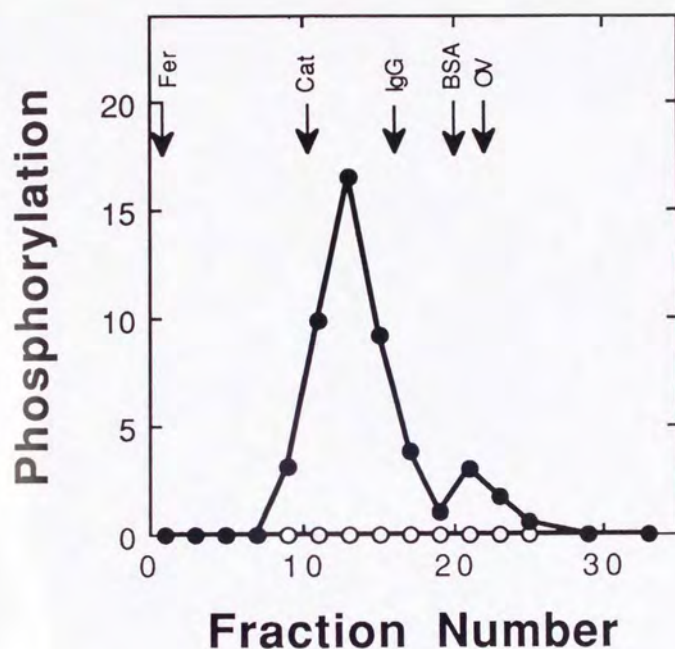


図13 ショ糖密度勾配遠心法によるMAPKK活性化活性の分画

phenyl-Sepharoseカラムクロマトグラフィーの2% Brij画分のうち300  $\mu$ lを12 mlの5-20%のショ糖密度勾配に重層した後遠心した。400  $\mu$ lずつ分画を行い、各画分のMAPKK活性化活性を測定した。各画分に脱リン酸化したMAPKKを加えてATP存在下インキュベートした後に、組み換えMAPキナーゼをリン酸化する活性を測定した(●)。○は脱リン酸化したMAPKKを加えない場合の対照実験。マーカータンパク質として、フェリチン (Fer)、カタラーゼ (Cat)、 $\gamma$ -グロブリン (IgG)、ウシ血清アルブミン (BSA)、オボアルブミン (OV) の沈降位置を矢印で示す。

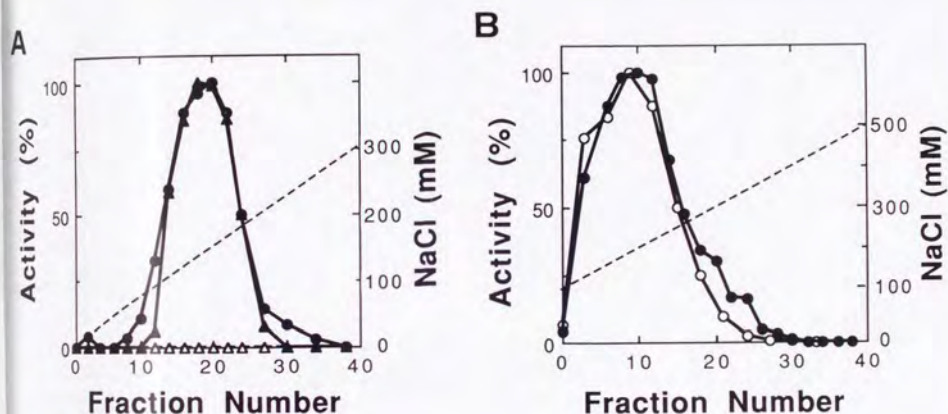


図14 DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーによる再分画

- (A) Sephacryl S-300のピーク1 (フラクションNo. 25と26) をbuffer Eで希釈した後、DEAE-cellulose (2 ml) にかけて、40 mlの0.03 M NaCl直線勾配により分画した。MAPKKをリン酸化する活性 (●)、MAPKKと各画分をATP存在下インキュベートした後測定した組み換えMAPキナーゼをリン酸化する活性 (=MAPKK活性化活性、▲) 及びその対照 (△) を示した。
- (B) Sephacryl S-300のピーク2 (フラクションNo. 36-38) を0.1 M NaClを含むbuffer Eで平衡化したDEAE-cellulose (2.5 ml) にかけて、50 mlの0.1-0.5 M NaCl直線勾配により分画した。MAPKKをリン酸化する活性 (●) と内在性のMAPキナーゼ活性 (○) の溶出パターンを示した。



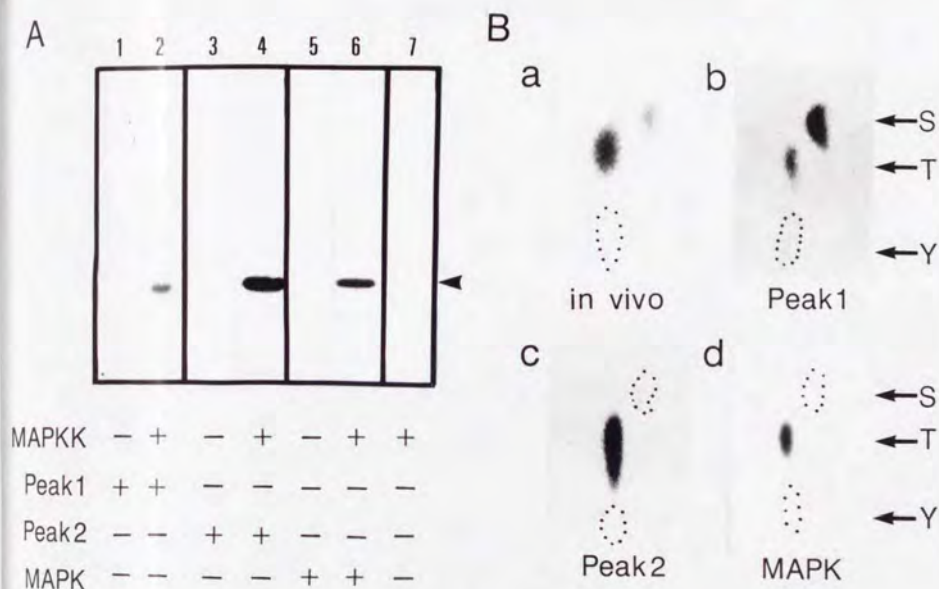


図15 *In vivo*及び*in vitro*でリン酸化されたMAPKKのホスホアミノ酸分析

(A) Sephacryl S-300のピーク1,ピーク2、あるいは精製MAPキナーゼと50  $\mu$ M ATP (20  $\mu$ Ci)、10 mM  $MgCl_2$  を、脱リン酸化したMAPKK存在下(レーン2、4、6及び7)あるいは非存在下(レーン1、3及び5)で30℃、20分間インキュベートした。サンプルを電気泳動し、オートラジオグラフィーを行った。矢頭はMAPKKの泳動位置を示す。

(B) [ $^{32}$ P]正リン酸ラベルした卵から、抗MAPKK抗体によりMAPKKを免疫沈降した。SDS-PAGEを行い、45 kDaのMAPKKに相当するバンドを切り出して二次元ホスホアミノ酸分析を行った(a)。*In vitro*でリン酸化されたMAPKKのバンドを(A)の各レーンから切り出しホスホアミノ酸分析を行った(レーン2、ピーク1、(b)；レーン4、ピーク2、(c)；レーン6、精製MAPキナーゼ、(d))。S：ホスホセリン、T：ホスホスレオニン、Y：ホスホチロシンを表わす。

して*in vivo*においてリン酸化されたMAPKKのホスホアミノ酸分析を行った。図15Bはこれらの結果を示したものである。*In vivo*においてリン酸化されたMAPKKにおいては、ホスホセリンとホスホスレオニンの比が約1:5であった(図15B、a)。これに対しピーク1は主としてMAPKKのセリン残基をリン酸化し(図15B、b)、ピーク2すなわちMAPキナーゼはほぼ選択的にスレオニン残基をリン酸化した(図15B、cおよびd)。以上の結果より、MAPKKは*in vivo*において、上流の因子であるMAPKK-K(=ピーク1)によってリン酸化され活性化されるばかりでなく、その直接の下流の因子であるMAPキナーゼ(=ピーク2)によってもリン酸化を受けていることが示唆された。

## § 10. 卵成熟過程に伴うMAPKK-K活性の変動

卵成熟過程に伴うMAPKK-K活性の変化の有無を明らかにするために、*in vivo*の状態を反映すると考えられる無細胞系を用いてMAPKK-K活性の測定を行った。*Xenopus*未成熟卵および成熟卵から無細胞抽出液を調製し、そこにグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)に融合したMAPKK(GST-MAPKK)を加えてインキュベートした後、抗GST抗体によりGST-MAPKKを免疫沈降した。対照として無細胞抽出液の調製時に用いたバッファーとインキュベートした上、同様に抗GST抗体により免疫沈降したGST-MAPKKを用いた(図16、Control)。各々の免疫沈降物中のMAPKK活性を組み換え型MAPキナーゼを活性化する活性として測定・定量し、GST-MAPKKを活性化する活性、すなわちMAPKK-K活性とした(図16)。GST-MAPKKは未成熟卵から調製した無細胞抽出液とのインキュベートによりわずかに活性化し(図16、ControlとImmatureの比較)、一方成熟卵から調製した無細胞抽出液とのインキュベートにより顕著な活性化を示した(図16、Mature)。したがって、卵成熟過程において細胞内のMAPKK-K活性が上昇していることが示唆された。

次に、成熟卵抽出液に見い出されたMAPKK-K活性の局在を検討した。成熟卵から調製した無細胞抽出液を、高速遠心により細胞質画分と膜画分に分画した。細胞質に存在するMAPKK-K活性(図17、Sup)と膜画分に存在するMAPKK-K活性(図17、Ppt)を、GST-MAPKKを活性化する活性として測定しその比をグラフに表わした(図17)。約80%のMAPKK-K活性が細胞質に存在することが見い出された。

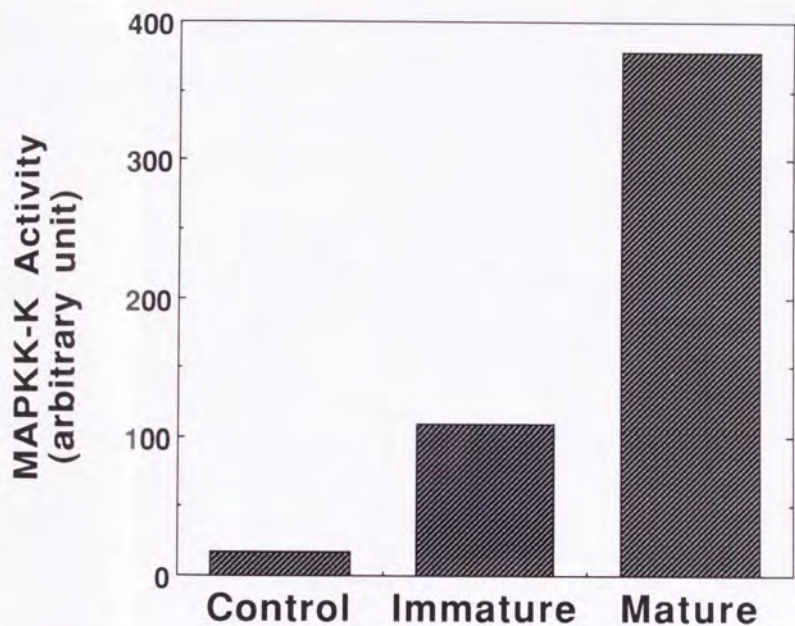


図16 *Xenopus*卵成熟過程に伴うMAPKK-Kの活性化

*Xenopus*未成熟卵及び成熟卵から無細胞抽出液を調製した。100  $\mu$ lの未成熟卵無細胞抽出液 (Immature)、成熟卵無細胞抽出液 (Mature)、及び対照として抽出に用いたバッファー (Control) のそれぞれにATP再生系を添加した上で、10  $\mu$ gのGST-MAPKKを加え、22℃で30分間インキュベートした。その後4  $\mu$ gの抗GST抗体及び15  $\mu$ lのProtein A Sepharoseを加えGST-MAPKKの免疫沈降を行い、組み換え型MAPキナーゼを活性化する活性を測定してMAPKK-K活性とした。



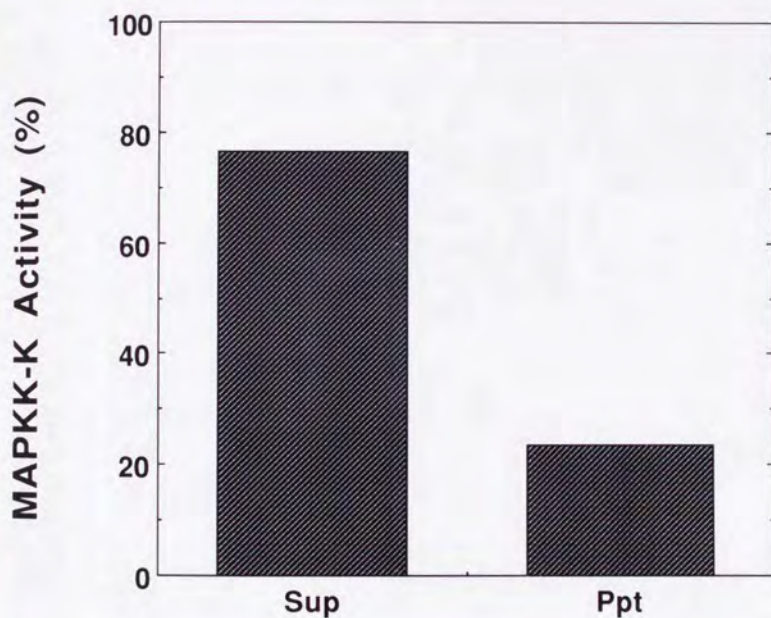


図17 *Xenopus*成熟卵におけるMAPKK-K活性の局在

図16で得た成熟卵無細胞抽出液を高速遠心 (300,000 x g、30分間) にかけて、細胞質画分と膜画分に分画した。細胞質画分 (Sup)、及び膜画分を1% Triton X100を含むバッファーで可溶化した画分 (Ppt) 中に存在するMAPKK-K活性を図16と同様に測定した。Sup及びPptに見いだされたMAPKK-K活性の和を100%として、それぞれの活性の割合を示した。

## § 11. 卵成熟過程におけるMos及びRaf-1の活性変動

現在までにいくつかの分子がMAPKK-Kの候補として報告されている。その中で、*Xenopus*卵に存在することの知られているMos及びRaf-1について卵成熟過程に伴う活性変動を調べた。未成熟卵無細胞抽出液 (Immature) 及び成熟卵無細胞抽出液 (Mature) を高速遠心にかけ、それぞれの細胞質画分 (Sup)、膜画分 (Ppt) を調製した。各々の画分から抗Mos抗体もしくは抗Raf-1抗体 (Fukuda et al., 1994) によりMosおよびRaf-1を免疫沈降し、沈降物中のMAPKK-K活性を測定した (図18、図19・左図)。MosのMAPKK-K活性は成熟卵の膜画分にもわずかに認められるものの、大部分が成熟卵の細胞質において検出された (図18)。すなわち、MosのMAPKK-K活性は、卵成熟に伴い顕著に増大し、大部分が細胞質に存在することが見い出された。一方、Raf-1のMAPKK-K活性も成熟過程に伴い上昇することが見い出されたが、その程度はMosに比して弱いものであり、活性が見い出されたのも膜画分においてのみであった (図19・左図)。Raf-1タンパクの存在量は卵成熟過程を通じてほぼ一定であり (図19、右上図)、また細胞質画分、膜画分にも存在していた (図省略)。したがって、膜画分に存在するRaf-1の活性化は、卵成熟過程に伴う何らかの翻訳後修飾の存在を示唆するものと考えられる。

次に、未成熟卵無細胞抽出液 (I) 及び成熟卵無細胞抽出液 (M) から抗Raf-1抗体により免疫沈降を行い、沈降物をSDS-PAGE後抗Raf-1抗体 (図19・右上図) もしくは抗HSP90抗体 (図19・右下図) によるイムノブロットを行った。卵成熟の進行に伴い、矢頭で示すRaf-1の電気泳動上の移動度の変化が観察された。またその時HSP90とRaf-1との共沈が見られた (図19・右下図、矢印)、共沈されるHSP90の量は一定であり、Raf-1とHSP90の複合体はRaf-1の活性化とは無関係に形成されていることが示唆された。

## § 12. 細胞質に存在するMAPKK-K活性の分画

先の実験から卵成熟の進行に伴いMAPKK-K活性が上昇し、その大部分が細胞質に存在することが見い出された。また成熟卵抽出液の部分精製より、MAPKK-Kがゲルろ過において見かけの分子量~400 kDaの位置に溶出することが見い出された。細胞質に存在するMAPKK-Kをより詳細に解析するために、Q-Sepharoseによる分画を行った。各画分と組み換えMAPKK及びキナーゼ不能型MAPキナーゼを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下インキュベートすることで、MAPKK-K活性を測定した。成熟卵抽出液の分

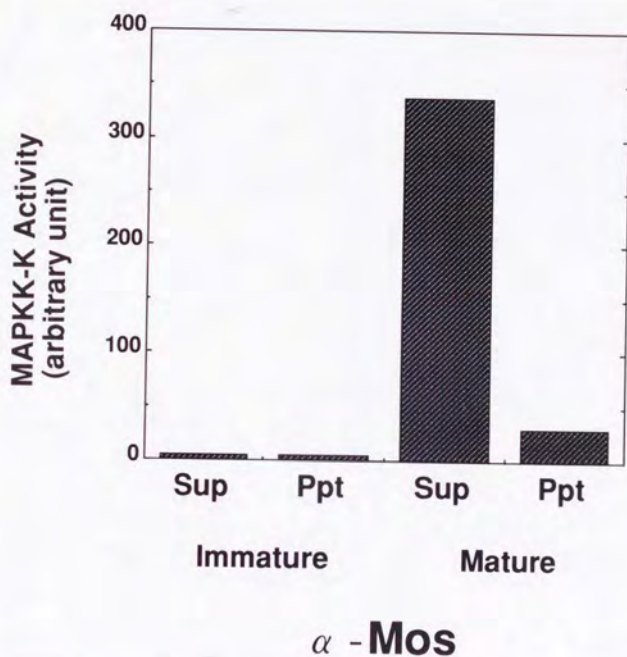


図18 抗Mos抗体によるMAPKK-K活性の免疫沈降

未成熟卵 (Immature) 及び成熟卵 (Mature) からそれぞれ図17と同様の方法でSupとPptの両画分を調製した。100  $\mu$ lのSup及びPpt画分に、5  $\mu$ gの抗Mos抗体及び15  $\mu$ lのProtein A Sepharoseを加え免疫沈降を行った。免疫沈降物と組み換えMAPKK及びキナーゼ不能型MAPキナーゼを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下でインキュベートした後、キナーゼ不能型MAPキナーゼに取り込まれた放射活性を測定することでMAPKK-K活性を測定した。



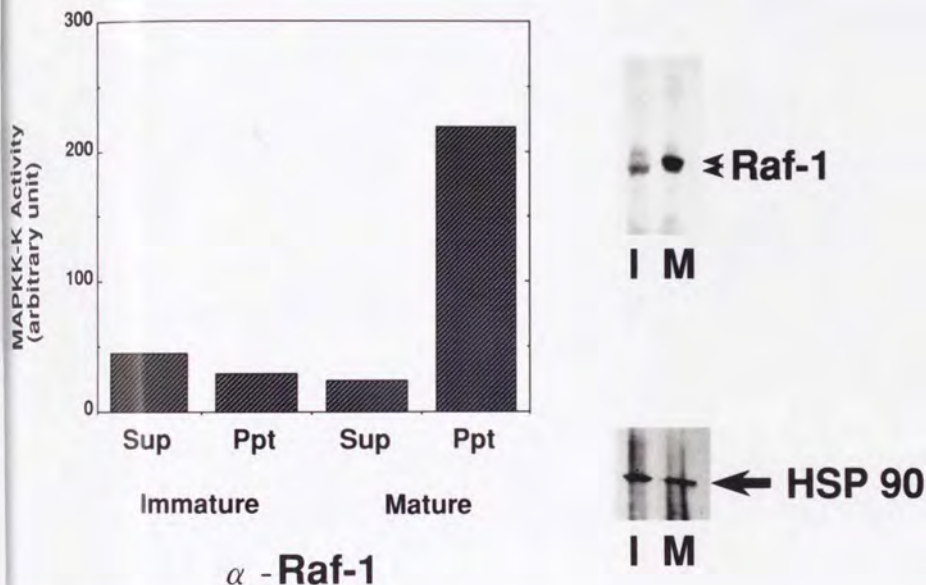


図19 抗Raf-1抗体によるMAPKK-K活性の免疫沈降

未成熟卵 (Immature) 及び成熟卵 (Mature) からそれぞれ図17と同様の方法でSupとPptの両画分を調製した。100  $\mu$ lのSup及びPpt画分に、10  $\mu$ gの抗Raf-1抗体及び15  $\mu$ lのProtein A Sepharoseを加え免疫沈降を行った。免疫沈降物中のMAPKK-K活性を図18と同様に測定した。また未成熟卵無細胞抽出液 (I) 及び成熟卵無細胞抽出液 (M) のそれぞれ100  $\mu$ lに10  $\mu$ gの抗Raf-1抗体及び15  $\mu$ lのProtein A Sepharoseを加え免疫沈降を行った。各免疫沈降物をサンプル処理後SDS-PAGEを行い、抗Raf-1抗体 (上段) もしくは抗HSP90抗体 (下段) によりイムノブロットを行った。矢頭はRaf-1の泳動位置を、矢印はHSP90の泳動位置を示す。

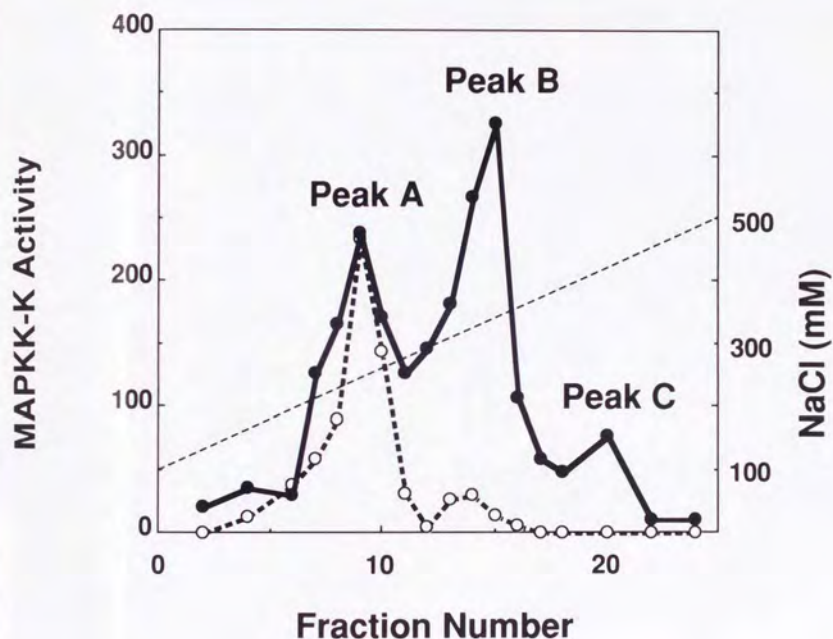


図20 Q-SepharoseによるMAPKK-K活性の分画

Q-Sepharoseによって、成熟卵抽出液細胞質画分(●)、もしくは未成熟卵抽出液細胞質画分(○)の分画を行った。100 mM NaClを含むバッファーによりカラムを洗浄した後、100-500 mMのNaCl直線濃度勾配により吸着タンパク質の分画を行った。各画分の一部と組み換えMAPKK及びキナーゼ不能型MAPキナーゼを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下でインキュベートした後、キナーゼ不能型MAPキナーゼに取り込まれた放射活性を測定することでMAPKK-K活性を測定した。

画において、DEAE-celluloseを用いた場合には一つのピークしか得られなかったが、Q-Sepharoseを用いた場合には二つの強い活性のピーク (Peak A、Peak B) と一つの弱い活性のピーク (Peak C) が得られた (図20、●)。両者の結果の違いは、カラム担体の分離能の違いを反映するものと考えられる。一方、未成熟卵抽出液をQ-Sepharoseにより分画すると、成熟卵抽出液の分画において見い出されたPeak Aと同じ位置に活性のピークが現われた (図20、○)。またその活性の強さは、成熟卵抽出液におけるPeak Aの活性とほぼ同じであった。未成熟卵から調製した無細胞抽出液中にはMAPKK-K活性がほとんど見い出されなかったことから (図16、Immature)、未成熟卵抽出液の分画において見い出されたMAPKK-K活性は、分画操作に伴うアーティファクトである可能性が考えられた。また抗体を用いた免疫除去の実験から、成熟卵抽出液の分画で得られたPeak Aの活性も同様に分画操作に伴うアーティファクトである可能性が示唆された (後述)。未成熟卵抽出液の分画パターンと成熟卵抽出液の分画パターンの比較から、卵成熟の進行に伴い最も顕著に活性化されるMAPKK-Kは、Peak Bとして溶出する分子であることが明らかとなった。したがって、卵成熟過程におけるMAPKK/MAPキナーゼカスケードの活性化が、Peak Bに存在する因子により引き起こされている可能性が強く示唆された。

### § 13. Peak Bに存在するMAPKK-K分子の同定

先の実験から、MosのMAPKK-K活性が卵成熟過程において顕著に上昇し、その活性は細胞質に局在していることが明らかとなった (図18)。MosによるMAPKK-K活性とPeak Bにおいて見い出されたMAPKK-K活性の異同について検討を行った。成熟卵抽出液より得られたPeak AとPeak BをそれぞれMono Qにより再分画した (図21)。各画分のMAPKK-K活性 (●) と、各画分から抗Mos抗体により免疫沈降されるMAPKK-K活性 (○) の測定を行った。Peak AをMono Qにより分画した場合には、抗Mos抗体により免疫沈降されるMAPKK-K活性は検出できず、Peak Aに存在するMAPKK-K活性はMos以外の因子により担われていることが示唆された (図21A)。一方、Peak BをMono Qにより分画した場合には、各画分のMAPKK-K活性 (図21B、●) と抗Mos抗体により免疫沈降されるMAPKK-K活性 (図21B、○) が完全に一致して溶出した。したがってPeak Bに存在するMAPKK-K活性がMosによって担われていることが強く示唆された。

MosによりMAPKK-K活性が担われている可能性をさらに検討するた



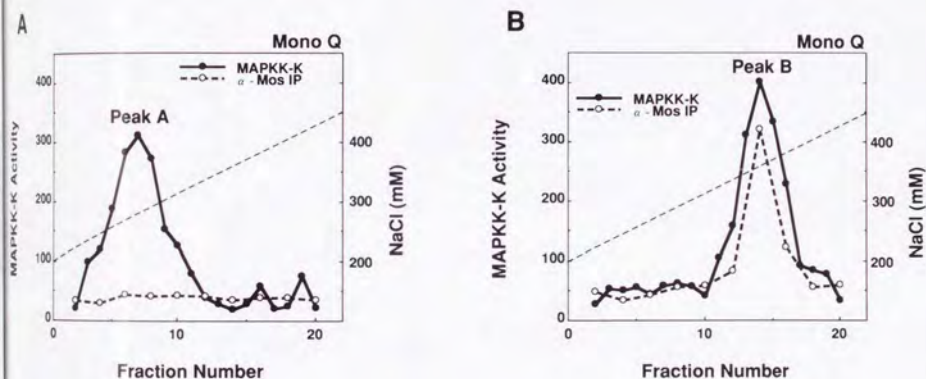


図21 抗Mos抗体によるPeak A及びPeak B画分からのMAPKK-K活性の免疫沈降

成熟卵抽出液細胞質画分より得られたPeak A画分(図20、フラクションNo. 8-10)及びPeak B画分(図20、フラクションNo. 13-15)のそれぞれ一部を、Mono Qによる200-450 mM NaCl直線濃度勾配により分画した(A: Peak Aの分画、B: Peak Bの分画)。Mono Qによって得られた各画分中のMAPKK-K活性(●)及び各画分からの抗Mos抗体による免疫沈降物中のMAPKK-K活性(○)を、各サンプルと組み換えMAPKK及びキナーゼ不能型MAPキナーゼを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下でインキュベートした後、キナーゼ不能型MAPキナーゼに取り込まれた放射活性を測定することで測定した。

## Chromatography of Peak B

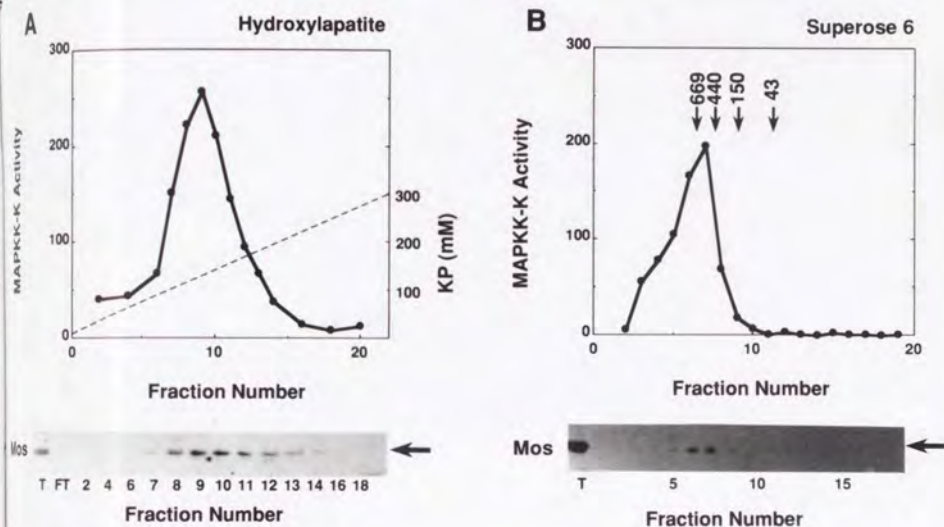


図22 Peak B中のMAPKK-K活性の精製

(A) 成熟卵抽出液細胞質画分より得られたPeak B画分をヒドロキシアパタイトにかけ、吸着タンパク質を10-300 mMリン酸バッファー直線濃度勾配により分画した。各画分の一部と組み換えMAPKK及びキナーゼ不能型MAPキナーゼを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下でインキュベートした後、キナーゼ不能型MAPキナーゼに取り込まれた放射活性を測定することでMAPKK-K活性を測定した。またPeak B画分(T)、ヒドロキシアパタイトにおける未吸着画分(FT)、及び各画分(フラクションNo. 2-18)のそれぞれ一部をサンプル処理し、SDS-PAGEを行った後抗Mos抗体によるイムノプロットを行った。Mosの泳動位置を矢印で示す。

(B) ヒドロキシアパタイトによる分画で得られたピーク(フラクションNo. 8-10)をマイクロコン30で濃縮した上で、Superose 6を用いて分画した。チログロブリン(669)、フェリチン(440)、イムノグロブリン(150)、オボアルブミン(43)の溶出位置をそれぞれ矢印で示した。各画分中のMAPKK-K活性の測定及び抗Mos抗体によるイムノプロットを(A)と同様に行った。



めに、Peak Bの精製を進めた。Peak Bをヒドロキシアパタイトカラムにより分画し、MAPKK-K活性の溶出(図22A、上図)とMosタンパク質の溶出(図22A、下図)の比較を行った。Mosタンパク質の溶出は、抗Mos抗体を用いたイムノブロットにより検出した。MAPKK-K活性の溶出とMosタンパク質(矢印)の溶出が、9番目の分画をピークとして完全に一致していることが見い出された。ヒドロキシアパタイトで得られたピーク画分をさらにSuperose 6により分画した(図21B)。MAPKK-K活性の溶出(図21B、上図)とMosタンパク質の溶出(図21B、下図)とは、6番目及び7番目の分画をピークとしてやはり完全に一致した。以上の結果から、Peak Bとして見い出されたMAPKK-K活性が癌原遺伝子産物であるMosによって担われていることが明らかとなった。また、Mosそのものは39kDaのタンパク質であるにもかかわらず、ゲルろ過において見かけの分子量400 kDa以上という高分子量域に溶出していることから(図21B)、非常に巨大な複合体を形成していることが示唆された。Superose 6における各画分の溶出タンパク質を銀染色法で調べたところ、活性の溶出に伴い複数のタンパク質が溶出するのが観察された(図省略)。したがって、Mosはホモオリゴマーとして機能するのではなく、他のタンパク質とヘテロオリゴマーを形成することでMAPKK-Kとしての機能を果たすことが示唆された。

#### § 14. Peak Aに存在するMAPKK-K分子の同定

Peak AのMAPKK-K活性を担う分子と、哺乳類培養細胞においてMAPKK-Kとして機能すると報告のあるMEKK及びB-Rafの異同を検討した。成熟卵抽出液からの抗MEKK抗体を用いた免疫沈降物中にはMAPKK-K活性が認められなかった(図省略)。一方、成熟卵抽出液から抗B-Raf抗体を用いて免疫沈降を行うと、膜画分及び細胞質画分において共に高いMAPKK-K活性が検出された(図省略)。未成熟卵抽出液から抗B-Raf抗体を用いて免疫沈降を行った場合にも、成熟卵抽出液を用いた場合と同程度の活性が検出された(図省略)。成熟卵抽出液においてPeak Aとして見い出されたMAPKK-K活性は、未成熟卵抽出液細胞質画分の分画においても同程度の活性を示したことから、抗B-Raf抗体によって免疫沈降されるMAPKK-K活性がPeak Aにおいて見い出された活性と同一である可能性が示唆された。

Peak AをSuperdex 200によるゲルろ過により分画し、各画分のMAPKK-K活性(●)と各画分からの抗B-Raf抗体による免疫沈降中のMAPKK-K活性(○)を比較した(図23A)。グラフに示すように、両活性



## Chromatography of Peak A

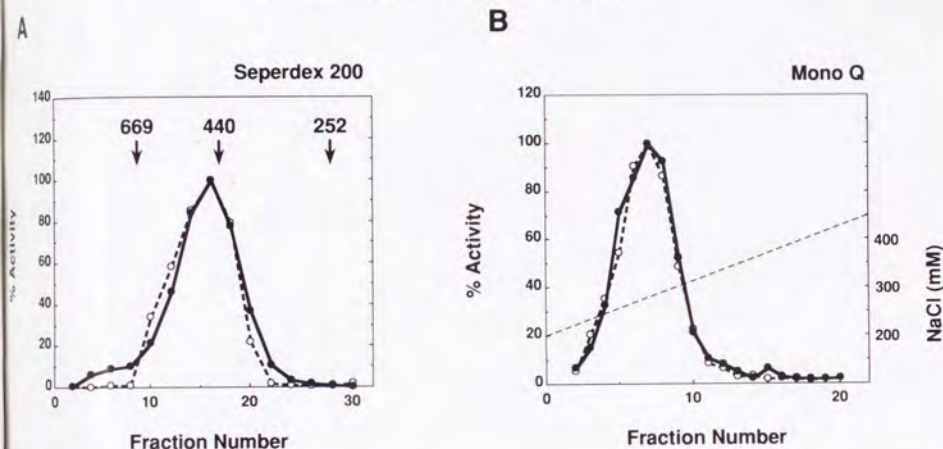


図23 Peak A中のMAPKK-K活性の精製

(A) 成熟卵抽出液細胞質画分より得られたPeak A画分を濃縮後、Superdex 200による分画を行った。チログロブリン (669)、フェリチン (440)、カタラーゼ (252) の溶出位置をそれぞれ矢印で示す。各画分中のMAPKK-K活性(●) 及び各画分から抗B-Raf抗体によって免疫沈降した際の沈降物中のMAPKK-K活性(○) を、各サンプルと組み換えMAPKK及びキナーゼ不能型MAPキナーゼを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下でインキュベートした後、キナーゼ不能型MAPキナーゼに取り込まれた放射活性を測定することで評価した。それぞれの活性のピークを100%としてグラフに示した。

(B) Superdex 200による分画のピーク (No. 14-18) をMono Qを用いた200-450 m NaCl直線濃度勾配により分画した。各画分中のMAPKK-K活性(●) 及び、各画分から抗B-Raf抗体により免疫沈降した際の沈降物中のMAPKK-K活性(○) を測定し、(A) と同様にグラフに示した。

は見かけの分子量～440 kDaをピークとして完全に一致して溶出した。さらにSuperdex 200で得られたピーク画分をMono Qにより分画した(図23B)。各画分のMAPKK-K活性(●)と各画分からの抗B-Raf抗体による免疫沈降物中のMAPKK-K活性(○)が、7番目の画分をピークとして完全に一致して溶出された。以上の結果から、Peak Aにおいて見い出されたMAPKK-K活性が、抗B-Raf抗体により認識されるB-Raf相同分子によって担われていることが強く示唆された。

## § 15. MAPキナーゼ活性化カスケードへのMosの寄与の評価

成熟卵無細胞抽出液細胞質画分に対してコントロールIgG(Mock)、抗Mos抗体( $\alpha$ -Mos)もしくは抗B-Raf抗体( $\alpha$ -B-Raf)を用いた免疫除去を行い、操作後に残存するMAPKK-K活性を測定した(図24、左図)。また操作後の各画分中に存在するMosの存在量を、抗Mos抗体を用いたイムノブロットにより測定した(図24、右図)。コントロールIgGを用いた場合に比べて、抗Mos抗体を用いた場合にはMosタンパク質の完全な消失及びそれに伴うMAPKK-K活性の顕著な低下が観察された。一方抗B-Raf抗体を用いた免疫除去操作によっては、MAPKK-K活性の低下は観察されず、またMosのタンパク量の減少も見られなかった。以上の結果は、成熟卵無細胞抽出液細胞質画分において見い出されたMAPKK-K活性の大部分がMosによって担われていることを強く示唆している。同時に、カラムクロマトグラフィーにおいて見い出されたPeak A活性(抗B-Raf抗体により認識される活性)が、分画前の状態においてはほとんど機能していないことが示唆された。

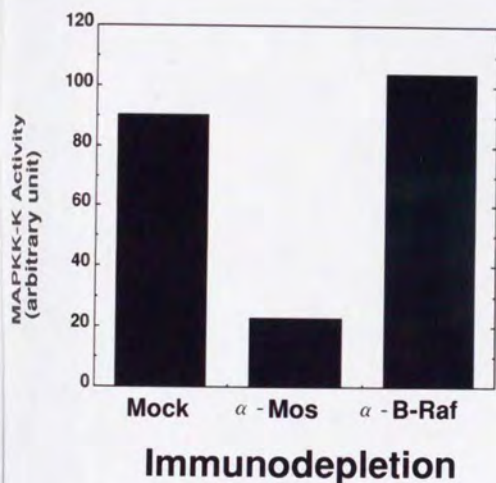


図24 *Xenopus*成熟卵抽出液細胞質画分からのMosタンパク質の免疫除去

成熟卵無細胞抽出液細胞質画分100  $\mu$ lに対し、それぞれウサギIgG (Mock)、5  $\mu$ g抗Mos抗体 ( $\alpha$ -Mos) もしくは10  $\mu$ g抗B-Raf抗体 ( $\alpha$ -B-Raf) 及び15  $\mu$ l Protein A Sepharoseを加え免疫除去を行った。免疫除去後の各画分に存在するMAPKK-K活性を図16と同様に測定した。また各画分の一部をサンプル処理後SDS-PAGEを行い、抗Mos抗体によるイムノプロットを行った。Mosの泳動位置を矢印で示す。



## 考察

### § 1. MAPキナーゼ活性化因子 (MAPKK) の同定

本研究において、不活性なMAPキナーゼをリン酸化し活性化する因子として、45 kDaの単一のポリペプチド、MAPKK、を同定・精製した(図3)。このMAPKKは、*Xenopus*卵成熟過程・受精後の過程の両過程において、MAPキナーゼにやや先行した活性変動を示すこと(図2)、並びに精製MAPKKの*Xenopus*未成熟卵へのマイクロインジェクション及び間期無細胞系への添加により内在性のMAPキナーゼの活性化を引き起こすこと(図5)、の二点から実際に細胞内でもMAPキナーゼの直接の上流因子として機能することが示唆された。また、精製の過程を通じてMAPキナーゼを活性化する活性が常に単一のピークとして溶出されたこと(図省略)から、卵成熟過程においては本研究で見出した45 kDa MAPKKが唯一のMAPキナーゼ活性化因子として機能していることが示唆された。

*Xenopus*MAPKKは*in vitro*において一般にタンパク質キナーゼの基質として用いられるヒストンH1、カゼイン、MBPなどをリン酸化しなかったことから(図省略)、非常に基質特異性の高いキナーゼとしてMAPキナーゼをリン酸化するものと考えられる。実際、熱変成させたMAPキナーゼを基質として用いた場合には、MAPKKによるリン酸化はほとんど見られなかった(図省略)。このことは、MAPKKがアミノ酸の一次配列のみを認識してMAPキナーゼをリン酸化するのではなく、MAPキナーゼの持つ高次構造を認識していることを示唆している。一方、当研究室においてEGF刺激により活性化するラットMAPKKが精製され、それが不活性な*Xenopus*MAPキナーゼを活性化しうること、及び精製した*Xenopus*MAPKKが大腸菌に発現させた43 kDaマウスMAPキナーゼを活性化しうること、が示された(Shirakabe et al., 1992)。このように、MAPKKが非常に高い基質特異性を持ちながら種間を越えてMAPキナーゼ活性化因子として働きうることは、MAPKK/MAPキナーゼカスケードが種を越えて保存されていることを示唆する。実際、当研究室をはじめ数多くの研究室からMAPKKのアミノ酸配列の報告がなされ(Crews et al., 1992; Ashworth et al., 1992; Seger et al., 1992; Kosako et al., 1993; Wu et al., 1993)、MAPキナーゼと同様、MAPKKも酵母から哺乳類に至るまで高度に保存された普遍的な分子であることが明らかとなった。

(Nishida and Gotoh, 1993)。また、最近酵母において高等動物のMAPキナーゼが酵母のMAPキナーゼの機能の一部を代替しうることが示された (Neiman et al., 1993; Lee et al., 1993; Gotoh et al., 1993)。このことは、高等動物のMAPキナーゼが酵母内において酵母のMAPKK分子により活性化されうること示しており、MAPKK/MAPキナーゼカスケードが一次構造上のみではなく機能的にも保存されていることを強く示唆している。

抗MAPKK抗体を用いたイムノブロットにより、45 kDa MAPKKは卵細胞のみではなく成体の様々な組織に広く存在していることが明らかとなった (図7B)。各組織のイムノブロットにおいても、卵細胞において見い出されるSDS-PAGE上45 kDaのバンドと全く同じ泳動度のバンドが認識されることから、発生の初期から分化の進んだ各組織に至るまで同一のMAPKK分子が用いられていることが強く示唆された。MAPKKの発現パターンはMAPキナーゼの発現と完全に一致しており、特に脳、脾臓において多量に発現していた。したがって、MAPKK/MAPキナーゼカスケードが神経系及び血球系 (特に免疫系) において重要な役割を担っていることが示唆される。MAPKK/MAPキナーゼカスケードがこれらの組織で担う生理機能に関しては、今後明らかにしていくべき大きな課題である。

*Xenopus* MAPKKはM期開始因子であるMPFの下流で活性化することが、精製MPFの未成熟卵へのマイクロインジェクション及び間期無細胞系への添加、という二つの実験系により示すことができた (図6)。セリン/スレオニンキナーゼであるMPFに始まるシグナル伝達機構中にMAPKK/MAPキナーゼカスケードが位置付けられることは、酵母や他の真核生物において見い出されたシグナル伝達系との比較で興味深い。卵成熟過程におけるMAPKK活性の上昇に伴いMAPKKのセリン/スレオニン残基がリン酸化されること (図8及び15)、及びセリン/スレオニン特異的ホスファターゼであるPP2Aで処理することにより活性型MAPKKの活性が失われること (図4) から、MAPKKがセリン/スレオニン残基のリン酸化により活性化されることが明らかとなった。MAPKKの上流にセリン/スレオニンキナーゼであるMPFが位置していることから、脱リン酸化により不活性型となったMAPKKがMPFにより再活性化される可能性が考えられたが、MPFは直接MAPKKをリン酸化あるいは活性化することはなかった (図省略)。したがって、MPFに始まるキナーゼカスケードにおいて、MAPKKとMPFの間には少なくとも一つセリン/スレオニンキナーゼが存在することが示唆された。



## § 2. MAPKK活性化因子の同定

近年、主として哺乳類培養細胞を用いた実験結果から、MAPKK-Kの候補としていくつかの分子が挙げられている。一番最初に報告のあったのは癌原遺伝子産物であるRaf-1である (Kyriakis et al., 1992; Dent et al., 1992; Howe et al., 1992)。活性型Raf-1による形質転換細胞においてMAPKKの活性化が観察され、抗Raf-1抗体による免疫沈降物中にMAPKKを活性化する活性が認められる、という内容である。しかし一方で、活性型Raf-1による形質転換細胞の全てにおいてMAPキナーゼの活性化が引き起こされるわけではない (Gupta et al., 1992; Chao et al., 1994) という報告や、アンチセンスを用いてRaf-1の発現を抑えた細胞においても外界刺激に伴うMAPキナーゼの活性化が観察される (Kizaka-Kondoh and Okayama, 1993) という報告もなされており、Raf-1が全てのシグナル伝達系においてMAPKK-Kとして機能しているわけではないと考えられている。実際、MEKK、B-Raf、Mos等の分子もMAPKK-Kとして機能しうることが報告されており (Lange-Carter et al., 1993; Lange-Carter and Johnson, 1994; Jaiswal et al., 1994; Vaillancourt et al., 1994; Nebreda and Hunt, 1993; Posada et al., 1993)、どのシグナル伝達系にどのMAPKK-Kが利用されているのかという点については、未だ明らかとなっていない。

MAPKK活性化活性 (=MAPKK-K活性) が卵成熟の進行に伴い活性化することを明らかにした (図16)。未成熟卵無細胞抽出液中で組み換えMAPKKをインキュベートした際のごくわずかなMAPKK活性の上昇は、大腸菌に発現させた組み換えMAPKKの立体構造が無細胞抽出液に含まれるシャペロニンタンパク質等の影響で変化した結果であると考えられる。実際、培養細胞に野性型のMAPKKを発現させた場合にも、それだけでMAPキナーゼ活性の亢進が観察されており、未成熟卵無細胞抽出液中での組み換えMAPKKのわずかな活性亢進と類似の現象であると予想される。またカラムクロマトグラフィー及び免疫除去実験から、卵成熟に伴い活性化するMAPKK-K活性が、主として癌原遺伝子産物であるMosによって担われていることを見い出した (図22及び24)。カラムクロマトグラフィーにおいて成熟卵抽出液細胞質画分に見い出されたPeak A活性 (抗B-Raf抗体により認識される活性) は、本来MAPKK-K活性を持たない未成熟卵抽出液の分画操作においても見い出されること (図20)、及び無細胞抽出液からの抗B-Raf抗体による免疫除去操作によってもMAPKK-K活性に変動が見られないこと (図24) の二点から、カラムクロマトグラフィー操作によって活性が出現したアーティファクトであると



考えられた。Peak Cに関しては、Mos、B-Raf、Raf-1等に対する抗体を用いたイムノブロットによって反応するバンドが認められないことから(図省略)新規の分子である可能性も考えられたが、活性が弱く精製が困難であるため明確な結論は得られていない。Mosタンパク質は卵成熟に伴い合成されることが知られているため、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを加えMosの合成を阻害した上で未成熟卵にプロゲステロンを添加してMAPKK及びMAPキナーゼ活性の変化を測定することで、*in vivo*におけるMAPキナーゼ活性化過程へのMosの関与を検討した(図省略)。シクロヘキシミドを加えない場合には、プロゲステロン添加後7時間でMosの合成が確認され、MosのMAPKK-K活性、MAPKK及びMAPキナーゼの活性がすべて顕著に上昇した。一方、シクロヘキシミド存在下ではプロゲステロン添加後同じく7時間が経過しても、Mosは合成されずMAPKK、MAPキナーゼの活性の上昇も見られなかった。また抗B-Raf抗体により免疫沈降されるMAPKK-K活性に関しては、シクロヘキシミドの有無による変化は見られなかった(図省略)。したがって*in vivo*における解析からも、MAPKK/MAPキナーゼカスケードの活性化にはMosを介した経路が主として用いられていることが強く示唆された。

癌原遺伝子であるB-Rafは、当初は脳や精巣など限られた組織にのみ存在すると考えられていたが、最近様々な組織に広く発現していることが確認されつつある(Reuter et al., 1995)。活性化に関しては、Raf-1と同様Rasタンパク質によって活性化が引き起こされるという報告がある反面(Jaiswal et al., 1994)、細胞内に活性阻害因子が存在していて、その因子との相互作用が消失すると活性が現われるという機構も提唱されている(Traverse and Cohen, 1994)。本研究において見いだされたPeak A活性に関しては、カラムクロマトグラフィーで活性が出現する点等、阻害因子との相互作用が示唆される。Peak A活性が、B-Rafの*Xenopus*ホモログによって担われているのか、B-Rafに近縁の別の分子によって担われているのかに関しては、今後Peak A活性を完全精製することで明らかにされるものと考えられる。

成熟卵抽出液からの部分精製MAPKK-Kを用いた結果から、MAPKK-Kは主としてセリン残基をリン酸化することによりMAPKKを活性化することが示唆された(図15)。Peak A活性(抗B-Raf抗体により認識される活性)及びPeak B(=Mos)を用いた解析からも、両者がともに*Xenopus*MAPKKの218番目のセリンと222番目のセリンをリン酸化することでMAPKKを活性化することが確認された(Gotoh et al., 1994)。Raf-1やMEKKも同じセリン残基のリン酸化を介してMAPKKを活性化すると考えられている(Gotoh et al., 1994; Zheng et al., 1994; Alessi et al.,

1994)。218、222番目のセリン残基はともにMAPKKファミリーにおいて種を越えて保存されており、ショウジョウバエや酵母においても同様の機構で活性化が引き起こされるものと考えられる。

成熟卵抽出液中において、細胞質画分以外に膜画分においてもMAPKK-K活性を見出した。哺乳類培養細胞においては、膜画分においてRaf-1が活性化を受けMAPKK-Kとして機能すると考えられている (Leever et al., 1994; Stokoe et al., 1994)。Xenopus卵においてもRaf-1が存在し、Rasを介したシグナル伝達系においてMAPKK-Kとして機能しうることから (Fukuda et al., 1994)、卵成熟過程におけるRaf-1の活性変化を調べたところ、卵成熟に伴い膜画分に存在するRaf-1のみが特異的にMAPKK-K活性を示すことを見出した (図19)。したがって、成熟卵抽出液膜画分に見出されたMAPKK-K活性の少なくとも一部はRaf-1によって担われていることが示唆された。XenopusRaf-1は卵成熟の進行に伴い、電気泳動における泳動度の高分子量側への移動 (=モビリティ・シフト) が観察された。このモビリティ・シフトは哺乳類Raf-1の活性化の際に見られる現象であり、上流もしくは下流の因子によるリン酸化によって引き起こされると考えられている。Xenopusの卵成熟過程においても同様の現象が生じていることを示唆している。また、哺乳類Raf-1に関しては、熱ショックタンパク質であるHSP90と複合体を形成しているという報告がなされている (Wartmann and Davis, 1994)。Xenopusにおいても、未成熟卵及び成熟卵中でともにRaf-1とHSP90が複合体を形成していることが示唆された。HSP90との複合体形成はRaf-1の活性化状態には依存しておらず、MAPKK-Kとして機能する上での必要性は明らかにされていない。しかし、Raf-1のタンパク質としての安定性にHSP90が関与しているとの報告が最近なされ (Schulte et al., 1995)、Xenopusにおいても同様の機構が働いている可能性が示唆される。最近、優勢不能型Raf-1を発現させることでMAPKK/MAPキナーゼカスケードの活性化を抑制し、卵成熟過程そのものもブロックしたという報告がなされた (Fabian et al., 1993; Muslin et al., 1993)。しかし、成熟卵中のMAPKK-K活性の大部分はMosによって担われているという本研究の結果から、先の報告における優勢不能型Raf-1の効果は間接的なものであることが示唆される。Raf-1はMAPKKと結合し複合体を形成することが知られている (Jelineck et al., 1994)。したがって例えば、優勢不能型Raf-1が内在性のMAPKKを非生理的な形で捕捉したためにMosによるMAPKKの活性化という本来のカスケードが阻害された可能性が考えられる。Rasが関与しないと考えられている卵成熟過程において (Deshpande and Kung, 1987)、どのような機構でRaf-1が活性化されているのかという点を含め、卵成熟過程に



おけるRaf-1の生理的機能については今後の課題である。

ごく最近、当研究室の小迫等により卵成熟過程にMAPKK/MAPキナーゼカスケードが必須であることが示された (Kosako et al., 1994)。また後藤等によりMAPKK/MAPキナーゼカスケードを活性化することで卵成熟過程を進行しうることが示された (Gotoh et al., 1995)。そこから提出されるモデルは、『プロゲステロン処理によりMosタンパク質の合成が引き起こされ、MAPKK/MAPキナーゼカスケードが活性化される。MAPキナーゼの活性化によりMosの合成がさらに増強される一方で、MPFの活性化が引き起こされる。MPF活性及びMosの活性によりさらにMAPKK/MAPキナーゼカスケードが活性化される。』というポジティブ・フィードバック機構である。本研究においてはまず、マイクロインジェクション及び無細胞系を用いた実験系によりMAPKK/MAPキナーゼカスケードがMPFの下流で機能することを示し、次に生化学的手法を用いてMAPKKの直接の上流として主としてMosが機能していることを示した。以上の内容は、当研究室より提示されたポジティブ・フィードバック機構に完全に合致するものである。MPFによるMosの合成や、MosによるMPFの活性化においてMAPKK/MAPキナーゼカスケードがどのような役割を担っているかについては今後の検討課題である。

### §3. MAPキナーゼによるMAPKKのリン酸化

MAPKKを活性化する因子の検索を進める過程で、脱リン酸化型のMAPKKをリン酸化はするが活性化することができない因子を検出した (図10)。この因子の活性は、DEAE-cellulose及びSephacryl S-300によるゲルろ過において内在性のMAPキナーゼ活性と完全に一致して溶出されること、及び*in vitro*において、精製*Xenopus* MAPキナーゼがこの因子と同様にMAPKKのスレオニン残基をリン酸化したこと (図15) から、この因子はMAPキナーゼそのものであると考えられた。*In vivo*においてMAPKKは卵成熟の進行に伴いセリン残基とスレオニン残基がリン酸化され、一方部分精製されたMAPKK-KはMAPKKのセリン残基をリン酸化することから、MAPKKの*in vivo*におけるスレオニン残基のリン酸化にMAPキナーゼが関与していることが示唆された。当研究室において明らかにされた*Xenopus* MAPKKの一次構造を見ると、そのC末端にMAPキナーゼのリン酸化コンセンサス (Alvarez et al., 1991; Gonzalez et al., 1991) に一致する、-Pro-Ser-Thr<sup>388</sup>-Pro-というスレオニン残基が存在していた (Kosako et al., 1993)。MAPKKの配列を通して、MAPキナーゼのリン酸化コンセンサスに一致するセリンあるいはスレオニン残基はこの



Thr<sup>388</sup>のみであった。また、このC末端に存在するMAPキナーゼによるリン酸化コンセンサス配列は高等動物において広く保存されていた。したがって、このThr<sup>388</sup>がMAPキナーゼによってリン酸化されている可能性が非常に高いと思われる。酵母の接合ホルモンのシグナル伝達系においては、下流の因子であるFUS3によって上流の因子がリン酸化を受け活性が負の方向に調節されるという、負のフィードバック機構が存在することが知られている (Gartner et al., 1992)。高等動物においても、MAPキナーゼがMAPKKをリン酸化することで活性を負の方向に調節している可能性を検討してみた。しかし、*in vitro*でのMAPキナーゼによるリン酸化に伴う、MAPKK活性の有為な低下は観察されなかった。一方、培養細胞にこの保存されたスレオニン残基をアラニン残基に置換した変異型MAPKKを発現させた場合には、外界刺激に伴うMAPKK活性の上昇が有為に増強された、という報告がなされている (Brunet et al., 1994)。このことは、保存されたスレオニン残基が、*in vivo*においては間接的な機構によりMAPKKの活性を負の方向に制御していることを示唆している。負の方向の活性調節機構そのものも含め、MAPキナーゼによるMAPKKのリン酸化の持つ生理的意義は今後明らかにしていくべき課題である。

## 謝辞

本研究を支えて下さいました横山茂之教授に、心から感謝致します。  
また、委託研究先の京都大学ウイルス研究所において、終始御指導・御  
助言下さいました、西田栄介教授並びに後藤由季子助手に深く感謝致し  
ます。MAPKKの精製を含め様々な実験を共同で行った小迫英尊氏に、  
また常に協力して下さいました京都大学西田研究室の皆様へ感謝致します。  
最後に、繁雑な事務手続きをお願いしてご迷惑をおかけした、谷本薫氏  
をはじめとする東京大学理学部生物化学科事務の皆様、並びに京都大学  
西田研究室秘書の田中喜代子氏に心から感謝致します。



## 参考文献

- Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandem, G., Rapp, U. R., Ashworth, A., Marshall, C. J. and Cowley, S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* 13, 1610-1619
- Alvarez, E., Northwood, I. C., Gonzalez, F. A., Latour, D. A., Seth, A., Abete, C., Curran, T. and Davis, R. J. (1991) Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 266, 15277-15285
- Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K. and Sturgill, T. W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 343, 651-653
- Ashworth, A., Nakielnny, S., Cohen, P. and Marshall, C. (1992) The amino acid sequence of a mammalian MAP kinase kinase. *Oncogene* 7, 2555-2556
- Bading, H. and Greenberg, M. E. (1991) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* 253, 912-914
- Biggs, III, W. H. and Zipursky, S. L. (1992) Primary structure, expression, and signal-dependent tyrosine phosphorylation of a Drosophila homolog of extracellular signal-regulated kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6295-6299
- Bird, T. A., Sleath, P. R., deRoos, P. C., Dower, S. K. and Virca, G. D. (1991) Interleukin-1 represents a new modality for the activation of extracellular signal-regulated kinases/microtubule-associated protein-2 kinases. *J. Biol. Chem.* 266, 22661-22670
- Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., Gregory, J. S., Slaughter, C., Moomow, C., Hsu, J. and Cobb, M. H. (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to

yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249 , 64-65

Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. and Yancopoulos, G. D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65 , 663-675

Boyle, W. J., van der Geer, P. and Hunter, T. (1991) Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol.* 201 , 110-149

Brunet, A., Pages, G. and Pouyssegur, J. (1994) Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett.* 346 , 299-303

Casillas, A., Hanekom, C., Williams, K., Katz, R. and Nel, A. E. (1991) Stimulation of B-cells via the membrane immunoglobulin receptor or with phorbol myristate 13-acetate induces tyrosine phosphorylation and activation of a 42-kDa microtubule-associated protein-2 kinase. *J. Biol. Chem.* 266 , 19088-19094

Chao, T.-S., Foster, D. A., Rapp, U. R. and Rosner, M. R. (1994) Differential Raf requirement for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium. *J. Biol. Chem.* 269 , 7337-7341

Chen, R.-H., Sarnecki, C. and Blenis, J. (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 12 , 915-927

Cobb, M. H., Boulton, T. G. and Robbins, D. J. (1991) Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul.* 2, 965-978

Courchesne, W. E., Kunisawa, R. and Thorner, J. (1989) A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* 58 , 1107-1119



Crews, C. M., Alessandrini, A. and Erikson, R. L. (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258 , 478-480

Davis, R. J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268 , 14553-14556

Dent, P., Haster, W., Haystead, T. A. J., Vincent, L. A., Roberts, T. M. and Sturgill, T. W. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH3T3 cells and in vitro. *Science* 257 , 1404-1407

Deshpande, A. K. and Kung, H.-F. (1987) Insulin induction of *Xenopus laevis* oocyte maturation is inhibited by monoclonal antibody against p21 ras proteins. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1285-1288

de Vries-Smith, A. M. M., Burgering, B. M. T., Leever, S. J., Marshall, C. J. and Bos, J. L. (1992) Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* 357 , 602-604

Elion, E. A., Grisafi, P. L. and Fink, G. R. (1990) FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60 , 649-664

Ely, C. M., Oddie, K. M., Litz, J. S., Rossomando, A. J., Kanner, S. B., Sturgill, T. W. and Parsons, S. J. (1990) A 42-kD tyrosine kinase substrate linked to chromaffin cell secretion exhibits an associated MAP kinase activity and is highly related to a 42-kD mitogen-stimulated protein in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 110 , 731-742

Fabian, J. R., Morrison, D. K. and Daar, I. O. (1993) Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* 122 , 645-652

Fukuda, M., Gotoh, Y., Kosako, H., Hattori, S. and Nishida, E. (1994) Analysis of the Ras p21/mitogen-activated protein kinase signaling in vitro and in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 269 , 33097-33101

- Gartner, A., Nasmyth, K. and Ammerer, G. (1992) Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev.* 6, 1280-1292
- Gonzalez, F. A., Raden, D. L. and , R. J. (1991) Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J. Biol. Chem.* 266 , 22159-22163
- Gonzalez, F. A., Seth, A., Raden, D. L., Bowman, D. S., Fay, F. S. and Davis, R. J. (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J. Cell Biol.* 122 , 1089-1101
- Gotoh, Y., Nishida, E., Yamashita, T., Hoshi, M., Kawakami, M. and Sakai, H. (1990) Microtubule-associated-protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. Identity with the mitogen-activated MAP kinase of fibroblastic cells. *Eur. J. Biochem.* 193 , 661-669
- Gotoh, Y., Nishida, E., Matsuda, S., Shiina, N., Kosako, H., Shiokawa, K., Akiyama, T., Ohta, K. and Sakai, H. (1991a) In vitro effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-activated MAP kinase. *Nature* 349 , 251-254
- Gotoh, Y., Moriyama, K., Matsuda, S., Okumura, E., Kishimoto, T., Kawasaki, H., Suzuki, K., Yahara, I., Sakai, H. and Nishida, E. (1991b) *Xenopus* M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF. *EMBO J.* 10, 2661-2668
- Gotoh, Y., Nishida, E., Shimanuki, M., Toda, T., Imai, Y. and Yamamoto, M. (1993) *Schizosaccharomyces pombe* Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to *Xenopus* mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13 , 6427-6434
- Gotoh, Y., Matsuda, S., Takenaka, K., Hattori, S., Iwamatsu, A., Ishikawa, M., Kosako, H. and Nishida, E. (1994) Characterization of recombinant *Xenopus* MAP kinase kinases mutated at potential phosphorylation sites. *Oncogene* 9, 1891-1898



- Gotoh, Y., Masuyama, N., Dell, K., Shirakabe, K. and Nishida, E. (1995) Involvement of the MAP kinase cascade in *Xenopus* mesoderm induction. *J. Biol. Chem.* 270, 25898-25904
- Gupta, S. K., Gallego, C., Johnson, G. L. and Heasley, L. E. (1992) MAP kinase is constitutively activated in gip2 and src transformed rat 1a fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267, 7987-7990
- Hanekom, C., Nel, A. E., Gittinger, C., Rheeder, A. and Landreth, G. E. (1989) Complexing of the CD-3 subunit by a monoclonal antibody activates a microtubule-associated protein 2 (MAP-2) serine kinase in Jurkat cells. *Biochem. J.* 262, 449-456
- Hattori, S., Fukuda, M., Yamashita, T., Nakamura, S., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase and its activator by ras in intact cells and in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 267, 20346-20351
- Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielnny, S., Cohen, P. and Marshall, C. J. (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71, 335-342
- Itoh, T., Kaibuchi, K., Masuda, T., Yamamoto, T., Matsuura, Y., Maeda, A., Shimizu, K. and Takai, Y. (1993) The post-translational processing of ras p21 is critical for its stimulation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 3025-3028
- Jaiswal, R. K., Moodie, S. A., Wolfman, A. and Landreth, G. E. (1994) The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6944-6953
- Jelinek, T., Catling, A. D., Reuter, C. W., Moodie, S. A., Wolfman, A. and Weber, M. J. (1994) RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8212-8218
- Kizaka-Kondoh, S. and Okayama, H. (1993) Raf-1 is not a major upstream

regulator of MAP kinases in rat fibroblasts. *FEBS Lett.* 326 , 255-258

Kosako, H., Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *EMBO J.* 12 , 787-794

Kosako, H., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1994) Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J.* 13 , 2131-2138

Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X.-f., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. and Avruch, J. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358 , 417-421

Labbe, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavodore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J. M., Picard, A. and Doree, M. (1989) MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* 8 , 3053-3058

Lackner, M. R., Kornfeld, K., Miller, L. M., Horvitz, H. R. and Kim, S. K. (1994) A MAP kinase homolog, mpk-1, is involved in ras-mediated induction of vulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 8 , 160-173

Lange-Carter, C. A., Pleiman, C. M., Gardner, A. M., Blumer, K. J. and Johnson, G. L. (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260 , 315-319

Lange-Carter, C. A. and Johnson, G. L. (1994) Ras-dependent growth factor regulation of MEK kinase in PC12 cells. *Science* 265 , 1458-1461

Lee, K. S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Arai, H., Nishida, E., Matsumoto, K. and Levin, D. E. (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 13 , 2067-2075

Leevers, S. J. and Marshall, C. J. (1992) Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *EMBO J.* 11 , 569-574



Leevers, S. J., Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369, 411-414

Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. and Pouyssegur, J. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122, 1079-1088

Miyasaka, T., Chao, M. V., Sherline, P. and Saltiel, A. R. (1990) Nerve growth factor stimulates a protein kinase in PC-12 cells that phosphorylates microtubule-associated protein-2. *J. Biol. Chem.* 265, 4730-4735

Mizoguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kawada, H. and Shinozaki, K. (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* 5, 111-122

Muslin, A. J., MacNicol, A. M. and Williams, L. T. (1993) Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4197-4202

Nebreda, A. R. and Hunt, T. (1993) The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J.* 12, 1979-1986

Neiman, A. M., Stevenson, B. J., Xu, H. P., Sprague, G. F., Herskowitz, I., Wigler, M. and Marcus, S. (1993) Functional homology of protein kinases required for sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* suggests a conserved signal transduction module in eukaryotic organisms. *Mol. Biol. Cell.* 4, 107-120

Nel, A. E., Hanekom, C., Rheeder, A., Williams, K., Pollack, S., Katz, R. and Landreth, G. E. (1990a) Stimulation of MAP-2 kinase activity in T lymphocytes by anti-CD3 or anti-Ti monoclonal antibody is partially dependent on protein

kinase C. *J. Immunol.* 144 , 2683-2689

Nel, A. E., Pollack, S., Landreth, G. E., Ledbetter, J. A., Hultin, I., Williams, K., Katz, R. and Akerley, B. (1990b) CD-3-mediated activation of MAP-2 kinase can be modified by ligation of the CD4 receptor. Evidence for tyrosine phosphorylation during activation of this kinase. *J. Immunol.* 145 , 971-979

Nishida, E. and Gotoh, Y. (1992) Mitogen-activated protein kinase and cytoskeleton in mitogenic signal transduction. *Int. Rev. Cytol.* 138 , 211-283

Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18 , 128-131

Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C. Meloche, S. and Pouyssegur, J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 , 8319-8323

Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* 10 , 885-892

Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F. and Cooper, J. A. (1993) Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 13 , 2546-2553

Reuter, C. W., Catling, A. D., Jelinek, T. and Weber, M. J. (1995) Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. *J. Biol. Chem.* 270 , 7644-7655

Schlender, K. K., Wilson, S. E. and Mellgren, R. L. (1986) Purification and characterization of the polycation-stimulated protein phosphatase catalytic subunit from porcine renal cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 872 , 1-10

Schulte, T. W., Blagosklonny, M. V., Ingui, C. and Neckers, L. (1995) Disruption of the Raf-1-HSP90 molecular complex results in destabilization of



Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J. Biol. Chem.* 270 , 24585-24588

Seeger, R., Seeger, D., Lozeman, F. J., Ahn, N. G., Graves, L. M., Campbell, J. S., Ericsson, L., Harrylock, M., Jensen, A. M. and Krebs, E. G. (1992) Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J. Biol. Chem.* 267 , 25628-25631

Shibuya, E. K., Polverino, A. J., Chang, E., Wigler, M. and Ruderman, J. V. (1992) Oncogenic ras triggers the activation of 42-kDa mitogen-activated protein kinase in extracts of quiescent *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 , 9831-9835

Shirakabe, K., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1992) A mitogen-activated protein (MAP) kinase activating factor in mammalian mitogen-stimulated cells is homologous to *Xenopus* M phase MAP kinase activator. *J. Biol. Chem.* 267 , 16685-16690

Stokoe, D., Mocdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M. and Hancock, J. F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264 , 1463-1467

Sturgill, T. W. and Wu, J. (1991) Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim. Biophys. Acta* 1092 , 350-357

Thomas, S. M., DeMarco, M., D'Arcangelo, G., Halegoua, S. and Brugge, J. S. (1992) Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* 68 , 1031-1040

Thompson, H. L., Shiroo, M. and Saklatvala, J. (1993) The chemotactic factor N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine activates microtubule-associated protein 2 (MAP) kinase and a MAP kinase kinase in polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. J.* 290 , 483-488

Toda, T., Shimanuki, M. and Yanagida, M. (1991) Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast

FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev.* 5, 60-73

Traverse, S. and Cohen, P. (1994) Identification of a latent MAP kinase kinase in PC12 cells as B-raf. *FEBS Lett.* 350, 13-18

Vaillancourt, R. R., Gardner, A. M. and Johnson, G. L. (1994) B-Raf-dependent regulation of the MEK-1/mitogen-activated protein kinase pathway in PC12 cells and regulation by cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6522-6530

Wartmann, M. and Davis, R. J. (1994) The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J. Biol. Chem.* 269, 6695-6701

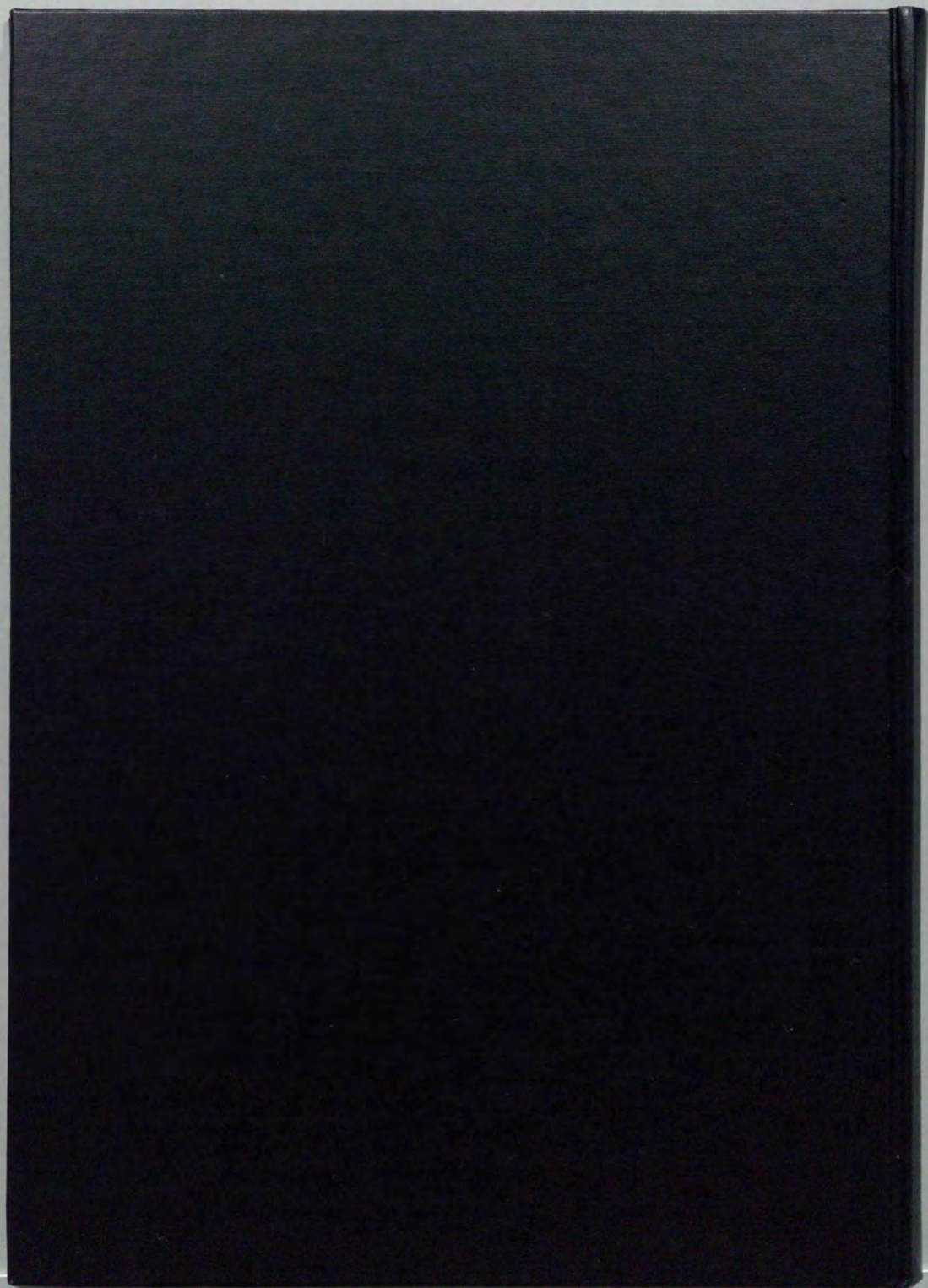
Wood, K. W., Sarnacki, C., Roberts, T. M. and Blenis, J. (1992) ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* 68, 1041-1050

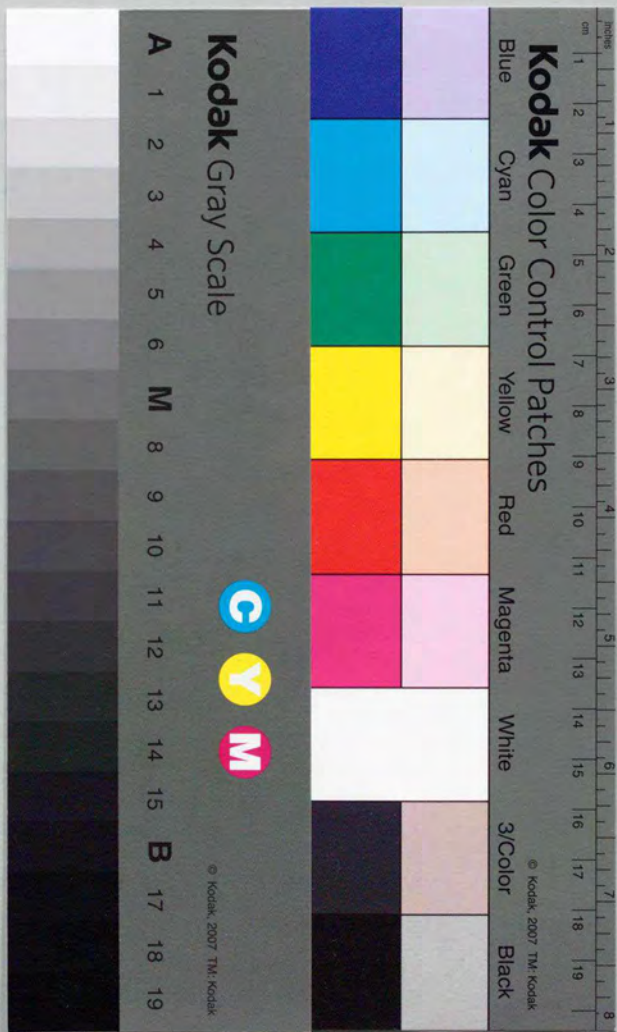
Wu, J., Harrison, J. K., Dent, P., Lynch, K. R., Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1993) Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 173-177

Wu, Y. and Han, M. (1994) Suppression of activated Let-60 ras protein defines a role of *Caenorhabditis elegans* Sur-1 MAP kinase in vulval differentiation. *Genes Dev.* 8, 147-159

Zheng, C.-F. and Guan, K.-L. (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J.* 13, 1123-1131







**Kodak Color Control Patches**

Blue    Cyan    Green    Yellow    Red    Magenta    White    3/Color    Black

**Kodak Gray Scale**

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

**C** **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM: Kodak