

総説

ストレス応答性MAPキナーゼカスケードにおけるプロテインホスファターゼ2Cの機能

大西 素子

中部大学応用生物学部応用生物化学科

はじめに

細胞はホルモンや成長因子など様々な細胞外シグナルに应答する情報伝達システムを備えているが、蛋白質のリン酸化および脱リン酸化反応はその主要機構のひとつである。蛋白質のリン酸化はプロテインキナーゼにより、その逆反応である脱リン酸化はプロテインホスファターゼにより触媒される。プロテインホスファターゼの研究は、キナーゼと比べて活性測定に基質の調節が必要であるため敬遠されて来たが、細胞内蛋白質のリン酸化レベルはプロテインホスファターゼとプロテインキナーゼの活性のバランスによって調節されていると考えられており、その機能が注目されている。

プロテインセリン/スレオニンホスファターゼの分類

プロテインホスファターゼは大きくセリン/スレオニンホスファターゼ、チロシンホスファターゼおよび二重特異性ホスファターゼとに分けられる。セリン/スレオニンホスファターゼは蛋白質のセリンまたはスレオニンの水酸基に結合したリン酸の加水分解を触媒するが、その基質特異性と阻害剤に対する感受性から、1983年にさらにタイプ1 (PP1) とタイプ2 (PP2) に分類された(表1) (Ingebritsen et al., 1983)。即ちPP1はインヒビター1と2 (I-1、I-2) に感受性を持ち (Huang et al., 1976)、PP2は抵抗性

である。また、cAMP依存性キナーゼによってリン酸化されたホスホリラーゼキナーゼを基質とした時、PP1は β サブユニットをPP2は α サブユニットを選択的に脱リン酸化する。PP2はさらに二価陽イオン要求性からA、BおよびCの3種類に分類される。PP2BはCa²⁺依存性を持ち、PP2CはMg²⁺またはMn²⁺依存性である。PP2Aは両者に対する要求性が無い。現在ではPP1、PP2AおよびPP2Bはその3次元構造の類似性から、PP4 (Brrewis et al., 1993)、PP5 (Chen et al., 1994)、PP6 (Bastians et al., 1996) およびPP7 (Huang et al., 1998) など新たに見つかったホスファターゼとともにPPPファミリーとも呼ばれる。

PP2Cの分子多様性と発現制御

PP1、PP2AおよびPP2Bは触媒サブユニットと調節サブユニットからなっており、調節サブユニットによってその基質特異性が変化すると考えられているが、PP2Cの調節サブユニットはみつかっておらず、分子量43~48Kの単量体として存在していると考えられている。また、PP1、PP2AおよびPP2Bの一次構造が互いに相同性を持つのに比べ、PP2Cはこれらの一次構造との相同性に乏しい。PP2Cは当初ラット肝に見い出され (Kikuchi, 1977)、引き続き複数のグループによって (Pato & Adelstein, 1980, Hiraga, 1981) 精製が行われた。その後の化学

表1 プロテインセリン/スレオニンホスファターゼの古典的分類

グリコーゲンホスホリラーゼキナーゼ のサブユニットに対する特異性		阻害剤に対する感受性		2価イオン要求性
		I-1およびI-2	オキサダ酸 (IC ₅₀ , nM)	
PP1	β	あり	10~20 nM	なし
PP2A	α	なし	0.1 nM	なし
PP2B	α	なし	弱い	Ca ²⁺
PP2C	α	なし	なし	Mg ²⁺

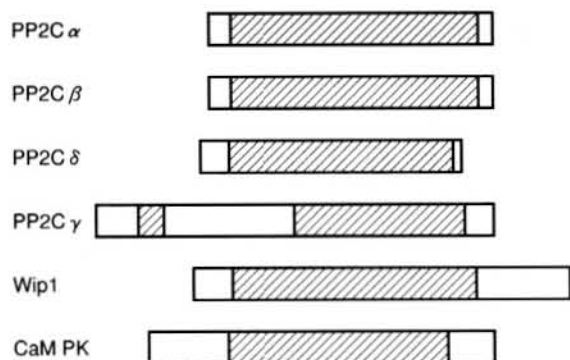


図1 ほ乳類PP2Cファミリー
相同性の高い領域を斜線で示した。

分析の結果 α と β の2種類のアイソフォームが存在することが判明し、1989年にラットPP2C α cDNAのクローニングが成功した後(Tamura, 1989), 引き続きPP2C β のクローニングもなされ(Wenk, 1992), PP2C α と β が異なった遺伝子によってコードされていることが明らかにされた。現在、ほ乳類では6種類のPP2C遺伝子の報告がなされているが、ショウジョウバエのゲノム解析の結果などからその種類は今後ますます増えそうである(Rubin et al., 2000) (図1)。

PP2C α と β のアミノ酸配列の類似性は約75%である。筆者らはPP2C α および β のcDNAの単離とこれを用いた大腸菌での活性蛋白質の発現に最初に成功した(Terasawa et al., 1993, Kato et al., 1994)。その後の解析の結果、PP2C α にはC末端の塩基配列のみが異なる3種類のアイソフォームが、PP2C β には同様の5種類のアイソフォームが単一のpre-mRNAからの選択的スプライシングによって生じることが明らかとなっている(Kato et al., 1995, 1996)。PP2C β の各アイソフォームのうち、PP2C β -1はマウス胚性幹細胞やマウス胚性腫瘍細胞での発現を含め、マウスのほとんどの臓器に普遍的に発現していたが、 β -2は脳と心筋に、 β -3, 4および5は精巣、小腸および肝臓に選択的に発現しており、組織特異的な機能を荷っているのではないかと推測された。マウスPP2C β 遺伝子を単離し、転写調節領域の解析を行った結果、少なくとも2種類のプロモーターの存在が明らかとなった(Ohnishi et al. 1999)。このうち上流に位置するプロモーターはTATA Boxを持たず、GC配列の多いハウスキーピングタイ

プのプロモーターの特徴を備えていた。下流のものにはTATAボックスの他、性決定に関する転写因子の結合に関わるとされているSRY配列やNRE配列が認められた。RT-PCRによる検討では、前者のプロモーターによって発現調節される転写産物が各種臓器に普遍的に検出され、後者による転写産物は精巣、腸管および肝臓のみに発現が検出されることから、PP2C β mRNA 3'末端の選択的スプライシングによるPP2C β -3, 4および5の発現が後者のプロモーターによる転写調節機構と連動している可能性が示唆された。

PP2Cによるストレス感受性MAPキナーゼシステムの制御

分裂酵母でPP2CはPtc1, Ptc2およびPtc3の3種類が見つかり、ほ乳類のPP2Cと約30%の相同性を示す。Ptc1は当初、熱ショック蛋白質HSP90と相同性を持つ分裂酵母のSwolの温度感受性変異株を多コピーで回復させる遺伝子として見つけられた(Shiozaki et al., 1994)。その後の研究により、ptc1⁻ ptc3⁻およびptc1⁻ ptc2⁻ ptc3⁻の多重変異体は温度感受性を示すにもかかわらず、高浸透圧培地ではその表現型が抑制されることから、PP2Cが細胞内浸透圧の調節に関係していることが推測された(Shiozaki et al., 1995)。

MAPキナーゼカスケードは、真核生物に普遍的に存在する情報伝達系である(Nishida et al., 1993)。この情報伝達系は、順番に活性化される3種類のキナーゼからなっており、まずMAPKKKが上流の分子との結合によって活性化されると、MAPKKのセリンおよびスレオニン残基をリン酸化し、これを活性化する。活性化されたMAPKKはMAPKのスレオニンおよびチロシン残基をリン酸化して活性化する(Widmann et al., 1999)。ほ乳類のMAPキナーゼカスケードは現在3つのグループに分けられているが、このうち最も早くから知られていたMAPキナーゼであるERK1およびERK2は、様々な増殖因子によってTEY配列がリン酸化され活性化される(Lewis et al., 1998)。ERKとは異なり、JNKは紫外線や高浸透圧などのストレス、TNFやIL-1などのサイトカイン刺激によってTPY配列がリン酸化され、活性化される。3

番目のグループのp38も浸透圧やその他のストレスによってTGYP配列がリン酸化され活性化されることが知られている。このp38と高い相同性を示すキナーゼは分裂酵母および出芽酵母ではそれぞれSpc1およびHog1として知られており、これらは酵母の浸透圧シグナル伝達にかかわるMAPキナーゼカスケードを構成していることが報告されている (Gustin et al. 1998) (図2)。分裂酵母のPP2CであるPtc1は、浸透圧によるストレス刺激では、Spc1やWis1などカスケードを構成するキナーゼを直接脱リン酸化しているわけではなく、Spc1によって活性化される転写因子Atf1の標的遺伝子の転写を抑制することにより、Spc1経路を負に調節していることが示されたが (Gaits et al., 1997)、熱ショックによって活性化したSpc1はPtc1およびPtc3によるスレオニン残基の脱リン酸化によって不活性化されることが示唆された (Nguyen et al., 1999)。出芽酵母ではこれと異なり、Ptc1、Ptc2およびPtc3が浸透圧ストレスで活性化されるHog1の脱リン酸化と不活性化に直接関与していることが示唆されている (Maeda et al., 1994, Warmka et al., 2001)。

このような酵母での研究結果から、PP2Cが普遍的にストレス応答MAPキナーゼカスケードの制御に関与していることが示唆されたため、筆者らはほ乳動物細胞でのPP2Cの過剰発現系を用いて、ストレス応答時のMAPキナーゼカスケードの活性化にPP2Cが与える影響を検討した。その結果、PP2C α またはPP2C β -1

をCOS-7 cellで発現した系で、アニソマイシンやNaCl刺激時に亢進するp38MAPキナーゼのチロシン残基のリン酸化が抑制されることが明らかとなり (Hanada et al., 1998)、同様の結果はTakekawaらからも報告された (Takekawa et al., 1998)。PP2Cがリン酸化セリン/スレオニンに特異的なホスファターゼであることから、その作用点はより上流であることが推測されたため、同じ系でのMAPKKのリン酸化状態を調べたところ、ストレス刺激時に亢進するMKK3および6のリン酸化はPP2C α またはPP2C β -1の高発現によって抑制されることがわかった。このリン酸化の抑制は、PP2C β -1の不活性型変異体を過剰発現した場合には見られなかったため、PP2C β -1の活性に依存することが判明した。P38のリン酸化および活性がPP2Cによって抑制されるのに対し、増殖因子によって活性化されるERK1およびERK2を活性化するMEK1に対してはPP2Cの過剰発現の影響は見られず、PP2Cはストレス応答MAPキナーゼカスケードを選択的に抑制していると考えられた。

そこでストレス応答性MAPキナーゼカスケードにおけるPP2Cの作用点を同定するためさらに検討を行った。まず、PP2C α または β -1の高発現によって抑制されるMKK6のリン酸化が、直接PP2Cによって脱リン酸化されたためかどうかを調べるため、大腸菌で発現、精製したそれぞれの蛋白質を用いて検討したところ、PP2C β -1はMKK6を不活性化できなかった。この結果から、PP2C β -1の作用点はさらに上流

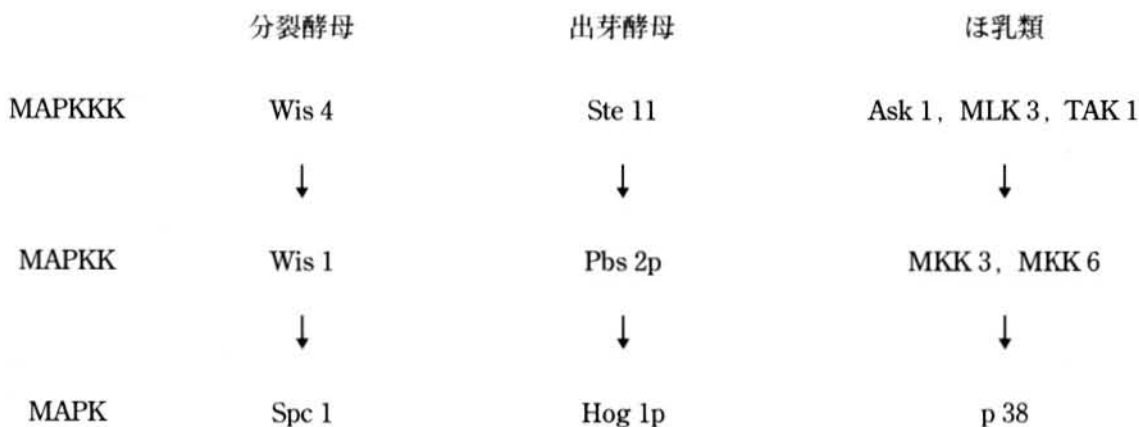


図2 ストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達系

出芽酵母では浸透圧、分裂酵母とはほ乳類では浸透圧を始め紫外線、熱ショックなど様々な細胞外からのストレスによって活性化され、情報を核に伝える。

であると考え、MAPKKKとPP2C β -1を高発現した場合の下流のシグナルのリン酸化状態および活性化に関して検討を行った。その結果、p38の上流に位置するMAPKKKの1つであるTAK1 (TGF β -activated kinase) とその活性化因子TAB1をCOS-7細胞で発現した場合亢進する、MKK6のリン酸化レベルがPP2Cの共発現によって抑制されることがわかった。また、TAK1の発現によるp38およびJNKの活性化も、同様にPP2Cの共発現によって抑制された。TAK1はIL-1刺激によって、リン酸化され活性化することが知られているが(図3)、PP2C β -1は共発現によってこのTAK1のリン酸化を抑制し、またMKK6を基質としてin vitroでTAK1のキナーゼ活性を調べると、PP2C β -1は量依存的にTAK1の活性を抑制した。さらに免疫沈降を行ったところ、内在性PP2C β -1はキナーゼ領域を含むTAK1の中央部分と相互作用し、特異的に複合体を形成していることが判明した。以上の結果から、PP2C β -1はTAK1と相互作用することによって脱リン酸化、活性を抑制し、その下流のMAPキナーゼカスケードを抑制することが示唆された。

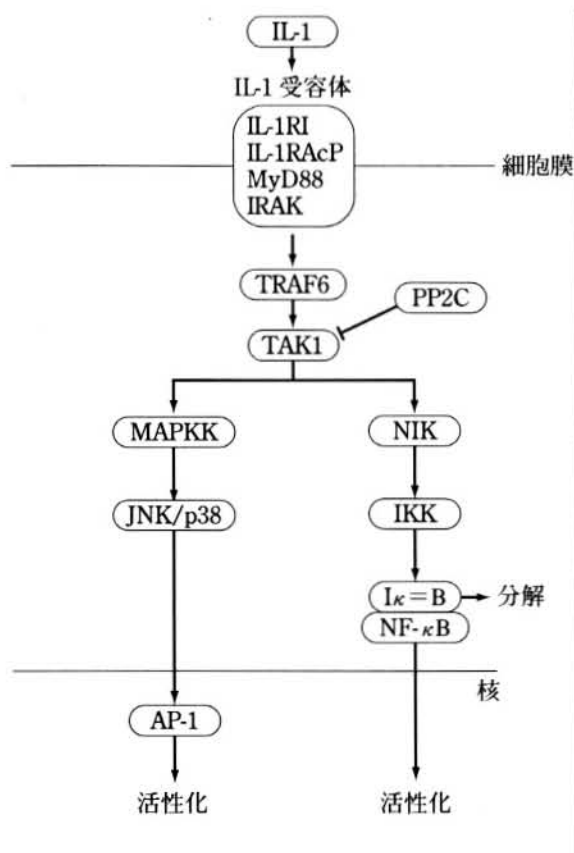


図3 IL-1 シグナル伝達経路

TAK1はIL-1刺激によって活性化されることが報告されているため(Ninomiya-Tsuji et al, 1999)、IL-1シグナル伝達経路におけるPP2C β -1の作用を検討した。IL-1Rを安定的に発現した293細胞にPP2C β -1とルシフェラーゼレポーター遺伝子を共発現し、IL-1で刺激したところ、下流の転写因子であるAP-1の活性がPP2C β -1の発現によって抑制されることがわかった。PP2C β -1のホスファターゼ活性を持たない優性ネガティブ変異体を発現した場合には、このAP-1に対するPP2C β -1の抑制作用は解除されるだけでなく、AP-1の活性が亢進しており、内在性のPP2C β がIL-1によるAP-1の活性化に関わっていることが裏付けられた。PP2C β -1はTAK1の高発現によるNF- κ Bの活性をも抑制したため、PP2CがIL-1シグナル伝達系の制御に関与している可能性が示唆されたが、その活性制御機構に関しては不明な部分が多くより詳細な解析が待たれる。

酵母からほ乳類に至るまで、ストレス応答性MAPキナーゼカスケードの制御に関わるPP2C機能は保存されていることがわかったが、PP2C α -2は、MAPKおよびMAPKKと共に脱リン酸化することが報告されており、その作用点など詳細な部分では分子種によって違いが見られた。PP2Cファミリーに属するホスファターゼは最近でも新しい分子が次々に報告されており、生理的機能、およびその活性調節機構について解明されることが期待される。

引用文献

- Bastians H., Ponstingl H. 1996. The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J. Cell. Sci.* 109:2865-2874.
- Brewis, N. D., Street, A. J., Prescott, A. R. 1993. PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J.* 12:987-996.
- Chen, M.X., McPartlin, A. E., Brown, L., Chen Y. H., Barker H., M., Cohen P. T. 1994. A novel human protein serine/threonine phos-

- phatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J.* 13:4278-4290.
- Gaits, F., Shiozaki, K., Russell, P. 1997. Protein phosphatase 2C acts independently of stress-activated kinase cascade to regulate the stress response in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 272:17873-17879.
- Gustin M. C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1264-1300.
- Hanada M., Kobayashi T., Ohnishi M., Ikeda S., Wang H., Katsura K., Yanagawa Y., Hiraga A., Kanamaru R., Tamura S. 1998. Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Lett.* 437:172-6.
- Hanada M., Ninomiya-Tsuji J., Komaki K., Ohnishi M., Katsura K., Kanamaru R., Matsumoto K., Tamura S. 2001. Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem.* 276:5753-5759.
- Hiraga A., Kikuchi K., Tamura S., Tsuiki S. 1981. Purification and characterization of Mg²⁺-dependent glycogen synthase phosphatase (phosphoprotein phosphatase IA) from rat liver. *Eur J Biochem.* 119:503-510.
- Huang, F. L., Glinsmann, W. H. 1976. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.*, 70:419-426.
- Huang X., Honkanen R. E. 1998. Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to *Drosophila* retinal degeneration C gene product (rdgC). *J. Biol. Chem.* 273:1462-1468.
- Ingebritsen, T.S. , Cohen, P. 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221:331-338.
- Kato S., Kobayashi T., Terasawa T., Ohnishi M., Sasahara Y., Kanamaru R., Tamura S. 1994. The cDNA sequence encoding mouse Mg²⁺-dependent protein phosphatase alpha. *Gene* 145:311-312.
- Kato S., Terasawa T., Kobayashi T., Ohnishi M., Sasahara Y., Kusuda K., Yanagawa Y., Hiraga A., Matsui Y., Tamura S. 1995. Molecular cloning and expression of mouse Mg²⁺-dependent protein phosphatase β -4 (type 2C β -4). *Arch Biochem Biophys.* 318:387-393.
- Kato S., Kobayashi T., Kusuda K., Nishina Y., Nishimune Y., Yomogida K., Yamamoto M., Sakagami H., Kondo H., Ohnishi M., Chida N., Yanagawa Y., Tamura S.. 1996. Differentiation-dependent enhanced expression of protein phosphatase 2C β in germ cells of mouse seminiferous tubules. *FEBS Lett.* 396:293-297.
- Kikuchi K. Tamura S., Hiraga A., Tsuiki S. 1977. Glycogen synthase phosphatase of rat liver. Its separation from phosphorylase phosphatase on DE-52 columns. *Biochem Biophys Res Commun.* 75:29-37.
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., Ahn, N. G. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74:49-139.
- Maeda T., Wurgler-Murphy S. M., Saito H. 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* 369:242-245.
- Nguyen, A. N., Shiozaki, K. 1999. Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev.* 13:1653-1663.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., Matsumoto, K. 1999. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature.* 398:252-6Nature 398:252-256.
- Nishida E., Gotoh, Y. 1993. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci.* 18:128-131.
- Ohnishi M, Chida N, Kobayashi T, Wang H,

- Ikeda S, Hanada M, Yanagawa Y, Katsura K, Hiraga A, Tamura S. 1999. Alternative promoters direct tissue-specific expression of the mouse protein phosphatase 2C β gene. *Eur J Biochem*. 263:736-45.
- Pato M.D., Adelstein R., S. 1980. Dephosphorylation of the 20,000-dalton light chain of myosin by two different phosphatases from smooth muscle. *J Biol Chem*. 255:6535-6538.
- Rubin G.M., Yandell M. D., Wortman J. R., Gabor Miklos G. L., Nelson C. R., Hariharan I. K., Fortini M. E., Li P. W., Apweiler R., Fleischmann W., Cherry J. M., Henikoff S., Skupski M. P., Misra S., Ashburner M., Birney E., Boguski M. S., Brody T., Brokstein P., Celniker S. E., Chervitz S. A., Coates D., Cravchik A., Gabrielian A., Galle R. F., Gelbart W. M., George R. A., Goldstein L. S., Gong F., Guan P., Harris N. L., Hay B. A., Hoskins R. A., Li J., Li Z., Hynes R. O., Jones S. J., Kuehl P. M., Lemaitre B., Littleton J. T., Morrison D. K., Mungall C., O'Farrell P. H., Pickeral O. K., Shue C., Vossell L. B., Zhang J., Zhao Q., Zheng X. H., Lewis S. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287:2204-2215.
- Shiozaki K., Akhavan-Niaki, H., McGowan, C. H., Russell, P. 1994. Protein phosphatase 2C, encoded by *ptc1+*, is important in the heat shock response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol*. 14:3742-3751.
- Shiozaki K., Russell P. 1995. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J*. 14:492-502.
- Takekawa M., Maeda T., Saito H. 1998. Protein phosphatase 2C α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J*. 17:4744-4752.
- Tamura S., Yasui A., Tsuiki S. 1989. Expression of rat protein phosphatase 2C (IA) in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 163:131-136.
- Terasawa T., Kobayashi T., Murakami T., Ohnishi M., Kato S., Tanaka O., Kondo H., Yamamoto H., Takeuchi T., Tamura S. 1993. Molecular cloning of a novel isotype of Mg^{2+} -dependent protein phosphatase β (type 2C β) enriched in brain and heart. *Arch Biochem Biophys*. 307:342-349.
- Warmka J., Hanneman J., Lee J., Amin D., Ota I. 2001. Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol*. 21:51-60.
- Wenk J, Trompeter HI, Pettrich KG, Cohen PT, Campbell DG, Mieskes G. 1992. Molecular cloning and primary structure of a protein phosphatase 2C isoform. *FEBS Lett*. 297:135-138.
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M. B., Johnson G. L. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev*. 79:143-180.
- Title :** Function of protein phosphatase 2C in the stress-activated MAP kinase signaling pathway
- Author :** Motoko Ohnishi (Department of Biological Chemistry, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)
- Key words :** Protein phosphatase, Stress activated protein kinase.