

ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

Gene targeting法によるMEK kinase 1 (MEKK1) の機能解析

湯尻俊昭

山口大学医学部応用医工学系・内科学第三講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 細胞生物学, シグナル伝達, ノックアウトマウス

はじめに

我々の体を構成している1つ1つの細胞は, その恒常性を維持するために外的環境の変化を感知し, それを細胞内に伝達し, 必要に応じて適切な遺伝子の発現を制御している. この細胞応答を引き起こすためにシグナル伝達経路が存在している. 中でもMAP kinaseカスケードは酵母から哺乳動物まで保存された伝達経路の一つである. 様々な高次生命現象, 例えば胚発生, 細胞分化・増殖や細胞死などの制御において重要な役割を果たすことが明らかにされている. MEK kinase 1 (MEKK1) はMAP kinaseカスケードのMAPKKKであり, Rafの次に発見され, 様々な機能解析が行われている. 我々は1998年よりgene targeting法を用いたMEKK1の機能解析を行ってきた. 本稿では一連の研究により明らかにされたこの蛋白の機能について概説する.

MEKK1の基本構造

MEKK1は分子量196kDのセリン・スレオニンキナーゼである. 酵母のMAPKKKであるste11やbyr2のマウスホモログとしてクローニングされた¹⁾. 生理的にはMAPKKファミリーのMKK4やMKK7の調節因子, さらにその下流のMAPKファミリーのJNK活性化調節因子として認識されている (図1). C端に約90kDのkinase domainを有し, N端の約

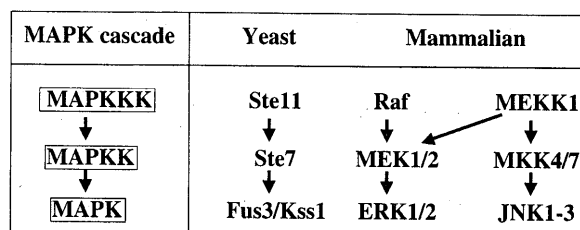


図1 MAP kinaseカスケード

110kD部分は様々な蛋白との結合領域が確認されている²⁾.

Gene targeting法によるMEKK1遺伝子の破壊

MEKK1のexon1をネオマイシン耐性遺伝子 (neo) で置換できるようにtargeting vectorを作成した. このvectorをマウスES細胞に遺伝子導入し, 相同組み換えにより, 片方のアリルをneoで置換したES細胞を選択した (MEKK1^{+/}-ES cell). このES細胞を常法によりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス (F1) を作出し, それらの交配によりホモ変異マウス (F2) を作出した³⁾. 一方, 高濃度G418法による両方のアリルを置換したダブルノックアウトES細胞 (MEKK1⁻-ES cell) も作成した⁴⁾.

平成16年5月11日受理

MAPKカスケードにおけるMEKK1の役割

MEKK1は過剰発現により、ERK, JNK, p38のそれぞれの活性化を誘導することが知られているが、生理的にはJNK活性に貢献していると考えられている。MEKK1^{-/-} ES cellを用いた解析により、p38の活性化には関与していないが、特異的な刺激やストレスによるJNK活性化にMEKK1が必須であること、またERK活性化にMEKK1は部分的に貢献していることを明らかにした。つまり、外界からの刺激に応じてMEKK1依存的JNK, ERK活性化経路がES細胞内に存在することを明らかにした⁹⁾。MAPKKKは現在まで、20種類以上存在することが分かっているが、このMAPKKKに特異的なシグナル伝達経路が存在することは大きな驚きであった。

NF κ B活性化経路におけるMEKK1の役割

Maniatisらは、MEKK1がNF κ Bの調節因子であるI κ B kinase (IKK) の上流に位置し、この活性化に関係していることを報告した^{5, 6)}。またAdult T cell leukemia (ATL) ウイルスの癌遺伝子産物TaxのNF κ B活性化経路にMEKK1が関与していることが報告されている⁷⁾。そこで我々はMEKK1^{-/-} mouse embryonic fibroblast (MEF) やES細胞を用いた実験により、Tax遺伝子を含めた様々な刺激やストレスによるNF κ Bの活性化を検討した。しかしながらMAPKカスケードのようなMEKK1特異的なNF κ B活性化経路は見出されなかった。MEKK1以外にもNF κ B inducing kinase (NIK), MEKK2, MEKK3, TAK1などのMAPKKKがIKKの活性化に関与していることが明らかにされており、重複した経路が存在することが示唆された。

アポトーシス調節機構におけるMEKK1の役割

細胞増殖能に関しては、MEKK1欠損細胞と野生型細胞はほぼ同様であった。ところが低濃度浸透圧刺激や微小管障害剤 (taxol, nocodazole) によるアポトーシス誘導においてMEKK1^{-/-} ES cellでは野生型に比べ有意な増加が認められた。つまりこれらの刺激において、MEKK1が細胞死を抑制する働きを持つことを明らかにした。興味深いことに、これ

らの刺激によるJNK活性化もMEKK1欠損によって低下しており、MEKK1-JNK経路が抗アポトーシス作用を示すことを示唆した⁸⁾。同様に、ES細胞由来の心筋細胞を用いることによって、酸化ストレスにおいてMEKK1-JNK経路は、抗アポトーシス作用を示すことを明らかにした⁹⁾。これまでMEKK1は過剰発現により細胞死を誘導すること、anoikisや抗癌剤によるストレスによってMEKK1がcaspaseの基質となりcleavageされ、caspaseの活性化をさらに誘導することが示されており、むしろMEKK1はアポトーシスを誘導する蛋白として認識されてきた^{10, 11)}。これらのデータを考慮するとMEKK1全体は細胞死から抑制する働きを持ち、MEKK1が外界から過剰なストレスによりcleavageされるとC端の約90kDのkinase domainは細胞死を誘導する役割を持つ、一種のスイッチ機能を持った蛋白ではないかと推測される。

細胞運動におけるMEKK1の役割

MEKK1ノックアウトマウスは妊孕性には異常はなく、ほぼ野生型マウスと同様に生まれてくるが、眼瞼結膜が欠失するという特徴的な表現型を持っている^{3, 12)}。このマウスの表現型はEGFRノックアウトマウスやTGF α ノックアウトマウスにおいても認められており、眼瞼結膜を構成する細胞のEGFRを介するシグナル伝達経路においてMEKK1は重要な役割を果たしていることが推測された。MEKK1^{-/-} MEFを用いた解析により、この細胞の細胞運動能の低下が認められ、MEKK1は細胞運動に貢献していることが示唆された。特に細胞接着に機能しており、MEKK1^{-/-} MEFではその細胞の接着能は野生型に比べ亢進していた。またMEKK1はfocal adhesion蛋白として、EGF刺激によってfocal adhesion kinase (FAK) 複合体と結合した^{13, 14)}。さらにMEKK1はcalpainと呼ばれるcysteine proteaseの活性化を調節し、talinやspectrin等のfocal adhesion蛋白の分解に関与していることを明らかにした¹⁴⁾。これらのことがMEKK1^{-/-} MEFの接着能の亢進、細胞運動能の低下につながっていることが示唆された。他のグループからは、keratinocyteにおいてMEKK1はactin polymerizationに貢献しており、MEKK1を介する

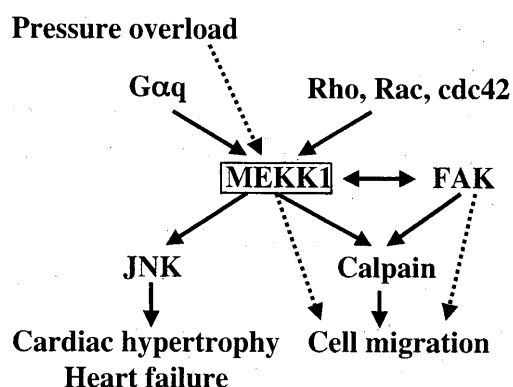


図2 MEKK1の新しい機能

actin stress fiberの形成低下がMEKK1ノックアウトマウスの眼瞼結膜形成不全につながっていることを証明した¹²⁾。さらに他のグループは、MEKK1^{-/-} ES cellをin vitroで好中球に分化することにより、この細胞においても細胞遊走能の低下を認めたことを報告している¹³⁾。このように、どの細胞においても細胞運動の低下を認めたことは、MEKK1が普遍的にこの機能に関与していることを示唆している(図2)。

MEKK1の新たな機能

MEKK1ノックアウトマウスを用いた解析により、大動脈結紮による圧負荷によって誘導される心筋のJNK活性化、アポトーシスや炎症反応にMEKK1は重要な役割を果たしていることが明らかにされた¹⁶⁾。さらに心肥大モデルとしての心臓特異的G蛋白GαqトランスジェニックマウスとMEKK1ノックアウトマウスを交配することにより、MEKK1がGαq過剰発現によって誘導される心肥大および心不全に必須であることを示した¹⁷⁾。これらの知見は心臓疾患においてMEKK1が治療の標的分子となる可能性を示唆するものである(図2)。

おわりに

gene targeting法を用いた解析により、MEKK1の新たな機能が明らかとなりつつある。その一つであるMEKK1の細胞接着や運動能に関与するメカニズムは、より詳細に検討すべき課題の一つである。また正常な状態だけでなく病的状態におけるMEKK1の機能、例えば心疾患におけるMEKK1の

機能はその代表的なものである。最近、我々は慢性骨髄性白血病の原因遺伝子産物であるBcr-Abl融合蛋白のシグナル伝達経路にMEKK1が関わっていることを明らかにした¹⁸⁾。このように外界からのストレスだけでなく、細胞内での異常な遺伝子変異によって引き起こる病的状態(例えば癌)が、いかにMEKK1が関わりを持っているかは今後の重要な課題と思われる。それらの解析にMEKK1欠損細胞やノックアウトマウスは極めて有用なツールとなり得ると思われ、今後の研究に期待したい。

引用文献

- 1) Lange-Carter CA, Pleiman CM, Gardner AM, Blumer KJ, Johnson GL. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 1993; **260**: 315-9.
- 2) Schlesinger TK, Fanger GR, Yujiri T, Johnson GL. The TAO of MEKK. *Front Biosci* 1998; **3**: D1181-6.
- 3) Yujiri T, Ware M, Widmann C, Oyer R, Russell D, Chan E, Zaitzu Y, Clarke P, Tyler K, Oka Y, Fanger GR, Henson P, Johnson GL. MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 7272-7.
- 4) Yujiri T, Sather S, Fanger GR, Johnson GL. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 1998; **282**: 1911-4.
- 5) Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 1997; **88**: 213-22.
- 6) Lee FS, Peters RT, Dang LC, Maniatis T. MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 9319-24.
- 7) Yin MJ, Christerson LB, Yamamoto Y, Kwak

- YT, Xu S, Mercurio F, Barbosa M, Cobb MH, Gaynor RB. HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate I κ B kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* 1998 ; **93** : 875-84.
- 8) Yujiri T, Fanger GR, Garrington TP, Schlesinger TK, Gibson S, Johnson GL. MEK kinase 1 (MEKK1) transduces c-Jun NH2-terminal kinase activation in response to changes in the microtubule cytoskeleton. *J Biol Chem* 1999 ; **274** : 12605-10.
- 9) Minamino T, Yujiri T, Papst PJ, Chan ED, Johnson GL, Terada N. MEKK1 suppresses oxidative stress-induced apoptosis of embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 ; **96** : 15127-32.
- 10) Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 1997 ; **90** : 315-23.
- 11) Widmann C, Gerwins P, Johnson NL, Jarpe MB, Johnson GL. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1998 ; **18** : 2416-29.
- 12) Zhang L, Wang W, Hayashi Y, Jester JV, Birk DE, Gao M, Liu CY, Kao WW, Karin M, Xia Y. A role for MEK kinase 1 in TGF-beta/activin-induced epithelium movement and embryonic eyelid closure. *EMBO J* 2003 ; **22** : 4443-54.
- 13) Yujiri T, Nawata R, Takahashi T, Sato Y, Tanizawa Y, Kitamura T, Oka Y. MEK kinase 1 interacts with focal adhesion kinase and regulates insulin receptor substrate-1 expression. *J Biol Chem* 2003 ; **278** : 3846-51.
- 14) Cuevas BD, Abell AN, Witowsky JA, Yujiri T, Johnson NL, Kesavan K, Ware M, Jones PL, Weed SA, DeBiasi RL, Oka Y, Tyler KL, Johnson GL. MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J* 2003 ; **22** : 3346-55.
- 15) Lieber JG, Webb S, Suratt BT, Young SK, Johnson GL, Keller GM, Worthen GS. The in vitro production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells. *Blood* 2004 ; **103** : 852-9.
- 16) Sadoshima J, Montagne O, Wang Q, Yang G, Warden J, Liu J, Takagi G, Karoor V, Hong C, Johnson GL, Vatner DE, Vatner SF. The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 2002 ; **110** : 271-9.
- 17) Minamino T, Yujiri T, Terada N, Taffet GE, Michael LH, Johnson GL, Schneider MD. MEKK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by Gq. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; **99** : 3866-71.
- 18) Nawata R, Yujiri T, Nakamura Y, Ariyoshi K, Takahashi T, Sato Y, Oka Y, Tanizawa Y. MEK kinase 1 mediates the antiapoptotic effect of the Bcr-Abl oncogene through NF-kappaB activation. *Oncogene* 2003 ; **22** : 7774-80.

Role of MEK kinase 1 (MEKK1) Defined by Targeted Gene Disruption

Toshiaki YUJIRI

*Internal Medicine III, Bio-Signal Analysis,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

MAP kinase cascades play a pivotal role in many aspects of cellular functions, and are evolutionarily conserved from yeast to mammals. MAP kinase pathways are composed of three kinases: a MAP kinase (MAPK), MAPK kinase (MAPKK), and a MAPK kinase kinase (MAPKKK). MEKK1 is a 196-kD protein serine-threonine kinase that has been cloned as a mammalian homologue of *Ste11* and *Byr2* MAPKKK in yeast. MEKK1 gene disruption by homologous recombination defined its role of JNK and ERK activations and cell survival by some specific stimuli. MEKK1 deficient cells also showed unexpected roles of cell migration. MEKK1 is associated with actin fibers and focal adhesions, localizing MEKK1 to sites critical in the control of cell adhesion and migration. MEKK1 is required for activation of the cysteine protease calpain and cleavage of spectrin and talin, proteins linking focal adhesions to the cytoskeleton. In MEKK1 knockout mice, the absence of this kinase was sufficient to prevent the cardiac hypertrophy induced by *Gαq* and elevated levels of apoptosis and inflammatory lesions by pressure overload. Thus, MEKK1 is a logical target for drug development in pathological conditions including heart diseases.