(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4127850号
(P4127850)

(45)発行日　平成20年7月30日(2008.7.30)　(24)登録日　平成20年5月23日(2008.5.23)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/40	(2006.01)	C07K	16/40	
C12N 9/12	(2006.01)	C12N	9/12	
A61K 38/45	(2006.01)	A61K	37/52	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12R 1/91	(2006.01)	C12N	9/12	

請求項の数 12　(全 38 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-523486
(86)(22)出願日　平成6年4月15日(1994.4.15)
(65)公表番号　特表平8-509128
(43)公表日　平成8年10月1日(1996.10.1)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/004178
(87)国際公開番号　WO1994/024159
(87)国際公開日　平成6年10月27日(1994.10.27)
審査請求日　平成13年3月28日(2001.3.28)
審判番号　不服2005-4889(P2005-4889/J1)
審判請求日　平成17年3月22日(2005.3.22)
(31)優先権主張番号　049,254
(32)優先日　平成5年4月15日(1993.4.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　505104478
ナシヨナル・ジユーイツシユ・センター・フオー・イミユノロジー・アンド・レスピラトリー・メデイシン
アメリカ合衆国コロラド州８０２０６デンバー・ジヤクソンストリート１４００
(74)代理人　100060782
弁理士　小田島　平吉
(72)発明者　ジヨンソン，ゲイリー・エル
アメリカ合衆国コロラド州８０３０４ボウルダー・ケラーフアームドライブ２４９７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】外部シグナルへの細胞反応性を調節するための方法および産物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記の配列表１に示されるアミノ酸配列を含み、哺乳類のＭＥＫ－１蛋白質をリン酸化することが可能である、単離された蛋白質。配列表１：

【表１】

```
TACACTCCTT GCCACAGTCT GGCAGAAAGA ATCAAACTTC AGAGACTCCT CCGGCCAGTT
GTAGACACTA TCCTTGTCAA GTGTGCAGAT CCAACAGCCG CACGAGTCAG CTGTCCATAT
CTACAGTGCT GGAACTCTGC AAGGGCCAAG CAGGAGAGCT GGCGGTTGGG AGAGAAATAC
TTAAAGCTGG GTCCATCGGG GTTGGTGGTG TCGATTACGT CTTAAGTTGT ATCCTTGGAA
ACCAAGCTGA ATCAAACAAC TGGCAAGAAC TGCTGGGTCG CCTCTGTCTT ATAGACAGGT
TGCTGTTGGA ATTTCCTGCT GAATTCTATC CTCATATTGT CAGTACTGAT GTCTCACAAG
CTGAGCCTGT TGAAATCAGG TACAAGAAGC TGCTCTCCCT CTTAACCTTT GCCTTGCAAT
CCATTGACAA TTCCCACTCG ATGGTTGGCA AGCTCTCTCG GAGGATATAT CTGAGCTCTG

CCAGG ATG GTG ACC GCA GTG CCC GCT GTG TTT TCC AAG CTG GTA ACC          527
      Met Val Thr Ala Val Pro Ala Val Phe Ser Lys Leu Val Thr
        1               5                  10

ATG CTT AAT GCT TCT GGC TCC ACC CAC TTC ACC AGG ATG CGC CGG CGT       575
Met Leu Asn Ala Ser Gly Ser Thr His Phe Thr Arg Met Arg Arg Arg
 15                  20                  25                  30

CTG ATG GCT ATC GCG GAT GAG GTA GAA ATT GCC GAG GTC ATC CAG CTG       623
Leu Met Ala Ile Ala Asp Glu Val Glu Ile Ala Glu Val Ile Gln Leu
                35                  40                  45

GGT GTG GAG GAC ACT GTG GAT GGG CAT CAG GAC AGC TTA CAG GCC GTG       671
Gly Val Glu Asp Thr Val Asp Gly His Gln Asp Ser Leu Gln Ala Val
            50                  55                  60

GCC CCC ACC AGC TGT CTA GAA AAC AGC TCC CTT GAG CAC ACA GTC CAT       719
Ala Pro Thr Ser Cys Leu Glu Asn Ser Ser Leu Glu His Thr Val His
        65                  70                  75

AGA GAG AAA ACT GGA AAA GGA CTA AGT GCT ACG AGA CTG AGT GCC AGC       767
Arg Glu Lys Thr Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Arg Leu Ser Ala Ser
    80                  85                  90

TCG GAG GAC ATT TCT GAC AGA CTG GCC GGC GTC TCT GTA GGA CTT CCC       815
Ser Glu Asp Ile Ser Asp Arg Leu Ala Gly Val Ser Val Gly Leu Pro
 95                 100                 105                 110

AGC TCA ACA ACA ACA GAA CAA CCA AAG CCA GCG GTT CAA ACA AAA GGC       863
Ser Ser Thr Thr Thr Glu Gln Pro Lys Pro Ala Val Gln Thr Lys Gly
                115                 120                 125

AGA CCC CAC AGT CAG TGT TTG AAC TCC TCC CCT TTG TCT CAT GCT CAA       911
Arg Pro His Ser Gln Cys Leu Asn Ser Ser Pro Leu Ser His Ala Gln
            130                 135                 140

TTA ATG TTC CCA GCA CCA TCA GCC CCT TGT TCC TCT GCC CCG TCT GTC       959
Leu Met Phe Pro Ala Pro Ser Ala Pro Cys Ser Ser Ala Pro Ser Val
        145                 150                 155

CCA GAT ATT TCT AAG CAC AGA CCC CAG GCA TTT GTT CCC TGC AAA ATA      1007
Pro Asp Ile Ser Lys His Arg Pro Gln Ala Phe Val Pro Cys Lys Ile
    160                 165                 170
```

【表２】

```
CCT TCC GCA TCT CCT CAG ACA CAG CGC AAG TTC TCT CTA CAA TTC CAG      1055
Pro Ser Ala Ser Pro Gln Thr Gln Arg Lys Phe Ser Leu Gln Phe Gln
175                 180                 185                 190

AGG AAC TGC TCT GAA CAC CGA GAC TCA GAC CAG CTC TCC CCA GTC TTC      1103
Arg Asn Cys Ser Glu His Arg Asp Ser Asp Gln Leu Ser Pro Val Phe
                195                 200                 205

ACT CAG TCA AGA CCC CCA CCC TCC AGT AAC ATA CAC AGG CCA AAG CCA      1151
Thr Gln Ser Arg Pro Pro Pro Ser Ser Asn Ile His Arg Pro Lys Pro
            210                 215                 220

TCC CGA CCC GTT CCG GGC AGT ACA AGC AAA CTA GGG GAC GCC ACA AAA      1199
Ser Arg Pro Val Pro Gly Ser Thr Ser Lys Leu Gly Asp Ala Thr Lys
        225                 230                 235

AGT AGC ATG ACA CTT GAT CTG GGC AGT GCT TCC AGG TGT GAC GAC AGC      1247
Ser Ser Met Thr Leu Asp Leu Gly Ser Ala Ser Arg Cys Asp Asp Ser
    240                 245                 250

TTT GGC GGC GGC GGC AAC AGT GGC AAC GCC GTC ATA CCC AGC GAC GAG      1295
Phe Gly Gly Gly Gly Asn Ser Gly Asn Ala Val Ile Pro Ser Asp Glu
255                 260                 265                 270

ACA GTG TTC ACG CCG GTG GAG GAC AAG TGC AGG TTA GAT GTG AAC ACC      1343
Thr Val Phe Thr Pro Val Glu Asp Lys Cys Arg Leu Asp Val Asn Thr
                275                 280                 285

GAG CTC AAC TCC AGC ATC GAG GAC CTT CTT GAA GCA TCC ATG CCT TCA      1391
Glu Leu Asn Ser Ser Ile Glu Asp Leu Leu Glu Ala Ser Met Pro Ser
            290                 295                 300

AGT GAC ACG ACA GTC ACT TTC AAG TCC GAA GTC GCC GTC CTC TCT CCG      1439
Ser Asp Thr Thr Val Thr Phe Lys Ser Glu Val Ala Val Leu Ser Pro
        305                 310                 315

GAA AAG GCC GAA AAT GAC GAC ACC TAC AAA GAC GAC GTC AAT CAT AAT      1487
Glu Lys Ala Glu Asn Asp Asp Thr Tyr Lys Asp Asp Val Asn His Asn
    320                 325                 330

CAA AAG TGC AAA GAA AAG ATG GAA GCT GAA GAG GAG GAG GCT TTA GCG      1535
Gln Lys Cys Lys Glu Lys Met Glu Ala Glu Glu Glu Glu Ala Leu Ala
335                 340                 345                 350

ATC GCC ATG GCG ATG TCA GCG TCT CAG GAT GCC CTC CCC ATC GTC CCT      1583
Ile Ala Met Ala Met Ser Ala Ser Gln Asp Ala Leu Pro Ile Val Pro
                355                 360                 365

CAG CTG CAG GTG GAA AAT GGA GAA GAT ATT ATC ATC ATT CAG CAG GAC      1631
Gln Leu Gln Val Glu Asn Gly Glu Asp Ile Ile Ile Ile Gln Gln Asp
            370                 375                 380

ACA CCA GAA ACT CTT CCA GGA CAT ACC AAA GCG AAA CAG CCT TAC AGA      1679
Thr Pro Glu Thr Leu Pro Gly His Thr Lys Ala Lys Gln Pro Tyr Arg
        385                 390                 395

GAA GAC GCT GAG TGG CTG AAA GGC CAG CAG ATA GGC CTC GGA GCA TTT      1727
Glu Asp Ala Glu Trp Leu Lys Gly Gln Gln Ile Gly Leu Gly Ala Phe
    400                 405                 410

TCT TCC TGT TAC CAA GCA CAG GAT GTG GGG ACT GGG ACT TTA ATG GCT      1775
Ser Ser Cys Tyr Gln Ala Gln Asp Val Gly Thr Gly Thr Leu Met Ala
415                 420                 425                 430
```

【表３】

```
GTG AAA CAG GTG ACG TAC GTC AGA AAC ACA TCC TCC GAG CAG GAG GAG      1823
Val Lys Gln Val Thr Tyr Val Arg Asn Thr Ser Ser Glu Gln Glu Glu
                435                 440                 445

GTG GTG GAA GCG TTG AGG GAA GAG ATC CGG ATG ATG GGT CAC CTC AAC      1871
Val Val Glu Ala Leu Arg Glu Glu Ile Arg Met Met Gly His Leu Asn
            450                 455                 460

CAT CCA AAC ATC ATC CGG ATG CTG GGG GCC ACG TGC GAG AAG AGC AAC      1919
His Pro Asn Ile Ile Arg Met Leu Gly Ala Thr Cys Glu Lys Ser Asn
        465                 470                 475

TAC AAC CTC TTC ATT GAG TGG ATG GCG GGA GGA TCT GTG GCT CAC CTC      1967
Tyr Asn Leu Phe Ile Glu Trp Met Ala Gly Gly Ser Val Ala His Leu
    480                 485                 490

TTG AGT AAA TAC GGA GCT TTC AAG GAG TCA GTC GTC ATT AAC TAC ACT      2015
Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Phe Lys Glu Ser Val Val Ile Asn Tyr Thr
495                 500                 505                 510

GAG CAG TTA CTG CGT GGC CTT TCC TAT CTC CAC GAG AAC CAG ATC ATT      2063
Glu Gln Leu Leu Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asn Gln Ile Ile
                515                 520                 525

CAC AGA GAC GTC AAA GGT GCC AAC CTG CTC ATT GAC AGC ACC GGT CAG      2111
His Arg Asp Val Lys Gly Ala Asn Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Gln
            530                 535                 540

AGG CTG AGA ATT GCA GAC TTT GGA GCT GCT GCC AGG TTG GCA TCA AAA      2159
Arg Leu Arg Ile Ala Asp Phe Gly Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ser Lys
        545                 550                 555

GGA ACC GGT GCA GGA GAG TTC CAG GGA CAG TTA CTG GGG ACA ATT GCA      2207
Gly Thr Gly Ala Gly Glu Phe Gln Gly Gln Leu Leu Gly Thr Ile Ala
    560                 565                 570

TTC ATG GCG CCT GAG GTC CTA AGA GGT CAG CAG TAT GGT AGG AGC TGT      2255
Phe Met Ala Pro Glu Val Leu Arg Gly Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Cys
575                 580                 585                 590

GAT GTA TGG AGT GTT GGC TGC GCC ATT ATA GAA ATG GCT TGT GCA AAA      2303
Asp Val Trp Ser Val Gly Cys Ala Ile Ile Glu Met Ala Cys Ala Lys
                595                 600                 605

CCA CCT TGG AAT GCA GAA AAA CAC TCC AAT CAT CTC GCC TTG ATA TTT      2351
Pro Pro Trp Asn Ala Glu Lys His Ser Asn His Leu Ala Leu Ile Phe
            610                 615                 620

AAG ATT GCT AGC GCA ACT ACT GCA CCG TCC ATC CCG TCA CAC CTG TCC      2399
Lys Ile Ala Ser Ala Thr Thr Ala Pro Ser Ile Pro Ser His Leu Ser
        625                 630                 635

CCG GGT CTG CGC GAC GTG GCC GTG CGC TGC TTA GAA CTT CAG CCT CAG      2447
Pro Gly Leu Arg Asp Val Ala Val Arg Cys Leu Glu Leu Gln Pro Gln
    640                 645                 650

GAC CGG CCT CCG TCC AGA GAG CTG CTG AAA CAT CCG GTC TTC CGT ACC      2495
Asp Arg Pro Pro Ser Arg Glu Leu Leu Lys His Pro Val Phe Arg Thr
655                 660                 665                 670

ACG TGG TAGTTAATTG TTCAGATCAG CTCTAATGGA GACAGGATAT CGAACCGGGA      2551
Thr Trp
```

【表４】

GAGAGAAAAG AGAACTTGTG GGCGACCATG CCGCTAACCG CAGCCCTCAC
GCCACTGAAC AGCCAGAAAC GGGGCCAGCG GGGAACCGTA CCTAAGCATG
TGATTGACAA ATCATGACCT GTACCTAAGC TCGATATGCA GACATCTACA
GCTCGTGCAG GAACTGCACA CCGTGCCTTT CACAGGACTG GCTCTGGGGG
ACCAGGAAGG CGATGGAGTT TGCATGACTA AAGAACAGAA GCATAAATTT
ATTTTTGGAG CACTTTTTCA GCTAATCAGT ATTACCATGT ACATCAACAT
GCCCGCCACA TTTCAAACTC AGACTGTCCC AGATGTCAAG ATCCACTGTG
TTTGAGTTTG TTTGCAGTTC CCTCAGCTTG CTGGTAATTG TGGTGTTTTG
TTTTCGATGC AAATGTGATG TAATATTCTT ATTTTCTTTG GATCAAAGCT
GGACTGAAAA TTGTACTGTG TAATTATTTT TGTGTTTTTA ATGTTATTTG
GTACTCGAAT TGTAAATAAC GTCTACTGCT GTTTATTCCA GTTTCTACTA
CCTCAGGTGT CCTATAGATT TTTCTTCTAC CAAAGTTCAC TCTCAGAATG
AAATTCTACG TGCTGTGTGA CTATGACTCC TAAGACTTCC AGGGCTTAAG
GGCTAACTCC TATTAGCACC TTACTATGTA AGCAAATGCT ACAAAAAAAA
AAAAAAAAA

【請求項２】

請求項１における配列表１に示される核酸配列と少なくとも８５％の相同性を有する核酸によってコードされ、哺乳類のＭＥＫ－１蛋白質をリン酸化することが可能である、単離された蛋白質。

【請求項３】

$MgCl_2$およびＡＴＰを含みｐＨ６．０とｐＨ８．０との間のｐＨに維持された反応混合物中で、４０分後にＭＥＫ－１蛋白質をリン酸化することが可能である、請求項２記載の単離された蛋白質。

【請求項４】

請求項１における配列表１に示される核酸配列と少なくとも９０％の相同性を有する核酸によってコードされる、請求項２記載の単離された蛋白質。

【請求項５】

請求項１における配列表１に示される核酸分子と緊縮条件下でハイブリダイズすることが可能な核酸分子によりコードされ、哺乳類のＭＥＫ－１蛋白質をリン酸化することが可能である、単離された蛋白質。

【請求項６】

残基１－２１５が切断されている、請求項１に記載された単離された蛋白質の切断形態を含む触媒ドメイン。

【請求項７】

請求項１－６のいずれか１に記載の蛋白質または触媒ドメインをコードする単離された核酸分子。

【請求項８】

請求項１－６のいずれか１に記載の蛋白質または触媒ドメインをコードし、そして発現制御配列に操作的に連結されている核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項９】

請求項８記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項１０】

請求項１－６のいずれか１に記載の蛋白質または触媒ドメインに対して特異的に結合する抗体。

【請求項１１】

細胞表面レセプターから発せられるシグナルを調節できる化合物の同定方法であって、該シグナル調節が請求項１－５のいずれか１に記載の蛋白質を含むものであり、かつ、

（ａ）　上記蛋白質を含有する細胞を推定上の調節化合物と接触させる工程、

（ｂ）　該細胞を細胞表面レセプターに結合しうるＥＧＦまたはＮＧＦと接触させる工程、および

（ｃ）　ＭＥＫ－１またはＭＡＰＫの活性化を決定することにより推定上の調節化合物の細胞のシグナルを調節する能力を評価する工程

を含んでなる方法。

【請求項１２】
請求項１－５にいずれかに記載の蛋白質のキナーゼ活性を阻害しうる化合物の同定方法であって、
（ａ）　推定上の阻害化合物を上記蛋白質と接触させて反応混合物を生成する工程、
（ｂ）　該反応混合物をＭＥＫ－１蛋白質と接触させる工程、および
（ｃ）　推定上の阻害化合物の上記蛋白質によるＭＥＫ－１蛋白質のリン酸化を阻害する能力を評価する工程
を含んでなる方法。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、単離化ＭＥＫキナーゼ核酸配列、実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質、ならびにＭＥＫＫ、ＭＥＫ、およびＭＡＰＫ酵素の調節および使用に係わる方法に関する。
発明の背景
マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰＫ）（細胞外シグナル調節キナーゼすなわちＥＲＫとも称される）は、チロシンキナーゼである成長因子レセプター（上皮成長因子（ＥＧＦ）レセプターのようなもの）およびトロンビンレセプターのようなヘテロ三量体のグアニンヌクレオチド結合性蛋白質（Ｇプロテイン）に結合するレセプターの両方によるリガンド結合に応答して迅速に活性化される。ＭＡＰＫは、種々の第二メッセンジャーにより伝達される多重細胞内シグナルを統合するようである。ＭＡＰＫは、酵素、ならびにＥＧＦレセプター、Ｒｓｋ９０、ホスホリパーゼA_2、アラキドン酸代謝物、ｃ－Ｍｙｃ、および恐らくｃ－Ｊｕｎを初めとする転写因子をリン酸化し、そしてその活性を調節する。チロシンキナーゼであるレセプターによるＭＡＰＫの迅速な活性化はＲａｓに依存するものの、ＭＡＰＫのＧ－プロテイン介在性活性化はＲａｓに非依存的な経路を通して主に生じるらしい。
イーストにおけるフェロモン－誘導性シグナル変換経路の相補性分析により、ＭＡＰＫのスキゾサッカロミセス　ボンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）およびサッカロミセス　セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）相同物であるＳｐｋ１およびＦｕｓ３－Ｋｓｓ１の活性を制御するプロテインキナーゼ系が特定されている（例えば、Ｂ．Ｒ．Ｃａｉｒｎｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖ．　６、１３０５（１９９２）；Ｂ．Ｊ．Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖ．　６、１２９３（１９９２）；Ｓ．Ａ．Ｎａｄｉｎ－Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．、ＥＭＢＯ　Ｊ．　７、９８５（１９８８）；Ｙ．Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ．　Ｂｉｏｌ．　１１、３５５４（１９９１）、を参照せよ）。Ｓ．セレビシアエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ではプロテインキナーゼＳｔｅ７は、Ｆｕｓ３－Ｋｓｓ１活性の上流レギュレーターであり、プロテインキナーゼＳｔｅ１１がＳｔｅ７を調節する。Ｓ．ポムベ（Ｓ．　ｐｏｍｂｅ）の遺伝子産物であるＢｙｒ１およびＢｙｒ２は、それぞれＳｔｅ７およびＳｔｅ１１に相同である。ＭＥＫ（ＭＡＰＫキナーゼもしくはＥＲＫキナーゼ）あるいはＭＫＫ（ＭＡＰキナーゼのキナーゼ）酵素はＳｔｅ７およびＢｙｒ１に配列が類似する。ＭＥＫは、チロシンとスレオニンの両方の残基でＭＡＰＫをリン酸化し、このことがＭＡＰＫの活性化をもたらす。哺乳類のセリン－スレオニンプロテインキナーゼＲａｆはＭＥＫをリン酸化および活性化し、このことがＭＡＰＫの活性化につながる。Ｒａｆは成長因子レセプターチロシンキナーゼ活性に応答して活性化され、そしてそのためＲａｆは膜会合性チロシンキナーゼの刺激化に応答してＭＡＰＫを活性化することができる。ＲａｆはＳｔｅ１１およびＢｙｒ２とは配列が無関係である。従ってＲａｆは、イーストにおいて特定されるフェロモン－反応性プロテインキナーゼ系からの哺乳類細胞における分岐を表すことができる。ＭＡＰＫの調節における細胞およびレセプター特異性の差異は、哺乳類のＭＥＫの他のＲａｆ非依存的レギュレーターが存在することを示唆する。
発明の要約
本発明は、新規の遺伝子、表示されるＭＥＫＫ、もしくは哺乳類のＭＥＫキナーゼに関す

る。ＭＥＫＫの調節は分化および有糸分裂誘発に係わる様々な治療的適用に有用である。
具体的には本発明は、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰＫ）に関し、本発明者が発見したこのプロテインキナーゼはＭＥＫＫにより活性化される。ＭＡＰＫは酵素および／または転写因子をリン酸化し、そしてその活性を調節することが知られているため、本発明はＭＥＫＫをコードする核酸配列の操作、および／または所望の細胞集団へのＭＥＫＫの投与のいずれかを介するそのような活性の調節に関する。本発明はまた、所望のレベルのＭＡＰＫ活性をもたらし、そしてチロシンキナーゼのような成長因子レセプターおよびトロンビンレセプターのようなＧプロテインに結合するレセプターの両方によるリガンド結合への典型的な応答を変化させるためのＲａｆおよびＭＥＫＫによる二重調節に関する。従って本発明は、実質的に純粋なＭＥＫＫ、ＭＥＫＫをコードする単離化核酸配列、ＭＥＫＫ遺伝子で形質転換させた宿主細胞、およびＭＥＫＫ蛋白質に対する抗体に関する。更に本発明は、成長因子レセプターおよびＧプロテイン結合性レセプターによるリガンド結合への応答を調節するためにＭＥＫＫ遺伝子を使用する遺伝子療法にも関する。
本発明の一つの態様は、転移、様々な形態の癌、自己免疫疾患、アレルギー性応答、および炎症性応答を阻害するためのＭＥＫＫの不活化を必要とする。他の態様は、創傷治癒活性を容易にさせるためのＭＥＫＫ産物の刺激化を必要とする。従って本発明は、肺および様々な他の組織における炎症性応答時に、好中球、マクロファージ、好塩基球細胞の活性を制御するのに有用である。本発明は、血小板活性化因子およびトロンビンレセプターにより調節される経路に影響を与えるのに有用である。本発明はまた、脈管形成および一定の種類の腫瘍、具体的には肺癌および他の上皮癌の阻害、ならびに平滑筋および動脈組織の治療における適用を見いだしている。その上、本発明を使用して好中球およびマクロファージの走化性応答を阻害し、同様にアレルギー応答を改善することができる。
本発明はまた、神経親和性成長因子として作用することにより分化および有糸分裂誘発の刺激化を達成して、例えばパーキンソン病およびアルツハイマー病のような特定の種類の細胞の萎縮を緩和することができる遺伝子療法におけるＭＥＫＫ遺伝子の使用をも含む。
他の態様においてはＭＥＫＫを、スクリーニングアッセイを用いることによる癌遺伝子および腫瘍作用物質についてのスクリーニング法として使用してこのような蛋白質がＭＥＫＫにより活性化されるか否かを決定する。ＭＥＫＫに対して作成される抗体を使用して、所定の癌および自己免疫疾患に関与する可能性のあるＭＥＫＫの発現レベルにおける変化を決定することができる。
本発明人はリガンドがＢ細胞もしくはＴ細胞の表面レセプターに結合する時期を認識しており、ＭＥＫＫはそのレセプターの連結から生じる主なリン酸化産物である。ＭＥＫＫはそれ自体、Ｔ細胞およびＢ細胞のシグナル変換経路における主要調節蛋白質であると考えられている。従ってＭＥＫＫ発現の調節は、ＴおよびＢ細胞の増殖および分化の調節に有用であると考えられる。
ＭＥＫＫを使用して診断的および治療的適用における使用のための抗体を産生することができる。例えば、ＭＥＫＫに対する抗体を使用して、ＭＥＫＫにより活性化される腫瘍細胞発現性腫瘍蛋白質についてのスクリーニングを行うことができる。
本発明の他の態様では、ＭＥＫＫ蛋白質をインビトロでの細胞増殖、有糸分裂誘発、および分化の刺激化のために用いることができる。例えば、拡張および分化させることが所望される細胞のいずれかの具体的な集団は、このような細胞をＭＥＫＫの有効量に露出することにより達成することができる。
本発明の更に他の態様ではＭＥＫＫ蛋白質を、抗炎症性応答に影響をもたらすための所望される細胞への投与に適する製剤で提供することができる。
本発明の他の態様では、宿主細胞をＭＥＫＫ遺伝子で形質転換させる。従ってＭＥＫＫ遺伝子は、癌、自己免疫疾患、神経性疾患、筋肉性疾患、アレルギー性疾応答、および炎症性応答を初めとする様々な疾患の治療のための遺伝子療法における道具として有用である。本明細書に用いられる際に「遺伝子療法」は、所望の遺伝子をある具体的な細胞集団に輸送してこのような細胞集団内の遺伝子の発現に影響をもたらすことを意味する。

図面の簡単な記述
図１Ａは、数々の細胞株およびマウス組織における単一な７．８ｋｂ　ＭＥＫＫ　ｍＲＮＡのノザン（ＲＮＡ）ブロットである。
図１Ｂは、ＭＥＫＫ遺伝子のサザン（ＤＮＡ）ブロットを示す。
図１Ｃは、齧歯類細胞株における７８－ｋｄおよび５０－ｋｄ形態のＭＥＫＫの発現を示す免疫ブロットである。
図２Ａは、ＭＥＫＫでトランスフェクトさせたＣＯＳ細胞内のＭＡＰＫの活性化を示す。
図２Ｂは、ベクター単独（対照）、あるいはＭＥＫＫをコードするベクターで形質転換させた、ＥＧＦで処理したかもしくは未処理の細胞中のＭＥＫＫの発現を示す免疫ブロットである。
図３は、ＭＥＫＫでトランスフェクトさせたＣＯＳ細胞中のＭＥＫの活性化およびリン酸化を示す。
図４Ａは、ＭＥＫＫによるＭＥＫ－１のリン酸化を示す。
図４Ｂは、ＣＯＳ細胞中で発現されるＭＥＫＫによるＭＥＫ－１のリン酸化の時間経過を示す。
図４Ｃは、ＣＯＳ細胞中で過剰発現されるＭＥＫＫの免疫ブロットである。
図５Ａは、活性化されるＭＥＫ－１によるＭＡＰＫのリン酸化を示す。
図５Ｂは、免疫沈降化されるＭＥＫＫによるＭＥＫ－１のリン酸化を示す。
図６Ａは、活性化されるＲａｆによるＭＥＫ－１のリン酸化を示す。
図６Ｂは、ＥＧＦで処理され、ＭＥＫＫを過剰発現するＣＯＳ細胞中のＲａｆの活性を示す。
図７は、ＭＥＫＫ抗血清を用いるＭＥＫＫ蛋白質の免疫沈降を示す。
図８は、免疫沈降化ＭＥＫＫもしくはＲａｆ－Ｂによるキナーゼ不活性ＭＥＫ－１のリン酸化を示す。
図９は、ＥＧＦで刺激化したＭＥＫＫおよびＲａｆ－Ｂの活性化の時間経過を示す。
図１０は、ＭＥＫＫ免疫沈降物からのＲａｆ－Ｂの免疫枯渇を示す。
図１１は、Ｒａｆ－Ｂの免疫枯渇がＲａｆ－Ｂの活性を減少させることを示す。
図１２は、優性のネガティブN^{17}ＲＡＳ発現によるＭＥＫＫおよびＲａｆ－Ｂの活性化の阻害を示す。
図１３は、ホルスコリン（ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ）によるＭＥＫＫのＥＧＦ活性化の阻害を示す。
図１４は、脊椎動物およびイーストのシグナル経路の概略図である。
図１５は、切断化ＭＥＫＫ分子による改善化ＭＥＫＫ活性を示す。
発明の詳細な記述
本発明は、細胞中のシグナル伝達を調節することが可能な新規のＭＥＫＫ蛋白質に関する。本発明のＭＥＫＫ蛋白質は全長のＭＥＫＫ蛋白質もしくはＭＥＫＫ蛋白質の一部分を含むことができる。本発明のＭＥＫＫ蛋白質はＭＥＫ蛋白質をリン酸化することおよび／またはＭＥＫＫキナーゼ活性を阻害することが可能である。本発明のＭＥＫＫ蛋白質はＭＥＫＫ触媒ドメインの少なくとも一部分を含み、そのためその蛋白質がＭＥＫ蛋白質をリン酸化することが可能となり、かつ／またはＭＥＫＫ調節ドメインの少なくとも一部分を含み、そのためその蛋白質がＭＥＫＫキナーゼ活性を阻害することが可能となることが好ましい。
Ｓｔｅ１１およびＢｙｒ２核酸配列を使用して哺乳類のＭＥＫキナーゼ（ＭＥＫＫ）ｃＤＮＡを同定した。Ｓｔｅ１１およびＢｙｒ２遺伝子間の配列相同性の領域に相当する非反復の縮重イノシンオリゴデオキシヌクレオチドを設計した。プライマー、およびＮＩＨ３Ｔ３細胞からのポリアデニル化ＲＮＡから取得されるｃＤＮＡ鋳型を用いて３２０塩基対（ｂｐ）のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅産物を単離し、そしてこれがＳｔｅ１１およびＢｙｒ２の両方に対して配列が類似することを見いだした。この３２０ｂｐのｃＤＮＡをプローブとして用いて、マウス脳のｃＤＮＡライブラリーから３２６０ｂｐのＭＥＫＫ　ｃＤＮＡ（本明細書ではＭＥＫＫ１として引用される）を同定した。ＭＥＫＫ１

のヌクレオチド配列を二本鎖ＤＮＡのジデオキシヌクレオチド配列決定により決定した。ＭＥＫＫ１についての核酸配列および翻訳されるアミノ酸配列を表１に示す。

表１

```
TACACTCCTT GCCACAGTCT GGCAGAAAGA ATCAAACTTC AGAGACTCCT CCGGCCAGTT
GTAGACACTA TCCTTGTCAA GTGTGCAGAT CCAACAGCCG CACGAGTCAG CTGTCCATAT
CTACAGTGCT GGAACTCTGC AAGGGCCAAG CAGGAGAGCT GGCGGTTGGG AGAGAAATAC
TTAAAGCTGG GTCCATCGGG GTTGGTGGTG TCGATTACGT CTTAAGTTGT ATCCTTGGAA
ACCAAGCTGA ATCAAACAAC TGGCAAGAAC TGCTGGGTCG CCTCTGTCTT ATAGACAGGT
TGCTGTTGGA ATTTCCTGCT GAATTCTATC CTCATATTGT CAGTACTGAT GTCTCACAAG
CTGAGCCTGT TGAAATCAGG TACAAGAAGC TGCTCTCCCT CTTAACCTTT GCCTTGCAAT
CCATTGACAA TTCCCACTCG ATGGTTGGCA AGCTCTCTCG GAGGATATAT CTGAGCTCTG

CCAGG ATG GTG ACC GCA GTG CCC GCT GTG TTT TCC AAG CTG GTA ACC          527
      Met Val Thr Ala Val Pro Ala Val Phe Ser Lys Leu Val Thr
        1               5                  10

ATG CTT AAT GCT TCT GGC TCC ACC CAC TTC ACC AGG ATG CGC CGG CGT       575
Met Leu Asn Ala Ser Gly Ser Thr His Phe Thr Arg Met Arg Arg Arg
 15                  20                  25                  30

CTG ATG GCT ATC GCG GAT GAG GTA GAA ATT GCC GAG GTC ATC CAG CTG       623
Leu Met Ala Ile Ala Asp Glu Val Glu Ile Ala Glu Val Ile Gln Leu
                35                  40                  45

GGT GTG GAG GAC ACT GTG GAT GGG CAT CAG GAC AGC TTA CAG GCC GTG       671
Gly Val Glu Asp Thr Val Asp Gly His Gln Asp Ser Leu Gln Ala Val
            50                  55                  60

GCC CCC ACC AGC TGT CTA GAA AAC AGC TCC CTT GAG CAC ACA GTC CAT       719
Ala Pro Thr Ser Cys Leu Glu Asn Ser Ser Leu Glu His Thr Val His
        65                  70                  75
```

```
AGA GAG AAA ACT GGA AAA GGA CTA AGT GCT ACG AGA CTG AGT GCC AGC      767
Arg Glu Lys Thr Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Arg Leu Ser Ala Ser
     80                  85                  90

TCG GAG GAC ATT TCT GAC AGA CTG GCC GGC GTC TCT GTA GGA CTT CCC      815
Ser Glu Asp Ile Ser Asp Arg Leu Ala Gly Val Ser Val Gly Leu Pro
 95                 100                 105                 110

AGC TCA ACA ACA ACA GAA CAA CCA AAG CCA GCG GTT CAA ACA AAA GGC      863
Ser Ser Thr Thr Thr Glu Gln Pro Lys Pro Ala Val Gln Thr Lys Gly
                115                 120                 125

AGA CCC CAC AGT CAG TGT TTG AAC TCC TCC CCT TTG TCT CAT GCT CAA      911
Arg Pro His Ser Gln Cys Leu Asn Ser Ser Pro Leu Ser His Ala Gln
            130                 135                 140

TTA ATG TTC CCA GCA CCA TCA GCC CCT TGT TCC TCT GCC CCG TCT GTC      959
Leu Met Phe Pro Ala Pro Ser Ala Pro Cys Ser Ser Ala Pro Ser Val
        145                 150                 155

CCA GAT ATT TCT AAG CAC AGA CCC CAG GCA TTT GTT CCC TGC AAA ATA     1007
Pro Asp Ile Ser Lys His Arg Pro Gln Ala Phe Val Pro Cys Lys Ile
    160                 165                 170

CCT TCC GCA TCT CCT CAG ACA CAG CGC AAG TTC TCT CTA CAA TTC CAG     1055
Pro Ser Ala Ser Pro Gln Thr Gln Arg Lys Phe Ser Leu Gln Phe Gln
175                 180                 185                 190

AGG AAC TGC TCT GAA CAC CGA GAC TCA GAC CAG CTC TCC CCA GTC TTC     1103
Arg Asn Cys Ser Glu His Arg Asp Ser Asp Gln Leu Ser Pro Val Phe
                195                 200                 205

ACT CAG TCA AGA CCC CCA CCC TCC AGT AAC ATA CAC AGG CCA AAG CCA     1151
Thr Gln Ser Arg Pro Pro Pro Ser Ser Asn Ile His Arg Pro Lys Pro
            210                 215                 220

TCC CGA CCC GTT CCG GGC AGT ACA AGC AAA CTA GGG GAC GCC ACA AAA     1199
Ser Arg Pro Val Pro Gly Ser Thr Ser Lys Leu Gly Asp Ala Thr Lys
        225                 230                 235

AGT AGC ATG ACA CTT GAT CTG GGC AGT GCT TCC AGG TGT GAC GAC AGC     1247
Ser Ser Met Thr Leu Asp Leu Gly Ser Ala Ser Arg Cys Asp Asp Ser
    240                 245                 250

TTT GGC GGC GGC GGC AAC AGT GGC AAC GCC GTC ATA CCC AGC GAC GAG     1295
Phe Gly Gly Gly Gly Asn Ser Gly Asn Ala Val Ile Pro Ser Asp Glu
255                 260                 265                 270

ACA GTG TTC ACG CCG GTG GAG GAC AAG TGC AGG TTA GAT GTG AAC ACC     1343
Thr Val Phe Thr Pro Val Glu Asp Lys Cys Arg Leu Asp Val Asn Thr
                275                 280                 285

GAG CTC AAC TCC AGC ATC GAG GAC CTT CTT GAA GCA TCC ATG CCT TCA     1391
Glu Leu Asn Ser Ser Ile Glu Asp Leu Leu Glu Ala Ser Met Pro Ser
            290                 295                 300

AGT GAC ACG ACA GTC ACT TTC AAG TCC GAA GTC GCC GTC CTC TCT CCG     1439
Ser Asp Thr Thr Val Thr Phe Lys Ser Glu Val Ala Val Leu Ser Pro
        305                 310                 315
```

```
GAA AAG GCC GAA AAT GAC GAC ACC TAC AAA GAC GAC GTC AAT CAT AAT      1487
Glu Lys Ala Glu Asn Asp Asp Thr Tyr Lys Asp Asp Val Asn His Asn
    320                 325                 330

CAA AAG TGC AAA GAA AAG ATG GAA GCT GAA GAG GAG GAG GCT TTA GCG      1535
Gln Lys Cys Lys Glu Lys Met Glu Ala Glu Glu Glu Ala Leu Ala
335                 340                 345                 350

ATC GCC ATG GCG ATG TCA GCG TCT CAG GAT GCC CTC CCC ATC GTC CCT      1583
Ile Ala Met Ala Met Ser Ala Ser Gln Asp Ala Leu Pro Ile Val Pro
                355                 360                 365

CAG CTG CAG GTG GAA AAT GGA GAA GAT ATT ATC ATC ATT CAG CAG GAC      1631
Gln Leu Gln Val Glu Asn Gly Glu Asp Ile Ile Ile Ile Gln Gln Asp
            370                 375                 380

ACA CCA GAA ACT CTT CCA GGA CAT ACC AAA GCG AAA CAG CCT TAC AGA      1679
Thr Pro Glu Thr Leu Pro Gly His Thr Lys Ala Lys Gln Pro Tyr Arg
        385                 390                 395

GAA GAC GCT GAG TGG CTG AAA GGC CAG CAG ATA GGC CTC GGA GCA TTT      1727
Glu Asp Ala Glu Trp Leu Lys Gly Gln Gln Ile Gly Leu Gly Ala Phe
    400                 405                 410

TCT TCC TGT TAC CAA GCA CAG GAT GTG GGG ACT GGG ACT TTA ATG GCT      1775
Ser Ser Cys Tyr Gln Ala Gln Asp Val Gly Thr Gly Thr Leu Met Ala
415                 420                 425                 430

GTG AAA CAG GTG ACG TAC GTC AGA AAC ACA TCC TCC GAG CAG GAG GAG      1823
Val Lys Gln Val Thr Tyr Val Arg Asn Thr Ser Ser Glu Gln Glu Glu
                435                 440                 445

GTG GTG GAA GCG TTG AGG GAA GAG ATC CGG ATG ATG GGT CAC CTC AAC      1871
Val Val Glu Ala Leu Arg Glu Glu Ile Arg Met Met Gly His Leu Asn
            450                 455                 460

CAT CCA AAC ATC ATC CGG ATG CTG GGG GCC ACG TGC GAG AAG AGC AAC      1919
His Pro Asn Ile Ile Arg Met Leu Gly Ala Thr Cys Glu Lys Ser Asn
        465                 470                 475

TAC AAC CTC TTC ATT GAG TGG ATG GCG GGA GGA TCT GTG GCT CAC CTC      1967
Tyr Asn Leu Phe Ile Glu Trp Met Ala Gly Gly Ser Val Ala His Leu
    480                 485                 490

TTG AGT AAA TAC GGA GCT TTC AAG GAG TCA GTC GTC ATT AAC TAC ACT      2015
Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Phe Lys Glu Ser Val Val Ile Asn Tyr Thr
495                 500                 505                 510

GAG CAG TTA CTG CGT GGC CTT TCC TAT CTC CAC GAG AAC CAG ATC ATT      2063
Glu Gln Leu Leu Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asn Gln Ile Ile
                515                 520                 525

CAC AGA GAC GTC AAA GGT GCC AAC CTG CTC ATT GAC AGC ACC GGT CAG      2111
His Arg Asp Val Lys Gly Ala Asn Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Gln
            530                 535                 540
```

```
AGG CTG AGA ATT GCA GAC TTT GGA GCT GCT GCC AGG TTG GCA TCA AAA      2159
Arg Leu Arg Ile Ala Asp Phe Gly Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ser Lys
        545                 550                 555

GGA ACC GGT GCA GGA GAG TTC CAG GGA CAG TTA CTG GGG ACA ATT GCA      2207
Gly Thr Gly Ala Gly Glu Phe Gln Gly Gln Leu Leu Gly Thr Ile Ala
    560                 565                 570

TTC ATG GCG CCT GAG GTC CTA AGA GGT CAG CAG TAT GGT AGG AGC TGT      2255
Phe Met Ala Pro Glu Val Leu Arg Gly Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Cys
575                 580                 585                 590

GAT GTA TGG AGT GTT GGC TGC GCC ATT ATA GAA ATG GCT TGT GCA AAA      2303
Asp Val Trp Ser Val Gly Cys Ala Ile Ile Glu Met Ala Cys Ala Lys
                595                 600                 605

CCA CCT TGG AAT GCA GAA AAA CAC TCC AAT CAT CTC GCC TTG ATA TTT      2351
Pro Pro Trp Asn Ala Glu Lys His Ser Asn His Leu Ala Leu Ile Phe
            610                 615                 620

AAG ATT GCT AGC GCA ACT ACT GCA CCG TCC ATC CCG TCA CAC CTG TCC      2399
Lys Ile Ala Ser Ala Thr Thr Ala Pro Ser Ile Pro Ser His Leu Ser
        625                 630                 635

CCG GGT CTG CGC GAC GTG GCC GTG CGC TGC TTA GAA CTT CAG CCT CAG      2447
Pro Gly Leu Arg Asp Val Ala Val Arg Cys Leu Glu Leu Gln Pro Gln
    640                 645                 650

GAC CGG CCT CCG TCC AGA GAG CTG CTG AAA CAT CCG GTC TTC CGT ACC      2495
Asp Arg Pro Pro Ser Arg Glu Leu Leu Lys His Pro Val Phe Arg Thr
655                 660                 665                 670

ACG TGG TAGTTAATTG TTCAGATCAG CTCTAATGGA GACAGGATAT CGAACCGGGA       2551
Thr Trp
```

```
GAGAGAAAAG AGAACTTGTG GGCGACCATG CCGCTAACCG CAGCCCTCAC
GCCACTGAAC AGCCAGAAAC GGGGCCAGCG GGGAACCGTA CCTAAGCATG
TGATTGACAA ATCATGACCT GTACCTAAGC TCGATATGCA GACATCTACA
GCTCGTGCAG GAACTGCACA CCGTGCCTTT CACAGGACTG GCTCTGGGGG
ACCAGGAAGG CGATGGAGTT TGCATGACTA AAGAACAGAA GCATAAATTT
ATTTTTGGAG CACTTTTTCA GCTAATCAGT ATTACCATGT ACATCAACAT
GCCCGCCACA TTTCAAACTC AGACTGTCCC AGATGTCAAG ATCCACTGTG
TTTGAGTTTG TTTGCAGTTC CCTCAGCTTG CTGGTAATTG TGGTGTTTTG
TTTTCGATGC AAATGTGATG TAATATTCTT ATTTTCTTTG GATCAAAGCT
GGACTGAAAA TTGTACTGTG TAATTATTTT TGTGTTTTTA ATGTTATTTG

GTACTCGAAT TGTAAATAAC GTCTACTGCT GTTTATTCCA GTTTCTACTA
CCTCAGGTGT CCTATAGATT TTTCTTCTAC CAAAGTTCAC TCTCAGAATG
AAATTCTACG TGCTGTGTGA CTATGACTCC TAAGACTTCC AGGGCTTAAG
GGCTAACTCC TATTAGCACC TTACTATGTA AGCAAATGCT ACAAAAAAAA
AAAAAAAAA
```

追加的な独特なＭＥＫＫ蛋白質であるＭＥＫＫ２、ＭＥＫＫ３、およびＭＥＫＫ４をＰＣＲにより同定した。ＭＥＫＫ１のアミノ酸配列と比較するＭＥＫＫ２およびＭＥＫＫ３についてのアミノ酸配列を表２に示す。

表２

MVTAVPAVFSKLVTMLNASGSTHFTRMRRRLMAIADEVEIAEVIQLGVEDTVDGHQDSL	MEKK 1
MDDQQALNSIMQDI----------	2
MDEQEALDSIMKDLVALQMSRRTRL-	3
AVAPTSCLENSSLEHTVHREKTGKGLSATRLSASSEDISDRLAGVSVGLPSSTTTEQPKP	1
AVLHKPVGQHYLYKKPGKQNLHHQKNRMMFESNLNIEEEKRILQVTRPVKLEDLRSKSKI	2
S--GYETMKNKDTGHPNRQSDVRIKFEHNGERRI-IAFSRPVRYEDVEHKVTTVFGQPLD	3
AVQTKGRPHSQCLNSS-PLSHAQLMFPAPSAPCSSAPSVPDISKHRPQAFVPCKIPSASP	1
AFGQSMDLHYTNNELVIPLTTQDDLDKAVELLDRSIHMKSL-KILLVVNGSTQA-TNLEP	2
LHYMNNELSILLKNQDDLDKAIDILDRSSSMKSLRILLLSQDRNHTSSSPHSGVSRQVRI	3
QTQRKFSLQFQRNCSEHRDSDQLSPVFTQS-RPPPSSNIHRPKPSRPVPGSTSKLGDATK	1
SPSPEDLNNTPLGAERKKRLSVVGPPNR--DRSSPPPGYIPDILHQIARNGSFTSINSEG	2
KPSQSAGDINTIYQAPEPRSRHLSVSSQNPGRSSPPPGYVPERQQHIARQGSYTSINSEG	3
SSMTLDLGSASRCDDSFGGGGNSGNAVIPSDETVFTPVEDKCRLDVNTELNSSIEDLLEA	1
EFIPESMDQ-MLDPLSLSSPENSGSGSCPSLDSPLDGESYPKSRMPRAQSYPDNHQEFTD	2
EFIPETSEQCMLDPLSSAENSLSGSCQSLDRSADSPSFRKSQMSRARSFPDNR---ECSD	3
SMPSSDTTVTFKSEVAVLSPEKAENDDTYKDDVNHNQKCKEKMEAEEEEALAIAMAMSAS	1
YDNPIFEKFGKGGTYPRRYHVSYHHQEYNDGRKTFPRARRTQGTSFRSPVSFSPTDHSLS	2
K----RETQLYDKGVKGGTYPRRYHVSVHHKDYNDGRRTFPRIRRHQGNLFTLVPSSRSL	3
QDALPIVPQLQVENGEDIIIIQQDTPETLPGHTKAKQPYRE***DAEWLKGQQIGLGAFSSCY***	1
TSSGSSVFTPEYDDSRIRRRGSDIDNPTLTVTDISPPSRSP***RAPTNWRLGKLLGQGAFGR***	2
STNGENMGVAVQYLDPRGRLRSADSENALTVQERNVPTKSP***SAPINWRRGKLLGQGAFGR***	3
QAQDVGTGTLMAVKQVTYVRNTSSEQEEVVEALREEIRMMGHLNHPNIIRMLGATCEKSN	1
VYLCYDVDTGRELAVKQVQFNPESPETSKEVNALECEIQLLKNLLHERIVQYYGCLRDPQ	2
VYLCYDVDTGRELASKQVQFDPDSPETSKEVSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLRDRA	3
YNLFIEWMAGGSVAHLLSKYGAFKESVVINYTEQLLRGLSYLHEN--Q-IIHRDVKGANL	1
EKTLSIFMELSPGGSIKDQLKAYGALTENVTRKYTRQILEGVHYLHSNMIVHRDIKGANI	2
EKILTIFMEYMPGGSVKDQLKAYGALTESVTRKYTRQILEGMSYLHSNMIVHRDIKGANI	3
LIDSTGQ-RLRIADFGAAARLASK-GTGAGEFQGQLLGTIAFMAPEVLRGQQYGRSCDVW	1
LRDSTGNIKLGDFGASKRLQTICLSGTGMKSVTG-PY----WMSPEVISGEGYGRKADIW	2
LRDSAGNVKLGDFGASKRLQTICMSGTGIRSVTGTPY----WMSPEVISGEGYGRKADVW	3
SVGCAIIEMACAKPPWNAEKHSNHLALIFKIASATTAPSIPSHLSPGLRDVAVRCLELQP	1
SVACTVVEMLTEKPPW-AEFEA-MAA-IFKIATQPTNPKLPPHVSDYTRDFLKRIFVEAK	2
SLGCTVVEMLTEKPPW-AEYEA-MAA-IFKIATQPTNPQLPSHISEHGRDFLRRIFVEAR	3
QDRPPSRE-LLKHPVFRTTW	1
L-RP-SAEELLRHMFVHYH	2
Q-RP-SAEELLTHHFAQLVY	3

太字のアミノ末端－調節ドメイン

下線を施してある配列－調節ヒンジ配列

太字イタリック－触媒ドメイン

ＭＥＫＫ４のキナーゼドメインのアミノ酸配列を、ＭＥＫＫ１、ＭＥＫＫ２、およびＭＥＫＫ３のキナーゼドメインと比較して表３に示す。

表３

..IRFQPNDHKTIKETADEELKIFEGIKHPNLVRYFGV..ELHREEM.YI
MEKK4
TYVRNTSSEQEEVVEALREEIRMMGHLNHPNIIRMLGATCEKSNYNLFIE
MEKK1
QVQFNPESPETSKEVNALECEIQLLKNLLHERIVQYYGCLRDPQEKTLSI
MEKK2
QVQFDPDSPETSKEVSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLRDRAEKILTI
MEKK3

IFMEYCDEGTLEEVSRLGLQEHV.I.RLYTKQITVAINVLHEHGNV.
MEKK4
.WMAGGSVAHLLSKYGAFKESVV.IN..YTEQLLRGLSYLHENQII
MEKK1
.FMELSPGGSIKDQLKAYGALTENVTRKYTRQILEGVHYLHSNMIV
MEKK2
.FMEYMPGGSVKDQLKAYGALTESVTRKYTRQILEGMSYLHSNMIV
MEKK3

表１を参照し、開始コドンについてのＫｏｚａｋ共通配列に基づくと、開始用のメチオニンはヌクレオチド４８６に生じることを予想することができる。このメチオニンで開始すると、このｃＤＮＡは７３ｋＤの分子サイズに相当する６７２アミノ酸の蛋白質をコードする。位置４４１には他の読み枠内メチオニンが存在し、これはＫｏｚａｋ規則には従わないが、６８７のアミノ酸残基（７４．６ｋＤ）を生じるであろう。このサイズ範囲はＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）および免疫ブロットにより決定されるＭＥＫＫの７８～８０ｋＤの見かけの分子サイズに対応する。

ＭＥＫＫ蛋白質の一次配列は２つの機能的ドメインを示唆し、それらは、（ｉ）調節的役割を担う可能性があるセリンおよびスレオニンに富むNH_2－末端部分、および（ｉｉ）ＣＯＯＨ－末端プロテインキナーゼ触媒ドメイン、である。NH_2－末端の４００アミノ酸の内の２０パーセントがセリンもしくはスレオニンである一方で、２つのみのチロシンが存在する。プロテインキナーゼＣによるリン酸化の幾つかの可能な部位がNH_2－末端領域に含まれることが明白であるが、ＭＥＫＫ配列内にはＳＨ２もしくはＳＨ３ドメインは全くコードされていない。触媒ドメインはＭＥＫＫのＣＯＯＨ－末端側半分に位置している。

ＭＥＫＫは、数々の細胞株およびマウス組織内に発現される７．８ｋＤのｍＲＮＡによりコードされる。図１Ａは、数々の細胞株およびマウス組織内の単一な７．８－ｋｂ　ＭＥＫＫ　ｍＲＮＡのノザン（ＲＮＡ）ブロットを示す。臭化エチジウム染色により示されるように等量（２０μｇ）の総ＲＮＡをゲルにかけた。ブロットは、ＭＥＫＫキナーゼドメインの一部分をコードする３２０－ｂｐのｃＤＮＡ断片もしくはＭＥＫＫのNH_2末端領域の一部分をコードする８５８－ｂｐ断片のいずれかで探索した。ＭＥＫＫのｍＲＮＡはマウスの心臓および脾臓ではかなり発現される一方で、肝臓には低い量が存在する。７．８ｋｂのＭＥＫＫ　ｍＲＮＡは、ＭＥＫＫのｃＤＮＡの５’および３’末端の両方から取得されるプローブで同定した。従って、ＭＥＫＫのｃＤＮＡは、約４ｋｂの仮定的な非翻訳配列を失っている。

ＭＥＫＫは単一遺伝子の産物であると考えられる。図１ＢはＭＥＫＫ遺伝子のサザン（ＤＮＡ）ブロットを示す。マウスゲノムＤＡＮ（１０μｇ）をＢａｍ　ＨＩ、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩ、もしくはＥｃｏ　ＲＩのいずれかで消化し、そしてゲルにかけた。ブロットをＭＥＫＫ遺伝子の３２０－ｂｐ断片で探索した。Ｂａｍ　ＨＩとＨｉｎｄ　ＩＩＩとの消化物における一本のバンドの出現は、ＭＥＫＫは一つの遺伝子によりコードされることを示唆する。Ｅｃｏ　ＲＩ消化物における２本のバンドの出現は、そのプローブがまたがるイントロン配列内のＥｃｏ　ＲＩ部位が存在するらしいことを示す。ＭＥＫＫ　ｍＲＮＡはマウスの心臓および脾臓内でかなり発現される一方で、肝臓内には低い量が存在する。７．８ｋｂのＭＥＫＫ　ｍＲＮＡが、ＭＥＫＫ　ｃＤＮＡの５’および３’末端の両方から取

得されるプローブで同定された。従って、ＭＥＫＫのｃＤＮＡは約４ｋｂの仮定的な非翻訳配列を失っている。
ＭＥＫＫのＣＯＯＨ－末端から取得される１５アミノ酸ペプチド
ＤＲＰＰＳＲＥＬＬＫＨＰＶＦＲ　に対する親和性精製化抗体で探索した細胞溶菌物の免疫ブロットは、７８ｋＤに遊走する顕著なバンドを特定した。
図１Ｃは、齧歯類の細胞株内のＭＥＫＫの７８－ｋＤおよび５０－ｋＤ形態の発現の免疫ブロットを示す。可溶性細胞性蛋白質（１００μｌ）もしくは組換えＭＥＫＫ　ＣＯＯＨ－末端融合蛋白質（３０μｌ）を、親和性精製化ＭＥＫＫ抗体（１：３００希釈）での免疫ブロットのためのゲルにかけた。クロム親和性細胞腫（ＰＣ１２）、Ｒａｔ　１ａ、およびＮＩＨ　３Ｔ３細胞は同じ７８－ｋＤの免疫反応性蛋白質を含み、これはしばしばＳＤＳ－ＰＡＧＥ上では二重線として遊走する。顕著な５０－ｋＤ免疫反応性種も共通して存在するが、調製毎にその強度が変化する。これは７８－ｋＤ蛋白質の蛋白質分解断片であると考えられる。免疫ブロット上での７８－および５０－ｋＤの免疫反応性バンドの両方の可視像は、１５－アミノ酸ペプチド抗原のその抗体とのインキュベーションにより阻害された。免疫ブロットにより検出されるＭＥＫＫ蛋白質はＭＥＫＫ　ｃＤＮＡの読み取り枠から予測される分子サイズに類似している。
ＭＥＫＫ蛋白質をＣＯＳ－１細胞内で発現させて、ＭＡＰＫを含むシグナル変換系を調節することにおけるその機能を特定した。図２Ａを参照すると、ＭＥＫＫがＣＯＳ－１細胞内で過剰発現された際には、ＭＡＰＫ活性は、ＭＥＫＫ　ｃＤＮＡ挿入断片を欠くプラスミドでトランスフェクトさせた対照細胞におけるものと比較して４～５倍高かった。１００ｍｍの培養皿内のＣＯＳ細胞をｐＣＶＭＶ５発現ベクター単独（１μｇ：対照）もしくはｐＣＶＭＶ５　ＭＥＫＫ構築物（１μｇ：ＭＥＫＫ）のいずれかでトランスフェクトさせた。４８時間後に、細胞をウシ血清アルブミン（０．１パーセント）を含む無血清培地内に１６～１８時間入れて休止を誘導した。その後に細胞をヒトＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）（＋ＥＧＦ）もしくは緩衝液（対照）で１０分間処理し、冷却リン酸緩衝化食塩水（ＰＢＳ）中で２回洗浄し、そして５０ｍＭのβ－グリセロリン酸エステル（ｐＨ７．２）、１００μＭのバナジン酸ナトリウム、２ｍＭの$MgCl_2$、１ｍＭのＥＧＴＡ、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００（０．５パーセント）、ロイペプチン（２μｇ／ｍｌ）、アプロチニン（２μｇ／ｍｌ）、および１ｍＭのジチオスレイトール（６００μｌ）を含む細胞溶菌緩衝液内で溶菌させた。ミクロフュージ内での最大速度で１０分間の遠心後、０．５～１ｍｇの可溶性蛋白質を含むＣＯＳ細胞溶菌物をＭＯＮＯ　Ｑカラムでのｆｐｌｃに供し、そして溶出分画をＭＡＰＫ活性についてアッセイした。ＭＡＰＫの活性化は、血清が剥奪されかついずれかの添加成長因子の非存在下にあるＣＯＳ細胞内で生じた。ＭＡＰＫの活性は、ＥＧＦでの対照細胞の刺激化後に観察されるものに類似していた。一時的にＭＥＫＫを過剰発現するＣＯＳ細胞のＥＧＦでの刺激化は、ＭＥＫＫ発現単独に関して観察されたものと比較してＭＡＰＫ活性をわずかに増加したに過ぎなかった。
ＭＥＫＫ蛋白質は、免疫ブロットによりトランスフェクト化ＣＯＳ細胞内で検出された。図２Ｂは、ベクター単独（対照）、あるいはＭＥＫＫをコードするベクターでトランスフェクトさせ、ＥＧＦで処理したかもしくは未処理の細胞内でのＭＥＫＫの発現を示す免疫ブロットを示す。ＣＯＳ細胞からの等量（１００μｇ）の可溶性蛋白質溶菌物を免疫ブロット用のゲル上に置いた。対照ＣＯＳ細胞からの溶菌物中には５０－ｋＤのＭＥＫＫのみが検出された。ＣＯＳ細胞内でのＭＥＫＫの一過性発現は顕著な８２ｋＤのバンドを生じ、これはＰＣ１２、Ｒａｔ　１ａ、もしくはＮＩＨ　３Ｔ３細胞において観察されたものと比較して若干大きかった。これは、翻訳の開始用の位置４８６よりはむしろ位置４４１のメチオニンの使用からもたらされるものと考えられる。８２ｋＤのＭＥＫＫ以上のバンドはＭＥＫＫのリン酸化からもたらされるようである。８２－ｋＤのＭＥＫＫ以下のバンドの群は蛋白質分解からもたらされると思われる。免疫ブロット中の１５－アミノ酸ＭＥＫＫペプチド抗原の抗血清への添加は全ての免疫反応性バンドの検出を妨げたが、これらのバンドは対照ＣＯＳ細胞の抽出物中には検出されず、このことはそれらが発現化ＭＥＫＫ蛋白質に由来することの表れである。

ＣＯＳ細胞中のＭＥＫＫの発現は、ＭＡＰＫをリン酸化および活性化するキナーゼであるＭＥＫを活性化することを見いだした。組換えＭＡＰＫを使用して、Ｍｏｎｏ　Ｓカラムでの高速蛋白質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）により分画化されたＣＯＳ細胞溶菌物中のＭＥＫ活性をアッセイした。（キセノプス　ラエビス）（ゼノパス　レービス）（Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｌａｅｖｉｓ）からのｐ４２　ＭＡＰＫをコードするｃＤＮＡをｐＲＳＥＴＢ発現ベクター内にクローン化した。この構築物を大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）ＢＬ２１（ＤＥ３）のＬｙｓＳ株内での、NH_2－末端にポリヒスチジン配列を含むｐ４２　ＭＡＰＫ融合蛋白質の発現のために用いた。発現プラスミドを含む培養物は３７℃下で、０．７～０．９の６００ｎＭでの光学密度にまで増殖させた。イソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（０．５ｍＭ）を添加して融合蛋白質合成を誘導し、そしてこの培養物を３時間インキュベートした。その後に細胞を回収し、そして凍結、解凍、および超音波処理によって溶菌させた。この溶菌物を１０，０００ｇで１５分間、４℃で遠心した。その後に上清をNi^{2+}－電荷セファロース（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ）樹脂に通し、そして可溶性組換えＭＡＰＫをリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ４．５）中で溶出させた。精製された組換えＭＡＰＫは８０パーセント以上純粋であった。精製された組換えＭＡＰＫはＭＥＫのための基質として役立ち、そしてＥＧＦレセプターの残基６６２～６８１（$EGFR^{662\sim681}$）からなるペプチドのリン酸化の触媒反応を行う。

一時的にＭＥＫＫでトランスフェクトさせたＣＯＳ細胞、ｍｏｃｋ－トランスフェクト化（対照）ＣＯＳ細胞、もしくはｍｏｃｋ－トランスフェクトさせかつＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）（＋ＥＧＦ）で処理したＣＯＳ細胞からの可溶性細胞溶菌物をＭｏｎｏ　Ｓカラム上でのＦＰＬＣにより分画化し、そして内因性ＭＥＫ活性を測定した。内因性ＭＡＰＫは分画２～４内に溶出される一方で、ＭＥＫは分画９～１３内に含まれていた。内因性ＭＥＫ活性をアッセイするために細胞を冷却ＰＢＳ中で２回洗浄し、そして５０ｍＭのβ－グリセロリン酸エステル、１０ｍＭの２－Ｎ－モルホリノエタン－硫酸（ｐＨ６．０）、１００μＭのバナジン酸ナトリウム、２ｍＭの$MgCl_2$、１ｍＭのＥＧＴＡ、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（０．５パーセント）、ロイペプチン（５μｇ／ｍｌ）、アプロチニン（２μｇ／ｍｌ）、および１ｍＭのジチオスレイトールを含む６５０μｌの溶液中で溶菌させた。ミクロフュージ内で最大速度で１０分間遠心させた後に、可溶性細胞溶菌物（１～２ｍｇの蛋白質）を、溶出緩衝液（５０ｍＭのβ－グリセロリン酸エステル、１０ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．０）、１００μＭのバナジン酸ナトリウム、２ｍＭの$MgCl_2$、１ｍＭのＥＧＴＡ、および１ｍＭのジチオスレイトール）内で平衡化させたＭｏｎｏ　Ｓカラムにかけた。このカラムを緩衝液（２ｍｌ）で洗浄し、そして結合蛋白質を溶出緩衝液中の０～３５０ｍＭのＮａＣｌの３０ｍｌの直線濃度勾配液で溶出させた。各分画の一部分（３０μｌ）を、４０μｌの最終容積中の緩衝液（２５ｍＭのβ－グリセロリン酸エステル、４０ｍＭのＮ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（２－エタノール硫酸）（ｐＨ７．２）、５０ｍＭのバナジン酸ナトリウム、１０ｍＭの$MgCl_2$、１００μＭのγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰ（３０００～４０００ｃｍｐ／ｐモル）、インヒビタープロテイン－２０（ＩＰ－２０；ＴＴＹＡＤＦＩＡＳＧＲＴＧＲＲＮＡＩＨＤ　；２５μｇ／ｍｌ）、０．５ｍＭのＥＧＴＡ、組換えＭＡＰキナーゼ（７．５μｇ／ｍｌ）、および２００μＭの$EGFR^{662\sim681}$）と混合することによりＭＥＫ活性についてアッセイした。３０℃で２０分間インキュベートした後に、$EGFR^{662\sim681}$内へのγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰの取り込みを測定した。このアッセイにおいては添加された組換えＭＡＰＫを活性化させる各カラム分画の能力を、ＥＧＦレセプター（ＥＧＦＲ）に由来するペプチドであるＭＡＰＫ基質内へのγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰの取り込みにより測定した。図３を参照すると、溶出される活性の第一ピークは、ＥＧＦＲペプチド基質を直接リン酸化する内因性の活性化ＭＡＰＫを表す。

活性の第二ピークはＣＯＳ細胞内の内因性ＭＥＫを表す。内因性ＭＥＫ活性はＭｏｎｏ　Ｓ　ＦＰＬＣの分画化により特徴決定した。図４Ａは、内因性ＭＥＫはＭＥＫＫを過剰発現する細胞内で活性化されることを示し、ＭＥＫの活性はＥＧＦで刺激化された調節細胞において観察されるものの約半分であった。従ってＭＥＫＫの発現はＭＥＫを活性化する

ことによりＭＡＰＫを活性化するようである。
ＣＯＳ細胞溶菌物をＭｏｎｏ　ＱカラムでのＦＰＬＣにより分画化して、発現されるＭＥＫＫを部分的に精製した。その後に精製化組換えＭＥＫ－１をγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰの存在下においてＭＥＫＫのための基質として用いて、ＭＥＫＫが直接ＭＥＫ－１をリン酸化するか否かを決定した。
ＭＥＫ－１をコードするｃＤＮＡを、ポリメラーゼ連鎖反応、ならびにＭＥＫ－１の５’コーディング領域および３’非翻訳領域の部分に相当するオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いてマウスＢ細胞のｃＤＮＡから取得した。触媒的に不活性なＭＥＫ－１をＬｙｓ^{343}のＭｅｔの部位特異的突然変異誘発により作成した。野生型のＭＥＫ－１および触媒的に不活性なＭＥＫ－１蛋白質を、それらのＮＨ$_2$－末端にポリヒスチジン配列を含む組換え融合蛋白質としてｐＲＳＥＴＡ内で発現させた。
ＭＥＫＫでトランスフェクトしたＣＯＳ細胞もしくはｍｏｃｋ－トランスフェクト化（対照）ＣＯＳ細胞からの溶菌物を先に記載するＭｏｎｏ　ＱカラムでのＦＰＬＣに供した。ＭＥＫＫを含む分画の一部分（２０μｌ）を、５０ｍＭのβ－グリセロリン酸エステル（ｐＨ７．２）、１００μＭのバナジン酸ナトリウム、２ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、１ｍＭのＥＧＴＡ、５０μＭのＡＴＰ、ＩＰ－２０（５０μｌ）、および１０μｌのγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰを含む緩衝液と４０μｌの反応容積で混合し、そして４０分間、触媒的に不活性な組換えＭＥＫ－１（１５０ｎｇ）（キナーゼ－ＭＥＫ－１）の存在下（＋）および非存在下（－）でインキュベートした。反応は、５×ＳＤＳ試料用緩衝液（１０μｌ）の添加により停止させ、１×ＳＤＳ緩衝液は、２％のＳＤＳ、５パーセントのグリセロール、６２．５ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ６．８）、５パーセントのβ－メルカプトエタノール、および０．００１パーセントのブロモフェノールブルーを含む。試料を３分間沸騰させ、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびオートラジオグラフィーに供した。自己リン酸化された組換え野生型ＭＥＫ－１（ＷＴ　ＭＥＫ－１）はリン酸化された触媒的に不活性なＭＥＫ－１と共に共遊走した。ＭＥＫＫはＭＥＫ－１をリン酸化することが可能であった。しかしながら対照細胞からの溶菌物の対応分画はＭＥＫ－１をリン酸化することが可能ではなかった。触媒的に不活性なＭＥＫ－１の修飾化形態をリン酸化アッセイに用いて、それが野生型ＭＥＫ－１がそうであるようには自己リン酸化しないことを確認した。触媒的に不活性なＭＥＫ－１のＭＥＫＫによるリン酸化は時間依存的であり（図４Ｂ）、ＭＥＫＫもリン酸化された。Ｍｏｎｏ　Ｑカラム（２０μｌ）でのＦＰＬＣからの分画２２を指示時間の間、触媒的に不活性な組換えＭＥＫ－１（０．１５μｇ）と共にもしくはそれなしでインキュベートした。キナーゼＭＥＫ－１およびＭＥＫＫのリン酸化は５分後には可視化され、そして約２０分後には最大に達した。ＭＥＫＫのリン酸化における時間依存的増加はＳＤＳ－ＰＡＧＥ中のＭＥＫＫ蛋白質の移動度の減少に対応していた。免疫ブロットは、ＭＥＫＫ蛋白質がＭＥＫをリン酸化する活性のピーク（分画２２）と共に共溶出される（Ｍｏｎｏ　Ｑカラムでの ＦＰＬＣ後）ことを示した（図４Ｃ）。ＭＥＫＫのゆっくり遊走する種も免疫ブロットにより検出された。
過剰発現されるＭＥＫＫによるＭＥＫのリン酸化がＭＥＫの活性化をもたらすか否かを決定するために、野生型組換えＭＥＫ－１および触媒的に不活性なＭＡＰＫの修飾化形態を結合アッセイ系に用いた。ＣＯＳ細胞溶菌物をＭｏｎｏ　Ｑ－ＦＰＬＣにより分離し、そしてＭＥＫＫを含む分画を、添加された野生型ＭＥＫ－１を活性化してその野生型ＭＥＫ－１がγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰの存在下で触媒的に不活性な組換えＭＡＰＫをリン酸化する能力についてアッセイした。ＭＥＫＫでトランスフェクトさせたＣＯＳ細胞もしくはｍｏｃｋ－トランスフェクト化（対照）ＣＯＳ細胞からの溶菌物をＭｏｎｏ　ＱでのＦＰＬＣにより分画化し、そしてＭＥＫＫを含む分画の一部分（２０μｌ）を緩衝液と混合した。各分画を、精製された野生型組換えＭＥＫ－１（１５０ｎｇ）の存在下（＋）もしくは非存在下（－）、および触媒的に不活性な（キナーゼ$^-$）精製化組換えＭＡＰＫ（３００μｇ）の存在下でインキュベートした。図５Ａを参照すると、ＭＥＫＫでトランスフェクトさせたＣＯＳ細胞の溶菌物からの分画２０～２４はＭＥＫ－１を活性化させた。従ってＭＥＫＫはＭＥＫ－１をリン酸化および活性化し、ＭＡＰＫのリン酸化を導いた。

ＭＥＫＫがＭＥＫを直接活性化し、そしてカラム分画内に含まれる一つもしくは複数の他のキナーゼの活性化を介してＭＥＫを活性化するのではないことを確認するために、過剰発現されるＭＥＫＫを、ＣＯＯＨ－末端ＭＥＫＫ融合蛋白質に対する抗血清を用いてＣＯＳ細胞溶菌物から免疫沈降させた。ＭＥＫＫ　ｃＤＮＡをＰｓｔ　Ｉおよび Ｋｐｎ　１で消化させ、このことによりＭＥＫＫの触媒ドメインをコードする１６７０－ｂｐの断片を作成した。この断片を、NH_2－末端にポリヒスチジン配列を含む組換え融合蛋白質としてｐＲＳＥＴＥＣ内で発現させた。精製化ＣＯＯＨ－末端ＭＥＫＫ融合蛋白質を使用してポリクローナル抗血清を作成した。免疫沈降化ＭＥＫＫを１０～１５μｌのＰＡＮ（１０ｍＭのピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス－２－エタンスルホン酸（Ｐｉｐｅｓ）（ｐＨ７．０）、１００ｍＭのＮａＣｌ、およびアプロチニン（２０μｇ／ｍｌ）中に再懸濁させ、そして２０μｌの最終容積での２０ｍＭのｐｉｐｅｓ（ｐＨ７．０）、１０ｍＭの$MnCl_2$、およびアプロチニン（２０μｇ／ｍｌ）中で、触媒的に不活性なＭＥＫ－１（１５０ｎｇ）および２５μＣｉのγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰと共に（＋）もしくはそれなしで（－）インキュベートした。反応は５×ＳＤＳ試料用緩衝液（５μｌ）の添加により停止した。この試料を３分間沸騰させ、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびオートラジオグラフィーに供した。図５Ｂを参照すると、ＭＥＫＫはＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で野生型のＭＥＫ－１と共に共遊走する触媒的に不活性なＭＥＫ－１をリン酸化した。過剰発現されるＭＥＫＫの数々のリン酸化バンドがこの免疫沈降物内に検出された。これらのバンドは恐らくはＭＥＫＫの自己リン酸化からもたらされ、そしてＭＥＫＫでトランスフェクトさせたＣＯＳ細胞からの溶菌物の免疫ブロットにより同定されたＭＥＫＫの形態に対応するものと思われる（図１Ｃ）。前免疫血清で取得された免疫沈降物はＭＥＫＫを全く含まず、そしてＭＥＫ－１をリン酸化しなかった。従って、ＭＥＫＫはＭＥＫを直接リン酸化するように思われるが、ＭＥＫＫを明瞭に排除することができない関連キナーゼはＭＥＫＫと共免疫沈降化される。

この結果はＭＥＫＫがＭＥＫをリン酸化および活性化することができ、このことが次にはＭＡＰＫをリン酸化および活性化することを示す（図６）。Ｒａｆもやはりリン酸化および活性化することができる（図６）。血清を剥奪してあるＣＯＳ細胞をＥＧＦで刺激化し、そしてＲａｆを、Ｒａｆ－１のＣＯＯＨ－末端に対する抗体で免疫沈降させた。Ｃｏｓ細胞をベクター単独（対照）もしくはＰＣＶ／Ｍ５－ＭＥＫＫ構築物（ＭＥＫＫ）で一時的にトランスフェクトさせた。休止対照細胞をヒトのＥＧＦ（３０μｇ／ｍｌ）でかあるいはそれなしで１０分間処理し、そしてＲａｆをＲａｆからのＣＯＯＨ－末端ペプチドに対する抗体で細胞溶菌物から免疫沈降させた。免疫沈降させたＲａｆを、触媒的に不活性なＭＥＫ－１（１５０ｎｇ）および２５μｌのγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰと共にインキュベートした。免疫沈降させたＲａｆはγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰの存在下でＭＥＫ－１をリン酸化した（図６Ａ）。ＭＥＫＫを過剰発現するＣＯＳ細胞からのＲａｆの免疫沈降物中にはＲａｆによるＭＥＫ－１のリン酸化がほとんどもしくは全く観察されなかった。ＥＧＦでのＭＥＫＫを過剰発現するＣＯＳ細胞の処理は、免疫沈降させたＲａｆによるＭＥＫ－１の類似の度合いのリン酸化をもたらした（図６Ｂ）。ＭＥＫＫでトランスフェクトさせ、かつ血清を剥奪してある細胞をＥＧＦで処理し、そしてＲａｆを免疫沈降させ、そして触媒的に不活性なＭＥＫ－１と共にインキュベートした。Ｒａｆに対する抗体での免疫ブロットにより示されるように、各試料中に等量のＲａｆが免疫沈降された。最もゆっくりと遊走するバンドはＲａｆもしくはＭＥＫ－１に無関係な免疫沈降化リン蛋白質を意味する。対照細胞およびＭＥＫＫでトランスフェクトした細胞からの免疫沈降物は、後続のＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＲａｆに対する抗体での免疫ブロットにより示されるように類似していた。従って、ＭＥＫＫおよびＲａｆの両方は独立にＭＥＫを活性化することが可能である。

マウスからのＭＥＫＫの同定は更に、イーストと哺乳類との間のＭＡＰＫ系の調節における保存を実証する。この結果は、ＭＡＰＫを制御する哺乳類の調節ネットワークはイーストにおけるものと比較してより複雑であることを示す。ＭＥＫＫおよびＲａｆの両方共がＭＥＫ、すなわち細胞表面からの様々なシグナルのためのＭＡＰＫのすぐ上流の収束点を

活性化する。Ｒａｆは関連するチロシンキナーゼ活性を有するレセプターに一次的に応答してＭＡＰＫネットワークを調節する一方で、ＭＥＫＫはＧプロテインおよびプロテインキナーゼＣを活性化するレセプターから発生する一次シグナルを媒介することができるらしい。この可能性は、プロテインキナーゼＣの負の方向の調節は成長因子に応答してＭＡＰＫの活性化を阻害することはないが、ムスカリン性M_1レセプターを刺激する作用物質に応答してＭＡＰＫの活性化を阻害する特異的細胞種における所見によって支持される。Ｓ．　セレビシアエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中のプロテインキナーゼＳｔｅ２０がフェロモン一応答経路中ではＳｔｅ１１の上流にあるという証拠もこの仮説を支持する。ＰＣ１２細胞では優性のネガティブ突然変異体Ｒａｓの発現は、Ｇプロテイン結合化レセプターの刺激化もしくはプロテインキナーゼＣの活性化に応答してＭＡＰＫの活性化を阻害することはないが、神経成長因子（ＮＧＦ）もしくは繊維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）に応答してＭＡＰＫの活性化を阻害する。しかしながら、チロシンキナーゼとＧプロテイン共役シグナル変換を統合する際の、ＲａｆとＭＥＫＫとのより複雑で細胞種に特異的な役割が存在するものと考えられる。ＭＥＫＫおよびＲａｆをＭＡＰＫネットワーク中の分岐として特定することは、この系の分化調節のための機構を提供する。

本発明はまた、本発明のＭＥＫＫ蛋白質に選択的に結合することが可能な抗体をも含む。このような抗体は、本明細書中では抗－ＭＥＫＫ抗体として引用される。抗－ＭＥＫＫ抗体のポリクローナル集団がＭＥＫＫ抗血清中に含まれている可能性がある。ＭＥＫＫ抗血清は、親和性精製化ポリクローナル抗体、硫酸アンモニウム留分抗血清、もしくは全抗血清を意味することができる。本明細書に用いられるように、用語「～に選択的に結合する」は、ＭＥＫＫ蛋白質に優先的に結合するこのような抗体の能力を意味する。結合は、免疫ブロットアッセイ、免疫沈降アッセイ、酵素免疫アッセイ（例えばＥＬＩＳＡ）、放射線免疫アッセイ、免疫蛍光抗体アッセイ、および免疫電子顕微鏡を初めとする当業者に知られる様々な方法を用いて測定することができ、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ．ａｌ．、Ｍｏｌｅｃｕａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｓ　Ｐｒｅｓｓ、１９８９、を参照せよ。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体のいずれかであることができる。本発明の抗体は、抗体断片、および一本鎖抗体を初めとする遺伝子的に作成された抗体のような機能的等価物を含み、これらは抗体を取得するために用いられる蛋白質のエピトープの内の少なくとも一つに選択的に結合することが可能である。抗体を、少なくとも部分的にはＭＥＫＫ核酸分子によりコードされる蛋白質に応答させて作成することが好ましい。抗体を、ＭＥＫＫ蛋白質の少なくとも一部分に応答させて作成することがより好ましく、そして抗体を、ＭＥＫＫ蛋白質のアミノ末端もしくはカルボキシル末端のいずれかに応答させて作成することが更により好ましい。

本発明の抗体を産生させるための好ましい方法は、ある動物にＭＥＫＫ蛋白質の有効量を投与して抗体を産生させ、そしてその抗体を回収することを含む。本発明の抗体は様々な使用可能性を有し、これらは本発明の範囲内に含まれる。例えば、このような抗体を使用して独特なＭＥＫＫ蛋白質を同定し、そしてＭＥＫＫ蛋白質を回収することができる。

本発明の一つの態様はＭＥＫＫ１のアミノ末端をコードする核酸分子を含み、これをｐＲＳＥＴ細菌ベクター内にクローン化してｐＭＥＫＫ－１組換え分子を産生した。ｐＭＥＫＫ－１組換え分子を大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）内で発現させ、そしてこの組換え分子にコードされる蛋白質を回収し、そして当業者に知られる標準方法を用いて精製した。ＮＺＷウサギを精製された組換えＭＥＫＫ１アミノ末端蛋白質で免疫化し、そして抗血清を当業者に知られる標準方法を用いて回収した。前述の方法はまた、ＭＥＫＫ１蛋白質のカルボキシル末端をコードする核酸分子を用いても実施した。抗－ＭＥＫＫ抗体を含む抗血清を、セファロース（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ）に結合されるＭＥＫＫ１蛋白質を固定化させてある親和性カラムに通した。親和性精製される抗－ＭＥＫＫ抗血清は、様々な細胞の種類からのＭＥＫＫ蛋白質に選択的に結合するが、Ｒａｆ－１、Ｂ－Ｒａｆ、もしくはＮ－Ｒａｆ蛋白質には結合しない抗体を含む。

ＥＧＦで刺激化した細胞もしくは刺激化していない細胞を溶菌し、そして既述のようにＳ

ＤＳ－ＰＡＧＥにより解析した。この細胞溶菌物に含まれるＭＥＫＫ蛋白質を、ＭＥＫＫ１のアミノ末端領域に特異的なＭＥＫＫ抗血清およびＭＥＫＫ１のカルボキシル領域に特異的なＭＥＫＫ抗血清を用いる免疫ブロットにより同定した。図７を参照すると、ＭＥＫＫ１、ならびにＭＥＫＫ活性を有する２つのより高い分子量の蛋白質ＭＥＫＫαおよびＭＥＫＫβを、アミノ末端領域（NH_4）に特異的なＭＥＫＫ抗血清を用いて同定した。ＭＥＫＫ１はＭＥＫＫ１のカルボキシル領域（ＣＯＯＨ）に特異的なＭＥＫＫ抗血清を用いて同定されたが、ＭＥＫＫαおよびＭＥＫＫβはそうではなかった。ＰＣ１２細胞溶菌物中に存在する約９５ｋＤと８２ｋＤとの２つのＭＥＫＫ免疫反応性種が、ＭＥＫＫのアミノ末端の一部分に対して作成したＭＥＫＫ抗血清により認識された。これらの蛋白質の両方の可視像は、精製される組換えＭＥＫＫ　NH_2－末端融合蛋白質抗原の抗体とのインキュベーションにより阻害された。単一の９５ｋＤ　ＭＥＫＫ蛋白質がＭＥＫＫ免疫沈降物内に存在したが、前免疫血清を用いた免疫沈降物内にはこれは存在しなかった。この９５ｋＤのＭＥＫＫは、ＰＣ１２細胞の細胞溶菌物中、ならびにＲａｔ１ａ、ＮＩＨ３Ｔ３、およびＳｗｉｓｓ３Ｔ３繊維芽細胞中に存在する約９５ｋＤのＭＥＫＫ蛋白質と共に共遊走した。繊維芽細胞の細胞株と比較すると、より多くの９５ｋＤ　ＭＥＫＫがＰＣ１２細胞中で発現された。Ｒａｆ－１もしくはＲａｆ－Ｂを特異的に認識する抗体での免疫ブロットは、これらの酵素の内のいずれのものもＭＥＫＫ免疫沈降物の混入物として存在するのではないことを示した。ＭＥＫＫ免疫沈降物中の９５ｋＤのＭＥＫＫはＰＣ１２細胞溶菌物中のＲａｆ－１もしくはＲａｆ－Ｂと一緒には共遊走せず、そしてＭＥＫＫとＲａｆ抗体との間には交差反応性は全く観察されなかった。

本発明のＭＥＫＫ蛋白質は、ＭＥＫＫ蛋白質を含む細胞の成長因子による刺激化に応答させて活性化することができる。飢餓培地（ＤＭＥＭ、０．１％ＢＳＡ）内での１８～２０時間のインキュベーションによりＰＣ１２細胞から血清を剥奪し、そしてＭＥＫＫを、未処理対照、あるいはＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）もしくはＮＧＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で処理した細胞からの等量の蛋白質を含む溶菌物から、ＭＥＫＫのNH_4－末端部分に特異的な既述の抗－ＭＥＫＫ抗体で免疫沈降させた。免疫沈降させたＭＥＫＫを８μｌのＰＡＮ［１０ｍＭのピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス－２－エタンスルホン酸（Ｐｉｐｅｓ）（ｐＨ７．０）、１００ｍＭのＮａＣｌ、およびアプロチニン（２０μｇ／ｍｌ）］中に再懸濁させ、そして２０μｌの最終容積の万能キナーゼ緩衝液［２０ｍＭのピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス－２－エタンスルホン酸（Ｐｉｐｅｓ）（ｐＨ７．０）、１００ｍＭの$MnCl_2$、およびアプロチニン（２０μｇ／ｍｌ）］中で、触媒的に不活性なＭＥＫ－１（１５０ｎｇ）および４０μＣｉの［$\gamma-^{32}P$］ＡＴＰと共に２５分間、３０℃でインキュベートした。反応は２×ＳＤＳ試料用緩衝液（２０μｌ）の添加により停止させた。この試料を３分間沸騰させ、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびオートラジオグラフィーに供した。Ｒａｆ－Ｂは、先のものと同じ未処理細胞溶菌物および処理化ＰＣ１２細胞溶菌物から、Ｒａｆ－ＢのＣＯＯＨ－末端ペプチドに対する抗血清（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｉｎｃ．社）で免疫沈降させ、そして同様にアッセイした。Ｒａｆ－１は、Ｒａｆ－１のＣＯＯＨ－末端の１２のアミノ酸に対する抗血清（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｉｎｃ．社）で免疫沈降させた。血清飢餓状態のＰＣ１２細胞の上皮成長因子（ＥＧＦ）処理はＭＥＫＫ活性の増加をもたらした。これらの結果は、インビトロでのキナーゼアッセイにおいて、ＭＥＫＫの免疫沈降物による精製化ＭＥＫ－１（キナーゼ不活性形態）のリン酸化を測定することにより取得した（図８）。ＮＧＦは、未処理細胞からの対照免疫沈降物と比較してＭＥＫＫ活性の僅かながらの上昇を刺激化した。ＮＧＦおよびＥＧＦによるＭＥＫＫ活性の刺激化はこれらの作用物質によるＲａｆ－Ｂの活性化に類似していたが、Ｒａｆ－Ｂは高い基本的活性を示した。ＮＧＦおよびＥＧＦによるｃ－Ｒａｆ－１の活性化はＭＥＫＫもしくはＲａｆ－Ｂのものと比較して殆ど無視できるものであった。

ＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）で０、１、３、５、１０、もしくは２０分間処理したＰＣ１２細胞の溶菌物からＭＥＫＫもしくはＲａｆ－Ｂを免疫沈降させ、そして既述のように触媒的に不活性なＭＥＫ－１（１５０ｎｇ）および［$\gamma-^{32}P$］ＡＴＰと共にインキュベート

した。データは、典型的な実験からの放射線活性ゲルのホスホリルイメージャー分析により定量化される各時間点についての応答の相対的強度を表す。ＥＧＦ処理の時間経過は、ＭＥＫＫの活性化が５分後に最大レベルに達し、そして少なくとも３０分間は持続することを示した（図９）。Ｒａｆ－Ｂは、類似の時間経過を示し、ピーク活性はＥＧＦ処理後３～５分以内に生じ、そして最高２０分間は持続した。

Ｒａｆ－ＢのものからＥＧＦ－刺激化ＭＥＫＫ活性を更に解離させるために、ＭＥＫＫの免疫沈降前にＲａｆ－Ｂを細胞溶菌物から免疫沈降させた。Ｒａｆ－Ｂを、ＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）で５分間処理してあるか、あるいは処理していないかのいずれかである血清飢餓状態のＰＣ１２細胞の溶菌物から予備浄化した。Ｒａｆ－Ｂを、Ｒａｆ－Ｂに対する抗血清を用いるか、あるいは対照として前免疫ＩｇＧ抗血清を用いて２回予備浄化させた。予備浄化した上清はその後にＭＥＫＫもしくはＲａｆ－Ｂ抗血清のいずれかで免疫沈降させ、そして先に詳細に記載されるように触媒的に不活性なＭＥＫ－１および［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰと共にインキュベートした。ＥＧＦ－刺激化もしくは未刺激化ＰＣ１２細胞溶菌物をＩｇＧもしくはＲａｆ－Ｂ抗血清のいずれかで予備浄化し、そしてその後にＭＥＫＫ抗血清もしくはＲａｆ－Ｂ抗体での免疫沈降に供した。図１０に示される結果は、Ｒａｆ－Ｂでの予備浄化はＲａｆ－Ｂインビトロキナーゼアッセイのホスホルイメージャー分析により測定したところ、Ｒａｆ－Ｂ活性の６０％の減少をもたらしたことを示す。ＥＧＦ－刺激化ＭＥＫＫ活性はＲａｆ－Ｂ枯渇により影響を受けず、このことはＲａｆ－ＢがＭＥＫＫの免疫沈降物の構成成分ではないことを示唆する。少なくとも４０％のＲａｆ－Ｂ活性がＲａｆ－Ｂ抗体での予備浄化に対して耐性である。ＣＯＳ細胞内で過剰発現される組換え野生型ＭＥＫＫはセリンおよびレオニン残基が容易に自己リン酸化され、そしてＭＥＫＫのアミノ末端はセリンおよびスレオニンにかなり富んでいる。ＰＣ１２細胞の免疫沈降物内に含まれるＭＥＫＫを、インビトロキナーゼアッセイにおいて精製化組換えＭＥＫＫアミノ－末端融合蛋白質の選択的リン酸化についてテストした。

血清飢餓状態のＰＣ１２細胞をＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）で５分間処理し、そして同じ細胞溶菌物からの等量の蛋白質を、ＭＥＫＫ、Ｒａｆ－Ｂ、もしくは対照としての前免疫抗血清のいずれかで免疫沈降させた。免疫沈降物を、先に記載するように、精製化組換えＭＥＫＫ　NH_2－末端融合蛋白質（４００ｎｇ）および［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰと共にインキュベートした。図１１に示される結果は、ＥＧＦ－刺激化および未刺激化ＰＣ１２細胞の溶菌物から免疫沈降させたＭＥＫＫは不活性な５０ｋＤ　ＭＥＫＫ　NH_2－融合蛋白質をしっかりとリン酸化させた一方で、Ｒａｆ－Ｂ、あるいはＥＧＦ－刺激化もしくは未刺激化細胞からの前免疫血清免疫沈降物は基質としてＭＥＫＫ　NH_2－融合蛋白質を使用しなかった。従ってＭＥＫＫ免疫沈降物中に含まれるＥＧＦ－刺激化ＭＥＫＫ活性は混入性のＲａｆキナーゼに起因するものではない。

ＭＥＫ－１およびＭＥＫＫ　NH_2－融合蛋白質の両方のリン酸化が９５ｋＤのＰＣ１２細胞のＭＥＫＫの活性に起因するものであることを保証するために、ＥＧＦ－刺激化および未刺激化細胞から調製された細胞溶菌物をＭｏｎｏ－ＱカラムでのＦＰＬＣにより分画化して、内因性ＭＥＫＫを部分精製した。未刺激化対照ＰＣ１２細胞もしくはＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）で５分間処理した細胞からの溶菌物をＭｏｎｏ－ＱカラムでのＦＰＬＣにより、０～５２５ｍＭのＮａＣｌの直線濃度勾配液を用いて分画化した。偶数番号の付いた各分画の一部分（３０μｌ）を、４０μｌの最終容積中、基質として精製化組換えＭＥＫ－１（１５０ｎｇ）を含む緩衝液（２０ｍＭのピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス－２－エタンスルホン酸（Ｐｉｐｅｓ）（ｐＨ７．０）、１０ｍＭの$MnCl_2$、アプロチニン（２０μｇ／ｍｌ）、５０ｍＭのβ－グリセロリン酸エステル（ｐＨ７．２）、１０ｍＭのＥＧＴＡ、ＩＰ－２０（５０μｇ／ｍｌ）、５０ｍＭのＮａＦ、および３０μＣｉの［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰ）と混合して、そして３０℃で２５分間インキュベートした。反応は２×ＳＤＳ試料用緩衝液（４０μｌ）の添加により停止させ、沸騰させ、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびオートラジオグラフィーに供した。ＭＥＫＫ活性のピークは分画１０～１２に溶出された。ＥＧＦ－処理化ＰＣ１２細胞の溶菌物からの偶数番号の付いた各分画の一部分（３０μｌ）を、ＭＥＫ－１の代わりの基質として精製化組換えＭＥＫＫ　NH_2－末端

融合蛋白質（４００ｎｇ）を含むこと以外は先に記載されるとうりの緩衝液と混合した。その後にキナーゼ不活性な精製化組換えＭＥＫ－１もしくはＭＥＫＫ　NH_2－末端融合蛋白質を［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰの存在下で基質として使用して、９５ｋＤのＭＥＫＫがいずれかの基質を直接リン酸化するかを否かを決定した。ＥＧＦで処理したＰＣ１２細胞からの溶菌物の分画１０～１４はＭＥＫ－１をリン酸化した一方で、未処理対照分画ではＭＥＫ－１のリン酸化が殆ど生じなかった。ＭＥＫＫ　NH_2－末端融合蛋白質もＭＥＫ－１と同じ分画でリン酸化されたが、活性のピークはやや広範囲であった（分画８～１６）。カラム分画の免疫沈降は、９５ｋＤのＭＥＫＫ蛋白質が、添加された外因性のキナーゼ不活性ＭＥＫ－１もしくは５０ｋＤのＭＥＫＫ　NH_2－末端融合蛋白質のいずれかをリン酸化する活性のピークと共に共溶出されることを示した。偶数番号の付いたカラム分画の一部分（９００μｌ）をトリクロロ酢酸での沈殿により濃縮し、そしてＭＥＫＫ抗体で免疫ブロットした。免疫反応性のピークは分画１０～１２に溶出された。

９５ｋＤのＰＣ１２細胞のＭＥＫＫおよびＲａｆ－Ｂが成長因子介在性シグナル伝達に機能的Ｒａｓ蛋白質を必要とするか否かを検査するために、優性のネガティブＨａ－ｒａｓ（Ａｓｎ１７）（N^{17}Ｒａｓ）をＰＣ１２細胞内で発現させ、そしてＥＧＦ－刺激化ＭＥＫＫもしくはＲａｆ－Ｂ活性化を、基質としてキナーゼ不活性ＭＥＫ－１を用いる免疫沈降においてアッセイした。デキサメサゾン誘導可能N^{17}Ｒａｓを安定に発現するＰＣ１２細胞を、１μＭのデキサメサゾンと共にもしくはそれなしで、０．１％のＢＳＡを含む培地中で１８～２０時間血清飢餓状態にさせ、そしてその後に未処理、もしくはＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）で５分間処理した。細胞溶菌物からの等量の可溶性蛋白質をＭＥＫＫもしくはＲａｆ－Ｂ抗血清のいずれかで免疫沈降させ、そして先に記載するように、触媒的に不活性な精製化組換えＭＥＫ－１および［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰと共にインキュベートした。N^{17}Ｒａｓの発現を、N^{17}Ｒａｓ遺伝子で安定にトランスフェクトしたＰＣ１２クローン内でその飢餓培地へのデキサメサゾンの添加により誘導した。N^{17}Ｒａｓ発現は、キナーゼ不活性ＭＥＫ－１をリン酸化させる能力により測定したところＥＧＦによるＭＥＫＫの活性化を阻害した（図１２を参照せよ）。Ｒａｆ－ＢのＥＧＦ－介在性活性化もやはり、非誘導化N^{17}Ｒａｓ形質転換体と比較すると、N^{17}Ｒａｓ発現性ＰＣ１２では非常に減少していた。野生型ＰＣ１２細胞へのデキサメサゾンの添加は、ＥＧＦにより誘導されるＭＥＫＫもしくはＲａｆ－Ｂ活性化の度合いに全く影響を及ぼさなかった。N_{17}Ｒａｓ遺伝子で安定にトランスフェクトされたＰＣ１２細胞クローンは野生型のＰＣ１２細胞と比較するとＭＥＫＫ活性のＥＧＦ－介在性活性化に対する反応性が低い。これらの結果は、ＰＣ１２細胞中のＲａｆ－ＢおよびＭＥＫＫの両方の成長因子刺激性活性化には機能的なＲａｓが必要であることを示し、このことはＲａｓはその細胞増殖および分化におけるその影響を、ＲａｆおよびＭＥＫＫファミリーの両方からの多重プロテインキナーゼエフェクターの活性化を介して媒介することができることを示唆する。

従って、ＥＧＦはＭＥＫＫ活性のピークを５分以内に刺激化し、これは処理後少なくとも３０分間は持続し、そしてこれはＲａｆ－Ｂ活性化の時間経過に類似していた。神経成長因子（ＮＧＦ）およびフォルボールエステルＴＰＡもまたＭＥＫＫを活性化するが、ＥＧＦと比較するとその度合いは低い。免疫沈降物もしくはカラム分画内のＭＥＫＫ活性は、ＥＧＦ－刺激化ｃ－Ｒａｆ－１およびＲａｆ－Ｂ活性のものから解離可能であった。ホルスコリンの予備処理は、ＥＧＦ、ＮＧＦ、およびＴＰＡによるＭＥＫＫとＲａｆ－Ｂの両方の活性化を廃止させた。ＥＧＦに応答するＭＥＫＫとＲａｆ－Ｂの両方の活性化は、優性なネガティブN^{17}Ｒａｓの安定な発現により阻害された。これらの所見は、成長因子によるＲａｓ－依存的ＭＥＫＫ調節の最初の証明を表し、そしてＲａｓが別の場合ではＲａｆおよびＭＥＫＫファミリーの一員との間で共役することができる複雑な細胞内ネットワークの出現を示唆する。

ＭＥＫＫは多数の種類の細胞（Ｔ細胞、神経細胞、および繊維芽細胞）におけるＪＵＮキナーゼ活性を選択的に調節する。ＪＵＮキナーゼはＭＡＰキナーゼの遠い親戚である。ＪＵＮキナーゼを活性化するＭＥＫＫの能力は、ＪＵＮキナーゼを活性化するＲａｆのものと比較すると約１００倍高い。ＪＵＮキナーゼは、様々な細胞の種類の成長および分化を

制御することに拘わる転写因子ＪＵＮの活性を調節する。
様々な種類の細胞における細胞死および他の機能を調節する腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）はＭＥＫＫ活性を刺激化する。ＭＥＫＫのＴＮＦ刺激化はＲａｆ非依存的である。細胞のＵＶ損傷により開始されるシグナル伝達経路はＴＮＦ応答経路と重複し、そしてまたＭＥＫＫを活性化するがＲａｆは活性化しない。従って、ＴＮＦとＵＶとの両方がＲａｆを活性化することなしにＭＥＫＫ活性を刺激化する。ＭＥＫＫのＵＶとＴＮＦとの両方がＲａｓ依存的である。
従って様々な種類の細胞におけるＭＥＫＫ活性のＲａｓ依存的調節は、ＲａｓがＲａｆファミリーの一員に加えてＭＥＫＫファミリーの活性化を制御することを示す。
９５ｋＤのＰＣ１２細胞ＭＥＫＫの成長因子介在性活性化がＰＫＡにより阻害されるか否かを決定するために、ホルスコリンを用いて細胞内ｃＡＭＰを上昇させ、そしてＰＫを活性化させた。血清飢餓状態のＰＣ１２細胞をホルスコリン（５０μＭ）で、もしくはそれなしで３分間前処理してプロテインキナーゼＡを活性化させ、そしてその後にＥＧＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）、ＮＧＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、もしくはＴＰＡ（２００ｎＭ）で５分間処理し、そしてＭＥＫＫを細胞溶菌物からの等量の可溶性蛋白質から免疫沈降させ、そして先に記載のように触媒的に不活性な精製化組換えＭＥＫ－１および［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰと共にインキュベートした。Ｒａｆ－Ｂ活性も同じ細胞溶菌物からアッセイして、その調節がＭＥＫＫのものと異なるか否かを検査した。Ｒａｆ－Ｂを先に記載されるように同じ細胞溶菌物から免疫沈降させ、そして先に記載されるようにＭＥＫ－１をリン酸化させる能力についてアッセイした。ホルスコリンの前処理は、キナーゼ不活性ＭＥＫ－１をリン酸化させる能力により測定したところ、ＥＧＦ、ＮＧＦ、およびＴＰＡによるＭＥＫＫとＲａｆ－Ｂとの両方の活性化を廃止させた（図１３）。ホルスコリン処理単独ではいずれのキナーゼにも感知できる程の影響は全く及ぼさなかった。これらの結果は、Ｒａｆ－１およびＲａｆ－Ｂに加えてＰＫＡ活性化は９５ｋＤのＰＣ１２細胞ＭＥＫＫの成長因子刺激化を阻害することを示し、Ｒａｓと上流との間もしくはＲａｓの下流、あるいはこれら３つのキナーゼの各レベルにおいて存在するＰＫＡ作用のための共通な調節制御地点の存在を示唆する。
類似するもしくは個別のＭＥＫ活性がG_iプロテイン結合化レセプターを介するＭＡＰＫの活性に関与しているかどうかを決定するために、トロンビン活性化Ｒａｔ　１ａ細胞からの細胞溶菌物中のＭＥＫ活性を調査した。トロンビン刺激化細胞は、ＥＧＦ刺激化細胞中に検出される主要ＭＥＫピークと共分画化されるＭＥＫ活性を示した。トロンビン攻撃誘発化細胞からのＭＥＫ活性の度合いは、ＥＧＦ刺激化で観察されるものと比較して一般的に２～３倍低く、このことはトロンビン攻撃誘発化細胞において本発明者が観察した一層少ないＭＡＰＫ応答に対応する。
ｇｉｐ２、ｖ－ｓｒｃ、ｖ－ｒａｓ、もしくはｖ－ｒａｆを発現するＲａｔ　１ａおよびＮＩＨ３Ｔ３細胞におけるＭＥＫの分化調節が、ＭＥＫ－１の仮定的レギュレーターであるプロテインキナーゼを調査するよう本発明者を導いた。最近、Ｒａｆ－１がＭＥＫをリン酸化および活性化することが示された。Ｒａｆの活性化を以下に記載の様式でアッセイした。細胞を血清飢餓状態にさせ、そして先に記載されるように適切な成長因子の存在下もしくは非存在下で攻撃誘発させた。血清飢餓状態のＲａｔ　１ａ細胞を緩衝液単独もしくはＥＧＦで攻撃誘発し、そしてＲａｆを、ＲａｆのＣ末端を認識する抗体で免疫沈降させた。細胞を氷冷ＲＩＰ緩衝液（５０ｍＭのトリス、ｐＨ７．２、１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．１％のＳＤＳ、０．５％のデオキシコール酸ナトリウム、１．０％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ１００、１０ｍＭのピロリン酸ナトリウム、２５ｍＭのグリセロリン酸ナトリウム、２ｍＭのバナジン酸ナトリウム、２．１μｇ／ｍｌのアプロチニン）中でこすることにより溶菌させ、そして１０分間ミクロフュージにかけて核を除去した。この上清を蛋白質含有量について標準化し、そしてＲａｆ－１のＣ末端に対するウサギ抗血清での免疫沈降前にプロテインＡセファロース（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ）で予備浄化させ、そして４℃で２～３時間プロテインＡセファロース（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ）にかけた。このビーズを氷冷ＲＩＰＡで２回、そしてＰＮＡ（１０ｍＭのＰｉｐｅｓ、ｐＨ７．０、１００ｍＭのＮａＣ

ｌ、２１μｇ／ｍｌのアプロチニン）で２回洗浄した。免疫沈降物の一部分をＳＤＳ試料緩衝液で希釈し、そして免疫ブロット分析に使用した。残りのものを５０μｌの最終容積でのキナーゼ緩衝液（２０ｍＭのＰｉｐｅｓ　ｐＨ７．０、１０ｍＭの$MnCl_2$、１５０ｎｇのキナーゼ不活性ＭＥＤＫ－１、３０μＣｉのγ－^{32}Ｐ－ＡＴＰ、および２０μｇ／ｍｌのアプロチニン）中に３０℃で３０分間再懸濁させた。野生型の組換えＭＥＫ－１をマーカーとして並行させて自己リン酸化させた。反応は１２．５μｌの５×ＳＤＳ試料緩衝液の添加により停止させ、５分間沸騰させ、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびオートラジオグラフィーに供した。

γ－^{32}Ｐ－ＡＴＰの存在下では、免疫沈降化させたＲａｆはＭＥＫ－１を自己リン酸化させることが可能であった。このアッセイに用いられた組換えＭＥＫ－１はキナーゼ不活性であり、野生型ＭＥＫ－１に関して観察されたようには自己リン酸化を行わないことが確認された。対照細胞からの免疫沈降物においてもＲａｆによるＭＥＫ－１のリン酸化はほとんどもしくは全く観察されなかった。ＥＧＦ刺激誘発は明らかにＲａｆを刺激化してＭＥＫ－１のリン酸化の触媒反応を行わせ、それとは対照的にＲａｔ　１ａ細胞のトロンビン刺激誘発は、内因性ＭＥＫが明らかに活性化されているとしても測定可能な程度にＲａｆを活性化することはなかった。ＥＧＦは、基本値の約２．６倍、組換えＭＥＫ－１のＲａｆリン酸化を刺激化した。Ｇｉｐ２もしくはｖ－Ｓｒｃ発現性Ｒａｔ　１ａ細胞からのＲａｆ免疫沈降物中では、ＲａｆによるＭＥＫのリン酸化はほとんど観察されなかった。ＥＧＦ刺激はこれらの細胞株におけるＭＥＫ－１のＲａｆ触媒化リン酸化を各々１．８倍および１．４倍活性化することが可能であった。Ｇｉｐ２およびｖ－Ｓｒｃ発現性細胞におけるＥＧＦ応答の鈍化は、ＭＡＰＫの構成性活性化へのＥＧＦレセプターの脱感作の結果であるらしい。後続のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、およびＲａｆ抗体を用いる免疫ブロットにより、この免疫沈降物中のＲａｆの量が類似することが示された。ＭＥＫのトロンビン刺激化が基準値の２～３倍であるために、Ｒａｆがこの成長因子によるＭＥＫ活性化に有意に寄与している場合にはＭＥＫリン酸化の少なくとも１．５倍の刺激化が予期される。このレベルの活性化はＥＧＦで刺激化したＧｉｐ２およびｖ－Ｓｒｃ発現性細胞株中において検出可能であった。従って、Ｒａｆのトロンビン活性化の検出の不成功はアッセイの感度に起因するのではなさそうである。ＭＡＰＫのトロンビン刺激化は３分目に最大となる。トロンビンでの１～５分間のＲａｔ　１ａ細胞の刺激化はＲａｆ活性を増加させなかった。

Ｒａｔ　１ａ細胞と同様にＮＩＨ３Ｔ３細胞においては、ＥｇｆはＲａｆを約２．７倍活性化させたが、一方でトロンビンはそのような活性化を行わなかった。ｖ－Ｒａｆ発現性ＮＩＨ３Ｔ３細胞はＭＥＫ－１のリン酸化において何の増加も見せなかった。この結果は予期されぬものであり、それはｖ－Ｒａｆ発現性ＮＩＨ３Ｔ３細胞中ではＭＥＫが明らかに活性化されているためである。ｃ－Ｒａｆ－１に加えてｐ９０およびｐ７５の両方のｇａｇ－ｒａｆ融合蛋白質を、抗血清によりｖ－Ｒａｆ　ＮＩＨ３Ｔ３細胞から免疫沈降した。ｐ７５ｇａｇ－ｒａｆはプロテインキナーゼ活性を示すことが判明しているが、インビトロのアッセイ系ではNH_2末端ｇａｇ融合蛋白質が立体的に組換えＭＥＫ－１のＲａｆリン酸化を阻害することが可能である。ｖ－Ｒａｆキナーゼ活性を測定するためには更に詳細な研究を行う必要があるであろう。この結果は、ＭＥＫの活性化はＲａｆの活性化だけによってはその理由を説明できないことを主張している。トロンビン刺激化を受けたG_iプロテイン共役化経路、ならびにｇｉｐ２およびｖ－ｓｒｃトランフェクト化細胞におけるＭＥＫ活性化に寄与するＭＥＫのための追加的な調節的キナーゼが存在する必要がある。

ＭＡＰＫは、様々なシグナル変換経路での主要中間体分子であると考えられるセリン／スレオニンキナーゼである。ＭＡＰＫは次にはＭＥＫによるリン酸化および活性化を受ける。

ＭＥＫの構成性活性化は、癌遺伝子トランスフェクト化細胞の内の大半の、そうでなければ全てのＭＡＰＫ活性の増加の理由を説明する。ｇｉｐ２およびｖ－ｓｒｃはＲａｔ　１ａ細胞中のＭＥＫを活性化させた一方で、ｖ－ＲａｆはＮＩＨ３Ｔ３細胞中で最も効率よ

くＭＥＫを活性化した。これらの癌蛋白質は成長因子として類似のＭＥＫ活性を活性化した。ｖ－Ｒａｓトランスフェクト化ＮＩＨ３Ｔ３細胞中では有意なレベルのＭＥＫ活性化は全く検出されなかった。この所見は、ＭＡＰＫとＭＥＫとの活性化の間のより密接な関連を示す。本発明者は、癌遺伝子発現性成長因子刺激化細胞中では、ＭＥＫ活性化に非依存的なＭＡＰＫの有意な活性化の所見は得ていない。

キナーゼ不活性ＭＥＫ－１のリン酸化を必要とするＲａｆ活性化アッセイの感度は、Ｒａｔ　１ａおよびＮＩＨ　３Ｔ３細胞の両方のＥＧＦ刺激化について観察される２０～２５％のＲａｆ活性を容易に検出することが可能であるはずであることを示唆する。ＭＥＫおよびＭＡＰＫの両方の活性が容易に検出される際のトロンビンに応答するＲａｆ活性化の検出の不成功は、Ｒａｔ　１ａおよびＮＩＨ　３Ｔ３細胞中ではＲａｆがトロンビンによっては有意に活性化されないことを示唆する。この所見は、Ｒａｆ以外の追加的プロテインイキナーゼがＭＥＫ－１をリン酸化および活性化することが可能であることを示唆する。本発明者は最近、Ｒａｆに無関係かつ非依存的なマウスのＭＥＫキナーゼ（ＭＥＫＫ）をクローン化および発現させた。ＭＥＫＫおよびＲａｆの両方がＭＥＫ－１をリン酸化および活性化することを見いだした。ＭＥＫＫはイーストのプロテインキナーゼＳｔｅ１１とＢｙｒ２とのマウス相同物であり、ＭＥＫはイーストのプロテインキナーゼＳｔｅ７とＢｙｒ１とのマウス相同物である。ＲａｆはＳｔｅ１１およびＢｙｒ２とは配列が無関係であり、このことはＲａｆはイーストにおいて特定されるフェロモン反応性プロテインキナーゼからの哺乳類における分岐を表すことを示唆する。

実験は、ＲａｆとＭＥＫＫとの両方がＭＥＫを活性化させ、このＭＥＫはＭＡＰＫ活性化に必要な多重プロテインキナーゼのための収束点として機能することを示す（図１４を参照せよ）。従ってＲａｆおよびＭＥＫＫは、様々な細胞表面レセプターにより開始されるシグナル入力のための分岐におけるプロテインキナーゼである。ＭＥＫＫは、Ｒａｔ　１ａおよびＮＩＨ　３Ｔ３細胞内でＭＥＫを調節するトロンビン調節化キナーゼであると考えられる。ＲａｆおよびＭＥＫＫは分化的には癌蛋白質により調節されているとも考えられている。

ＭＡＰＫとＭＡＰＫの上流レギュレーターとの間でのＭＥＫの設置は、統合ばかりでなく成長因子レセプターにより開始されるシグナルネットワークの独立性も提供する。例えば、セリン／スレオニンキナーゼであるＲａｆおよびＭＥＫＫはＭＥＫをリン酸化することができるが、同様に他の蛋白質もリン酸化しそうである。ＭＥＫはＭＡＰＫの選択的調節用に特殊化された複式のチロシン／スレオニンキナーゼである。

本発明の一つの態様は、ＭＥＫＫがＭＡＰＫを活性化することの認識に関する。例えば、ＭＡＰＫは哺乳類系における様々な細胞性経路に関与することが知られている。ＭＡＰＫは、哺乳類の細胞性有糸分裂誘発、ＤＮＡ合成、細胞分裂、および分化に関与することが知られている。ＭＡＰＫはまた、ｃ－Ｊｕｎおよびｃ－Ｍｙｃのような癌遺伝子の活性化に関与することも認識されている。理論に縛られる訳ではないが、本発明者はＭＡＰＫは遺伝的起源を有する様々な異常にも密接に関与していると考えている。ＭＡＰＫは核膜を横断することが知られており、そして様々な遺伝子の発現を調節することの少なくとも部分的な原因となっていると考えられている。ＭＡＰＫはそれ自体、癌、神経性疾患、自己免疫性疾患、アレルギー性反応、創傷治癒、および炎症性応答の誘因もしくは進展における有意な役割を演じるもの考えられる。本発明者は、ＭＥＫＫをコードする核酸配列を最初に同定することにより、その配列がＭＥＫＫの発現を調節し、そしてそのためＭＡＰＫの活性化を調節することが可能であることを今回認識した。

ＭＥＫＫはＭＡＰＫの活性化以外にも様々な他の能力において機能することも知られている。ＭＥＫＫによる刺激化もしくは阻害のいずれかにより調節される他の細胞性活性の調節を実施するためにＭＥＫＫの発現を調節することはそれ自体、本発明の範囲内に含まれる。

本発明の他の態様は、ＭＥＫＫおよびＲａｆの両方がＭＡＰＫを活性化することが可能であるということの認識に関する。本発明者は、ＭＥＫＫは構造的にはＲａｆとは異なるものの、ＲａｆとＭＥＫＫとの両方がＭＡＰＫ活性の調節に関与することを発見した。従っ

て、所望の調節的結果を達成するためにＲａｆおよびＭＥＫＫの発現の刺激化もしくは阻害のいずれかを行うことは本発明の範囲内に含まれる。従って一つの態様においては、ＭＥＫＫ活性を遮断する目的でＭＥＫＫ発現を、例えばアンチセンス核酸配列の使用により阻害することができる。別法では、Ｒａｆの発現を同一細胞内で同様に調節してＭＡＫＫ活性の最大阻害を達成することができる。従ってＭＡＰＫ系の調節は、ＲａｆおよびＭＥＫＫ発現のいずれかもしくは両方の阻害および／または刺激化により微調整することができる。

よく知られる組換えＤＮＡ発現技術の使用を介してＭＥＫＫの発現を調節することは本発明の範囲内に含まれる。例えば、適切な宿主細胞をＭＥＫＫ配列で形質転換することができ、そして適切な制御因子をＭＥＫＫ配列と操作的に連結させて所望の発現を達成することができる。

その細胞内に存在するＭＥＫＫ酵素の量は、実質的にその酵素の合成を抑制解除する、その酵素をコードする核酸配列のコピー数を増幅させる、およびそれらの組み合わせを初めとするが、これらには限定されない様々な様式で増加させることができる。

本明細書で用いられる際には「酵素の合成を実質的に抑制解除する」は、通常に野生型細胞により産生されるのと比較して一層多くの量の酵素を産生し、その結果基質から産物への変換の量および／または率が野生型細胞におけるものと比較して高くなることを意味する（すなわち、基質から産物への変換が亢進される）。ＭＥＫＫ酵素合成の抑制解除は、その酵素をコードする遺伝子の転写および／または翻訳に通常及ぼされる調節的制御を妨害すること、ならびにその酵素に対応するメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の安定性を増加させることを初めとする様々な様式で達成することができる。例えば、各々のリプレッサーを少なくとも部分的に不活化させること、および／またはオペレーター配列を改変してそれに結合するリプレッサーの能力を減少させることにより、通常は抑制に供される酵素の合成を増加させることができる。転写（例えば、プロモーター）および／または翻訳（例えば、シン－デルガルノ（Ｓｈｉｎｅ　Ｄｅｌｇａｒｎｏ）配列）制御シグナル（例えば、開始、伸長、および／または停止シグナル）の改変もやはり、酵素産生の率および量の両方を亢進させることができる。酵素合成を抑制解除するための方法には組換えＤＮＡ技術が含まれる。

本明細書に用いられる際には、細胞内の核酸配列のコピー数の増幅は、その細胞のゲノム内でその核酸配列のコピー数を増加させるか、もしくは形質転換によりその細胞内にその核酸配列の追加的コピーを導入することのいずれかにより達成することができる。コピー数増幅は、より多くの量の酵素が産生されて、基質から産物への変換の亢進が導かれるような様式において実施される。例えば、本発明の核酸を含む組換え分子を細胞内に形質転換させて酵素合成を亢進させることができる。形質転換は、核酸配列をある細胞内に挿入することによるいずれかの方法を用いて達成することができる。形質転換技術には、トランスフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、およびプロトプラスト融合が含まれるが、これらには限定されない。形質転換後にはその細胞は、染色体外ベクター上に留まっているか、あるいは宿主ゲノム内に取り込まれるかのいずれかである可能性があるその核酸配列の多重コピーを産生することができる。形質転換前に組換え分子上の核酸配列を操作して、より高い比活性を有する酵素をコードさせることができる。

本発明の一つの態様は実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質である。本発明に従うと、実質的に純粋であるか、あるいは単離された蛋白質は、その天然の環境から取り出されてきた蛋白質である。「単離された」および「実質的に純粋な」はそれ自体、蛋白質が精製された度合いを反映する必要は必ずしもない。実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質は、その天然の源から取得することができる。実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質はまた、組換えＤＮＡ技術もしくは化学的合成を用いて産生することもできる。本明細書に用いられる際には、実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質は全長のＭＥＫＫ蛋白質あるいはそのような蛋白質の相同物であることができ、この相同物とは、アミノ酸が削除（例えば、ペプチドのようなその蛋白質の切断版）、挿入、逆位、置換、および／または誘導化（例えば、グリコシル化、ホスホリ

ル化、アセチル化、ミリスチル化、プレニル化、パルミチン酸付加、アミド化、および／またはグリコシルホスファチジルイノシトールの付加による）が施されていて、その結果その相同物がキナーゼ活性を有し、そして／またはＭＥＫＫ蛋白質に対する免疫応答を誘導することが可能な少なくとも一つのエピトープを含む（すなわち、当業者に知られる技術を使用してこの相同物が免疫原としてある動物に投与される際には、この動物はＭＥＫＫ蛋白質の少なくとも一つのエピトープに対する液性および／または細胞性免疫応答を生じるであろう）ＭＥＫＫ蛋白質のようなものである。キナーゼ活性、キナーゼ調節活性、ならびに免疫応答をもたらすある蛋白質の能力を当業者に知られる技術を用いて測定することができる。

全長蛋白質の相同物を初めとする本発明のＭＥＫＫ蛋白質は更に、表１に開示されるように、緊縮条件下で、ＭＥＫＫ蛋白質をコードする核酸配列の少なくとも一部分を含む核酸と（すなわち、それに）ハイブリダイズすることが可能な核酸分子によりコードされることを特徴とする。本明細書に使用される際には、句、ある実在物の「少なくとも一部分」は、その実在物の機能的側面を有するのに少なくとも十分であるその実在物の量を意味する。例えば本明細書に用いられる場合、ある核酸配列の少なくとも一部分は、緊縮条件下で安定なハイブリッドを形成することが可能な核酸配列の量である。核酸は配列はあるｃＤＮＡ（相補的ＤＮＡ）核酸分子の演繹化配列を表し、この産生法は以下に開示される。（核酸配列決定技術は完璧に過誤を含まないという訳ではないため、表１に示される核酸配列は、良くてもＭＥＫＫ蛋白質の少なくとも一部分をコードする核酸分子の見かけの核酸配列を表すことが銘記されるべきである）。本明細書に使用される際には、緊縮ハイブリッド形成条件は、オリゴヌクレオチドを初めとする核酸分子（もしくは配列）を用いて類似配列を同定する標準的なハイブリッド形成条件を意味する。このような標準条件は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、前述、において開示されている。本発明の好ましいＭＥＫＫ蛋白質は、表１に示される核酸配列と少なくとも約８０パーセントの相同性（類似領域内での同一性）を有する核酸配列によりコードされる。本発明のより好ましいＭＥＫＫ蛋白質は、表１に示される核酸配列と少なくとも約８５パーセントの相同性を有する核酸配列によりコードされ、そして本発明の更により好ましいＭＥＫＫ蛋白質は、表１に示される核酸配列と少なくとも約９０パーセントの相同性を有する核酸配列によりコードされる。

ＭＥＫＫ蛋白質相同物は、天然の対立遺伝変異もしくは天然の突然変異の結果であることが可能である。ＭＥＫＫ蛋白質相同物はまた、その蛋白質への直接的改変、あるいは無作為的もしくは標的化突然変異誘発を実施するための例えば古典的技術もしくは組換えＤＮＡ技術を用いるその蛋白質をコードする遺伝子への改変を初めとするが、これらには限定されない当業者に知られる技術を使用して産生することもできる。相同物を初めとする本発明の単離された蛋白質を、哺乳類のＭＥＫ蛋白質をリン酸化する、および／またはＭＥＫＫ蛋白質に対する免疫応答を誘導するその蛋白質の能力により簡単な様式で同定することができる。本発明のＭＥＫＫ蛋白質への改変は全長ＭＥＫＫ蛋白質を切断することを含む。本発明のＭＥＫＫ蛋白質への好ましい改変は例えば、少なくとも一部分の調節ドメイン（表２に示される）を欠損させて構成的に活性なＭＥＫＫ蛋白質を産生すること、少なくとも一部分の触媒ドメイン（表２に示される）を欠損させて、ＭＥＫＫ活性を調節することが可能な蛋白質のインヒビターとして作用することが可能な不活性ＭＥＫＫ蛋白質を産生すること、ＭＥＫＫ蛋白質の内の少なくとも一部分の調節ドメインを単離してＭＥＫＫ調節蛋白質を阻害することが可能な分子を産生させること、および触媒ドメイン（すなわち、ホスホトランスフェラーゼドメイン）中のリシン残基をメチオニン残基で置換して触媒ドメインを不活化させることを含む。

触媒ドメインを含むが調節ドメインは含まないＭＥＫＫ１の２つの切断形態を標準的な組換えＤＮＡ技術を使用して作成した。表２を参照すると、第一切断化ＭＥＫＫ分子は残基１から残基２１５までＭＥＫＫ１を切断することにより産生され、そのことによりＰＰＰＳＳヒンジ配列および調節ドメインの欠損が生じて切断化ＭＥＫＫ分子ＰＰＰＳＳ－ｔｒｕｎｃが形成された。第二のより小さい切断化ＭＥＫＫ分子は残基１から残基１までで

ＭＥＫＫ１を切断することにより産生され、このことによりＰＰＰＳＳヒンジ配列および調節ドメインが除去されて切断化ＭＥＫＫ分子Ｎｃｏ１－ｔｒｕｎｃが形成された。ＰＰＰＳＳ－ｔｒｕｎｃおよびＮｃｏ１－ｔｒｕｎｃのＭＡＰＫ活性を活性化させる能力をも全長ＭＥＫＫ蛋白質および陰性対照蛋白質と比較した。図１５に示される結果は、切断化ＭＥＫＫ分子は全長ＭＥＫＫよりも一層活性であることを示す。実際に切断化ＭＥＫＫ分子は、全長ＭＥＫＫ蛋白質と比較すると少なくとも約１．５倍高い活性であった。従って、ＭＥＫＫの調節ドメインの除去は触媒ドメインの活性の抑制解除を行い、酵素活性の改善をもたらす。

本発明の単離化蛋白質の最低限のサイズはエピトープを形成するのに十分であり、これは典型的には少なくとも約７から約９までのアミノ酸のサイズである。当業者は気づいているように、エピトープは、天然の状態で互いに接近しているアミノ酸、ならびに天然の蛋白質の三次構造に起因して、ごく十分に接近してエピトープを形成するアミノ酸を含むことができる。

機能的に等価な核酸配列は、生物学的に活性な酵素をコードする核酸配列の能力を実質的に妨害することのないヌクレオチド欠損、添加、逆位、および／または置換のような改変を含む核酸配列を含むことができる。すなわち本発明の機能的に等価な核酸配列は、それらの天然の対応物に類似する生物学的活性を有する酵素をコードする。機能的に等価な真核生物の核酸配列はまた、その核酸配列のコーディング領域の周辺および／またはその中に含まれる介在配列および／または非翻訳配列を含むことができる。

機能的に等価な核酸配列は、当業者に知られる方法を用いて取得することができる（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、前述、を参照せよ）。例えば、核酸配列は、部位特異的突然変異誘発、突然変異を誘導するための核酸の化学的処理、核酸断片の制限酵素開裂、核酸断片の連結、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅、および／または核酸配列の選択される領域の突然変異誘発、核酸配列の混合物を「構築」するためのオリゴヌクレオチド混合物の合成および混合群の連結、ならびにそれらの組み合わせ物のような古典的突然変異誘発技術および組換えＤＮＡ技術を初めとするが、それらには限定されない様々な技術を使用して改変することができる。機能的に等価な核酸は、その核酸配列によりコードされる蛋白質の機能についてスクリーニングすることにより改変化核酸配列の混合物から選択することができる。数々のスクリーニング技術が当業者に知られており、それらには、相補性アッセ、結合アッセイ、および酵素アッセイが含まれるがこれらには限定されない。形質転換は、核酸配列を細胞内に挿入することによるいずれかの方法を使用して達成することができる。形質転換技術には、トランスフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、およびプロトプラスト融合が含まれるが、これらには限定されない。組換え細胞は単細胞性のままであることができるか、あるいは組織もしくは多細胞生物体内で増殖することができる。本発明の形質転換化核酸配列は染色体外に留まることができるか、あるいは発現されるそれらの能力を保持するような様式で宿主の染色体内の一つもしくは複数の部位内に組み込まれることができる。本発明の酵素をコードする核酸配列の発現がプラスミド配列の発現もしくは宿主ゲノム内へ組み込まれる配列に起因する可能性があるということは、それ自体本発明の範囲内に含まれる。

組換え細胞を、一つもしくは複数の組換え分子で宿主細胞を形質転換させることにより産生させ、その組換え分子の各々が、一つもしくは複数の転写制御配列を含む発現ベクターに操作的に連結される本発明の一つもしくは複数の核酸配列を含むことが好ましい。細胞は一つもしくは複数の組換え分子で形質転換させることができる。

本明細書において使用される際には、節「操作的に連結される」は、ある核酸配列の、宿主細胞内に形質転換させた際にその配列が発現されることが可能であるような様式における発現ベクター内への挿入を意味する。本明細書において使用される際には発現ベクターは、宿主細胞を形質転換させること、宿主細胞内で複製すること、および特定される核酸配列の発現を実施することが可能なＤＮＡもしくはＲＮＡベクターである。発現ベクターは原核生物性もしくは真核生物性のいずれかであることができ、そして典型的にはウイルスもしくはプラスミドである。

本発明の核酸配列を、プロモーター、オペレーター、リプレッサー、エンハンサー、停止配列、複製起点、ならびに宿主細胞に適合しかつ核酸配列の発現を制御する他の調節配列を含む発現ベクターに操作的に連結させることができる。具体的には、本発明の発現ベクターは転写制御配列を含む。転写制御配列は、転写の開始、伸長、および停止を調節する配列である。特に重要な転写制御配列は、プロモーター、エンハンサー、オペレーター、およびリプレッサー配列のような転写開始を制御するものである。適切な転写制御配列は、本発明の宿主細胞の内の少なくとも一つにおいて機能することができ、かつ細菌、イースト、真菌類、昆虫、動物、および植物の転写制御配列を含むことができるいずれかの転写制御配列を含む。

本発明の組換え分子は、形質転換される予定の細胞内の核酸配列の発現を効果的に調節することが可能ないずれかの転写制御配列に操作的に連結される、本明細書に記載されるいずれかの核酸配列組み合わせ物であることができる。

本発明の組換え細胞は、本発明のいずれかの核酸配列で形質転換されるいずれかの細胞を含む。

組換えＤＮＡ技術の使用は、例えば、宿主細胞内での核酸配列のコピー数、それらの核酸配列が転写される効率、得られる転写物が翻訳される効率、および翻訳後改変の効率を操作することにより形質転換化核酸配列の発現を改善することができる。酵素をコードする核酸配列の発現を増加させるのに有用な組換え技術は、高コピー数プラスミドへの核酸配列の操作的連結、一つもしくは複数の宿主細胞染色対内への核酸の組込み、プラスミドへのベクター安定化配列の添加、転写制御シグナル（例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー）の置換もしくは改変、翻訳制御シグナル（例えば、リボソーム結合部位、シン－デルガルノ（Ｓｈｉｎｅ－Ｄｅｌｇａｒｎｏ）配列））の置換もしくは改変、酵素をコードする核酸配列の宿主細胞のコドン使用に対応させるための改変、転写物を脱安定化させる配列の欠失、および培養中の組換え酵素産物から組換え細胞増殖を一時的に分離する制御シグナルの試用を含むがこれらには限定されない。本発明の発現化組換え酵素の活性は、既述の経路に関連する酵素をコードする核酸配列を断片化、壊変、もしくは誘導化することにより改善することができる。

本発明はまた、細胞の表面上のレセプターから開始するシグナルを調節することが可能な化合物を同定する方法も含む。このような方法は、（ａ）ＭＥＫＫ蛋白質を含む細胞を仮定的な調節化合物と接触させる段階、（ｂ）その細胞を、その細胞の表面上のレセプターに結合することが可能なリガンドと接触させる段階、（ｃ）ＭＥＫＫ蛋白質のリン酸化を決定することによりその仮定的な調節配列の細胞性シグナルを調節する能力を評定する段階、を含む。段階（ｃ）は、ＭＥＫＫ蛋白質のＭＥＫ蛋白質をリン酸化する能力を測定することによりＭＥＫＫ蛋白質の活性化を決定することを含む。

他の態様においては、細胞内でのシグナル変換を調節することが可能な化合物を同定する方法は、（ａ）仮定的な阻害性化合物をＭＥＫＫ蛋白質と接触させて反応混合物を形成する段階、（ｂ）その反応混合物をＭＥＫ蛋白質と接触させる段階、および（ｃ）その仮定的な阻害性化合物のＭＥＫＫ蛋白質によるＭＥＫ蛋白質のリン酸化を阻害する能力を評定する段階、を含む。段階（ｃ）から取得される結果をＭＥＫ蛋白質をリン酸化するＲａｆ蛋白質の能力を阻害する仮定的阻害性化合物の能力と比較して、その化合物がＲａｆ蛋白質に非依存的なＭＥＫＫ蛋白質を必要とするシグナル変換を選択的に調節することができるかどうかを決定することができる。前述の方法において用いられるＭＥＫＫ、ＭＥＫ、およびＲａｆ蛋白質は組換え蛋白質もしくは天然に取得される蛋白質であることができる。

本発明の他の態様は、細胞の表面上のレセプターから開始されるシグナルを調節する化合物を同定するためのキットを含む。このようなキットは、（ａ）ＭＥＫＫ蛋白質を含む少なくとも一つの細胞、（ｂ）その細胞の表面上のレセプターに結合することが可能なリガンド、および（ｃ）仮定的な調節化合物のＭＥＫＫ蛋白質のリン酸化を変化させる能力を評定するための手段、を含む。リン酸化を決定するためのこのような手段は、例えばリン酸化をホスホセルロースブロット用試薬を用いて検出することができる当業者に知られる

方法および試薬を含む。
他の態様では本発明のキットは、（ａ）ＭＥＫＫ蛋白質、（ｂ）ＭＥＫ蛋白質、および（ｃ）仮定的阻害性化合物のＭＥＫＫ蛋白質によるＭＥＫ蛋白質のリン酸化を阻害する能力を評定するための手段、を含むことができる。本発明のキットは更に、Ｒａｆ蛋白質、およびＭＥＫ蛋白質をリン酸化するＲａｆ蛋白質の能力を阻害する仮定的阻害性化合物の能力を決定するための手段を含むことができる。
本発明の一つの態様は、ある動物に有効な様式で投与した際に、その動物の細胞内でのシグナル変換を調節することが可能な治療的組成物である。具体的には、このような治療的組成物は、癌、自己免疫疾患、炎症性応答、アレルギー性応答、ならびにパーキンソン病およびアルツハイマー病のような神経性疾患のような医学的疾患を治療するための動物への投与に有用である。治療的組成物は、ＭＥＫＫ蛋白質の少なくとも一部分、および／または本発明のＭＥＫＫ蛋白質の少なくとも一部分をコードする核酸を含むことができる。治療的組成物は、キナーゼ活性および／またはキナーゼ調節的活性を有するＭＥＫＫ蛋白質を含むことができる。治療的組成物は、キナーゼドメインおよび／またはキナーゼ調節ドメインを有するＭＥＫＫ蛋白質を含むことができることが好ましい。
治療的組成物は適切な担体を含むこともできる。本明細書において用いられる際には「担体」は、本発明の化合物をインビトロもしくはインビボで作用の適切な部位に輸送するための輸送機関として適切ないずれかの物質を意味する。担体はそれ自体、本発明の化合物を含む治療的組成物の賦形剤もしくは製剤として作用することができる。
本発明のこれまでの記述は詳細な説明および記述の目的で提示されている。その上この記述は、本発明内に開示される形式表現に本発明を制限することを意図してはいない。結果として先の教示にふさわしい変法および改変物、ならびに関連技術分野内の技術もしくは知識は本発明の範囲内に含まれる。本明細書内に記述される好ましい態様は更に、本発明を実施することの既知の最善方法を説明し、そして様々な態様において、かつ本発明の具体的な適用もしくは試用により必要とされる様々な改変法を用いて本発明を利用することを当業者に可能にさせることを意図する。添付される請求の範囲は、従来の技術により許容される範囲までの代理態様を含むものとみなすことが意図される。以下に本発明の主な特徴および態様を列挙する。
１．　表１に示されるアミノ酸配列を含む、実質的に純粋な蛋白質。
２．　表２に示されるアミノ酸配列を含む、実質的に純粋な蛋白質。
３．　前記蛋白質がＳｒｃ相同物２もしくはＳｒｃ相同物３ドメインを含まない、上記１もしくは２の蛋白質。
４．　前記蛋白質がセリンおよびスレニンに富む部分を含む、上記１もしくは２の蛋白質。
５．　前記蛋白質がキナーゼ触媒ドメインを含む、上記１もしくは２の蛋白質。
６．　前記蛋白質がＭＥＫもしくはＭＡＰＫ蛋白質を活性化することが可能な、上記１もしくは２の蛋白質。
７．　前記蛋白質が、Ｒａｆ蛋白質に非依存的に哺乳類のＭＥＫをリン酸化することが可能な蛋白質をコードする核酸配列によりコードされる、上記１もしくは２の蛋白質。
８．　前記蛋白質を用いてＭＥＫＫ蛋白質に結合することが可能な抗体を産生する、上記１もしくは２の蛋白質。
９．　前記抗体がモノクローナルである、上記７の蛋白質。
１０．　表１に示される核酸配列によりコードされる、実質的に純粋な蛋白質。
１１．　哺乳類のＭＥＫ蛋白質をリン酸化することが可能であり、そしてセリンおよびスレオニンに富む部分ならびにキナーゼ触媒ドメインを含み、かつＳＨ２もしくはＳＨ３ドメインを含まない実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質。
１２．　前記蛋白質が、ＭＥＫもしくはＭＡＰＫ蛋白質を活性化することが可能な、上記１１の蛋白質。
１３．　前記蛋白質が少なくとも６７２のアミノ酸を含む、上記１１の蛋白質。
１４．　前記蛋白質が表２に示されるアミノ酸配列を含む蛋白質としての様式で機能する

、上記１１の蛋白質。
１５．　ＭｇＣｌ$_2$およびＡＴＰを含む反応混合物中に約４０分間、前記混合物を約ｐＨ６．０とｐＨ８．０との間のｐＨに維持した後にＭＥＫ蛋白質をリン酸化することが可能であって、かつ前記蛋白質がＲａｆ蛋白質から区別されるアミノ酸配列を有するものである請求の範囲１１の実質的に純粋な蛋白質。
１６．　Ｒａｆ蛋白質に非依存的にＭＡＰＫ蛋白質の活性を調節することが可能であって、かつ前記蛋白質は前記Ｒａｆ蛋白質から識別されるアミノ酸配列を有するものである上記１１の実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質。
１７．　ＭＡＰＫ蛋白質の活性を調節することにより、ある細胞の表面上の成長因子レセプターから開始されるシグナルを調節することが可能であって、かつ調節する前記能力が、Ｒａｆ蛋白質シグナル調節から分岐しているものである上記１１の実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質。
１８．　前記成長因子レセプターがヘテロ三量体のグアニンヌクレオチド結合性蛋白質に結合する、上記１６の蛋白質。
１９．　前記成長因子レセプターが、トロンビンレセプターおよびムスカリン性レセプターからなる群より選択される、上記１７の蛋白質。
２０．　イーストのフェロモン－応答性プロテインキナーゼ系からの哺乳類細胞における分岐を表し、かつ前記蛋白質が、Ｒａｆ蛋白質に非依存的にＭＡＰＫ蛋白質を調節することが可能なものである上記１１の実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質。
２１．　表３に示されるキナーゼドメインを含む、実質的に純粋なＭＥＫＫ蛋白質。
２２．　実質的に純粋なＭＥＫＫ　Ｎ末端調節ドメイン。
２３．　実質的に純粋なＭＥＫＫ　Ｃ末端触媒ドメイン。
２４．　セリンおよびスレオニンに富む部分ならびにキナーゼドメインを含み、ＳＨ２もしくはＳＨ３ドメインを含まないＭＥＫＫ蛋白質をコードする単離された核酸分子。
２５．　表２に示されるＭＥＫＫ蛋白質をコードする上記２４の単離された核酸分子。
２６．　表３に示されるキナーゼドメインを含むＭＥＫＫ蛋白質をコードする上記２４の単離された核酸分子。
２７．　表１に示される核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする上記２４の単離された核酸分子。
２８．　ＭＥＫＫ蛋白質のＮ末端調節ドメインをコードする単離された核酸分子。
２９．　ＭＥＫＫ蛋白質のＣ末端触媒ドメインをコードする単離された核酸分子。
３０．　ＭＥＫＫ蛋白質またはその調節もしくは触媒ドメインをコードし、そして発現制御配列に操作的に連結されている核酸分子を含む発現ベクター。
３１．　上記３０の発現ベクターを含む宿主細胞。
３２．　ＭＥＫＫ蛋白質に特異的に結合する抗体。
３３．　表２に示されるＭＥＫＫ蛋白質に特異的に結合する上記３２の抗体。
３４．表３に示されるキナーゼドメインを含むＭＥＫＫ蛋白質に特異的に結合する上記３２の抗体。
３５．　癌、自己免疫疾患、炎症性反応、アレルギー反応および神経性疾患よりなる群から選ばれる疾患の治療用医薬製剤におけるＭＥＫＫ蛋白質またはその調節もしくは触媒ドメインの使用。
３６．　細胞表面レセプターから発せられるシグナルを調節できる化合物の同定方法であって、該シグナル調節がＭＥＫＫ蛋白質に伴うものであり、かつ、
（ａ）　ＭＥＫＫ蛋白質を含有する細胞を推定上の調節化合物と接触させる工程、
（ｂ）　該細胞を細胞表面レセプターに結合しうるリガンドと接触させる工程、および
（ｃ）　ＭＥＫＫ依存性経路の一員の活性化を決定することにより推定上の調節化合物の細胞のシグナルを調節する能力を評価する工程
を含んでなる方法。
３７．　工程（ｃ）がＭＥＫＫ依存性経路の一員のリン酸化を測定することを含んでなる上記３６の方法。

３８．　工程（ｃ）が、ＭＥＫＫ蛋白質のＭＥＫ蛋白質および／またはＪＥＫ蛋白質のリン酸化能を測定することを含んでなる上記３６の方法。
３９．　細胞におけるシグナル伝達を調節しうる化合物の同定方法であって、
（ａ）　推定上の阻害化合物をＭＥＫＫ蛋白質と接触させて反応混合物を生成する工程、
（ｂ）　該反応混合物をＭＥＫ蛋白質と接触させる工程、および
（ｃ）　推定上の阻害化合物のＭＥＫＫ蛋白質によるＭＥＫ蛋白質のリン酸化を阻害する能力を評価する工程
を含んでなる方法。
４０．　細胞表面レセプターから発せられ、ＭＥＫＫ蛋白質に伴うシグナルを調節しうる化合物を同定するためのキットであって、
（ａ）　ＭＥＫＫ蛋白質を含有する少なくとも１つの細胞、
（ｂ）　該細胞表面レセプターに結合しうるリガンド、および
（ｃ）　推定上の調節化合物のＭＥＫＫ蛋白質のリン酸化を変更する能力を評価する手段
を含んでなるキット。
４１．　細胞表面レセプターから発せられ、ＭＥＫＫ蛋白質に伴うシグナルを調節しうる化合物を同定するためのキットであって、
（ａ）　ＭＥＫＫ蛋白質、
（ｂ）　ＭＥＫ蛋白質、および
（ｃ）　推定上の阻害化合物のＭＥＫＫ蛋白質によるＭＥＫ蛋白質のリン酸化を阻害する能力を評価する手段
を含んでなるキット。

【図１Ａ】

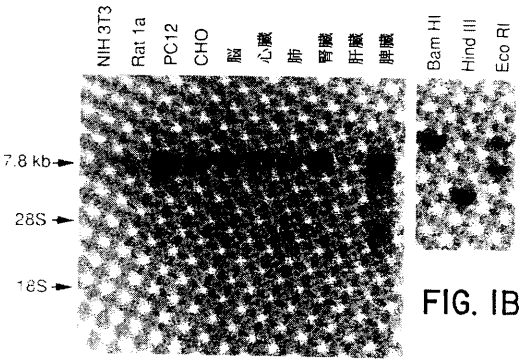

FIG. IB

FIG. IA

【図１Ｂ】

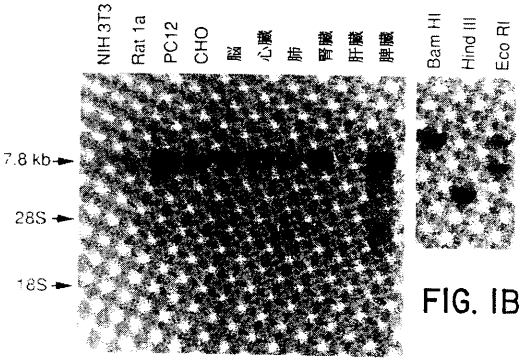

FIG. IB

FIG. IA

【図１Ｃ】

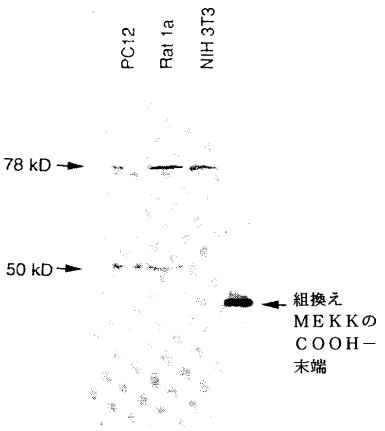

FIG. IC

【図２Ａ】

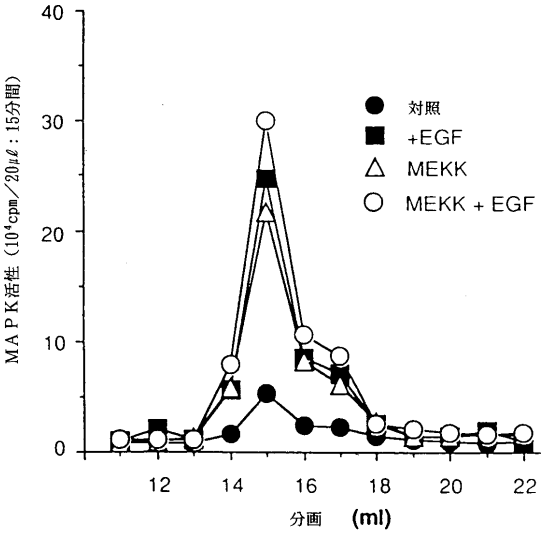

FIG. 2A

【図２Ｂ】

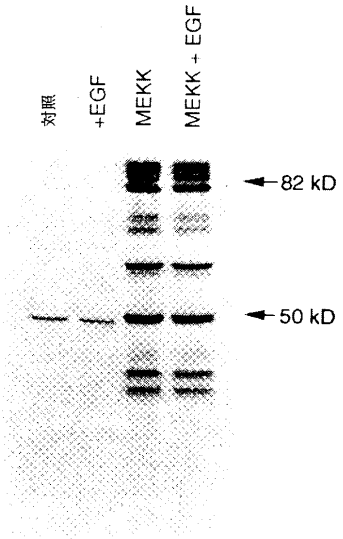

FIG. 2B

【図３】

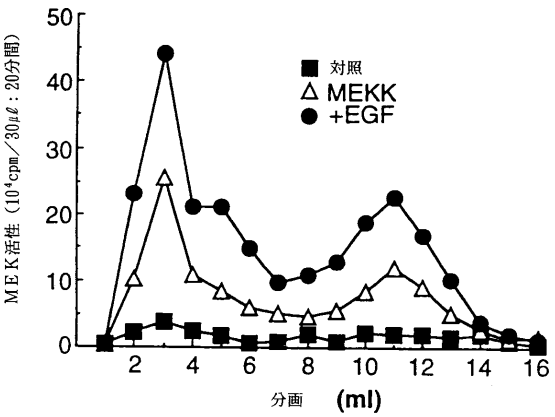

FIG. 3

【図４Ｂ】

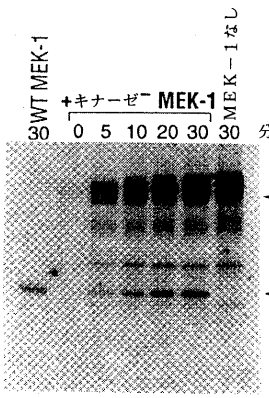

FIG. 4B

【図４Ｃ】

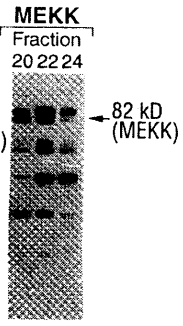

FIG. 4C

【図４Ａ】

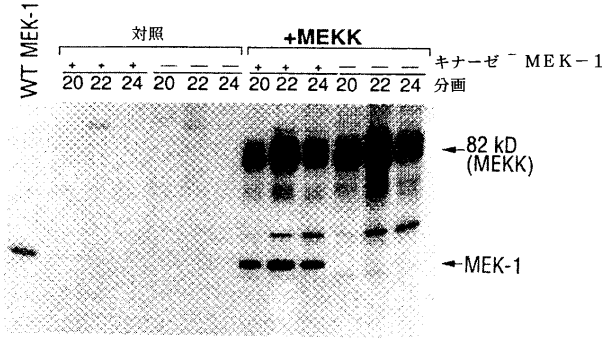

FIG. 4A

【図４Ｃ】

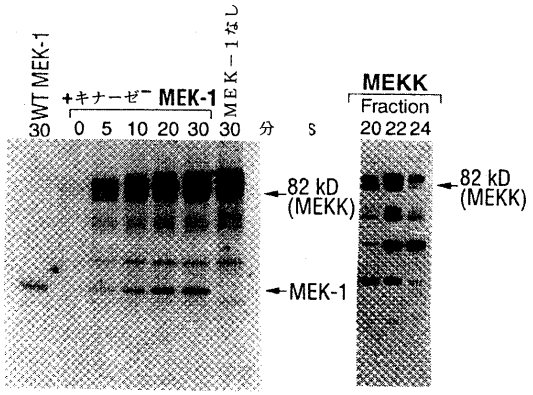

FIG. 4B FIG. 4C

【図５Ａ】

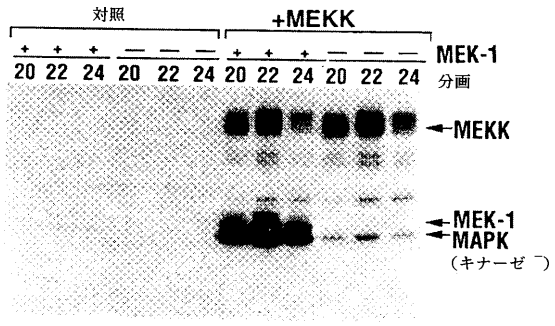

FIG. 5A

【図５Ｂ】

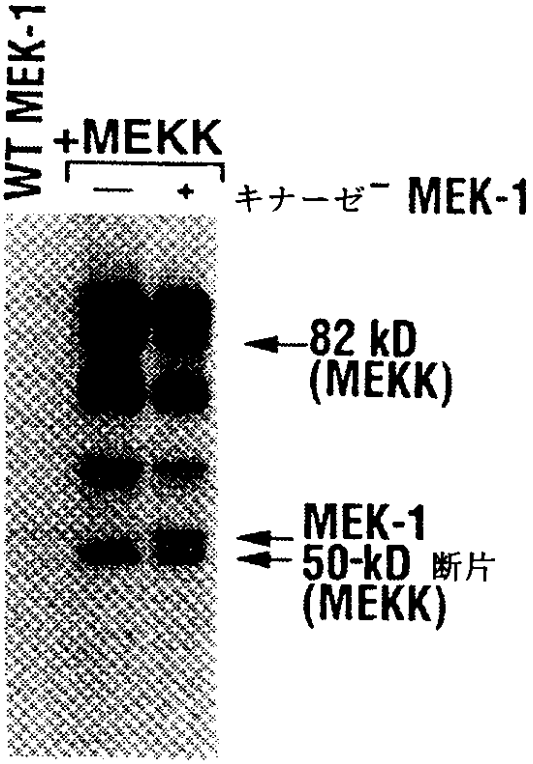

FIG. 5B

【図６Ａ】

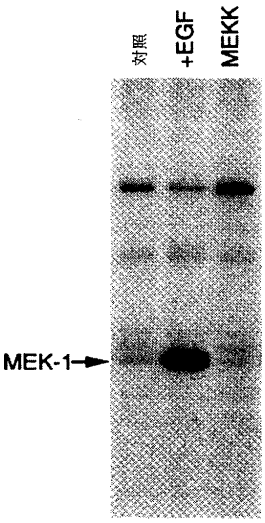

FIG. 6A

【図６Ｂ】

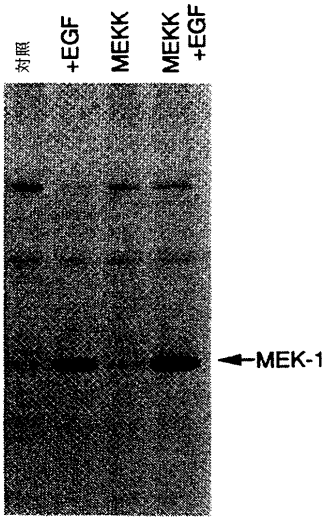

FIG. 6B

【図７】

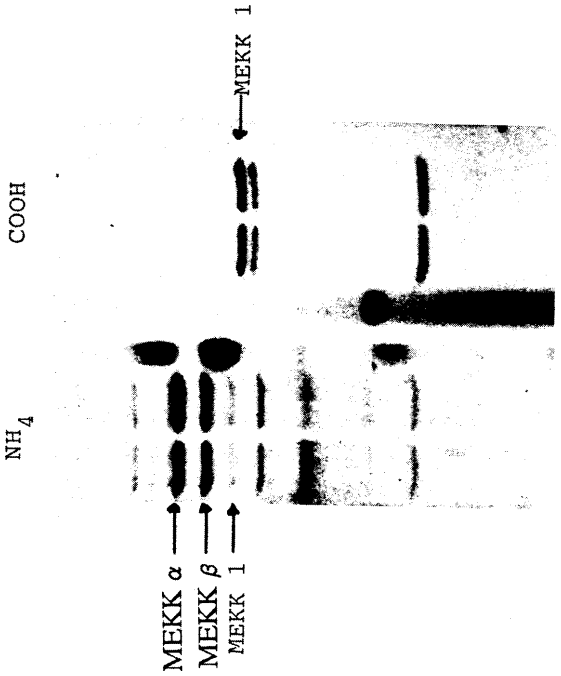

FIG. 7

【図８】

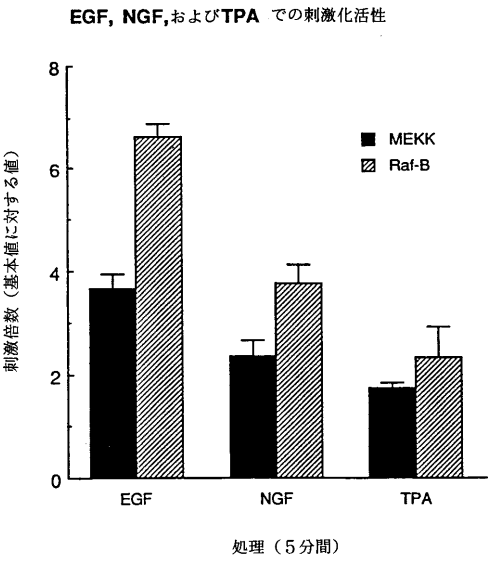

FIG. 8

【図９】

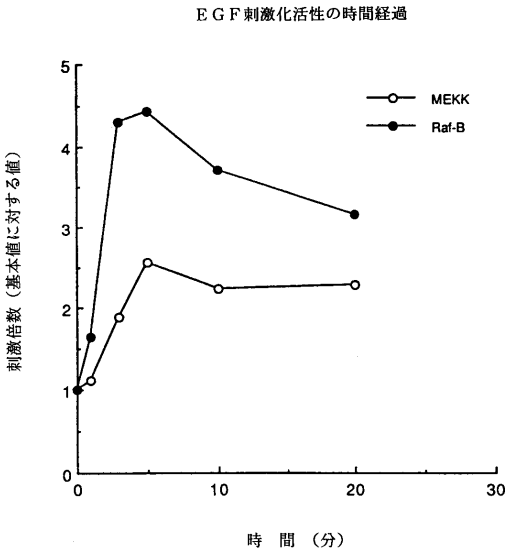

FIG. 9

【図１０】

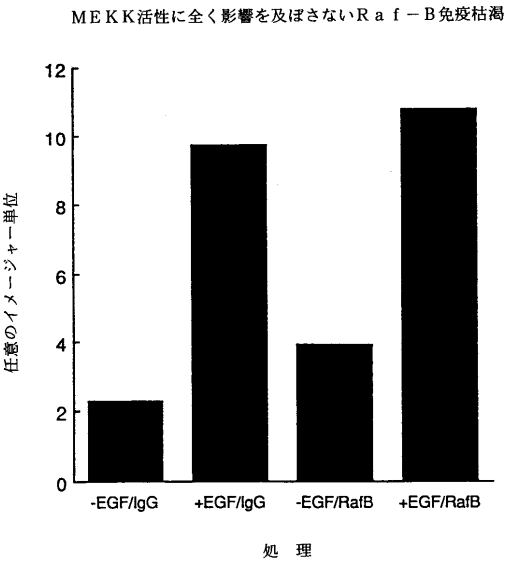

FIG. 10

【図１１】

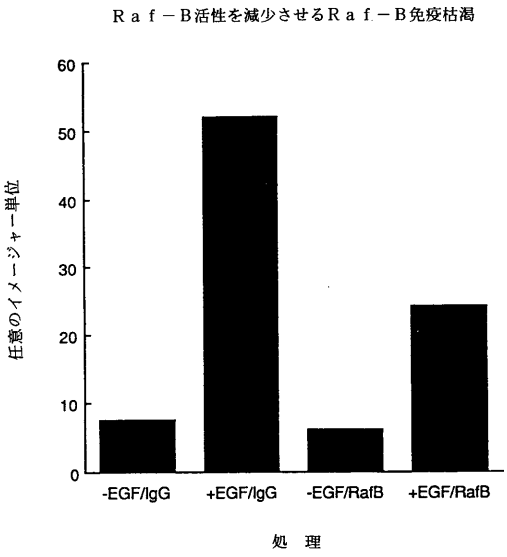

FIG. 11

【図１２】

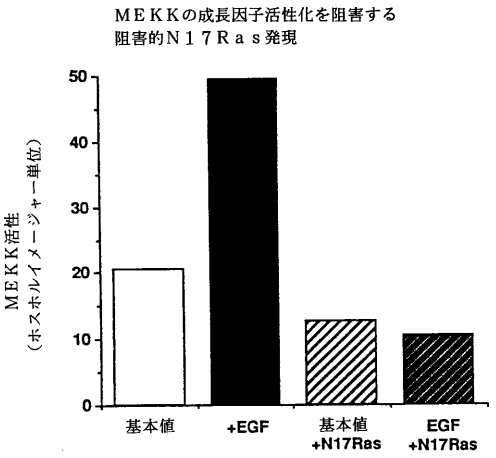

FIG. 12

【図１３】

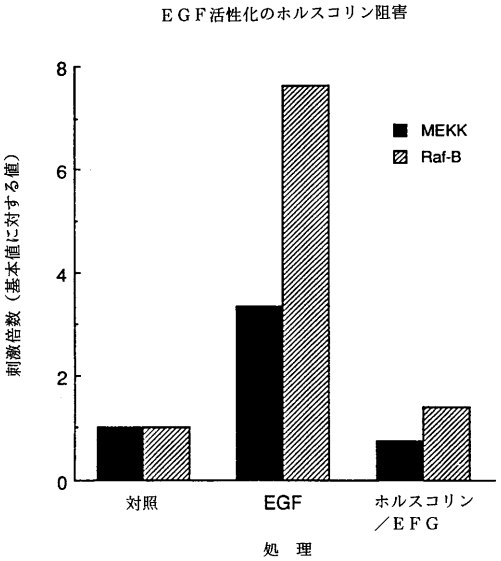

FIG. 13

【図１４】

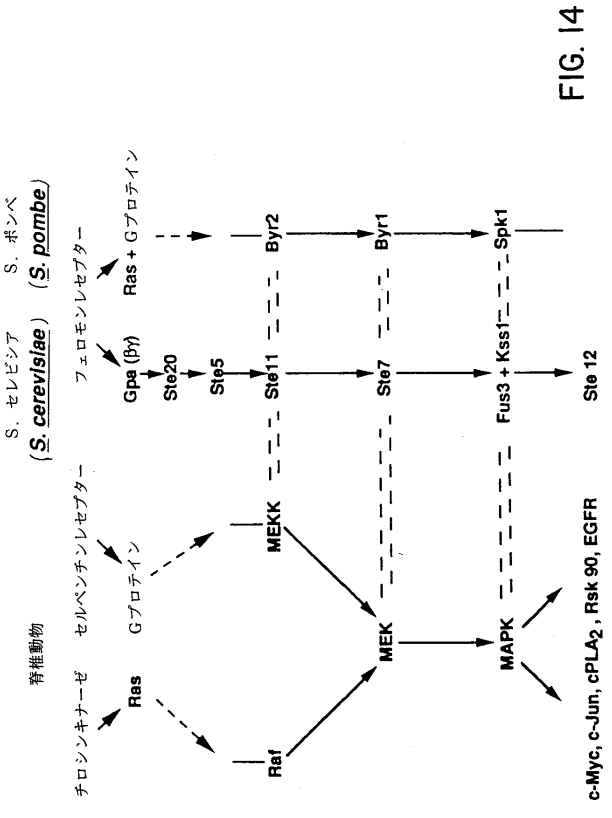

FIG. 14

【図１５】

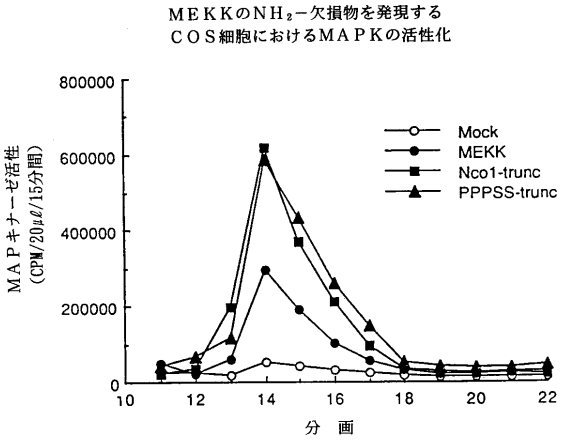
MEKKのNH₂－欠損物を発現する
COS細胞におけるMAPKの活性化
MAPキナーゼ活性
(CPM/20μl/15分間)
800000
600000
400000
200000
0
10
12
14
16
18
20
22
分 画
Mock
MEKK
Nco1-trunc
PPPSS-trunc

FIG. 15

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C１２R 1:91

合議体
審判長 平田 和男
審判官 鈴木 恵理子
審判官 小暮 道明

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)