

ラット c-Yes タンパク質チロシンキナーゼの クローニングとその自己リン酸化部位の決定

清水 雅 裕

広島大学医学部生化学第二講座 (主任: 五十嵐和彦教授)

受付 平成 12 年 12 月 22 日

受理 平成 13 年 1 月 9 日

ラットのがん原遺伝子 *c-yes* をラット肝臓全 cDNA よりクローニングした。その遺伝子産物 *c-Yes* は541アミノ酸から構成され、分子量は 60.6 kDa で、マウス、ヒト、メダカ *c-Yes* の一次構造と各々98, 96, 82%一致した。Src ファミリーチロシンキナーゼの *c-Yes* は、キナーゼおよびユニークドメイン内チロシン残基の分子間自己リン酸化に伴い酵素活性が促進される。ユニークドメイン内の自己リン酸化部位およびそのリン酸化が酵素活性に与える影響を調べる目的で、ラット *c-Yes* のユニークドメイン内自己リン酸化部位と推定される Tyr16 あるいは Tyr32 を Phe に置換した変異型 (Y16F, Y32F) および野生型を Sf9 昆虫細胞に発現させた。3種類のラット *c-Yes* は2種類のカラムを用いていずれも均質に精製された。各精製酵素の比活性は、ラット肝臓より精製した *c-Yes* の比活性とほぼ同等であり、いずれの酵素も基質へのリン酸取り込み速度が酵素濃度の二乗と直線関係を示し、分子間触媒機構により活性化された。野生型, Y16F および Y32F 変異型 *c-Yes* は自己リン酸化により1モルあたりそれぞれ1.57, 0.71, 0.91モルのリン酸がチロシン残基に取り込まれた。自己リン酸化した3種類の *c-Yes* をトリプシン消化し、二次元ペプチドマップで解析した結果、ユニークドメインの Tyr32 とキナーゼドメインの Tyr424 が主な自己リン酸化部位と判明した。しかし、野生型, Y16F および Y32F 変異型 *c-Yes* は自己リン酸化により4, 2.5, 3.9倍の酵素活性化が認められた。ユニークドメインのリン酸化は酵素活性に影響がないと考えられた。

Key words : がん原遺伝子 (protooncogene), *c-yes*, 自己リン酸化 (autophosphorylation), チロシンキナーゼ (tyrosine kinase), Src ファミリー (Src family)

がん原遺伝子 *c-yes*⁴²⁾ は、Yamaguchi 73 および Esh 鳥肉腫ウイルスゲノムから見出されたがん遺伝子 *v-yes*¹⁷⁾ に対応する細胞側の遺伝子で、その遺伝子産物である *c-Yes* は、Src ファミリータンパク質チロシンキナーゼの一員である。このキナーゼファミリーの原型である *c-Src*⁸⁾ は、Rous 鳥肉腫ウイルスゲノムに見出された *v-src* 遺伝子の正常細胞ホモログ *c-src* の遺伝子産物であり、Src およびこれと高い相同性を示す Yes, Fyn, Yrk, Fgr, Hck, Lyn, Lck, Blk をまとめて Src ファミリーキナーゼと呼んでいる⁵⁾。これらは約500アミノ酸残基よりなり、共通の構造すなわち、N 末側からミリスチン酸化部位、各 Src ファミリーで固有の配列をもち、50から90アミノ酸残基からなるユニークドメイン、SH3 (Src homology 3) ドメイン、SH2 (Src homology 2) ドメイン、チロシンキナーゼド

メインおよびリン酸化によりキナーゼ活性を負に制御するチロシン残基を含む C 末部位で構成されている^{5,16)}。SH3 ドメインより C 末側は Src ファミリーキナーゼ間で高度に保存されているが、ユニークドメインでは相同性が低く、このドメインが各キナーゼの個性を決定するのに重要な役割を担うと考えられている⁵⁾。

Src ファミリーキナーゼでは、キナーゼ活性の調節に少なくとも2カ所のチロシン残基のリン酸化・脱リン酸化が重要である⁵⁾。最も解析が進んでいる *c-Src* を例にとると、C 末側527番のチロシン残基が Csk (C-terminal Src kinase)^{29,44)} あるいは自己リン酸化³⁰⁾ によってリン酸化されると *c-Src* のキナーゼ活性は抑制される。これは、C 末側のリン酸化チロシン残基と SH2 ドメインとの結合により分子の立体構造が変化

してキナーゼドメインが非活性型になるためである^{51,52}。逆に, チロシンホスファターゼ^{28,50,56}により脱リン酸化されると, SH2 ドメインとの結合が解離して c-Src が活性化する。また, 416番チロシン残基の自己リン酸化により, キナーゼ活性が促進される^{19,34}。Yes⁴⁴, Lck³, Lyn⁷, Fyn⁴⁷, Fgr³⁷でも, Csk による C 末側チロシン残基のリン酸化によって酵素が不活性化され, 上述のリン酸化・脱リン酸化による活性調節が Src ファミリーキナーゼには基本的に存在するが, これら以外のリン酸化による活性調節も指摘されている^{1,12}。

c-Yes は鳥類および哺乳類でその存在が確認され, 幅広い組織で発現しているが, 特に脳, 肺, 腎臓, 精巣で高い^{36,55}。細胞内で, c-Yes は N 末端のグリシン残基に酸アミド結合したミリスチン酸を介して形質膜と結合し, 細胞外からのシグナル伝達に重要な役割を演じている。例えば, 細胞に PDGF^{21,27,49}, アンジオテンシン II⁴⁸あるいはインターロイキン11¹⁰などの刺激が加わると, それらのレセプターにより c-Yes は活性化され, 細胞増殖や細胞分化を促すシグナル伝達路のタンパク質をリン酸化する。また, IgE あるいは IgA が結合した免疫グロブリンレセプターは c-Yes を活性化し, ヒスタミンの放出⁹や免疫複合体のトランスサイトーシス²⁵に関与する。さらに, c-Yes は細胞外 Ca²⁺濃度の上昇に伴って細胞間接着部位に移動し, 細胞間接着の解離に関与する³¹。

ヒトの悪性黒色腫細胞では, c-Yes の酵素活性およびタンパク量がメラニン細胞に比べてともに5-10倍高いが, c-Yes に変異は見つかっていない²³。c-Yes タンパク質発現量の増加とキナーゼ活性の増大は, ヒト大腸がん細胞^{32,33}でも報告され, 腺腫からがんへの進展に関与すると考えられている。

東ら², 有木ら¹によりラット肝臓膜画分より精製された c-Yes は, そのチロシン残基の分子間自己リン酸化により活性化されることが明らかになった。また, ラット c-Yes はキナーゼドメイン中の自己リン酸化部位以外に, ユニークドメイン内のチロシン残基も自己リン酸化されることがわかった。そのキナーゼドメイン内の自己リン酸化部位はマウス c-Yes の424番に相当するチロシン残基であり, ユニークドメイン内自己リン酸化部位は32番のチロシン残基と推定したが, 16番のチロシン残基の可能性も残されていた¹。

本研究でラット c-yes の全長 cDNA をラット肝臓全 cDNA よりクローニングした。それを元に, c-Yes の野生型, ユニークドメイン内自己リン酸化部位と推定された16あるいは32番のチロシンをフェニルアラニン

に置換した変異型 (Y16F および Y32F) をバキュロウイルス発現系を用いて Sf9 昆虫細胞に発現させ, 2ステップのカラム操作で c-Yes を均質に精製した。これらの精製酵素を用いてユニークドメイン内の自己リン酸化部位を決定し, その部位のリン酸化が酵素活性に与える影響を調べた。この結果, ユニークドメイン内の自己リン酸化部位は主に32番のチロシン残基であり, このリン酸化は酵素活性に影響しないと考えられた。

材料と方法

1. 材料

[γ -³²P] ATP, アンフォライン担体, Thermo Sequenase 蛍光シークエンサー用サイクルシークエンシングキットおよび ECL Western blotting 検出試薬は Amersham-Pharmacia より購入した。カゼイン-トヨパールは宮内らの方法²⁶に従い作製した。ウシ血清アルブミン, ヒト γ -グロブリン, フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF), AMP-PNP およびチロシン-グルタミン酸 (1:4) コポリマー (分子量47,000) は Sigma より購入した。Taq Extender PCR Additive, c-Yes に対するモノクローナル抗体 (Mab 3H9), リン酸化チロシンに対するモノクローナル抗体および TPCK 処理トリプシンは, それぞれ Stratagene, 和光純薬, Transduction Laboratories および Worthington Biochemical より購入した。ペプスタチンとロイペプチンはペプチド研究所, ゲンタマイシンとアプロチニンはナカライテスクより購入した。Taq ポリメラーゼは Life Technologies より, バキュロウイルストランスファーベクター, 核内ポリヘドリン産生 *Autographa californica* ウイルス DNA と *Spodoptera frugiperda* (Sf9) 細胞は Pharmingen より購入した。Grace 昆虫細胞培養用メディウムとウシ胎仔血清は Gibco より購入した。ラット c-Yes は, 肝臓膜画分より有木らの方法¹に従い精製した。他の化合物は市販の特級試薬を使用した。

2. ラット c-yes cDNA の塩基配列の決定

ラット肝臓全 cDNA は, 肝臓全 RNA を鋳型に逆転写酵素を用いて作製した¹。ラット c-yes の全長 cDNA を得るため, マウス c-yes cDNA 塩基配列¹⁸を元に 5'-CGTGGAGCGAGCGGATTTGA-3' (YF-2) と 5'-CGTGTCTAGACGGTTTTGTCT-3' (YR-2) のプライマーを作製した。マウス c-yes cDNA では YF-2 と YR-2 プライマー間には1,644塩基が存在し, これはマウス c-Yes アミノ酸配列1番のメチオニンから終止コドンまでが含まれる。上記プライマーを各々0.4 μ M

と、20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml ウシ血清アルブミン, 0.4 mM dNTPs, 2 ユニット Taq ポリメラーゼ, 2 ユニット Taq Extender PCR Additive およびラット肝臓全 cDNA 0.5 μg を含む全量 50 μl の反応液で、95°C, 1 分間の変性反応後、35 サイクルの PCR (95°C, 30 秒間の変性反応, 50°C, 30 秒間のアニーリング反応, 72°C, 2 分間の伸長反応) を行い、ラット c-yes 全長 cDNA を得た。得られた cDNA はエチジウムプロマイドを含む 1% アガロースゲルで電気泳動し、その大きさを確認した。

5 つの独立した PCR クローンを pUC19 ベクターに組み込み、Thermo Sequenase 蛍光シーケンサー用サイクルシーケンシングキットと Pharmacia Biotech の ALF DNA シーケンサーを用いてラット c-yes cDNA の塩基配列を決定した。

3. ラット c-yes cDNA の変異導入

pUC19 ベクターに組み込んだラット c-yes cDNA の 16 あるいは 32 番コドン を TAT (Tyr) から TTT (Phe) に置換した。コドン 16 番の変異導入では、pUC19 ベクターに組み込んだ c-yes cDNA を鋳型に、プライマー YF-5 (5'-GGTCTAGATGGGCTGCATTA AAAAGT-3', c-yes cDNA 開始コドンから 18 塩基に Xba I 認識部位を付加) と Y16F-R (5'-CACTCCAAAATGACCGGC-3', 下線部が変異導入箇所), Y16F-F (5'-ATTAAATTTACACCGGAA-3') と M13-Fwd (5'-CGACGTTGTAAACGACGGCCAGT-3', pUC19 のプライマー) を用いて PCR を行った。各々の PCR 産物を精製してアニーリング後、これを鋳型に YF-5 と M13-Fwd を用いて PCR を行った。変異部位の塩基配列を確認後、これを Xba I /Pst I の制限酵素切断部位で切断し、pUC19 ベクターに組み込んだ野生型 c-yes cDNA の制限酵素 Xba I /Pst I による切断断片と置換した。コドン 32 番の変異導入は、プライマー YF-5 と Y32F-R (5'-CACTCCAAAATGACCGGC-3'), Y32F-F (5'-GGTCATTTTGGAGTGGAA-3') と M13-Fwd を用いて行った。

4. トランスファーベクターの構築と組換えタンパク発現ウイルスの作製

バキュロウイルスを用いた遺伝子発現システムは、Summers と Smith⁴³⁾の方法に基づく Pharmingen のマニュアルに従った。pUC19 ベクターに組み込まれた野生型、Y16F および Y32F 変異型 cDNA を Xba I /Sma I 部位で切り出し、バキュロウイルストランスファーベクター pVL1392 の Xba I /Sma I 部位に組み込んだ。組換えタンパク発現ウイルスは、トランス

ファーベクターと核内ポリヘドリン産生 *Autographa californica* ウイルス DNA をリン酸カルシウム法により Sf9 昆虫細胞に取り込ませ、*in vivo* 相同組換えにより作製し、ブランクアッセイ法で純化した。野生型および変異型ウイルスを Sf9 昆虫細胞に感染後 27°C, 7 日間培養してその上清を集め、高力価ウイルスストックを得た。Sf9 細胞は 10% ウシ胎仔血清と 100 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンを含む Grace 昆虫細胞用メディアウムで単層培養し、継代した。

5. 緩衝液の組成

全ての緩衝液は、プロテアーゼ阻害剤として終濃度 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ ペプスタチン, 1 $\mu\text{g/ml}$ アプロチニン, 10 $\mu\text{g/ml}$ ロイペプチンおよび 10 mM ベンザミジンを含む。細胞溶解液の組成は、25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1 mM ジチオスレイトール (DTT), 10% (v/v) グリセロール, 2% Triton X-100, 0.5 M NaCl およびプロテアーゼ阻害剤である。Hepes 緩衝液の組成は、20 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5% (w/v) グルコースおよびプロテアーゼ阻害剤である。Hepes-Triton 緩衝液は、Hepes 緩衝液に 0.2% Triton X-100 を加えた。

6. 野生型および変異型 c-Yes の発現

$1-2 \times 10^6$ 細胞/ml の Sf9 細胞に対して感染力価を 5 として組換えウイルスを感染させた。27°C, 72 時間培養後、遠心して $5-6.5 \times 10^8$ 個の細胞を集め、20 ml PBS (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 および 100 mM NaCl, pH 7.5) で 2 回洗浄後、-80°C で保存した。細胞に SDS 添加緩衝液 [160 mM Tris-HCl, pH 7.8, 12% (w/v) SDS, 20% グリセロール, 0.068% (w/v) プロモフェノールブルー, 16 mM DTT および 80 mM EDTA] を加えて 100°C, 3 分間熱処理し、SDS-PAGE を行った。c-Yes に対する特異抗体、Mab 3H9 を用いて Western blotting を行い、野生型および変異型 c-Yes の発現を確認した。

7. 野生型および変異型 c-Yes の精製

100 mm 径細胞培養用ディッシュ 20 枚から集めた感染細胞 $5-6.5 \times 10^8$ 個に対して、 2×10^7 細胞あたり 1 ml の細胞溶解液を加え、凍結・融解操作後、4°C, 2 時間振盪して可溶化し、細胞粗抽出液を得た。以後、全ての操作は 0-4°C で行った。粗抽出液の 30,000 $\times g$, 30 分間遠心上清 (細胞溶解液画分) に Hepes 緩衝液を加え、アミコン YM-10 膜で限外濾過して食塩濃度を 30 mM に下げた。その濃縮液を Hepes-Triton 緩衝液で平衡化したカゼイントヨパールカラム (20 \times 1.6 cm) に 40 ml/時間の流速で吸着させた。カラムを平衡緩衝液 40 ml で洗浄後、0 から 0.5 M の直線濃度勾配

の食塩を含む HEPES-Triton 緩衝液 (全量 300 ml) で溶出した。流速は 20 ml/時間で 3 ml ずつ分取した。野生型 c-Yes では、カゼイントヨパールカラムクロマトグラフィーの後ろのピークを集め、それに HEPES 緩衝液を加え、YM-10 膜で脱塩・濃縮して食塩濃度を 10 mM 以下、容量 9 ml とした (カゼイントヨパール画分)。濃縮した酵素液を、有木らと同じ方法¹⁾で LKB アンフォラインカラム (110 ml) にチャージし、1.2 kV, 20時間の等電点電気泳動を行った。2.5 ml ずつ分画し、それぞれに 1 M HEPES-NaOH, pH 7.4 を 0.1 ml 加えて中和後、酵素活性の高い分画を集めた (アンフォライン画分)。Y16F および Y32F 変異型 c-Yes の精製も野生型と同じ方法で行い、2つのカラムクロマトグラフィーで野生型と同様の酵素溶出パターンを示した。本酵素活性は -80°C で少なくとも8ヶ月間は変化しなかった。

8. チロシンキナーゼ活性の測定

チロシンキナーゼ活性は、チロシン-グルタミン酸コポリマーへの ^{32}P の取り込み量で測定した²⁾。キナーゼ活性の標準測定液 (standard assay mixture, 全量 $60\mu\text{l}$) は、20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 20 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, $50\mu\text{M}$ Na_3VO_4 , 0.2% Triton X-100, 0.5 mg/ml チロシン-グルタミン酸コポリマー, $15\mu\text{M}$ [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP (2.6×10^3 cpm/pmol) と酵素標品を含む。酵素反応は、[$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP を加え開始した。 30°C , 10分間反応後、反応液 $50\mu\text{l}$ を Whatman 3MM 濾紙 (2×1.5 cm) にスポットし、氷冷した 8% (w/v) ピロリン酸を含む 10% (w/v) トリクロロ酢酸中に入れて反応を停止した。濾紙を 5% トリクロロ酢酸で 3 回洗浄後にエタノールで 1 回洗浄して乾燥後、蒸留水 10 ml を入れたシンチレーションバイアルに入れて ^{32}P の放射活性を Cerenkov 効果を利用して測定した。対照として、同時にコポリマーを加えずに反応を行い、その値を完全系より減じた。酵素の 1 ユニットの値は、上記の条件下で 1 分間に ATP から基質へ転移するリン酸量 (pmol/min) の平方根値とした。

9. c-Yes の自己リン酸化

ラット肝臓より精製した c-Yes (130 ユニットのタンパク質) と Sf9 細胞から精製した野生型および変異型 c-Yes (各々 60 ユニットのタンパク質) の自己リン酸化反応は、20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 20 mM MgCl_2 , 0.2% Triton X-100, $30\mu\text{M}$ Na_3VO_4 , 0.5 mM DTT および $30\mu\text{M}$ [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP (1.15×10^4 cpm/pmol) を含む全量 $60\mu\text{l}$ の反応液で行った。 30°C , 2時間反応後、 $10\mu\text{l}$ SDS 添加緩衝液を加え反応を停止した。混合液を 40°C , 2時間熱処理後、SDS-PAGE

を行った。ゲルの 60 kDa コマジーブルー染色バンドは、FUJIX BAS2000 画像解析により放射活性をもつことから、自己リン酸化された c-Yes であると確認できた。ゲルから 60 kDa バンドを切り出し、 ^{32}P の放射活性を測定した。

10. 自己リン酸化した c-Yes のトリプシン消化と 2 次元ペプチドマップによる分析

ラット肝臓より精製した c-Yes ($1.5\mu\text{g}$) を有木らの報告³⁾に従い、自己リン酸化後、トリプシン消化した。得られたリン酸化ペプチドの一部は、逆相 C-18 カラムで分離した⁴⁾。自己リン酸化した組換え c-Yes ($0.6\mu\text{g}$) は、SDS-PAGE で分離後、ゲル片を細切し、 $500\mu\text{l}$ の 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8.2 溶液中で 37°C , 40時間トリプシン消化した。当初 50 ng トリプシンを加え、24時間後にゲル片および上清に分離し、それぞれに更に 50 ng トリプシンを加えた。

得られたトリプシン消化リン酸化ペプチドは凍結乾燥後、電気泳動用緩衝液 [ピリジン/酢酸/蒸留水, 1:10:189 (v/v), pH 3.5] に溶解した。各 2,000 cpm の溶解液を Whatman 3MM 濾紙にスポットし、1 次元目に電気泳動用緩衝液中で 3 kV, 2 時間の高圧濾紙電気泳動、2 次元目は濾紙クロマトグラフィー [1-ブタノール/ピリジン/酢酸/蒸留水, 15:10:3:12 (v/v)] を行った。濾紙を乾燥し、 -80°C でオートラジオグラフィーを行った。

11. ゲル電気泳動と Western blotting

SDS-PAGE³⁵⁾は10%のポリアクリルアミドゲルを使用し、c-Yes に対する特異抗体 Mab 3H9 を用いた Western blotting は吉川らの方法⁵⁴⁾に従った。ゲルのタンパク質染色はコマジーブルー R-250 を用いた。分子量マーカーとして、ウサギ骨格筋ホスホリラーゼ b (97.4 kDa), ウシ血清アルブミン (66 kDa), ヒト γ -グロブリンの重鎖 (50 kDa) および軽鎖 (23.5 kDa) を用いた。

12. 他の測定法

リン酸化アミノ酸分析は東らの方法²⁾に従った。タンパク定量はウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Bradford 法⁴⁾で行った。

結 果

1. ラット c-yes cDNA のクローニングと解析

マウス c-yes cDNA 塩基配列¹⁸⁾を元に作製したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてラット肝臓全 cDNA を鋳型に PCR を行い、ラット c-yes 全長 cDNA をクローニングした。得られた cDNA は 1,644 塩基で、その 3 番から 1,625 番が翻訳領域であった。推定され

A

TAATGGGCTGCATTAAGTAAAGAAAACAAAAGTCCAGCCATTAATATACACCGAAAATCCTACAGACCTGTAACACAAAGTCCCGGTCATTATGGAGTGAACATGCTACAGCTG 120
M G C I K S K E N K S P A I K Y T P E N P T E P V N T S A G H Y G V E H A T A A 40
CCACGACCTCTCCACAAAGGAGCATCAGCTAATTTTAAACAGCTTTCCATGACACCCCTTGGAGGGTCTCTGGGGTGACTCCTTTTGGAGGAGCATCTTCCTCATTCTCAGTGGTGC 240
T T S S T K G A S A N F N S L S M T P F G G S S G V T P F G G A S S S S F S V V P 80
CAAGTTCATATCTACAAGTTTAAACAGTGGTGTCACTATATTTGGCCCTTATGATTATGAGCTAGAACACAGAACCTTTCTTTAAAGAGGGTAAAGATTTCAAATAATTA 360
S S Y P T S L T G G V T I F V A L Y D Y E A R T T E D L S F K K G E R F Q I I N 120
ACAATACGGAAGGAGACTGGTGGGAAGCAAGATCAATTCGTACCGGAAAGATGGTTATATCCCTAGCAATATGATAGCGCCTGCAGATTCCTATTGAGCAGAAAGATGGTATTTGGCA 480
N T E G D W W E A R S I A T G K N G Y I P S N Y V A P A D S I Q A E E W Y F G K 160
AAATGGGAGAAAAGATGCTGAAAGTACTTCTGAATCCTGGGAATCAGCGAGTATATCTTAGTAGAGAGAAAGTAAACTACTAAAGTGGCTTATTCCCTCCTCAATTCGTGATTGGG 600
M G R K D A E R L L N P G N Q R G I F L V R E S E T T K G A Y S L S I R D W D 200
ATGAGGTAAAGGGTGCAATGTGAAGCATTACAAAATCAGAAAATTCGAAACCGGTGACTACATCACGACCAGAGCTCAGTTTGTACTCTACAGAACTGGTGAAGCATTACACAG 720
E V R G D N V K H Y K I R K L D N G G Y Y I T T R A Q F D T L Q K L V K H Y T E 240
AACATGCTGATGGATTATGCCCAAATTAACAACCGTCTGTCCAACCTGTGAAACCGCAGACTCAAGGCTCGCAAAAGACGCTTGGGAAATCCCTCGAGAGTCTTTGCGACTCGAGGTTA 840
H A D G L C H K L T T V C P T V K P Q T Q G L A K D A W E I P R E S L R L E V K 280
AACTAGGTCAAGGATGCTTTGGTGAAGTGTGGATGGGAACATGGAATGGAACCACAAAAGTAGCAATCAAAAACACTAAAGCCAGTACAATGATGCCAGAAGCATTCTTCAAGAAGCTC 960
L G Q G C F G E V W M G T W N G T T K V A I K T L K P G T M M P E A F L Q E A Q 320
AGATAATGAAAAAATTAAGACACGATAAACTTGTCCGCTCTATGCACTGTTTCTGAAGAGCCAATTTATATGCTCACTGAGTTTATGTCAAAAGGAAGCTTGTAGATTCCTTAAAG 1080
I M K K L R H R K L L V P L Y A V V S E E P I Y I V T E F M S K G S L L D F L K E 360
AAGGAGATGGAAAGTATTGAAGCTCCACAGCTGGTTGATATGGTGTCTCAGATTGCTGATGGCATATATGAAAGAATGAACACTATATCCAGGAGTCTCCGAGCTGTAATA 1200
G D G K Y L K L P Q L V D M A A Q I A D G M A Y I E R M N Y I H R D L R A A N I 400
TTCTGTGGGAGAAAATCTTGTATGCAAAATAGCAGATTTGGCTTAGCAAGCTAATTAAGACAAATGAATACACAGCAAGACAAGGTGCAAAATTTCCAATCAAGTGGACAGCTCTCG 1320
L V G E N L R H D K L I A D F L Y A V V S E E P I Y I V T E F M S K G S L L D F L K E 360
AGGCTGCGCTTTATGGTCGATTACGATAAAGTCAGATGTGTGGTCACTTTGGAATTTACAGACAGAGCTGGTAAACAAAAGGAAGTGGCCGTATCCAGGTATGGTAAACCGAGAGTGT 1440
A A L Y G R F T I K S D V W S F G I L Q T E L V T K G R V P Y P G M V N R E V L 480
TGGAACAAGTAGAGCGAGGTCAGAAATGCCCTGCCCTCAGGCTGCCAGAAATCCCTCCATGAATGATGAATCTTTGCTGGAAGAAGGATCTGATGAGAGACCACATTTGAATATA 1560
E Q V E R G Y R M P C P Q G C P E S L H E L M N L C W K K D P D E R P T F E Y I 520
TTCAGTCATTCTTAGAAGACTTCTACTGCTACAGAGCCGAGTACCAACAGGAGAAAATTTATAATCCAAGTAGCCCTGTAT 1644
Q S F L E D Y F T A T E P Q Y Q P G E N L Ter 541

B

	Myristylation	Unique	
rat	MGCISKENKSPAIRKYTPENP	-TEPVNTSAGHYGEHATAAAT--SSTKGSANFNLSMTPPFGSSG-VTPFGASSSFS--VVPSSYPTSLTGGVTIF	100
mouseL.....SP.....S.....V.....P.....V.....S.....G.....	100
humanR.....T-P.....S.....VS.....A.PT.VSPGPS.....A.....TAV.....S.....AG.....	102
XiphoVR.....A.G.....L.Q.D.SNVV.....SAHL.....P.PTIMQGS---PAMKATQN.SHPTALS.....V.SPM.....T.....TSVT.NNPF.AVI.....F.....		103
SH3			
rat	EARTTEDLSFKKGERFQIINNTEGDWWEARS	IATGKNGYIPSNYVAPADSIQAEWYFGMKRKAERLLLNPNQRGIFLVRESETTKAYSLSIRDWDEVRGDN	206
mouseS.....V.....	206
humanI.....	208
XiphoSD.....R.D.....N.E.....S.....LS...T...L...E...T...I.....L...TK...	209
SH2			
rat	VKHYKIRKLDNGGYYITTRAQFDTLQKLVKHYTEHADGLCHKLT	TVCPVTKPQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQGC	312
mouse	312
human	314
Xipho	C.....T.....MS.M.....V.....Y.....Q.....I.....D.R.....S.....	315
Kinase			
rat	EAPLQEAQIMKKLRHDKLVPLYAVVSEEP	IYIVTEFMSKGSLLDFLKEGDGKYLKLPQVDMAAQIADGMAYIERMNYIHRDLRAANILVGENLVCKIADPGLARL	418
mouseI.....	418
human	420
XiphoE.....G.....H.....S.....F.....AD.....	421
Regulatory			
rat	IEDNEYTARQGAQKFPKWTAPAAALYGRFTIKSDVWSFGILQTELVT	KGRVYPGMVNREVLEQVERGYRMPCPQGCPESELHLMNLCWKKDPDERPTFEYIQSFL	524
mouse	524
human	526
XiphoL.....D.....M.RQ.....E.....	527
rat	EDYFTATEPQYQGENL		541
mouse		541
human		543
XiphoD.....		544

Fig. 1. Nucleotide and predicted amino acid sequences of rat *c-yes* cDNA and comparison with *c-Yes* proteins from other species.

(A) Nucleotide sequence and predicted translation product of rat *c-yes* cDNA. The DNA sequence for rat *c-yes* has been deposited in the DDBJ database (accession number AB037472). (B) The deduced amino acid sequences of rat, mouse, human, and southern swordtail fish (*Xiphophorus herelli*) *c-yes* cDNAs are aligned in accordance with the sequence homology between them. Amino acids of the mouse, human, and *Xiphophorus* sequences are shown only where they are different from those of the rat sequence. Conserved amino acids are marked with (.) and gaps are marked with (-).

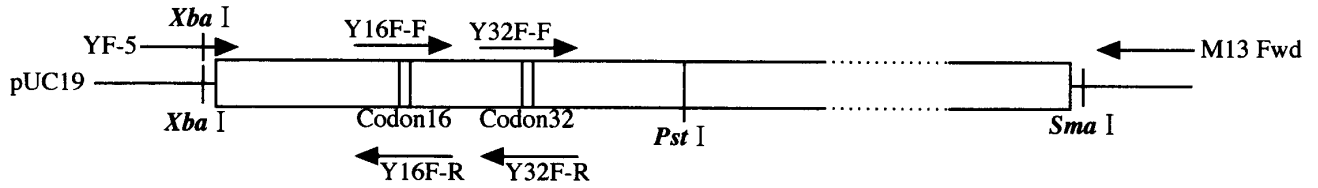


Fig. 2. Strategy for the construction of Y16F and Y32F mutant baculovirus transfer vectors.

るタンパク質は541アミノ酸残基より構成され、分子量は60.6 kDaであった (Fig. 1A)。ラット c-Yes タンパク質の一次構造は、マウス¹⁸⁾、ヒト⁴²⁾、メダカ¹¹⁾ c-Yes とそれぞれ98, 96, 82%が一致した (Fig. 1B)。各々の SH3, SH2 およびキナーゼドメインは上記4種間で84%以上が一致し、ラット c-Yes のアミノ酸11番から94番のユニークドメインでもマウス、ヒトではそれぞれ89, 76%が一致したが、メダカでは45%しか一致しない (Fig. 1B)。

有木らは、ラット肝臓膜画分より精製した c-Yes の自己リン酸化部位の1つがマウス c-Yes の424番チロシン残基に相当することを報告している¹⁾。ラット c-yes cDNA クローニングの結果、ラット c-Yes でも424番がチロシン残基であり、ラット c-Yes キナーゼドメイン内の自己リン酸化部位は Tyr424 と確定できた (Fig. 1B, ★印)。ラット c-Yes キナーゼドメイン内の自己リン酸化部位 Tyr424 は、酵素活性を負に調節するリン酸化部位 Tyr535 (Fig. 1B, ◎印) とともに、その周辺のアミノ酸配列を含めて4種間でよく保存されている。ラット c-Yes では Tyr32 がユニークドメイン内自己リン酸化部位と示唆されたが、Tyr16もその候補である¹⁾。これら2つのチロシン残基とその周辺のアミノ酸配列も4種間でよく保存されている (Fig. 1B, ●, ▼印)。

2. 野生型および変異型ラット c-Yes 組換えタンパク発現ウイルスの作製と昆虫細胞における発現

ラット c-Yes のユニークドメイン内自己リン酸化部位を確定し、そのリン酸化のチロシンキナーゼ活性におよぼす影響を調べる目的で、Sf9 昆虫細胞を用いてラット c-Yes の野生型、16あるいは32番のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型 (Y16F, Y32F) の発現を試みた。

まず合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いた部位特異的変異導入法により、ラット c-yes cDNA のコドン16あるいは32番のチロシンをフェニルアラニンに置換した (Fig. 2)。次いで、これらを組み込んだバキュロウイルストランスファーベクターと野生型バキュロウイルス DNA を Sf9 昆虫細胞に導入し、*in*

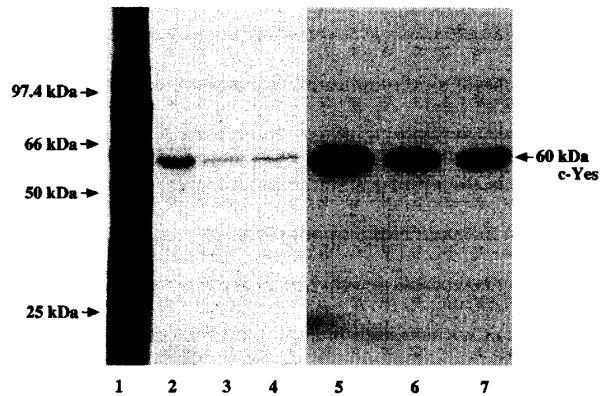


Fig. 3. Purification of wild-type, Y16F, and Y32F mutants of c-Yes from Sf9 cells.

Total lysate of Sf9 cells expressing wild-type c-Yes (lane 1, 17.5 μ g protein), purified wild-type (lanes 2 and 5, 0.3 μ g), Y16F (lanes 3 and 6, 0.2 μ g), and Y32F (lanes 4 and 7, 0.3 μ g) mutants of rat c-Yes were analyzed by SDS-PAGE (10%) and stained with Coomassie Blue (lanes 1-4), or immunoblotted with an Mab 3H9 antibody (lanes 5-7). The size of each molecular weight marker is indicated on the left.

in vivo 相同組換えにより野生型および変異型 c-Yes を発現できる組換えタンパク発現ウイルスを作製した。Sf9 昆虫細胞 $1-2 \times 10^6$ 細胞/ml に対して感染力価を5としてウイルスを感染させ、27°C、72時間培養し、c-Yes タンパク質を発現させた。

3. 昆虫細胞に発現させたラット c-Yes の精製

組換えバキュロウイルスを感染させた Sf9 昆虫細胞から野生型、Y16F および Y32F 変異型ラット c-Yes を2% Triton X-100 と0.5 M 食塩を含む緩衝液を用いて可溶化した。可溶化標品はタンパク染色される約60 kDa バンドを含み (Fig. 3)、これは c-Yes 特異抗体 Mab 3H9 と Western blotting で反応した。その後、3種類のラット c-Yes をカゼイントヨパールカラムおよびアンフォライン等電点電気泳動カラムを用いて精製した。カゼイントヨパールカラムクロマトグラフィーでは、野生型 c-Yes のチロシンキナーゼ活性は0.15 M

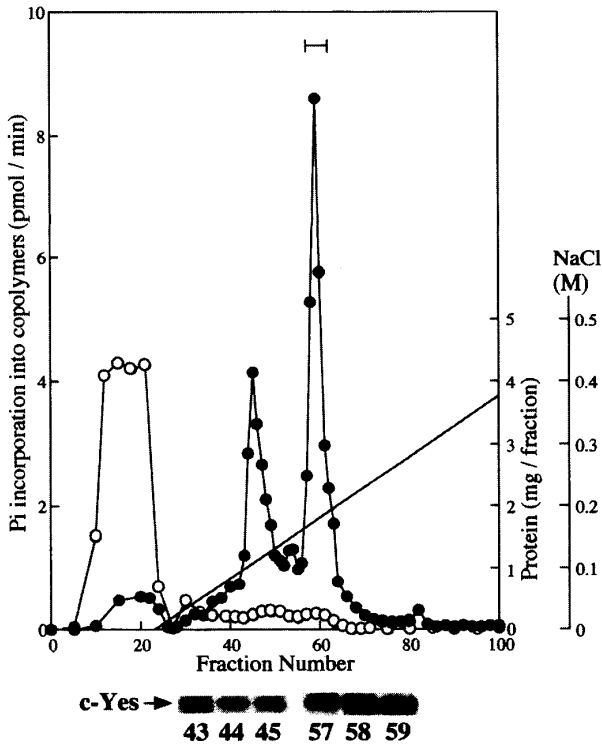


Fig. 4. Casein-Toyopearl column chromatography of rat wild-type c-Yes.

Infected Sf9 cell lysates (54 ml, 31.6 mg protein, 32,300 units) were applied to a casein-Toyopearl column (20×1.6 cm). Elution and assay for protein concentration (○) were performed as described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES." Rates of Pi incorporation into Tyr-Glu copolymers (●) were measured with 10 μl of each fraction under the standard assay conditions. Fractions of 3 ml were collected. The active fractions (—) were pooled. *lower panel*; The same volume of indicated fraction was analyzed by Western blotting with an Mab 3H9 antibody.

と 0.2 M 食塩濃度で溶出され、各々の酵素活性の比率は 1 : 3 であった (Fig. 4)。各活性ピークには c-Yes 特異抗体と反応する 60 kDa のタンパク質が含まれるが、Western blotting で検出されたバンドの濃度を比較すると、2 番目のピークは最初のピークに比べ、約 2 倍濃かった (Fig. 4, lower panel)。ラット肝臓膜画分より精製した c-Yes は、カゼイントヨパールカラムクロマトグラフィーで 0.25 M 食塩濃度で溶出されたり。以上の結果を考慮し、Fig. 4 の横線で示したピークを集め、次にアンフォラインカラムクロマトグラフィーを行った。野生型ラット c-Yes のキナーゼ活性ピークは pH 5.8 で溶出し (Fig. 5)、SDS-PAGE で 60

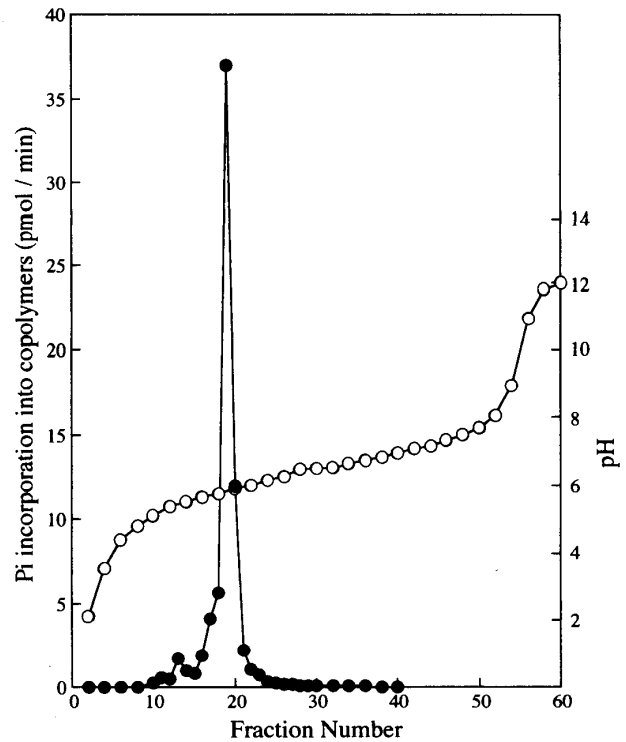


Fig. 5. Isoelectrofocusing electrophoresis of wild-type c-Yes.

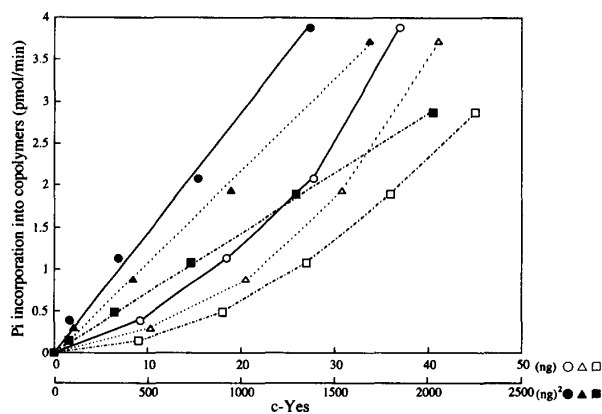
Casein-Toyopearl fraction (9 ml, 1.17 mg protein, 11,600 units) was applied to an Ampholine electrofocusing column. Electrofocusing was performed with carrier ampholites (pH 5-7) as described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES." Fractions of 2.5 ml were collected. Rates of Pi incorporation into Tyr-Glu copolymers (●) were measured with 5 μl of each fraction under the standard assay conditions. pH (○) of each fraction was measured.

kDa の単一タンパクバンドを示した (Fig. 3)。精製された 60 kDa のタンパク質は、その分子量および Western blotting で c-Yes 特異抗体と反応することから、c-Yes と同定した (Fig. 3)。野生型ラット c-Yes は 2 つのカラム操作で均質に精製され、感染 Sf9 昆虫細胞の細胞溶解液画分から比活性で 96 倍になり、収率は 16% であった (Table 1)。野生型ラット c-Yes の比活性は、チロシン-グルタミン酸コポリマーの人工基質を用いた場合、96,300 ユニット/mg で、ラット肝臓膜画分より精製した c-Yes の比活性、87,600 ユニット/mg と近似していた。組換え c-Yes を用いたリン酸化反応で、酵素濃度の増加とともに基質へのリン酸取り込み速度は放物線状に促進された (Fig. 6)。酵素濃度の二乗に対するグラフに書き直すと、基質のリン酸化速度は直線的に上昇し (Fig. 6)、これは野生型

Table 1. Purification of c-Yes from infected Sf9 cells

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Wild type					
Cell lysate	31.6	32,300	1,000	1	100
Casein-Toyopearl	1.17	11,600	9,900	10	36
Ampholine	0.054	5,200	96,300	96	16
Y16F mutant					
Cell lysate	27.9	35,200	1,300	1	100
Casein-Toyopearl	0.8	13,700	17,100	13	39
Ampholine	0.047	4,300	91,500	70	12
Y32F mutant					
Cell lysate	20.2	45,600	2,300	1	100
Casein-Toyopearl	1.31	12,400	9,500	4	27
Ampholine	0.043	5,600	130,200	57	12

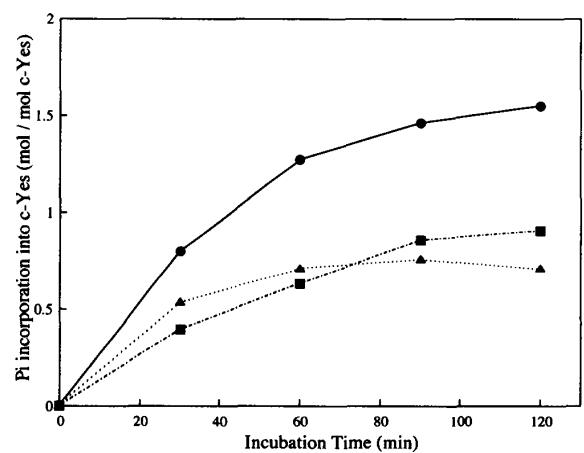
The enzymes were prepared from $5-6.5 \times 10^8$ infected Sf9 cells. Purification and assay procedures were described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES."

**Fig. 6.** Enzyme dose curves of Tyr-Glu copolymers phosphorylation.

Indicated doses of rat c-Yes purified from Sf9 cell (Ampholine fraction) were employed. Rates of Pi incorporation into copolymers (wild-type; ●, ○ : Y16F; ▲, △ : Y32F; ■, □) were measured at 30°C for 10 min as described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES."

c-Yes の酵素活性化が分子間相互作用によるものであることを示している。この関係は、細胞溶解液画分から精製酵素まで認められた。そこで、酵素の1ユニットを1分間当たりの基質に取り込まれたリン酸量 (pmol/min) の平方根と定義した。

Sf9 昆虫細胞に発現させた Y16F と Y32F 変異型 c-Yes も、上述の方法で精製した (Table 1)。アンフォラインカラムクロマトグラフィーで Y16F と Y32F 変異型の主な酵素活性ピークは各々 pH 5.8 と 5.9 で溶出

**Fig. 7.** Stoichiometry of incorporation of ^{32}P into c-Yes.

Each enzyme (wild-type; ●: Y16F; ▲: Y32F; ■, □, 60 units, $0.6 \mu\text{g}$ protein) was incubated with $30 \mu\text{M}$ [γ - ^{32}P] ATP at 30°C as described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES". At indicated times, $5 \mu\text{l}$ aliquots of the mixtures were withdrawn and spotted on a Whatman 3MM paper, and further processed as described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES."

された。SDS-PAGE のタンパク染色と c-Yes 特異抗体を用いた Western blotting により各精製酵素が均質であり、c-Yes であることを確認した (Fig. 3)。Y16F と Y32F 変異型は比活性で細胞溶解液画分からそれぞれ 70倍、57倍に精製され、収率は両者とも12%であった (Table 1)。Y16F と Y32F 変異型の比活性は各々 91,500と130,200ユニット/mgで、野生型 c-Yes と近い

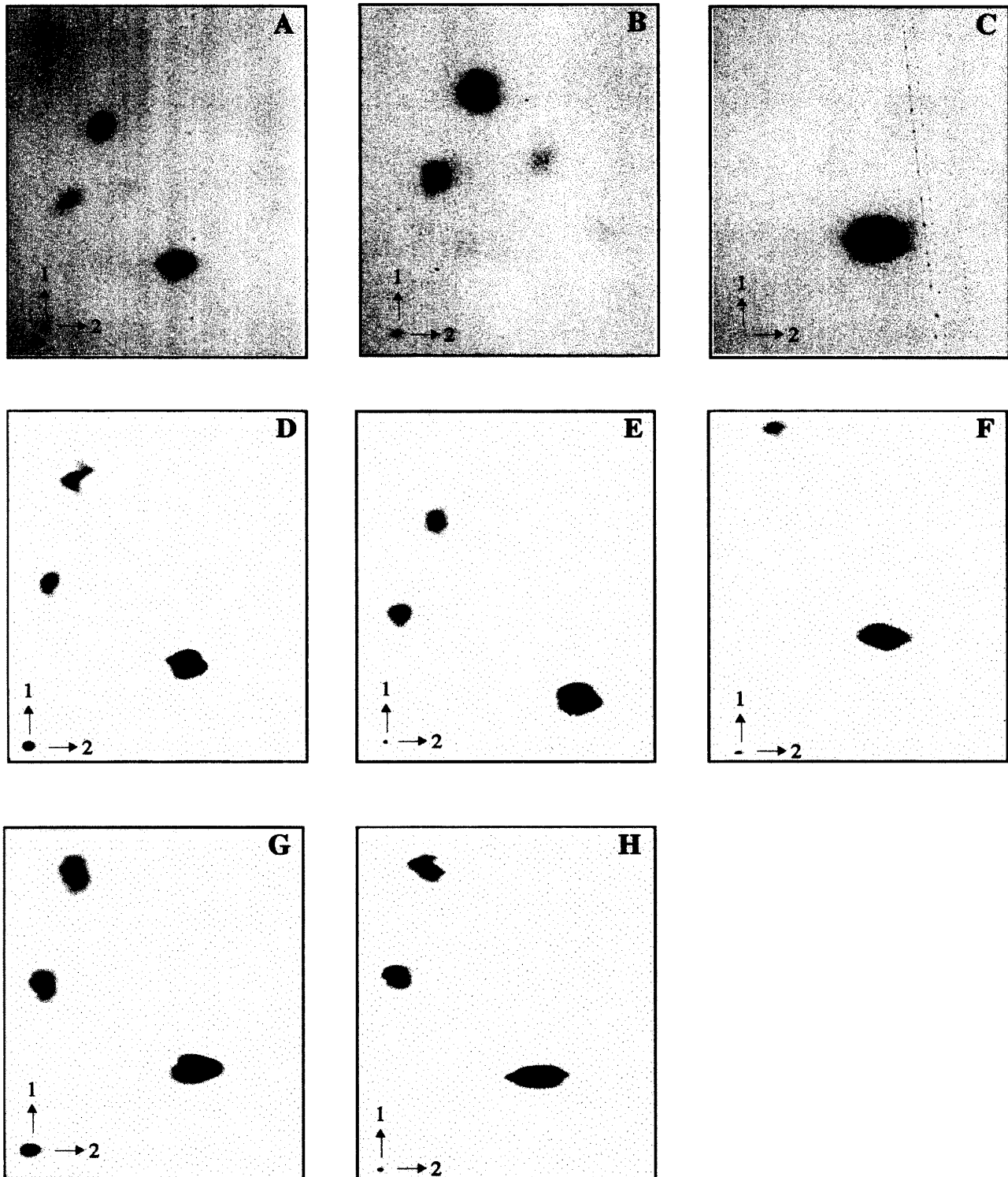


Fig. 8. Tryptic phosphopeptide maps of autophosphorylated c-Yes.

Autophosphorylation, tryptic digestion, separation of phosphopeptides on a C-18 column, high voltage paper electrophoresis and chromatography, and autoradiography of rat liver c-Yes (130 units, 1.5 μ g protein) and purified wild-type, Y16F, and Y32F mutants c-Yes (60 units, 0.6 μ g protein each) were carried out as described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES." Paper electrophoresis (Direction 1) and subsequent paper chromatography (Direction 2) were carried out. Tryptic phosphopeptides from rat liver c-Yes (A) and its N- (B) and C- (C) terminal ones. Phosphopeptides from wild-type (D), Y16F (E), Y32F (F), and co-chromatography of wild-type and Y16F (G), or Y32F (H). About 2,000 cpm of phosphopeptides was spotted.

値を示した。両変異型もリン酸化反応において、酵素濃度の増加とともに基質へのリン酸取り込み速度は放物線状に促進され (Fig. 6), 野生型 c-Yes およびラット肝臓膜画分より精製した c-Yes^{1,2)}と同様の曲線を描いた。以上の結果から, Sf9 昆虫細胞に発現させて精製した3種類のラット c-Yes は, ラット肝臓膜画分より精製した天然の c-Yes とほぼ同様の性質を持っていることが明らかとなり, 以降の実験に使用可能であることが確認された。

4. ラット c-Yes のユニークドメイン内自己リン酸化部位の同定

野生型, Y16F および Y32F 変異型 c-Yes を各々 [γ -³²P] ATP とインキュベートし, SDS-PAGE 後, c-Yes へのリン酸取り込み量 (自己リン酸化) を測定した。リン酸化チロシンに対するモノクローナル抗体を用いた Western blotting の結果から, 3種類の精製酵素にはいずれもリン酸化チロシン残基は存在しない (未発表結果)。自己リン酸化量は時間とともに増加して2時間後に最大となり, 野生型, Y16F および Y32F 変異型 c-Yes 1モルに対して1.57, 0.71および0.91モルのリン酸が取り込まれた (Fig. 7)。自己リン酸化した c-Yes のリン酸化アミノ酸分析では, リン酸化チロシンのみが検出された (未発表結果)。

ラット c-Yes のユニークドメイン内自己リン酸化部位を同定するため, 自己リン酸化した c-Yes のリン酸化ペプチドマップを比較検討した。まず c-Yes を [γ -³²P] ATP とともに2時間自己リン酸化後, トリプシン消化を行った。ラット肝臓より精製した c-Yes を自己リン酸化し, そのトリプシン消化物を逆相 C-18 カラムにチャージしてリン酸化ペプチドを分離すると, 有木らの報告¹⁾どおり, 2つのリン酸化ペプチド (N 末側と C 末側リン酸化ペプチド) が得られた。N 末側リン酸化ペプチドのアミノ酸配列は Y¹⁶TPENPTEPVNTSAGHY³²GVEHATAATTSSTK で Tyr16 と Tyr32 を含み, C 末側は LIEDNEY⁴²⁴TAR で Tyr424 を含む¹⁾。各リン酸化ペプチドを, 高圧濾紙電気泳動およびペーパークロマトで分析すると, N 末側リン酸化ペプチドは2つ, C 末側リン酸化ペプチドは1つの明らかに異なる移動度を示す放射活性スポットが検出できた (Fig. 8B, C)。

野生型と Y16F 変異型 c-Yes のリン酸化ペプチドマップ (Fig. 8D, E) は, ラット肝臓より精製した c-Yes のリン酸化ペプチドマップ (Fig. 8A) と相同であり, 野生型と Y16F 変異型のコクロマトグラム (Fig. 8G) でも, 新たなスポットは検出されなかった。これより, 各マップ左上部の2つのスポットは N 末

側, 右下部のスポットは C 末側のリン酸化ペプチドと判定した。これらはいずれも, その N 末側と C 末

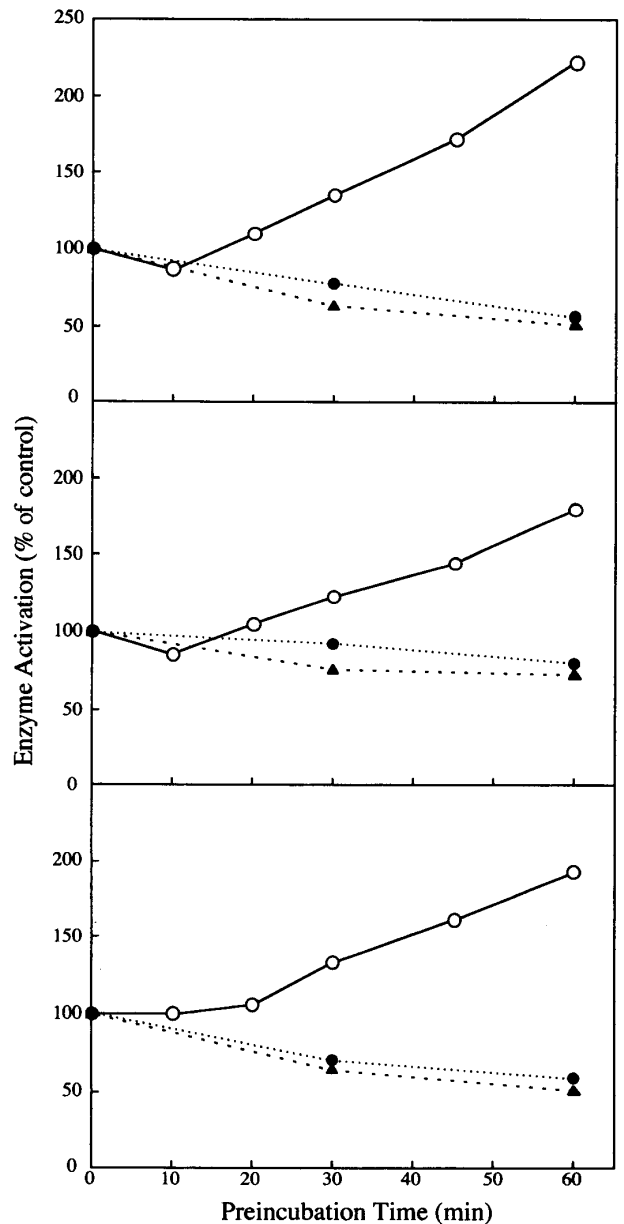


Fig. 9. Activation of c-Yes tyrosine kinase activity by autophosphorylation.

The purified wild-type c-Yes and its mutants (30 units, 0.3 μ g protein each) were preincubated separately with ATP (○), AMP-PNP (●), or H₂O (▲) at 30°C in 60 μ l of standard assay conditions. At indicated times, 5 μ l of mixture was withdrawn and assayed for the kinase activity as described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES." c-Yes kinase activity at zero time of preincubation was taken as 100%. At zero time, all three forms of c-Yes showed activity of 1.6 pmol of ³²P incorporated into Tyr-Glu copolymers per min.

側のカウントの比率は1:1.8であった。一方、Y32F 変異型 c-Yes のリン酸化ペプチドマップでは、2つのスポットが出現した (Fig. 8F)。野生型とのコクロマトグラムで新たなスポットが検出されなかったことから、これらは N 末側および C 末側ペプチドであると判定した (Fig. 8H)。そのカウントの比率は1:20で、N 末側は著しく少ない。両変異型の結果と、野生型と Y16F 変異型で各スポットの比率が同じであったことから、野生型では N 末側ペプチドの Tyr32 に大部分のリン酸が取り込まれたと考えられる。以上の結果より、ラット c-Yes の自己リン酸化部位は C 末側が Tyr424、N 末側が主に Tyr32 と考えられた。

5. c-Yes の自己リン酸化と活性化

ラット肝臓から精製した c-Yes は自己リン酸化によりそのチロシンキナーゼ活性が3.9倍促進された¹⁾。c-Yes のユニークドメイン自己リン酸化のチロシンキナーゼ活性におよぼす影響を調べる目的で、精製した野生型、Y16F および Y32F 変異型 c-Yes を ATP、AMP-PNP および蒸留水とともにプレインキュベート (自己リン酸化反応) し、その後チロシン-グルタミン酸コポリマーを基質として酵素活性を測定した。AMP-PNP は ATP の非水解アナログで、 γ 位のリン酸基が転位されないため、これと共にインキュベートしても c-Yes の自己リン酸化はおこらない。ATP とのプレインキュベーション時間とともに、c-Yes のチロシンキナーゼ活性の促進が認められた (Fig. 9)。一方、AMP-PNP あるいは蒸留水とプレインキュベートした c-Yes は時間とともにむしろキナーゼ活性が減少した。AMP-PNP あるいは蒸留水の場合と比較して、1時間のプレインキュベーションで c-Yes の自己リン酸化がおこると、野生型、Y16F および Y32F 変異型 c-Yes はそれぞれ4.0、2.5および3.9倍キナーゼ活性が促進された (Fig. 9)。以上の結果より、c-Yes はユニークドメインの変異に関わらず、自己リン酸化によりチロシンキナーゼ活性が促進されることから、ユニークドメインの自己リン酸化は酵素活性に影響しないことが判明した。

考 察

本研究で、ラット c-yes が原遺伝子をラット肝臓全 cDNA よりクローニングし、その塩基配列を決定した。推定されるラット c-Yes のアミノ酸配列をヒト、マウス、メダカのそれと比較すると、リン酸化が想定されるユニークドメイン内の Tyr16 と Tyr 32、キナーゼドメイン内の Tyr424、および C 末側の Tyr535 とそれぞれの周囲の配列が魚類からヒトまでよく保存さ

れていた。その中でユニークドメインはラットとメダカでは45%しかアミノ酸配列が一致しないにもかかわらず、Tyr16 および Tyr32 は保存されていた。これらのチロシン残基のリン酸化・脱リン酸化による酵素活性の調節が種を越えて重要な役割を担ってきた可能性がある。

Sf9 昆虫細胞を用いて組換え c-Src⁶⁾、Lck²²⁾、Fyn²⁰⁾ などの Src ファミリーキナーゼの発現、精製が行われた。これらは、酵素活性や基質特異性などが天然のものとはほぼ同じであることが確かめられている。本研究では、ラット c-Yes のユニークドメイン内自己リン酸化部位を決定し、そのリン酸化の酵素活性におよぼす効果を調べる目的で16番、32番の Tyr を Phe に置換した変異型 (Y16F、Y32F) および野生型 c-Yes を Sf9 昆虫細胞に発現させ、いずれも均質に精製した。有木ら¹⁾が行ったラット肝臓から c-Yes を精製した場合と比較すると、7精製ステップから3ステップに短縮され、時間的、労力的な効率化が図れた。今回、100 mm 径細胞培養ディッシュ20枚分の Sf9 昆虫細胞を用いて得られたキナーゼタンパク質約 50 μ g は、ラット肝臓約50匹分から得られる酵素量に匹敵する。3種類の精製酵素はいずれも比活性、自己リン酸化による活性化、基質へのリン酸取り込み速度が酵素濃度の二乗と直線関係を示すなど、ラット肝臓より精製した酵素¹⁾と酵素化学的に同様の性質を示した。

最近、大腸菌⁴⁵⁾および Sf9 昆虫細胞⁴⁶⁾を用いてヒト c-Yes が均質に精製された。大腸菌の発現系では、c-Yes の N 末側に GST (glutathione S-transferase) を結合させた融合タンパク質として発現、精製が行われた。精製した c-Yes では自己リン酸化によるチロシン残基へのリン酸取り込み量は、c-Yes 1モルに対して0.15モルと低い値を示し、自己リン酸化による酵素活性化はなかった⁴⁵⁾。Sf9 昆虫細胞から精製したヒト野生型 c-Yes⁴⁶⁾は、マグネシウムあるいはマンガンイオン要求性、ATP やチロシン-グルタミン酸コポリマーに対する K_m 値などが、ラット肝臓より精製された c-Yes²⁾とほぼ同等であった。しかし、自己リン酸化に関する記載はない。

本研究で Sf9 昆虫細胞を用いて発現、精製した3種類のラット c-Yes の自己リン酸化によるリン酸取り込み量は、c-Yes 1モルに対して野生型で1.57モル、Y16F 変異型で0.71モル、Y32F 変異型で0.91モルであった。ラット肝臓より精製した c-Yes のリン酸取り込み量は0.7モルであった¹⁾。自己リン酸化した c-Yes をトリプシン消化後、二次元ペプチドマップ分析により、N 末側 (Tyr16、Tyr32) および C 末側 (Tyr424)

のリン酸化部位の同定が可能となった。2つの N 末側リン酸化ペプチドのうち、陰極側に移動度の速いスポットは Y16F と Y32F 変異型のいずれでも出現することから、Tyr16 あるいは Tyr32 のいずれかがリン酸化されたペプチドと考えられる。もう1つの N 末側スポットは、Y32F 変異型では出現しないことから、Tyr32 のみがリン酸化されたペプチドと考えられる。自己リン酸化量と各スポットの放射活性の相対比から、野生型 c-Yes 1 モルにつき N 末側に0.56モル、Tyr424 に1.01モルのリン酸が取り込まれたと計算できる。また、Y16F 変異型では Tyr32 に0.25モル、Tyr424 に0.46モル、Y32F 変異型では Tyr16 に0.04モル、Tyr424 に0.87モルのリン酸が取り込まれた。いずれの c-Yes においても、Tyr424 へのリン酸取り込み量が最も多い。Y16F および Y32F 変異型の結果から、Tyr32 は Tyr16 に比べ格段に自己リン酸化されやすいことが判明した。また、野生型と Y16F 変異型で出現した各スポットの相対比がほぼ同じことから、野生型 c-Yes の N 末側のリン酸の大部分は Tyr32 に取り込まれたと考えられる。以上の結果より、Tyr424 と Tyr32 がラット c-Yes における主な自己リン酸化部位と判定した。この結果は、有木ら¹¹⁾の Tyr16 および Tyr32 とそれぞれの周囲のアミノ酸配列を含むペプチドを用いた c-Yes によるリン酸化実験の結果と合致する。しかし、Tyr16 も Y32F 変異型で少ないながらも自己リン酸化が認められたので、野生型 c-Yes のこの部位も部分的にリン酸化される可能性がある。

本研究のラット c-Yes では、ユニークドメイン内チロシン残基の変異にかかわらず、自己リン酸化により野生型、Y16F および Y32F 変異型で各々4、2.5および3.9倍の酵素活性化が観察された。二次元ペプチドマップの解析から、いずれの場合も Tyr424 がリン酸化されていた。Tyr424 はキナーゼドメイン内に存在し、このチロシン残基は他の Src ファミリーキナーゼでも保存されている。キナーゼドメイン内のチロシン残基の自己リン酸化によって酵素の活性化がもたらされることから、c-Yes の酵素活性化は Tyr424 の自己リン酸化によるものと考えられる^{19,34)}。しかし、Y16F 変異型は野生型、Y32F 変異型に比べて活性化の程度が低い。Src ファミリーキナーゼの Fyn は、ユニークドメイン内の Tyr28、Tyr30 および Tyr39 が自己リン酸化され、酵素活性化に部分的に関与している¹²⁾。c-Yes でも Tyr16 が酵素活性化に部分的に関与し、Y16F 変異型では自己リン酸化とキナーゼ活性化が低く抑えられた可能性もある。Tyr32 は、Tyr424 とともにラット c-Yes における主な自己リン酸化部位

の1つであるが、そのリン酸化は酵素活性に対して影響を与えなかった。

Src ファミリーキナーゼでは、C 末側チロシン残基が Csk によりリン酸化され、その酵素活性が抑制される^{29,44)}。c-Src³⁰⁾および Lck¹⁴⁾では、このチロシン残基の自己リン酸化もみられる。c-Yes でも Csk により C 末側535番のチロシン残基がリン酸化され、酵素活性が抑制されるが、Tyr535 の自己リン酸化は知られていない⁴⁴⁾。3種類の組換え c-Yes ならびにラット肝臓から精製した c-Yes でも、この部位の自己リン酸化は認められなかった。

C 末側チロシン残基がリン酸化された c-Src^{51,52)}および Hck³⁸⁾の結晶構造解析により、C 末側のリン酸化チロシン残基と自身の SH2 ドメインが結合し、また SH3 ドメインと SH2 ドメイン/キナーゼ間のリンカー部分が結合していることが解明された。これら各ドメインの分子内結合により、キナーゼドメイン内チロシン残基の自己リン酸化が行えず、また基質認識部位も形成できないため、酵素の不活性化状態が維持される。一方、チロシンホスファターゼにより C 末側リン酸化チロシン残基が脱リン酸化されたり、リン酸化チロシン残基を持つタンパク質がキナーゼの SH2 ドメインに結合したり、プロリンリッチなタンパク質がキナーゼの SH3 ドメインに結合すると、先ほど述べた分子内結合が解除され、立体構造に変化を生じて酵素が活性化される^{13,52)}。しかしながら、結晶構造解析に使用された c-Src と Hck はいずれもユニークドメインに相当する N 末側約90アミノ酸残基を除いたタンパク質であり、ユニークドメインの立体配座は不明である。Src ファミリーの Yes, Fyn, Yrk, Fgr, Lyn, Lck, Blk にはユニークドメイン内にチロシン残基が存在する。これらの中で自己リン酸化が見出されているのは Fyn¹²⁾と c-Yes¹⁾のみで、そのリン酸化部位周囲の配列には部分的にしか相同性がない。c-Yes のユニークドメイン内チロシン残基の自己リン酸化は Fyn とは異なる役割を担うことも考えられる。

ユニークドメイン内 Tyr32 の自己リン酸化の意義は現時点では不明であるが、上述した Src ファミリーキナーゼの活性制御の知見からいくつかの可能性が挙げられる。リン酸化チロシン残基は SH2 ドメインの標的であり、事実、PDGF レセプターの自己リン酸化されたリン酸化チロシン残基に、c-Yes は SH2 ドメインを介して結合し活性化される²⁷⁾。Tyr32 のリン酸化は SH2 ドメイン含有タンパク質との結合部位を提供したり、c-Yes 自身の SH2 ドメインと結合することで、C 末のリン酸化チロシン残基と c-Yes の SH2 ドメイン

との結合を阻害し、酵素の活性化状態を維持する可能性もある。また、c-Yes は分子間自己リン酸化反応で酵素活性が上昇することから、Tyr32 の自己リン酸化により他の c-Yes の SH2 ドメインと結合して、相互に活性化することも考えられる。

タンパク質のリン酸化はその分子の立体構造を変化させる。例えば、ホスホリラーゼでは Ser14 のリン酸化により、立体構造が変化し、活性化される³⁹⁾。c-Yes でも Tyr424 の自己リン酸化によりキナーゼドメイン中の activation loop 構造が変化し、酵素活性の促進に結びつくと予想される⁵²⁾。同様に、Tyr32 のリン酸化によるリン酸基、負電荷の導入により c-Yes 分子の立体構造が変化し、基質の認識や基質特異的な酵素活性の制御にかかわることも考えられる。c-Yes の SH3 ドメインには YAP (Yes-associated protein) 65 が結合し⁴¹⁾、ユニークドメインには Ca²⁺依存性にキナーゼ活性阻害タンパク質が結合することも示唆されている⁵⁴⁾。Tyr32 のリン酸化は c-Yes とこれらとの相互関係にも影響を与えるかもしれない。

c-Yes ノックアウトマウス^{24,40)}では、特異な表現型が出現しなかった。これは Src ファミリーキナーゼの中でも c-Yes と一次構造が類似し、また c-Yes 同様細胞に普遍的に存在する c-Src や Fyn が、欠失した c-Yes の機能を補完したためと考えられた。事実、細胞の PDGF 刺激^{21,27)}や細胞外 Ca²⁺濃度の上昇³¹⁾によりこれら3種の Src ファミリーキナーゼはいずれも活性化された。しかし、最近、細胞における c-Yes に特異的な役割が明らかにされ始めた。アンジオテンシン II⁴⁸⁾やインターロイキン11¹⁰⁾刺激によるシグナル伝達路の活性化、シガ毒素による細胞死¹⁵⁾、また IgA-Ig レセプターの免疫複合体のトランスサイトーシス²⁵⁾に、c-Yes が特異的に関わる事が判明した。しかしながら、これらの研究では、細胞における c-Yes のリン酸化部位の検索はされていない。c-Yes に特徴的なユニークドメインの自己リン酸化は、細胞における c-Yes 特異的なシグナル伝達にかかわるのか、またそのリン酸化の意義はどこにあるのかを細胞、組織および個体レベルで調べることは、今後の重要な課題と考えられる。

謝 辞

稿を終えるに際し、終始懇切なる御指導ならびに御校閲を賜った恩師・武田誠郎名誉教授、五十嵐和彦教授、整形外科教室 生田義和教授に深甚なる感謝の意を表します。碓井裕史助教授ならびに田邊修講師をはじめ生化学第二教室の皆様の御助力に対し、心より

御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. **Ariki, M., Tanabe, O., Usui, H., Hayashi, H., Inoue, R., Nishito, Y., Kagamiyama, H. and Takeda, M.** 1997. Identification of autophosphorylation sites in c-Yes purified from rat liver plasma membranes. *J. Biochem.* 121 : 104-111.
2. **Azuma, K., Ariki, M., Miyauchi, T., Usui, H., Takeda, M., Semba, K., Matsuzawa, Y., Yamamoto, T. and Toyoshima, K.** 1991. Purification and characterization of a rat liver membrane tyrosine-protein kinase, the possible protooncogene c-yes product, p60^{c-yes}. *J. Biol. Chem.* 266 : 4831-4839.
3. **Bougeret, C., Delaunay, T., Romero, F., Jullien, P., Sabe, H., Hanafusa, H., Benarous, R. and Fischer, S.** 1996. Detection of a physical and functional interaction between Csk and Lck which involves the SH2 domain of Csk and is mediated by autophosphorylation of Lck on tyrosine 394. *J. Biol. Chem.* 271 : 7465-7472.
4. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
5. **Brown, M. T. and Cooper, J. A.** 1996. Regulation, substrates and function of src. *Biochem. Biophys. Acta* 1287 : 121-149.
6. **Budde, R. J. A., Ramdas, L. and Ke, S.** 1993. Recombinant pp60^{c-src} from baculovirus-infected insect cells: Purification and characterization. *Prep. Biochem.* 23 : 493-515.
7. **Cheng, H. C., Bjorge, J. D., Aebbersold, R., Fujita, D. J. and Wang, J.H.** 1996. Purification of bovine thymus cytosolic C-terminal Src kinase (CSK) and demonstration of differential efficiencies of phosphorylation and inactivation of p56^{lyn} and pp60^{c-src} by CSK. *Biochemistry* 35 : 11874-11887.
8. **Czernilofsky, A. P., Levinson, A. D., Varmus, H. E. and Bishop, J. M.** 1980. Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (*src*) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature* 287 : 198-203.
9. **Eiseman, E. and Bolen, J. B.** 1992. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 355 : 78-80.
10. **Fuhrer, D. K. and Yang, Y. C.** 1996. Activation of Src-family protein tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 mouse preadipocytes by interleukin-11. *Exp. Hematol.* 24 : 195-203.
11. **Hannig, G., Otilie, S. and Schartl, M.** 1991.

- Conservation of structure and expression of the *c-yes* and *fyn* genes in lower vertebrates. *Oncogene* 6 : 361-369.
12. **Hansen, K., Alonso, G., Courtneidge, S. A., Rönstrand, L. and Heldin, C. H.** 1997. PDGF-induced phosphorylation of Tyr28 in the N-terminus of Fyn affects Fyn activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 : 355-362.
 13. **Hubbard, S. R., Mohammadi, M. and Schlessinger, J.** 1998. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 273 : 11987-11990.
 14. **Jullien, P., Bougeret, C., Camoin, L., Bodeus, M., Durand, H., DiSanto, J. P., Fischer, S. and Benarous, R.** 1994. Tyr394 and Tyr505 are autophosphorylated in recombinant Lck protein-tyrosine kinase expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 224 : 589-596.
 15. **Katagiri, Y. U., Mori, T., Nakajima, H., Katagiri, C., Taguchi, T., Takeda, T., Kiyokawa, N. and Fujimoto, J.** 1999. Activation of Src family kinase Yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. *J. Biol. Chem.* 274 : 35278-35282.
 16. **Kefalas, P., Brown, T. R. P. and Brickell, P. M.** 1995. Signalling by the p60^{c-src} family of protein-tyrosine kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27 : 551-563.
 17. **Kitamura, N., Kitamura, A., Toyoshima, K., Hirayama, Y. and Yoshida, M.** 1982. Avian sarcoma virus Y73 genome sequence and structural similarity of its transforming gene product to that of Rous sarcoma virus. *Nature* 297 : 205-208.
 18. **Klages, S., Adam, D., Eiseman, E., Fargnoli, J., Dymecki, S. M., Desiderio, S. V. and Bolen, J. B.** 1993. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding the murine *c-yes* tyrosine protein kinase. *Oncogene* 8 : 713-719.
 19. **Kmieciak, T. E. and Shalloway, D.** 1987. Activation and suppression of pp60^{c-src} transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* 49 : 65-73.
 20. **Koegl, M., Kypta, R. M., Bergman, M., Alitalo, K. and Courtneidge, S. A.** 1994. Rapid and efficient purification of Src homology 2 domain-containing proteins: Fyn, Csk and phosphatidylinositol 3-kinase p85. *Biochem. J.* 302 : 737-744.
 21. **Kypta, R. M., Goldberg, Y., Ulug, E. T. and Courtneidge, S. A.** 1990. Association between the PDGF receptor and members of the *src* family of tyrosine kinases. *Cell* 62 : 481-492.
 22. **Lehr, R. V., Ma, Y. G., Kratz, D., Brake, P. G., Wang, S., Faltynek, C. R., Wang, X. M. and Stevis, P. E.** 1996. Production, purification and characterization of non-myristylated human T-cell protein tyrosine kinase in a baculovirus expression system. *Gene* 169 : 275-279.
 23. **Loganzo, Jr. F., Dosik, J. S., Zhao, Y., Vidal, M. J., Nanus, D. M., Sudol, M. and Albino, A. P.** 1993. Elevated expression of protein tyrosine kinase c-Yes, but not c-Src, in human malignant melanoma. *Oncogene* 8 : 2637-2644.
 24. **Lowell, C. A. and Soriano, P.** 1996. Knockouts of *src*-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev.* 10 : 1845-1857.
 25. **Luton, F., Vergés, M., Vaerman, J. P., Sudol, M. and Mostov, K. E.** 1999. The Src family protein tyrosine kinase p62^{yes} controls polymeric IgA transcytosis in vivo. *Mol. Cell* 4 : 627-632.
 26. **Miyauchi, T., Ariki, M., Usui, H., Semba, K., Matsuzawa, Y., Yamamoto, T., Toyoshima, K. and Takeda, M.** 1992. Purification and characterization of a possible protooncogene *fyn* product, p59^{fyn}, from a rat brain particulate fraction. *J. Biochem.* 112 : 729-732.
 27. **Mori, S., Rönstrand, L., Yokote, K., Engström, Å., Courtneidge, S. A., Welsh, L. C. and Heldin, C. H.** 1993. Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF β -receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J.* 12 : 2257-2264.
 28. **Muthuswamy, S. K. and Muller, W. J.** 1994. Activation of the Src family of tyrosine kinases in mammary tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 64 : 111-123.
 29. **Okada, M. and Nakagawa, H.** 1988. Identification of a novel protein tyrosine kinase that phosphorylates pp60^{c-src} and regulates its activity in neonatal rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154 : 796-802.
 30. **Osusky, M., Taylor, S. J. and Shalloway, D.** 1995. Autophosphorylation of purified c-Src at its primary negative regulation site. *J. Biol. Chem.* 270 : 25729-25732.
 31. **Owens, D. W., McLean, G. W., Wyke, A. W., Paraskeva, C., Parkinson, E. K., Frame, M. C. and Brunton, V. G.** 2000. The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell* 11 : 51-64.
 32. **Park, J., Meisler, A. I. and Cartwright, C. A.** 1993. c-Yes tyrosine kinase activity in human colon carcinoma. *Oncogene* 8 : 2627-2635.
 33. **Peña, S. V., Melhem, M. F., Meisler, A. I. and Cartwright, C. A.** 1995. Elevated c-Yes tyrosine kinase activity in premalignant lesions of the colon.

- Gastroenterology 108 : 117-124.
34. **Piwnica-Worms, H., Saunders, K. B., Roberts, T. M., Smith, A. E. and Cheng, S. H.** 1987. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60^{c-src}. *Cell* 49 : 75-82.
 35. **Rudolph, S. A. and Krueger, B. K.** 1979. Endogenous protein phosphorylation and dephosphorylation. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10 : 107-133.
 36. **Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K. and Miyoshi, N.** 1999. Expression of c-yes oncogene product in various animal tissues and spontaneous canine tumors. *Res. Vet. Sci.* 66 : 205-210.
 37. **Ruzzene, M., James, P., Brunati, A. M., Donella, D. A. and Pinna, L. A.** 1994. Regulation of c-Fgr protein kinase by c-Src kinase (CSK) and by polycationic effectors. *J. Biol. Chem.* 269 : 15885-15891.
 38. **Sicheri, F., Moarefi, I. and Kuriyan, J.** 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385 : 602-609.
 39. **Sprang, S. R., Acharya, K. R., Goldsmith, E. J., Stuart, D. I., Varvill, K., Fletterick, R. J., Madsen, N. B. and Johnson, L. N.** 1988. Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature* 336 : 215-221.
 40. **Stein, P. L., Vogel, H. and Soriano, P.** 1994. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev.* 8 : 1999-2007.
 41. **Sudol, M.** 1994. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene* 9 : 2145-2152.
 42. **Sukegawa, J., Semba, K., Yamanashi, Y., Nishizawa, M., Miyajima, N., Yamamoto, T. and Toyoshima, K.** 1987. Characterization of cDNA clones for the human *c-yes* gene. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 41-47.
 43. **Summers, M. D. and Smith, G. E.** 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex. Agri. Exp. Stn. Bull.* 1555 : 1-56.
 44. **Sun, G., Sharma, A. K. and Budde, R. J.** 1998. Autophosphorylation of Src and Yes blocks their inactivation by Csk phosphorylation. *Oncogene* 17 : 1587-1595.
 45. **Sun, G. and Budde, R. J. A.** 1997. Expression, purification, and initial characterization of human Yes protein tyrosine kinase from a bacterial expression system. *Arch. Biochem. Biophys.* 345 : 135-142.
 46. **Šušna, M., Luong-Nguyen, N. H., Crespo, J., Maier, R., Missbach, M. and McMaster, G.** 2000. Active recombinant human tyrosine kinase c-Yes: Expression in baculovirus system, purification, comparison to c-Src, and inhibition by a c-Src inhibitor. *Prot. Exp. Pur.* 19 : 99-106.
 47. **Takeuchi, M., Kuramochi, S., Fusaki, N., Nada, S., Kawamura, T. J., Matsuda, S., Semba, K., Toyoshima, K., Okada, M. and Yamamoto, T.** 1993. Functional and physical interaction of protein-tyrosine kinases Fyn and Csk in the T-cell signalling system. *J. Biol. Chem.* 268 : 27413-27419.
 48. **Tang, H., Zhao, Z. J., Landon, E. J. and Inagami, T.** 2000. Regulation of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2 by angiotensin II in endothelial cells: Roles of Yes tyrosine kinase and tyrosine phosphatase SHP-2. *J. Biol. Chem.* 275 : 8389-8396.
 49. **Twamley-Stein, G. M., Pepperkok, R., Ansoerge, W. and Courtneidge, S. A.** 1993. The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth factor-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 7696-7700.
 50. **Weiss, A. and Littman, D. R.** 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76 : 263-274.
 51. **Xu, W., Harrison, C. and Eck, M. J.** 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385 : 595-602.
 52. **Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J. and Harrison, S. C.** 1999. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell* 3 : 629-638.
 53. **Yoshikawa, K., Usui, H., Imazu, M., Tsukamoto, H. and Takeda, M.** 1985. Comparison of tyrosine protein kinases in membrane fractions from mouse liver and Ehrlich ascites tumor. *J. Biol. Chem.* 260 : 15091-15099.
 54. **Zhao, Y., Uyttendaele, H., Krueger, J. G., Sudol, M. and Hanafusa, H.** 1993. Inactivation of c-yes tyrosine kinase by elevation of intracellular calcium levels. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 7507-7514.
 55. **Zhao, Y. H., Krueger, J. G. and Sudol, M.** 1990. Expression of cellular-yes protein in mammalian tissues. *Oncogene* 5 : 1629-1635.
 56. **Zheng, X. M., Wang, Y. and Pallen, C. J.** 1992. Cell transformation and activation of pp60^{c-src} by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 359 : 336-339.

Molecular Cloning of Rat c-Yes Protein Tyrosine Kinase and Identification of Autophosphorylation Sites

Masahiro SHIMIZU

Department of Biochemistry, Hiroshima University School of Medicine

(Director: Prof. Kazuhiko IGARASHI)

Rat c-Yes, a Src family protein tyrosine kinase, is autophosphorylated at Tyr residues in the catalytic domain and in the unique domain with a concomitant increase in the the kinase activity. The site in the catalytic domain corresponds to the common autophosphorylation sites of other family members. To determine the autophosphorylation site(s) in the unique domain of rat c-Yes and their effects on the activation, I cloned the rat *c-yes* protooncogene and expressed wild-type, Y16F, and Y32F (Tyr was replaced with Phe) mutant c-Yes in Sf9 insect cells using the baculovirus expression system. The three forms of c-Yes were purified to homogeneity by two column chromatographies and shown to have similar specific activities and similar enzymatic properties of activation by intermolecular autophosphorylation. Pi incorporations into one mol of wild-type, Y16F, and Y32F c-Yes by autophosphorylation were 1.57, 0.71, and 0.91 mol, respectively. By analyzing two-dimensional tryptic phosphopeptide maps derived from the three forms of autophosphorylated c-Yes, the major phosphorylation site in the unique domain was suggested to be Tyr32. Preincubated with ATP stimulated the kinase activities of wild-type, Y16F, and Y32F by 4.0, 2.5, and 3.9-fold, respectively. This result suggests that phosphorylation in the catalytic domain (Tyr424), but not Tyr16 or Tyr32 is responsible for the activation by autophosphorylation.