



インスリンによる3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1(PDK1)のリン酸化機構

日野, 泰久

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 61(4):131-138

(Issue Date)

2001-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00044705>



インスリンによる 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1(PDK1) のリン酸化機構

日 野 泰 久

神戸大学医学部内科学第二講座
神戸市中央区楠町 7-5-1
Phone : 078-382-5861
Fax : 078-382-2080

(平成13年1月11日受付)

【要 約】

3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1(PDK1) は phosphatidyl-inositol(PI) 3-キナーゼの下流で機能する多くの蛋白キナーゼをリン酸化し、活性化する蛋白キナーゼである。インスリン受容体と PDK1 をともに安定的に発現した CHO 細胞をインスリンで処理すると、SDS-PAGE 上の PDK1 の移動度の低下が生じた。また、熱刺激や過酸化水素刺激でも同様の移動度の低下が生じた。放射性リン酸標識実験により、インスリンによる PDK1 の移動度の低下は PDK1 のリン酸化の増強を反映することが明らかとなった。PI3-キナーゼの薬理的阻害剤である wortmannin は、インスリンによる PDK1 の移動度の低下及び PDK1 のリン酸化を抑制し、恒常的活性型 PI3-キナーゼは刺激非存在下にも PDK1 の移動度の低下を促進した。キナーゼ欠損型の PDK1 も野生型 PDK1 と同様にインスリン刺激により移動度が低下した。優位抑制型 Akt, 優位抑制型 protein kinase C(PKC) λ , p70S6 キナーゼの活性化を阻害する薬理的阻害剤である rapamycin はインスリン依存性の PDK1 の移動度の低下を阻害しなかった。以上の結果により、インスリン刺激により PDK1 は PI3-キナーゼ依存性にリン酸化され、この PDK1 のリン酸化には Akt, p70S6 キナーゼ及び PKC λ は関与しないことが示唆された。

【緒 言】

PI3-キナーゼは受容体型チロシンキナーゼのリガンドによる刺激を始めとした様々な刺激による細胞反応を媒介することが知られている^(1, 2)。PI3-キ

ナーゼ依存性の細胞内情報伝達経路には不明な点も多いが、近年、Akt, p70S6 キナーゼ, serum- and glucocorticoid-induced protein kinase(SGK), novel PKC や atypical PKC のある種のアイソフォームといった PI3-キナーゼの下流で機能する蛋白キナーゼが数多く同定され、これらの分子の PI3-キナーゼの媒介する細胞反応への関与が明らかになりつつある⁽¹⁻⁵⁾。

PDK1 は Akt をリン酸化し活性化する蛋白キナーゼとして同定されたが^(6, 7), その後、p70S6 キナーゼ, SGK に加え、novel PKC や atypical PKC をもリン酸化し活性化することが報告された⁽⁴⁻¹¹⁾。このことは PDK1 が PI3-キナーゼ依存性の細胞内情報伝達経路に重要な機能を果たす可能性を示唆するが、PI3-キナーゼからの情報がいかなる機構で PDK1 に伝達されるかは明らかではない。増殖因子刺激や PI3-キナーゼの阻害剤で細胞を処理しても、PDK1 のキナーゼ活性に変化は生じないことが報告されており⁽¹²⁾, PDK1 のキナーゼ活性自体が PI3-キナーゼにより制御される可能性は否定的である。また、PI3-キナーゼ依存性の機構によって、PDK1 が細胞質分画から細胞膜分画へ移行するという報告もあるが^(13, 14), これには異論も存在する⁽¹⁵⁾。

本研究では、PI3-キナーゼからの細胞内情報がいかなる機構で PDK1 へ伝達されるかを明らかにするため、インスリンによる刺激が PDK1 のリン酸化に影響を与えるか否か、またこの機構に PI3-キナーゼが関与するか否かを検討した。

【方 法】

細胞と抗体

キーワード : PDK1, インスリン, PI3-キナーゼ, Akt, PKC λ , リン酸化

CHO-IR 細胞に PCMV3 ベクターにサブクローニングされた Myc タグを付加したヒト PDK1 遺伝子⁽⁷⁾を導入し、既報の如く限界希釈法にて単一クローンを得⁽¹⁶⁾、インスリン受容体と PDK1 を安定的に発現した CHO-IR/PDK1 細胞を確立した。抗 Myc 抗体は既報の如く調整し⁽¹⁶⁾、抗 p70S6 キナーゼ抗体、抗 PDK1 抗体は各々 Santa Cruz 社、Upstate Biotechnology 社より購入した。

プラスミドとアデノウイルスベクター

恒常的活性型 PI3-キナーゼ(AxCAMyr-p110)⁽¹⁷⁾、恒常的活性型 Akt(AxCAMyr-Akt)⁽¹⁸⁾、恒常的活性型 PKC λ (AxCA λ Δ PD)⁽¹⁹⁾、優位抑制型 Akt (AxCAAkt-AA)⁽¹⁶⁾、優位抑制型 PKC λ (AxCA λ Δ NKD)をコードするアデノウイルスベクターは既報の如く調整した。Lys111 または Ser241 をアラニンに置換した 2 種のキナーゼ欠損型 PDK1(PDK1-K111Q 及び PDK1-S241A)は、Myc タグを付加したヒト PDK1 より Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit(Stratagene 社)を用いて作成した。また、これらの変異体をコードするアデノウイルスベクターを adenovirus expression kit(タカラ社)を用いて作成し、各々 AxCAPDK1-K111Q, AxCAPDK1-S241A と名付けた。細胞へのアデノウイルスの感染は既報の如く行った⁽¹⁶⁾。

イムノブロット、放射性リン酸標識及びキナーゼアッセイ

16 時間血清を除去した CHO-IR/PDK1 細胞または CHO-IR 細胞を、20 分間 wortmannin で処理、非処理の後、100nM インスリン刺激、8.8mM 過酸化水素刺激、または 45 °C での熱刺激を 10 分間加え、細胞可溶化分画を抗 Myc 抗体、または抗 PDK1 抗体によるイムノブロットに供した。放射性リン酸標識は既報の如く行い⁽¹⁸⁾、標識細胞を 20 分間 wortmannin で処理、非処理の後、100nM インスリンで 10 分間刺激し、細胞可溶化分画を抗 Myc 抗体により免疫沈降を行った。免疫沈降物を SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィーに供した。放射活性は BAS2000 phosphoimager により定量した。p70S6 キナーゼ活性は既報の方法で測定した⁽¹⁶⁾。

【結 果】

インスリンによる PDK1 の移動度の変化

CHO-IR/PDK1 細胞をインスリンで 10 分間処理、非処理の後、細胞可溶化分画を SDS-PAGE で分離後、抗 PDK1 抗体を用いたイムノブロットに供したところ、PDK1 の分子量に一致するバンドが 2 本検

出された。インスリン非処理状態では低移動度(高分子量)のバンドの強度は、高移動度(低分子量)のバンドの強度に比して非常に弱く、インスリン処理により低移動度のバンド強度が増強し、高移動度のバンド強

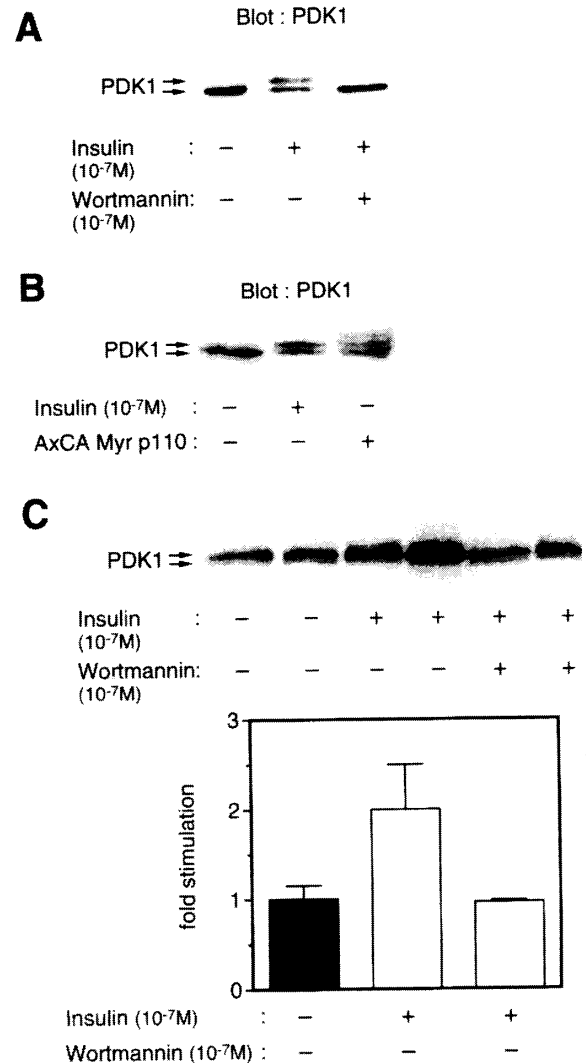


Figure 1. インスリンによる PI3-キナーゼ依存性の PDK1 の移動度の低下とリン酸化

(A) CHO-IR/PDK1細胞を 100nM wortmannin で 20 分間処理、非処理の後、100nM インスリンにて 10 分間刺激を行い、細胞可溶化分画を抗 PDK1 抗体によるイムノブロットに供した。(B)CHO-IR/PDK1 細胞に AxCAMyr-p110 を 5MOI (multiplicity of infection)にて感染させ、感染 48 時間後に抗 PDK1 抗体によるイムノブロットに供した。(C)CHO-IR/PDK1 細胞を放射性リン酸にて標識し、100nM の wortmannin で 20 分間処理、非処理の後、100nM インスリンで 10 分間刺激した。その後、細胞可溶化分画を抗 Myc 抗体にて免疫沈降し、免疫沈降分画を SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィーに供した(上段)。また、オートラジオグラフィー上の 2 本の PDK1 のバンドの放射活性を測定した(下段)。

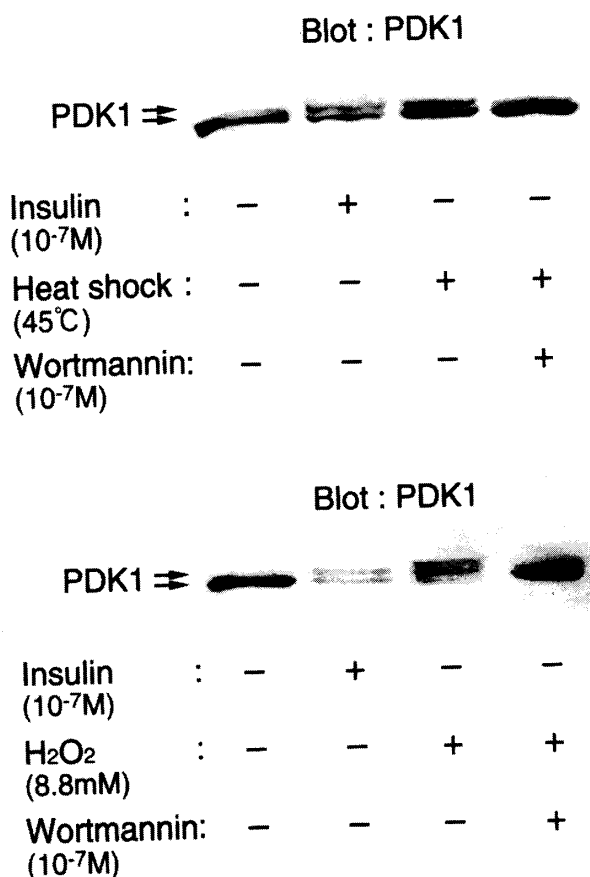


Figure 2. 熱刺激, 及び過酸化水素刺激の PDK1 の移動度への影響

CHO-IR/PDK1 細胞を 100nM の wortmannin で 20 分間処理, 非処理の後, 100nM のインスリン刺激, 8.8mM の過酸化水素刺激, もしくは 45°C の熱刺激を 10 分間行い, その後, 細胞の可溶化分画を抗 PDK1 抗体を用いたイムノブロットに供した。

度は減弱した(Fig. 1A)。このインスリン依存性の PDK1 の SDS-PAGE 上の移動度の低下は wortmannin 処理によりほぼ完全に抑制された。また, 恒常的活性型 PI3-キナーゼをアデノウイルスベクターを用いて細胞に発現させると, インスリン非存在下にも PDK1 の移動度の低下が生じた(Fig. 1B)。インスリンによる PDK1 のリン酸化

放射性リン酸で標識した CHO-IR/PDK1 細胞をインスリン処理し, 抗 Myc 抗体による免疫沈降の後, SDS-PAGE で分離し, オートラジオグラフィーに供した。インスリン非処理状態では放射活性が低いバンドが高移動度の位置に, 放射活性が強いバンドが低移動度の位置に認められ, インスリン処理により, 高移動度のバンドが減弱し, 低移動度のバンドが著しく増強した(Fig. 1C)。また, インスリン処理により, PDK1 の総放射活性は約 2 倍に増強した(Fig. 1C)。インスリンによるオートラジオグラフィー上の

PDK1 の各バンドの強度の変化, 2 本のバンドの総放射活性の増加は wortmannin 処理により抑制された(Fig. 1C)。

熱刺激, 過酸化水素刺激による PDK1 の移動度の低下

熱刺激及び過酸化水素刺激は各種の蛋白キナーゼの活性を増強することが知られている⁽²⁰⁻²²⁾。そこで, 次にこれらの刺激による PDK1 の SDS-PAGE 上の移動度の変化について検討した。10 分間 45°C の熱刺激または 8.8mM の過酸化水素刺激はいずれも PDK1 の移動度の低下を惹起した(Fig. 2)。また, これらの刺激による PDK1 の移動度の低下は wortmannin にて抑制された。

キナーゼ欠損型 PDK1 のインスリンによる移動度の低下

CHO-IR 細胞に Myc tag で標識した 2 種のキナーゼ欠損型 PDK1(PDK1-K111Q 及び PDK1-S241A)を一過性に発現させ, これらの変異体のインスリンによる移動度の変化を検討した。いずれの変異体もインスリン処理により野生型 PDK1 と同程度の移動度の低下が生じ, これは wortmannin にて抑制された(Fig. 3)。

PDK1 の移動度の変化を促すシグナル伝達経路の解析

次に, PDK1 の移動度の低下を促す細胞内情報伝達経路について解析した。CHO-IR/PDK1 細胞を mammalian TOR(mTOR)の阻害剤である rapamycin で処理すると, インスリン依存性の p70S6 キナーゼの SDS-PAGE 上の移動度の低下(Fig. 4A), 及び活性化(data not shown)はほぼ完全に抑制されたが, PDK1 の移動度の低下は阻害されなかった(Fig. 4A)。また, アデノウイルスベクターを用いて優位抑制型の Akt(Fig. 4B)もしくは優位抑制型の PKC λ (Fig. 4C)を, CHO-IR 細胞において各々の内因性のキナーゼの活性を十分に抑制しうる量発現させても^(16, 19), PDK1 の移動度の低下は抑制されなかった。

【考 察】

今回の研究では, インスリン処理により SDS-PAGE 上の PDK1 の移動度の低下が生じることが明らかとなった。放射性リン酸標識実験の結果から, この移動度の低下は PDK1 のリン酸化の増強を反映することが示された。また, インスリンによる PDK1 の移動度の低下, PDK1 のリン酸化が PI3-キナーゼの薬理的阻害剤である wortmannin により阻害され

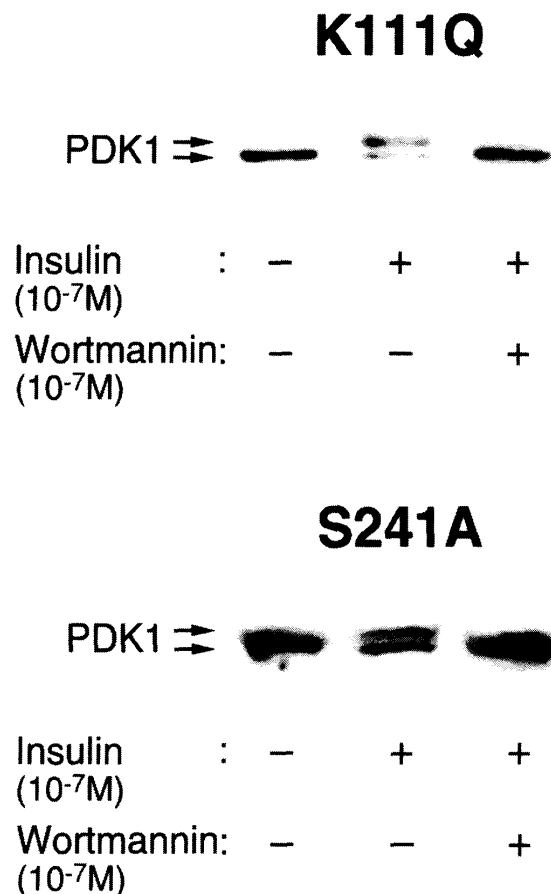


Figure 3. インスリン刺激のキナーゼ欠損型 PDK1 の移動度への影響

CHO-IR細胞に AxCAPDK1-K111QP もしくは AxCAPDK1-S241A を各々3MOI で感染させた。感染 48 時間後に 100nM の wortmannin で 20 分間処理, 非処理の後, 100nM インスリンにて 10 分間刺激を行った。その後, 細胞可溶化分画を抗 PDK1 抗体によるイムノブロットに供した。

たこと, 及び, 恒常的活性型 PI3-キナーゼの発現により, 刺激非存在下にも PDK1 の移動度の低下が生じたことから, PDK1 のリン酸化には PI3-キナーゼが関与することが示唆された。

最近, Casamayor らは 293 細胞において, I 型インスリン様増殖因子刺激や wortmannin 処理を行っても PDK1 のリン酸化には変化が生じないと報告している⁽²³⁾。彼らの結果と本研究の結果が異なる理由は明かではないが, 使用した細胞, 刺激に用いたリガンドの差に起因する可能性がある。また, Grillo らは単離脂肪細胞を peroxovanadate で刺激することにより, PDK1 のチロシン残基のリン酸化が生じることを報告している⁽²⁴⁾。しかし, 我々の検討では CHO-IR/PDK1 細胞から免疫沈降した PDK1 を抗フォスフォチロシン抗体を用いたイムノブロットに供しても, インスリン処理により PDK1 の抗フォスフォチ

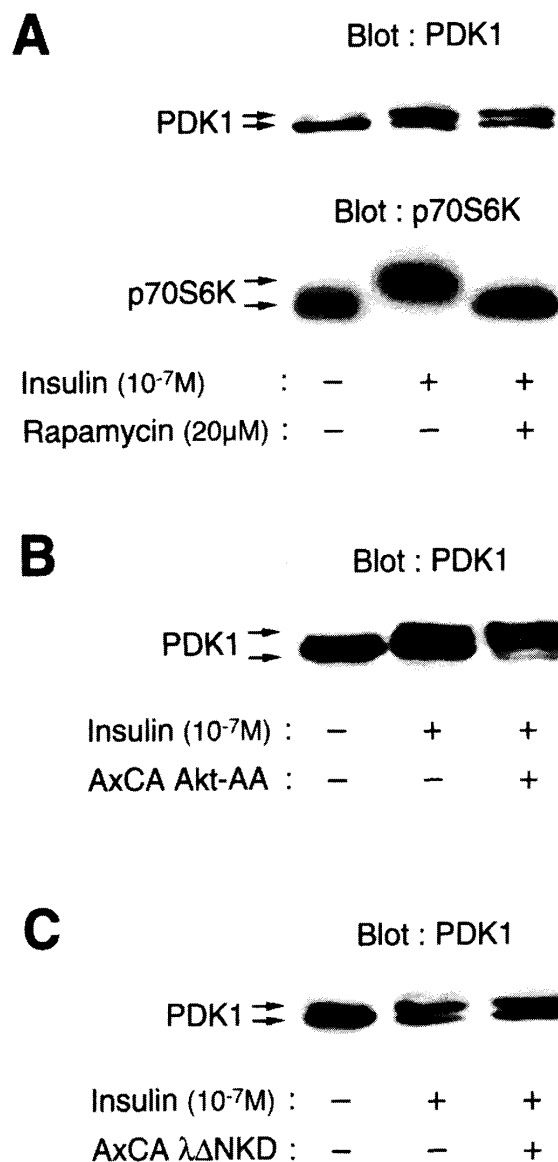


Figure 4. Rapamycin, 優位抑制型 Akt 及び優位抑制型 PKC λ のインスリンによる PDK1 の移動度への影響

(A) CHO-IR/PDK1細胞を20μM の rapamycin で 20 分間処理, 非処理の後, 100nM のインスリンで 10 分間刺激し, その後, 細胞可溶化分画を抗 PDK1 抗体(上段), 抗 p70S6 キナーゼ抗体(下段)を用いたイムノブロットに供した。(B, C) CHO-IR/PDK1 細胞に AxCAAkt-AA を 20MOI で, AxCA λΔNKD を 30MOI で感染させた。感染 48 時間後, 細胞を 100nM インスリンにて 10 分間刺激を行い, 細胞可溶化分画を抗 PDK1 抗体によるイムノブロットに供した。

ロシン抗体への反応性には変化が生じないことを確認しており(data not shown), 本細胞におけるインスリン依存性の PDK1 のリン酸化はチロシン残基には生じない可能性が示唆される。

多くの蛋白キナーゼが自己リン酸化することが知られている⁽²⁶⁾。しかし、キナーゼ欠損型の PDK1 もインスリン処理によりリン酸化を生じたことから、PDK1 のリン酸化には PDK1 自身のキナーゼ活性は関与しないことが示唆される。p70s6 キナーゼ、Akt, 及び PKC λ は PI3-キナーゼの下流で機能する蛋白キナーゼであり⁽¹⁻³⁾, p70S6 キナーゼ及び Akt は、インスリンのみならず、今回、PDK1 のリン酸化を惹起することが明かとなった熱刺激や過酸化水素刺激によっても活性化される^(21, 22)。しかし、優位抑制型変異体や薬理学的阻害剤を用いた検討から、これらのいずれのキナーゼの活性もインスリンによる PDK1 のリン酸化には関与しない可能性が示唆された。実際、恒常的活性型 Akt(My μ -Akt)や恒常的活性型 PKC λ (λ Δ PD)をアデノウイルスベクターを用いて CHO-IR 細胞に発現させても、インスリン刺激非存在下では PDK1 のリン酸化は生じなかった(data not shown)。このことから、PDK1 は、p70S6 キナーゼ、Akt, 及び PKC λ 以外の PI3-キナーゼの下流で機能する蛋白キナーゼによりリン酸化されることが示唆された。

現時点でインスリンによる PDK1 のリン酸化の生理的意義は明かではない。蛋白のリン酸化は触媒活性、蛋白同士の相互作用、細胞内局在、蛋白の分解速度や安定性といった様々な現象を制御することが知られている。しかし、細胞から免疫沈降した PDK1 の活性は増殖因子刺激や薬理学的阻害剤により影響を受けないことが報告されており⁽¹²⁾, インスリンによるリン酸化が PDK1 のキナーゼ活性の制御に関わる可能性は低いと考えられる。一方、PI3-キナーゼの下流のシグナルが PDK1 の細胞膜への移行に関与するとの報告もあるが^(13, 14), これには異論も存在する⁽¹⁵⁾。我々の検討でもインスリン処理により、細胞膜分画と細胞質分画における PDK1 の量比やこれらの分画間での PDK1 の高移動度、低移動度のバンドの量比には有意な差異を認めなかった(data not shown)。しかし、これらの結果は PDK1 のリン酸化が、細胞内の特定の部位への局在や他の分子との相互作用に関与する可能性を完全に否定するものではなく、今後、PDK1 上のリン酸化部位の決定や、PDK1 をリン酸化するキナーゼの同定を通じて、PDK1 リン酸化の生理的意義が明かとなるものと思われる。

【謝 辞】

本研究にあたり、ご指導を賜りました神戸大学医学部内科学第二講座、春日雅人教授に厚くお礼申し上げます。

ます。

【文 献】

- 1) Toker, A., and Cantley, L. C.: Signalling through the kuoud oridycts of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*. 387: 673-676, 1997.
- 2) Shepherd, P. R., Withers, D. J., and Siddle, K.: Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333:471-490, 1998.
- 3) Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D. R.: The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346:561-576, 2000.
- 4) Kobayashi, T., and Cohen, P.: Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate ogisogatutkubisutude 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem. J.* 339:319-328, 1999.
- 5) Park, J., Leong, M.L. L., Buse, P., Maiyar, A.C., Firestone, G. L., and hemmings, B. A.: Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18:3024-3033, 1999.
- 6) Alessi, D.R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., and Cohen, P.: Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* 7:261-269, 1997.
- 7) Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., and Hawkins, P. T.: Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*. 279:710-714, 1998.
- 8) Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B., and Thomas, G.: Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*. 279:707-710, 1998.

- 9) Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N., and Avruch, J.: 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr. Biol.* 8:69-81, 1998.
- 10) Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., and Parker, P. J.: Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*. 281:2042-2045, 1998.
- 11) Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C.-S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S., and Toker, A.: Regulation of protein kinase C α by PI3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* 8:1069-1077, 1998.
- 12) Dong, L. Q., Zhang, R.-B., Langlais, P., He, H., Matthew, C., Zhu, L., and Liu, F.: Primary structure, tissue distribution, and expression of mouse phosphoinositide-dependent protein kinase-1, a protein kinase that phosphorylates and activates protein kinase C ζ . *J. Biol. Chem.* 274:8117-8122, 1999.
- 13) Anderson, K. E., Coadwell, J., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T.: Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* 8:684-691, 1998.
- 14) Filippa, N., Sable, C. L., Hemmings, B. A., and Van Obberghen, E.: Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol. Cell. Biol.* 20:5712-5721, 2000.
- 15) Currie, R. A., Walker, K. S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C. P., Cohen, P., Alessi, D. R., and Lucocq, J.: Role of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem. J.* 337:575-583, 1999.
- 16) Kitamura, T., Ogawa, W., Sakaue, H., Hino, Y., Kuroda, S., Takata, M., Matsumoto, M., Maeda, T., Konishi, H., Kikkawa, U., and Kasuga, M.: Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* 18:3708-3717, 1998.
- 17) Kotani, K., Ogawa, W., Hino, Y., Kitamura, T., Ueno, H., Sano, W., Sutherland, C., Granner, D. K., and Kasuga, M.: Dominant negative forms of Akt (protein kinase B) and atypical protein kinase C λ do not prevent insulin inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274:21305-21312, 1999.
- 18) Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W., and Kasuga, M.: Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.* 19:6286-6296, 1999.
- 19) Kotani, K., Ogawa, W., Matsumoto, M., Kitamura, T., Sakaue, H., Hino, Y., Miyake, K., Sano, W., Akimoto, K., Ohno, S., and Kasuga, M.: Requirement of atypical protein kinase C λ for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18:6971-6982, 1998.
- 20) Kyriakis, J. M., and Avruch, J.: Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18:567-577, 1996.
- 21) Shaw, M., Cohen, P., and Alessi, D. R.: The activation of protein kinase B by H2O2 or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem. J.* 336:241-246, 1998.
- 22) Kuroda, S., Ogawa, W., Kitamura, T., Konishi, H., Kikkawa, U., and Kasuga, M.: Requirement of the serine-threonine kinase Akt for heat treatment-induced activation of

- p70 S6 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:781-785, 1998.
- 23) Casamayor, A., Morrice, N. A., and Alessi, D. R.: Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem. J.* 342:287-292, 1999.
- 24) Grillo, S., Gremeaux, T., Casamayor, A., Alessi, D. R., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.-F.: Peroxovanadate induces tyrosine phosphorylation of phosphoinositide-dependent protein kinase-1 potential involvement of src kinase. *Eur. J. Biochem.* 267:6642-6649, 2000.
- 25) Newton, A. C., and Johnson, J. E.: Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376:155-172, 1998.

Insulin-induced phosphorylation of 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1(PDK1) in CHO cells

Yasuhisa Hino

Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine,
7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan

PDK1 is a serine-threonine kinase that contributes to the phosphorylation and activation of various other protein kinases, including several that act downstream of phosphoinositide (PI) 3-kinase. In CHO cells expressing both recombinant PDK1 and insulin receptors, as well as heat shock and hydrogen peroxide each induced a shift in the electrophoretic mobility of PDK1. Labeling of cells with ^{32}P revealed that this mobility shift reflected an increase in PDK1 phosphorylation. The PI 3-kinase inhibitor wortmannin abolished the insulin-induced mobility shift of and incorporation of ^{32}P into PDK1, and a constitutively active mutant of PI 3-kinase induced the mobility shift in the absence of insulin. Insulin also induced similar shifts in the mobilities of two kinase-deficient mutants of PDK1, and dominant negative or constitutively active mutants of Akt or of the λ isoform of protein kinase C did not affect PDK1 mobility. Rapamycin, which inhibited p70 S6 kinase activation, did not affect the insulin-induced shift in PDK1 mobility. These results suggest that insulin induces phosphorylation of PDK1 by a PI 3-kinase-dependent mechanism, and that the kinase activity of PDK1 or signals mediated through Akt, p70 S6 kinase, or protein kinase C λ do not contribute to this effect.