Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-04-28

熱刺激依存性のAktの活性化機構の解析

藤田, 欣也

(Citation)
神戸大学医学部紀要,62(1/2):17-24

(Issue Date)
2001-12

(Resource Type)
departmental bulletin paper

(Version)
Version of Record

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/00097794

熱刺激依存性のAktの活性化機構の解析

藤 田 欣 也

神戸大学医学部内科学第二講座

連絡先：藤田欣也
神戸市中央区楠町７－５－１
TEL　078-382-5441
FAX　078-382-2080

（平成13年３月22日受付）

【要　約】

Aktは増殖因子刺激やストレス刺激依存性に活性化し多彩な生物学的作用に関わるセリンスレオニンキナーゼである。今回，熱刺激依存性のAktの活性化機構を検討した。CHO細胞では熱刺激によりAktの活性化と308位のスレオニン残基及び473位のセリン残基のリン酸化が生じた。Aktの308位スレオニン残基もしくは473位のセリン残基をアラニンに置換した変異体における熱刺激依存性のリン酸化を検討したところ，前者では473位の，後者では308位のリン酸化が生じ，各々の部位のリン酸化は野生型の同部位のリン酸化と同程度であった。このことから，これらの部位のリン酸化は独立した機構により生じることが示唆された。熱刺激依存性のAktのリン酸化及び活性化はIA型及びIB型 phosphatidylinositol（PI）３-キナーゼの薬理学的阻害剤であるワルトマニンにより阻害されたが，IA型PI ３-キナーゼを選択的に抑制する優位抑制型変異体の強制発現では抑制されなかった。このことから，熱刺激依存性のAktの活性化はIA型PI ３-キナーゼ以外のワルトマニン感受性因子によって制御されることが示唆された。

【緒　言】

Aktはそのアミノ末端にplekstrin homologyドメインを有するセリンスレオニンキナーゼであり，cAMP依存性プロテインキナーゼやプロテインキナーゼCに相同性を示すキナーゼドメインを有することからプロテインキナーゼ B（protein kinase B:PKB）とも呼ばれる(1)。Akt は血小板由来増殖因子やインスリンなどの増殖因子刺激により活性化されるが，高浸透圧，ずり応力，熱ショックといったストレス刺激によって活性化されることも報告されており，多彩な細胞外刺激に応答する情報伝達分子といえる(1)。

phosphatidylinositol（PI）３-キナーゼはPIのイノシトール環 のD３位をリン酸化する脂質リン酸化酸素であり，細胞増殖，小胞輸送，細胞遊走，遺伝子転写，アポトーシス抑制，インスリンの代謝調節作用など多くの生物学的作用の制御因子である(2)。PI ３-キナーゼは通常，4種のサブクラスに分類される(3)。分子量110kDaの触媒サブユニットとSrc homology（SH）２ドメインを有する調節サブユニットから構成されるIA型PI３-キナーゼは，最初に同定された PI３-キナーゼであり，細胞内で活性化するとPI，３，４-２リン酸やPI３，４，５-３リン酸を産生する(２，３)。増殖因子刺激によりチロシンキナーゼが活性化すると，IA型PI３-キナーゼはSH２ドメインを介してチロシンリン酸化蛋白と結合する(２，３)。IA型PI ３-キナーゼとチロシンリン酸化蛋白との結合を阻害するような変異調節サブユニット（Δp85)の強制発現により，増殖因子依存性のPI３，４-２リン酸，PI３，４，５-３リン酸の産生や種々の細胞応答が抑制されることから(４-６)，IA型PI ３-キナーゼはチロシンリン酸化蛋白と結合することにより活性化されると考えられている。IB型PI３-キナーゼも分子量110kDaの触媒サブユニットと調節サブユニットからなるが，IB型PI３-キナーゼの調節サブユニットはチロシンリン酸化蛋白とは結合せず，チロシンキナーゼの下流の情報伝達には関与しないと考えられている(２，３)。PI３-キナーゼの細胞内で機能の検討にはワルトマニンやLY294002といった薬理学的阻害剤が用いられるが，これらの阻害剤はIA型PI３-キナーゼ，IB型のPI３-キナーゼの両者の活性を

キーワード：PI ３キナーゼ，Akt，熱刺激，細胞内情報伝達

同程度に阻害することが知られている(2，3)。

増殖因子刺激によりAktが活性化される際にはAktの308位のスレオニン残基及び473位のセリン残基がリン酸化する(7)。これらの部位を中性アミノ酸に置換した変異体は増殖因子依存性の活性化が生じないことから(7)，同部位のリン酸化はAktの活性化に必須と考えられる。また，増殖因子依存性のAktの活性化はワルトマニンやLY294002，さらにはΔp85の強制発現により阻害されることから(1，9)，IA型PI3-キナーゼにより制御されると考えられる。

熱刺激依存性のAktの活性化におけるPI3-キナーゼの関与については不明な点が多い。COS細胞や3T3-L1細胞における熱刺激依存性のAktの活性化はワルトマニンで抑制されないことが報告されている(9，10)。一方，ShawらはSwiss 3T3細胞では熱刺激依存性のAktの活性化がLY294002で抑制されたと報告している(11)。また，熱刺激依存性にAktが活性化する際に308位のスレオニン残基及び473位のセリン残基のリン酸化が生じるか否かについては報告がない。そこで，本研究では，熱刺激依存性のAktのリン酸化，活性化におけるIA型PI3-キナーゼの関与について検討した。

【方　法】

細胞と抗体

CHO-IR細胞，エピトープタグを付加したAktを安定的に発現したCHO-IR細胞（CHO-IR／Akt細胞）及び抗Akt抗体は既報のごとく作成した(8)。Aktの308位リン酸化スレオニン残基特異的抗体，473位リン酸化セリン残基特異的抗体はNew England Biolab社より購入した。

プラスミドとアデノウイルスベクター

Aktの308位のスレオニン残基，473位のセリン残基をアラニンに置換した変異体はHAエピトープタグを付加したラットAkt1 cDNA(8)を用いて，Quick Change Site-directed Mutagenesis kit (Stratagene社）により作成し，各々の変異体をAkt-T308A，Akt-S473Aと名づけた。一過性発現実験では，CHO-IR細胞に蛋白発現ベクターSRαに挿入したAkt T308AまたはAkt-S473AをLipofectAMINE（GIBCO-BRL社）を用いて導入し，遺伝子導入40時間後に実験に供した。優位抑制型PI3-キナーゼ（Δp85)，優位抑制型SOS（ΔSOS）をコードするアデノウイルスベクターは既報のごとく作成した(12)。CHO-IR細胞，CHO-IR／Akt細胞へのアデノウイルスベクターの感染は既報のごとく行った(8)。

キナーゼ活性の測定

Aktの各種のコンストラクトを一過性に発現したCHO-IR細胞もしくはCHO-IR／Akt細胞を16時間血清除去の後，100nM，10分間のインスリン刺激もしくは45℃，10分間の熱刺激を行い，既報のごとく細胞可溶化分画を調整した(13)。細胞可溶化分画から抗HA抗体もしくは抗FLAG抗体を用いてAktを免疫沈降し，免疫沈降分画中のAkt活性をHiston 2Bを基質として既報のごとく測定した(8，13)。また，細胞可溶化分画を抗フォスフォチロシン抗体で免疫沈降し，免疫沈降分画中のPI3-キナーゼ活性を既報のごとく測定した(12)。

【結　果】

熱刺激によるAktの308位スレオニン残基及び473位セリン残基のリン酸化

我々は以前にCHO細胞に45℃の熱刺激を加えるとAktが活性化されることを報告している(13)。増殖因子刺激によるAktの活性化には308位のスレオニン残基及び473位のセリン残基のリン酸化が必須であることが報告されている(7)。そこで，熱刺激によりAktが活性化する際にも同部位のリン酸化が生じるか否かを部位特異的抗リン酸化セリン，スレオニン抗体を用いて検討した。CHO-IR細胞にHAエピトープを付加したAktを一過性に発現させ，熱刺激処理，非処理の後，細胞を可溶化し，抗HA抗体により免疫沈降を行った。免疫沈降物を308位リン酸化スレオニン抗体，473位リン酸化セリン抗体，抗Akt抗体を用いたイムノブロットに供した。各々の細胞でAktの発現量はほぼ同等であったが，熱刺激を行った細胞から得られた分画のみが，308位リン酸化スレオニン抗体，473位リン酸化セリン抗体によりイムノブロット上のバンドとして検出された（Fig. 1)。このことから，増殖因子刺激と同様に，熱刺激によってもAktの308位及び473位のリン酸化が生じることが示唆された。

次に308位スレオニン残基，473位セリン残基をアラニンに置換した変異体（Akt-T308A及びAkt-S473A）を用いて同様の検討を行った。Akt-S473Aは熱刺激により308位のリン酸化が，Akt-T308Aは熱刺激により473位のリン酸化が生じた（Fig. 1)。Akt-S473Aの308位のリン酸化，Akt-T308Aの473位のリン酸化は，各々野生型Aktの308位，473位のリン酸化と同程度であった。このことから，熱刺激によるAktの308位，473位のリン酸化は各々独立した機構により生じることが示唆された。

熱刺激依存性のAktのリン酸化，活性化における優位抑制型PI3-キナーゼとワルトマニンの効果

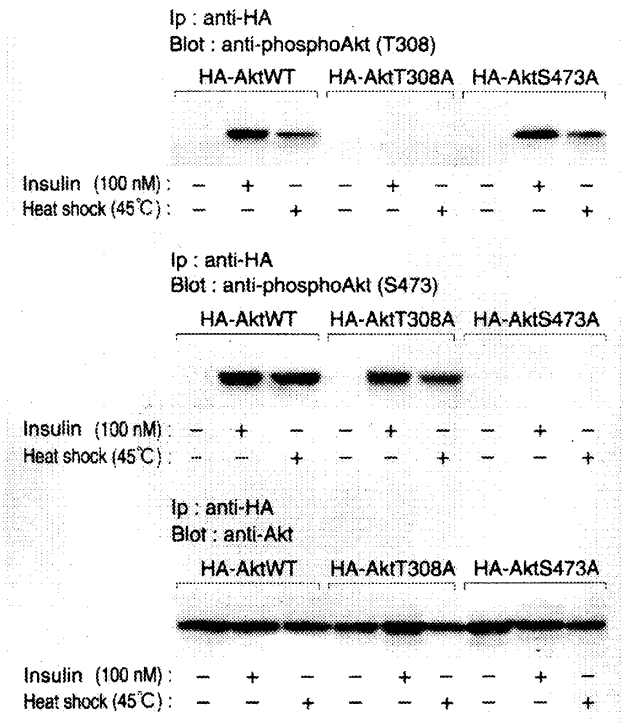


Fig.1

熱刺激とインスリンによるAktのリン酸化

CHO-IR 細胞にHAエピトープを付加した野生型 Akt (Akt WT), Akt-T308A, Akt-S473Aを一過性に発現させ，インスリン処理または熱処理を行った後，細胞を可溶化し抗HA抗体で免疫沈降した。免疫沈降物をAkt の308位リン酸化スレオニン残基特異的抗体(T308,上段)，473位リン酸化セリン残基特異的抗体(S473,中段)，抗Akt抗体（下段）を用いたイムノブロットに供した。

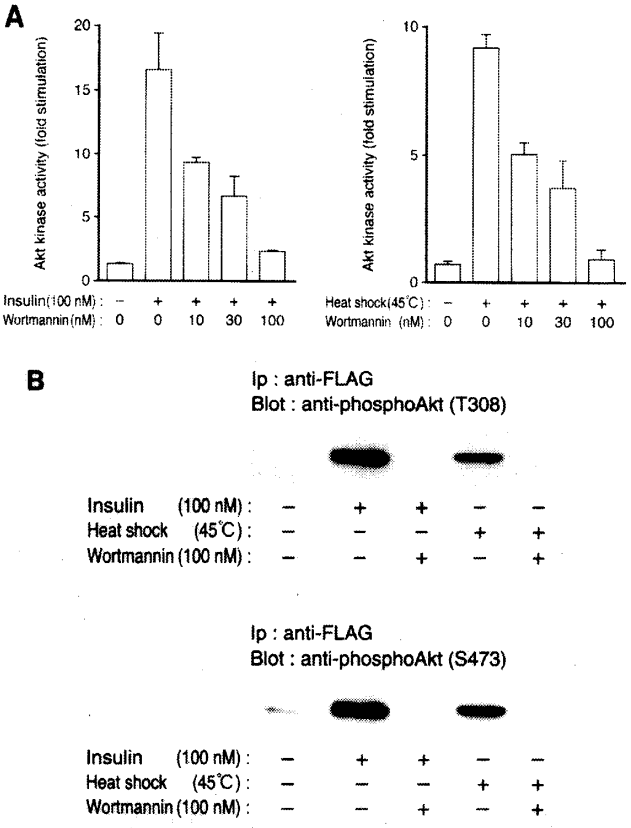


Fig.2.

熱刺激依存性のAkt活性化，リン酸化におけるワルトマニンの効果

（A） CHO-IR／Akt 細胞を各種濃度のワルトマニンで30分間前処理した後，インスリン処理または熱処理を行った。その後，細胞可溶化分画を抗FLAG抗体で免疫沈降し，免疫沈降分画中のAkt活性を測定した。

（B） CHO-IR／Akt 細胞を100nM のワルトマニンで30分間前処理した後，インスリン処理または熱処理を行い，細胞可溶化分画を抗FLAG抗体で免疫沈降し，免疫沈降分画をAktの308位リン酸化スレオニン残基特異的抗体，473位リン酸化セリン残基特異的抗体を用いたイムノブロットに供した。

次に熱刺激依存性のAkt のリン酸化，活性化におけるPI3-キナーゼの関与を検討した。インスリン受容体とFLAGエピトープタグを付加したAkt を安定的に発現させたCHO-IR／Akt 細胞をワルトマニンで30分間処理，非処理の後，インスリン刺激もしくは熱刺激を行い，抗FLAG抗体免疫沈降分画中のAkt活性を測定したところ，インスリンでは約17倍，熱刺激では約8倍のAkt の活性増強を認めた（Fig. 2 A)。いずれの刺激によるAkt の活性化もワルトマニンにより濃度依存性に抑制され，100nMワルトマニンの前処置により，ほぼ基礎値にまで低下した(Fig. 2 A)。また，インスリン依存性，熱刺激依存性のAkt の308位，473位のリン酸化もワルトマニンの前処置により，ほぼ完全に抑制された（Fig. 2 B)。

触媒サブユニットとの結合部位を欠失したIA型PI3-キナーゼの変異調節サブユニット（Δp85）は，チロシンリン酸化蛋白との結合を抑制することにより，IA型PI3-キナーゼ活性を特異的に抑制する(4)。そこで，次に，Δp85が熱刺激依存性のAkt のリン酸化，活性化に及ぼす影響を検討した。CHO-IR細胞をインスリンで処理すると，抗フォスフォチロシン抗体で免疫沈降されるPI3-キナーゼ活性は約15倍に増強したが，熱刺激は抗フォスフォチロシン抗体で免疫沈降されるPI3-キナーゼ活性に影響を与えなかった（Fig. 3 A)。アデノウイルスベクターを用いてΔp85を発現させた細胞では，インスリン依存性のPI3-キナーゼの活性化が容量依存性に抑制された（Fig. 3 A)。Δp85の発現はインスリンによるAkt の活性化を容量依存性に抑制したが，熱刺激依存性のAkt の活性化には影響がなかった（Fig. 3 B)。さらに，Δp85の発現はインスリンによるAkt の308位，473位のリン酸化を抑制したが，熱刺激による同部位のリン酸化には影響を与えなかった（Fig. 3 C)。

最後に熱刺激依存性のAkt の活性化におけるRASの関与を検討した。RASのGTP-GDP変換促進因

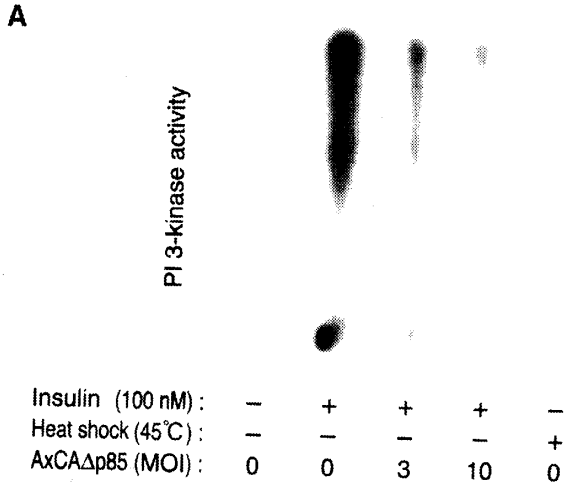
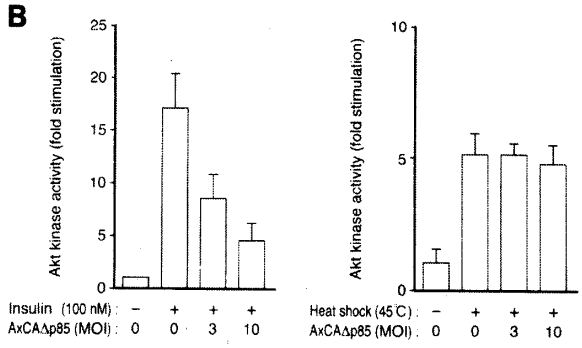
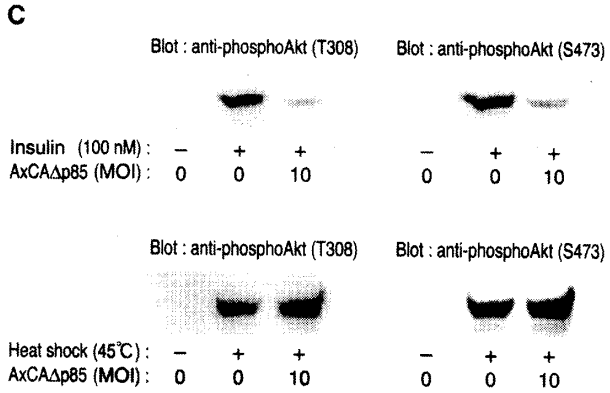


Fig.3
熱刺激依存性のAkt活性化，リン酸化におけるΔp85の効果

(A)　Δp85 のPI 3 - キナーゼ活性への影響。CHO-IR／Akt 細胞を各種ウイルス濃度(MOI : multiplicity of infection)のAxCAΔ85で感染させた。ウイルス感染48時間後，細胞にインスリン処理または熱処理を行い，抗フォスフォチロシン抗体で沈降するPI 3 - キナーゼ活性を測定した。



(B)　AxCAΔp85を感染させた CHO-IR／Akt 胞をインスリン処理または熱処理の後，抗FLAG抗体免疫沈降分画中のAkt 活性を測定した。



(C)　AxCAΔp85を感染させた CHO-IR／Akt 細胞をインスリン処理または熱処理の後，細胞可溶化分画をAkt の308位リン酸化スレオニン残基特異的抗体，473位リン酸化セリン残基特異的抗体を用いたイムノブロットに供した。

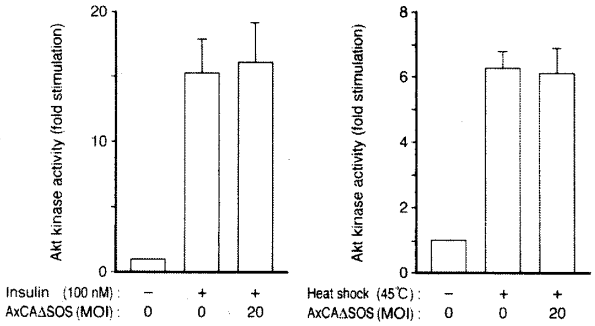


Fig.4
熱刺激依存性のAkt活性化，リン酸化におけるΔSOSの効果

CHO-IR／Akt 細胞にΔSOSをコードするアデノウイルスベクター(AxCAΔSOS)をMOI20 で感染させた後，インスリン処理または熱処理を行い，抗FLAG抗体免疫沈降分画中のAkt 活性を測定した。

子であるSOSの触媒ドメインを欠失した変異体(ΔSOS)は，RAS - MAPキナーゼの活性化を抑制する(12, 14)。アデノウイルスベクターを用いてCHO-IR／Akt 細胞にΔSOSを発現させてもインスリン依存性，熱依存性のAkt の活性化には影響がなかった(Fig. 4)。以上のことから，熱刺激依存性のAkt の活性化にはIA型PI 3 - キナーゼを介した経路及びSOS - RASを介した経路は関与しないことが示唆された。

【考　　察】

今回の検討では熱刺激によるAkt の活性化の際に，増殖因子刺激時と同様に，308位スレオニン残基及び473位セリン残基のリン酸化が生じることが明らかとなった。ある種の蛋白キナーゼは活性化する際にキナーゼ自身の複数のセリン，スレオニン残基のリン酸化を伴うことが知られている(15)。また，蛋白キナーゼのリン酸化は段階的に生じることも報告されている。たとえば，p70S 6 キナーゼの場合，活性の発現に必須である229位のセリン残基のリン酸化が生じるには，前もって，389位のスレオニン残基がリン酸化をうけることが必要であり(16, 17)，増殖因子刺激によるAkt の活性化の際にも，308位スレオニン残基のリン酸化が473位セリン残基のリン酸化に影響を及ぼす可能性が報告されている(18)。今回の検討では，熱刺激依存性にAkt - S473Aの308位，Akt - T308Aの473位のリン酸化が生じ，各々の残基のリン酸化は野生型Akt の同部位のリン酸化と同程度であった。このことから，熱刺激によるAkt の308位，473位のリン酸化は各々独立した機構により生じ，互いのリン酸化には影響を与えない可能性が示唆された。

増殖因子によるAkt のリン酸化，活性化はPI 3 - キ

ナーゼの薬理学的阻害剤であるワルトマニンにより抑制されることが知られているが，高浸透圧や酸化ストレスなどの細胞外ストレス依存性のAktの活性化におけるワルトマニンの効果については一定の見解がえられていない(9-11)。今回の検討では，CHO細胞では熱刺激依存性のAktの活性化及び308位，473位のリン酸化はPI3-キナーゼの薬理学的阻害剤であるワルトマニンにより抑制されることが明らかとなった。ところが，IA型PI3-キナーゼを選択的に抑制するPI3-キナーゼの優位抑制型変異体（Δp85）は，インスリン依存性のAktのリン酸化，活性化を抑制したが，熱刺激依存性のAktのリン酸化，活性化には影響を及ぼさなかった。このことは，熱刺激依存性のAktの活性化には，ワルトマニンに感受性のある分子が関与するものの，IA型PI3-キナーゼ経路は関与しないことを示唆するものと考えられる。IA型PI3-キナーゼはチロシンリン酸化蛋白との結合により活性化し，細胞内でPI3，4P2やPI3，4，5P3を産生し，多彩な細胞内情報伝達経路を活性化する(2)。CHO細胞に熱刺激を加えてもチロシンリン酸化蛋白に結合するPI3-キナーゼ活性の増強はみられなかったことからも，IA型PI3-キナーゼは熱刺激依存性のAkt活性化機構には主要な役割を果たさないことが示唆される。

低分子量G蛋白質RASのAktの活性化への関与を示唆する成績がある(19)。また，RASがIA型，IB型PI3-キナーゼに直接結合し活性化することも報告されている(20)。しかし，CHO細胞において RAS-MAPキナーゼ経路の活性化を十分に抑制できる量の優位抑制型SOSを発現させても(8)，熱刺激依存性のAktの活性化には影響がなく，RASを介した経路も熱刺激によるAktの活性化には関与しないことが示唆される。

現時点では熱刺激依存性のAkt活性化に関与するワルトマニンの標的分子の本体は明らかではない。IB型PI3-キナーゼはIA型PI3-キナーゼとほぼ同程度のワルトマニン感受性を示すことから(3)，熱刺激によるAkt活性化を制御する因子の候補の一つと考えられる。IA型PI3-キナーゼと比較してIB型PI3-キナーゼの生理作用については不明な点が多い。また，その活性化機構についても，3量体型G蛋白質のシグナルにより活性化される可能性が指摘されているのみである(20, 21)。熱刺激によって活性化されるワルトマニン感受性分子の同定がAktの活性化機構を考える上で重要な課題と思われる。

【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。

【文　献】

1) Coffer, P. J., Jin, J., Woodget, J. R. Protein kinase-B (c-AKT) : a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem. J. 335 : 1-13, 1998.

2) Shepherd P. R., Withers, D. J., Siddle, K. Phosphoinositide 3-kinase : the key switch mechanism in insulin signalling. Biochem. J. 333 : 471-490, 1998.

3) Vanhaesebroeck, B., Leevers, S. J., Panayotou, G. Waterfield, M. D. Phosphoinositide 3-kinases : a conserved family of signal transducers. Trends, Biochem. Sci. 22 : 267-272, 1997.

4) Hara,K., Yonezawa,K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T, Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T. R., Hawkins, P. T., Dhand, R., Clarke, A. E., Holman, G. D., Waterfield, M. D., Kasuga, M. 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91 : 7415-7419, 1994.

5) Kotani, K., Ogawa, W., Hino, Y., Kitamura, T., Ueno, H., Sano, W., Sutherland, C., Granner, D. K., Kasuga. M. Dominant negative forms of Akt (protein kinase B) and atypical protein kinase Cλ do not prevent insulin inhibition of phosphoenolpyuvate carboxykinase gene transcription. J. Biol. Chem. 274 : 21305-21312, 1999.

6) Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W., Kasuga, M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide

phosphodiesterase 3 B by the serine-threonine kinase Akt. Mol. Cell. Biol. 19 : 6286 - 6296, 1999.

7) Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B. A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO. J. 15 : 6541 - 6551, 1996.

8) Kitamura, T., Ogawa, W., Sakaue, H., Hino, Y., Kuroda, S., Takata, M., Matsumoto, M., Maeda, T., Konishi, H., Kikkawa, U., 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.

9) Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Ono, Y., Tokunaga, C., Kuroda, S., Kikkawa, U. Activation of RAC - protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3 - kinase.Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 : 7639 - 7643, 1996.

10) Tirosh, A., Potashnik, R., Bashan, N., Rudich, A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistrbution of insulin receptor substrate - 1 and phosphatidylinositol 3 - kinase in 3 T 3 - L 1 adipocytes.A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT 4 translocation. J. Biol. Chem. 274 : 10595 - 10602, 1999.

11) Shaw, M., Cohen, P., Alessi, D. R. The activation of protein kinase B by H_2O_2 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.

12) Sakaue, H., Ogawa, W., Takata, M., Kuroda, S., Kotani, K., Matsumoto, M., Sakaue, M., Nishio, S., Ueno, H., Kasuga, M. Phosphoinositide 3 - kinase is required for insulin-induced but not for growth hormone - or hyperosmolarity - induced glucose uptake in 3 T 3 - L 1 adipocytes. Mol. Endocrinol. 11 : 1552 - 1562, 1997.

13) Kuroda, S., Ogawa, W., Kitamura, T., Konishi H., Kikkawa, U., Kasuga, M. Requirement of the serine - threonine kinase Akt for heat treatment - induced activation of p70 S 6 kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249 : 781 - 785, 1998.

14) Sakaue, M., Bowtell, D., Kasuga, M. A dominant - negative mutant of mSOS1 inhibits insulin - induced Ras activation and reveals Ras - dependent and - independent insulin signaling pathways. Mol. Cell. Biol. 15 : 379 - 388, 1995.

15) Mellor, H., Parker, P. J., The extended protein kinase C superfamily. Biochem. J. 332 : 281 - 292, 1998.

16) Dennis, P. B., Pullen, N., Pearson, R. B., Kozma, S. C., Thomas, G. Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70 (s 6 k) activation loop phosphorylation. J. Biol. Chem. 273 : 14845 - 14852, 1998.

17) Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B. A., Thomas, G. Phosphorylation and activation of p70s 6 k by PDKI. Science. 279 : 707 - 710, 1998.

18) Toker, A., Newton, A. C. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK - 2 site. J. Biol. Chem. 275 : 8271 - 8274, 2000.

19) Datta, K., Bellacosa, A., Chan, T. O., Tsichlis, P. N. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3 - kinase. Activation by growth factors, v - src and v - Ha - ras, in Sf9 and mammalian cells. J. Biol. Chem. 271 : 30835 - 30839, 1996.

20) Downward, J. Role of phosphoinositide - 3 - OH kinase in Ras signaling. Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. 31 : 1 - 10, 1997.

21) Stephens, L. R., Eguinoa, A., Erdjument - Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A. S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., Hawkins, P. T. The G $\beta\gamma$ sensitivity of a PI3K is

dependent upon a tightly associated adaptor, p101. Cell. 89 : 105 - 114, 1997.

22) Stoyanov. B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B. Dhand, R., Nurnberg, B., Gierschik, P., Seedorf, K., Hsuan, J. J., Waterfield, M. D., Wetzker, P. Cloning and characterzation of a G protein activared human phosphoinositide - 3 kinase. Science. : 269 : 690 - 693. 1995.

Regulation of heat shock-induced activation of Akt

Kinnya Fujita

Second Department of Internal Medicine
Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

Akt is a serine/threonine kinase activated in response to a variety of extracellular stimuli. In this study, regulation of heat shock-induced activation of Akt was investigated. Thr308 and Ser473 of Akt become phosphorylated in response to heat shock.Upon heat shock,Akt mutants in which either Thr308 or Ser473 were replaced by alanine were phosphorylated at Ser473 or Thr308, respectively, suggesting that phoshphorylation of these two sites are independently regulated Phosphorylation of Thr308 and Ser473 as well as kinase activity of Akt induced by heat shock were inhibited by wortmannin, an inhibitor of both class IA and class IB phosphatydilinositol (PI) 3-kinase.However, a dominant negative mutant of class IA PI-3 kinase, a mutant regulatory subunit lacking the biding site for its catalytic subunit, did not affect heat shock-induced activation and phosphorylation of Akt. These results suggest that a wortmannin-sensitive pathway that is distinct from class IA PI 3-kinase is involved in heat-shock induced Akt activation.