



# Phosphorylation of type II ( $\beta$ ) protein kinase C by casein kinase II

富永, 正寛

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1025

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001025>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	とみ なが まさ ひろ 富 永 正 寛 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第754号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成3年9月30日
学位論文題目	Phosphorylation of Type II ( $\beta$ ) Protein Kinase C by Casein Kinase II (Casein Kinase IIによるtype II ( $\beta$ ) Protein Kinase Cのリン酸化反応)
審査委員	主査 教授 西 塚 泰 美 教授 尾 原 秀 史 教授 斎 藤 洋 一

## 論文内容の要旨

### 緒 言

Protein Kinase C (以下PKC) は、 $\text{Ca}^{2+}$ /リン脂質依存性の Ser/Thr 蛋白質リン酸化酵素であり、細胞内情報伝達機構の鍵を握る酵素と考えられている。最近PKCには、cDNAクローニングの結果から少なくとも3種類の分子種、type I ( $\gamma$ )、type II ( $\beta$  I +  $\beta$  II)、type III ( $\alpha$ ) が存在し、それぞれの分子種によって活性化の様相や組織分布に差がみられることが明らかになってきた。またこれまでに、PKC分子の自己リン酸化反応が見出され、PKCの活性調節あるいは、細胞内局在への関与が議論されている。一方、Casein Kinase II (以下CK-II) も、広く体内組織に分布する Ser/Thr 蛋白質リン酸化酵素であるが、インスリンや各種の成長因子により活性調節をうけることが報告されており、細胞増殖や分化におけるCK-IIの役割が示唆されている。本研究では、CK-IIによるPKC分子種のリン酸化について解析を行なった。その結果CK-IIによるPKCのリン酸化は、type II ( $\beta$ ) 特異的であり、しかも $\text{Ca}^{2+}$ /リン脂質依存下の膜に結合した活性型のPKCが選択的にリン酸化をうけることが明らかになった。これらの結果は、type II PKCに特徴的な調節機構の存在する可能性を示唆している。

### 実験方法および結果

#### 1. CK-IIによるPKC分子種のリン酸化

3種類のPKC分子種、type I ( $\gamma$ )、type II ( $\beta$  I +  $\beta$  II)、type III ( $\alpha$ ) はラット脳よりハイドロキシアパタイトカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにて分離・精製した。一方CK-II

は、ラット肺より Takio らの方法により精製した。CK-ⅡによるPKCのリン酸化反応は、50 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) pH7, 0.15M NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50 μM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P GTP (5~10×10<sup>5</sup>cpm), 0.1 μM poly-L-lysine, 10 μg/ml phosphatidylserine (PS), 1 μg/ml diolein (DO), 0.3mM CaCl<sub>2</sub>, PKC (1.8 μg), CK-Ⅱ (0.12 μg) を含み、30°C, 15分間反応の後、Lemmli sample buffer にて反応を停止し、電気泳動後、autoradiography にてリン酸化を定量した。TypeⅡPKCは、CK-Ⅱ非存在下ではリン酸化されず、CK-Ⅱ存在下のみリン酸化をうけた。この際、PKC 1 mol当たり0.2~0.3molのリン酸が取り込まれた。一方、typeⅢPKCはCK-Ⅱによってはほとんどリン酸化されなかった。また、typeⅠPKCは、CK-Ⅱ非存在下でもリン酸化が観察され、CK-Ⅱ存在下によりごく微量のリン酸化の増加が認められるものの、そのリン酸化のほとんどが自己リン酸化反応によるものと考えられた。以上より、typeⅡPKCがCK-Ⅱにより選択的にリン酸化をうけることが判明した。

## 2. CK-ⅡによるPKCのリン酸化におけるpoly-L-lysine及びheparinの効果

Poly-L-lysine 及び heparin は、それぞれCK-Ⅱの activator 及び inhibitor であることが知られている。上記の反応液中に poly-L-lysine (30~100nM) 或いは heparin (30~100nM) を添加し、CK-Ⅱによる typeⅡPKCのリン酸化を比較定量した。同時にCK-Ⅱによる casein のリン酸化についても poly-L-lysine 及び heparin の効果を検討した。CK-Ⅱによる casein 及び typeⅡPKCのリン酸化は、いずれも activator である poly-L-lysine によって促進され、inhibitor である heparin により抑制されることから、typeⅡPKCのリン酸化が実際にCK-Ⅱによるものであることが裏づけられた。

## 3. CK-ⅡによるtypeⅡPKCのリン酸化部位

PKC分子種は、分子種間でほとんど構造の一定した4個の領域(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)とこの4領域を取り囲む構造の異なる5個の領域(V<sub>1</sub>~V<sub>5</sub>)から成り立ち、N末端側のC<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>領域を含む調節ドメインとC末端側のC<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>領域を含む活性ドメインより構成されている。CK-Ⅱによる typeⅡPKCのリン酸化部位を同定するため、リン酸化をうけたtypeⅡPKCをトリプシン分解とそれに続く Asp-N と Glu-C プロテアーゼのよる分解を行い、リン酸化ペプチドを高速液体クロマトグラフィーにより分離した。得られたリン酸化ペプチドのアミノ酸配列の解析から、リン酸化部位は、調節ドメインの中のV<sub>1</sub>領域の Ser-11であることが決定された。CK-Ⅱが認識するリン酸化部位については、リン酸化をうける Ser 及び Thr 残基のC末端側に Clu あるいは Asp の酸性アミノ酸残基を伴う基本構造が知られている。今回CK-Ⅱによりリン酸化された typeⅡPKCの Ser-11のC末端側にはGluが3残基集合して存在しており、CK-Ⅱが認識するリン酸化部位の典型的特徴を保持していた。

## 4. Ca<sup>2+</sup>, phosphatidylserine 及び diolein の効果

CK-Ⅱによる typeⅡPKCのリン酸化におけるCa<sup>2+</sup>, PSおよびDOの依存性を検討した。PKCは、Ca<sup>2+</sup>, PS及びDOによって細胞質から細胞膜へ移行し活性型になることが知られている。TypeⅡPKCは、Ca<sup>2+</sup>, PS及びDO存在下で最も強くCK-Ⅱによりリン酸化をうけ、さらにこれらの活性化因子は、PKCの活性化と同じ様式でPKCのCK-Ⅱによるリン酸化を促進した。一方CK-Ⅱによる

casein のリン酸化は、これらの因子によって影響を受けないことが示された。従って、これらの活性化因子は基質であるPKCに作用しPKCを活性型に変換することにより、そのCK-IIによるリン酸化を高めていることが示された。即ち、細胞刺激に対応して細胞膜に移行した活性型のtype II PKCが選択的にCK-IIによってリン酸化されることが示唆された。

#### 5. Phosphorylated及びnon-phosphorylated type II PKCの分離・比較

Type II PKCをCK-IIによりリン酸化し、DEAE-5PW カラムクロマトグラフィーにより、Phosphorylated 及び non-phosphorylated type II PKCに分離した。各分画の活性、電気泳動後の蛋白染色及び autoradiography により、DEAE-5PWカラムから溶出される最初のピークは non-phosphorylated PKC、2 番目のピークは phosphorylated PKCであることが示された。Non-phosphorylated PKCと phosphorylated PKCについて、H1 histone 合成ペプチドを基質としてそれぞれの $\text{Ca}^{2+}$ 、PS及びDOによる活性化を比較したが有為な差は見られなかった。

### 考 察

Casein kinasesは、幅広く哺乳動物の細胞に存在しており、DEAEセルロースカラムにより Casein kinase I (以下CK-I) とCK-IIに分離される。CK-Iは、phosphate donor としてATPのみを特異的に用いるのに対し、CK-IIは、ATPと同様GTPも phosphate donor として用いることができる。一方PKCは、自己リン酸化反応も含めて基質のリン酸化反応にはATPを用いることが知られている。これらの理由で、CK-IによるPKCのリン酸化反応の解析に、PKCの自己リン酸化反応の影響を除外するためのGTPを用いた。PKCがリン酸化される反応としては、他にPKC自身の自己リン酸化反応やCK-IIによるリン酸化反応が報告されている。これらの場合は、PKC分子種がすべてリン酸化され、また調節ドメインと活性ドメインの両者がリン酸化される。しかし今回示されたごとく、CK-IIによるPKCのリン酸化は、PKC分子種のうち type II ( $\beta$ ) に特異的であり、特に膜に結合した活性型のtype II PKCが選択的にリン酸化される。またそのリン酸化部位も、調節ドメインのV 領域中のSer-11に限局されている。PKCが細胞増殖や分化に重要な役割を担う酵素であるのはすでに報告されてきた。これに対してCK-IIに関しては、最近細胞内CK-II活性が成長因子によって急速に増大することが報告されている。また、type II 及び III PKCは、phorbol ester によるdown-regulation 及び retinoic acid のよるHL-60細胞の分化の際には、それぞれ異なる調節をうけることも示唆されている。CK-IIによるPKCのリン酸化反応の生理的意義は現在不明であるが、リン酸化部位が phorbol ester 結合領域に接近していることや、またPKCの活性化に連動していることから、type II PKCに得意的な細胞局在や down-regulation 関与している可能性が示唆される。

### 論文審査の結果の要旨

細胞の表面に到達したシグナルがその後どのようにして細胞内へ伝達されるかは現在注目を集める研究課題であるが、その一つの様式として、いくつかの異なった蛋白質磷酸化酵素が活性化の連鎖反

応をおこし、最終的に細胞核や、代謝の機能を調節している酵素などの作用を左右する仕組みが有力視されている。例えば、EGFやインスリン等によって活性を顕わしたチロシン・キナーゼがある機序を介してMAP・キナーゼを活性化、それがS6・キナーゼを磷酸化してそれを活性化する等の可能性はその典型的な例である。プロテイン・キナーゼC (PKC) も、このような蛋白質磷酸化反応のカスケードの中に組みこまれている可能性があり、ことに $\epsilon$ -PKC等についてはその妥当性の検討が開始されているが、なお明瞭なことは判っていない。

本学位申請者は、このような状況の中で、PKCが蛋白質磷酸化反応のカスケードの中に組み込まれている一つの可能性として、カゼイン・キナーゼとPKCとの相互作用について検討を加えた。カゼイン・キナーゼは2種類の存在が知られていて、細胞核の中に圧倒的に強い活性を示し、遺伝子活性の調節に関与することが知られている他、細胞質にも存在し、種々の生体機能の調節にかかわっていると考えられている。本申請者は、PKCの多くの分子種の中で $\beta$  II分子腫のみがカゼイン・キナーゼIIによって選択的に磷酸化を受けることを見出した。そこでこの反応の詳しい解析を行った結果、その磷酸化部位がPKCの活性調節部位の中でN末端より11番目のセリン残基であることを同定した。この反応の結果として、 $\beta$  II-PKCの活性の強弱には直接的な影響は与えないが、その部位が活性調節部位に存在していること、またPKCの調節因子である種々の脂質の存在に強く影響されることから、 $\beta$  II-PKCの活性の接続に関与する可能性が示唆された。

カゼイン・キナーゼは最近、多くの増殖因子の作用によってその活性の上昇が観察されているので、増殖因子が $\beta$  II-PKCの活性連動している可能性がある。このように本研究はこれまで明らかではなかったPKCと他の蛋白質磷酸化酵素、ことにカゼイン・キナーゼとのクロストークの可能性を開いたもので価値ある業績と認める。よって博士(医学)の学位を得る資格があると認める。