



# Analysis of the function of protein kinase PKN under heat stress

Kitagawa, Michinori

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Date of Publication)

2008-04-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1910

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3156311>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001910>

※ 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）	きた がわ みち のり 北 川 道 憲	（大阪府）
博士の専攻 分野の名称	博 士（理 学）	
学位記番号	博い第107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11年3月31日	
学位論文題目	Analysis of the function of protein kinase PKN under heat stress （熱ストレス下における蛋白質磷酸化酵素 PKN の機能解析）	

審 査 委 員	主査 教授 小 野 功 貴	
	教授 松 田 吉 弘	教授 中 村 千 春

### 論 文 内 容 の 要 旨

PKN は、カルボキシル末端にプロテインキナーゼ C (PKC) ファミリーと相同性の高い触媒領域を持ちながら、そのアミノ末端にはロイシンジッパー様構造の繰り返しを有するユニークな蛋白質磷酸化酵素である。その酵素学的解析から、PKN はアラキドン酸等の不飽和脂肪酸によって活性化されることが明らかとなったが、PKC の活性化因子である  $\text{Ca}^{2+}$ /PS/DO による活性化は見られなかった。さらに、PKN は、熱刺激等のストレスによって細胞質から核内へ移行することが知られており、シグナル伝達において独特の位置付けがなされることが予想された。様々なストレスに対する細胞内シグナル伝達機構については、これまでに多くの詳細な解析がなされており、蛋白質磷酸化酵素がその伝達経路において重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、UV・浸透圧刺激等に対しては、蛋白質磷酸化酵素から成る MAP キナーゼカスケードの活性化が起り、MAP キナーゼの核移行・核内転写因子の磷酸化を経て、種々の遺伝子発現を誘導するシグナル伝達経路が明らかとなっている。熱刺激は、熱ストレス蛋白質 (HSP) の発現を誘導する刺激として知られているが、この熱刺激に対するシグナル伝達についても蛋白質磷酸化酵素の関与を示唆する報告が多い。哺乳類動物細胞においては、この HSP の発現は熱ストレス転写因子 (HSF1) によって制御されていることが知られている。HSF1 は熱刺激に応じて磷酸化を受けること・HSF1 を欠落した細胞は熱耐性が減少すること・熱刺激に応じた HSP の発現誘導は蛋白質磷酸化酵素阻害剤として知られているスタウロsporin によって抑制されること等が知られており、熱刺激に対するシグナル伝達において HSF1 の磷酸化が極めて重要な役割を果たしていると考えられるが、HSF1 を活性化する蛋白質磷酸化酵素はいまだ報告されていない。さらに、熱刺激は、細胞内におけるアラキドン酸遊離を起し、HSP の発現を促進することも報告されている。PKN の熱刺激に応じた細胞内局在の変化をこれらの報告と合わせて考慮すると、PKN が熱刺激に対するシグナル伝達に関わっている可能性が高いと考えられた。そこで、この HSF1 を介した HSP の発現調節機構における PKN の機能解析を行った。

まず、HeLaS3 細胞において PKN と HSF1 を共発現し、熱応答性 HSP の発現量の変化を検討した。その結果、PKN/AF3 (PKN の活性化型断片) のみ過剰発現した場合には、各種 HSP の発現量に全

く変化が見られなかったが、PKN/AF3をHSF1と共発現した場合には、HSPの1つである $\alpha$ B-cyrstallinの発現量の増加が見られた。さらに、燐酸化活性を失う点変異を導入した(PKN/AF3(K644E))を共発現した場合、あるいはPKN/AF3をその燐酸化活性阻害剤であるスタウロスポリン存在下において共発現した場合には、この $\alpha$ Bクリスタリンの発現量の増加が全くみられなかったことから、PKN/AF3の燐酸化活性がHSF1を介した $\alpha$ B-cyrstallinの発現調節に関与している可能性が示唆された。また、前述の解析から、 $\alpha$ B-cyrstallinの増加には核局在型HSF1が必要であること、さらに、HSF1のゲルシフト解析から、PKN/AF3はHSF1のDNA結合能には何ら影響を与えないことが明らかとなり、PKN/AF3によりHSF1の転写活性が活性化されることが示唆された。しかし一方で、HSP70・HSP27の発現量には全く変化が見られないことから、これらの蛋白質が転写段階で異なる制御を受けていることが考えられた。そこで、HSP70または $\alpha$ B-cyrstallinの転写活性制御領域をluciferaseレポーター遺伝子上流に組み込み、その転写制御に対するPKNの影響を検討した。その結果、HSF1とPKN/AF3の共発現が $\alpha$ B-cyrstallinの転写活性制御領域に対して転写活性促進を起こすことが見出されたが、HSP70に対してはその効果が見られなかった。さらに、その $\alpha$ B-cyrstallinの複写活性制御領域の欠失体を作成し、解析を進めた結果、その転写活性化が $\alpha$ B-cyrstallin上に存在する2つの熱ショック応答領域(HSE)を介して起こっている事が明らかとなった。

以上の事から、PKNが、HSF1を介した $\alpha$ B-cyrstallinの転写・発現誘導に関与する可能性が示唆された。PKNが直接HSF1を燐酸化し、その転写活性を上昇させているのか、あるいは、PKNが他の何らかの因子に作用し、HSF1と協調的に働いて $\alpha$ B-cyrstallinの発現を誘導しているのかは、今後さらに詳細な解析を進めることが必要である。一方、他のHSPに関しては、何ら変化が見られなかったことから、 $\alpha$ B-cyrstallin特異的に転写・発現を誘導する機構が存在すると考えられる。神経変性疾患の一つであるアレキサンダー病等、 $\alpha$ B-cyrstallinのみ発現量の増加が見られる現象がいくつか報告されており、今後、PKNの生理的機能を明らかにする事がこれらの現象を解明する上で重要であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

蛋白質燐酸化酵素は、細胞の増殖・分化・細胞周期などの制御において重要な役割を果たすことが知られており、各種蛋白質燐酸化酵素の活性制御機構の解明・その基質となる標的蛋白質の同定は、各酵素の細胞内情報伝達機構における位置付けを解明する上で極めて重要である。本研究においては、蛋白質燐酸化酵素PKNの細胞内局在の変化に注目して、本酵素の生理的機能を解明する事を目的としている。

PKNは、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸によって活性化される蛋白質燐酸化酵素であるが、PKCと相同性の高い触媒領域を持ちながら、そのアミノ末端にロイシンジッパー様構造の繰り返しを有するユニークな蛋白質燐酸化酵素である。さらに、PKNが熱ストレス等のストレス刺激によって細胞質から核内へ移行することが知られており、シグナル伝達において独特の位置付けがなされる事が予想されている。様々なストレスに対する細胞内シグナル伝達機構については、これまでに多くの詳細な解析がなされており、特に熱ショック蛋白質(HSP)の発現等、熱ストレスによるシグナル伝達については蛋白質燐酸化酵素の関与を示唆する報告が多い。さらに、熱ストレスが細胞内におけるアラキドン酸遊離をおこし、HSPの発現を促進することも報告されている。哺乳類動物細胞においては、このHSPの発現は転写因子HSF1によって制御されていることが知られており、熱刺激に応じてこ

の転写因子自体が燐酸化されること・HSF1を欠落した細胞は熱耐性が減少すること等から、熱刺激に対するシグナル伝達において不可欠な因子であると考えられているが、その転写因子を活性化する蛋白質燐酸化酵素はいまだ報告されていない。PKNの熱ストレスに応じた細胞内局在の変化をこれらの報告と合わせて考慮すると、PKNが熱ストレスによるシグナル伝達に関わっている可能性が高いと考えられる。そこで本申請者は、このHSF1を介したHSPの発現調節制御におけるPKNの機能解析を行った。

本申請者は、まず、HeLaS3細胞においてPKNとHSF1を共発現し、熱応答性HSPの転写・発現量の変化を検討した結果、PKN/AF3（PKNの活性化型断片）をHSF1と共発現した時のみ、HSPの1つである $\alpha$ B-cyrstallinの発現量の増加を見出した。さらに、燐酸化活性を失う点変異を導入したPKN/AF3を共発現した場合、あるいはPKN/AF3をその阻害剤であるスタウロポリン存在下において共発現した場合には、この $\alpha$ Bクリスタリンの発現量の増加が全くみられなかったことから、PKNの燐酸化活性がHSF1を介した $\alpha$ B-cyrstallinの発現調節に関与している可能性を示唆した。また、この $\alpha$ B-cyrstallinの増加には核局在型HSF1が必要であること・PKN/AF3はHSF1のDNA結合能には何ら影響を与えないことから、PKN/AF3によりHSF1の転写活性が活性化されることも示唆された。しかし一方で、HSP70、HSP27の発現量は変化しないのに対して $\alpha$ B-cyrstallinのみ増加が見られたことから、これらの蛋白質が転写段階で異なる制御を受けていることが考えられた。そこで、本申請者は、HSP70または $\alpha$ B-cyrstallinの転写活性制御領域をluciferaseレポーター遺伝子上流に組み込み、その転写制御に対するPKNの影響を検討した。その結果、HSF1とPKN/AF3の共発現が $\alpha$ B-cyrstallinの転写活性制御領域に対して転写活性促進を起こすことが見出されたが、HSP70に対してはその効果が見られなかった。さらに、その $\alpha$ B-cyrstallinの転写活性制御領域の欠失体を作成し、解析を進めた結果、その転写活性化が $\alpha$ B-cyrstallin上に存在する2つの熱ショック応答領域（HSE）を介して起こっている事を明らかにした。

以上の結果は、PKNがHSPの1つである $\alpha$ B-cyrstallinの転写制御に関与する可能性を初めて示したものであり、 $\alpha$ B-cyrstallinをはじめとする各種HSPの発現制御機構を考えるうえで重要な知見であると思われる。PKNの燐酸化活性が直接HSF1を活性化しているのか、あるいはPKNが他の転写因子のシグナル伝達系に作用してHSF1と協調的に転写活性を上昇させているのか等の解析が必要ではあるが、PKNの核内での機能、特に転写制御における役割に示唆を与えるものである。

以上のように、本研究は、蛋白質燐酸化酵素PKNの生理機能をその細胞内局在に着目して解析を進めたものであり、本酵素の細胞内情報伝達機構における役割を考えるうえで重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者北川 道憲は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。