



タンパク質リン酸化酵素PKBの活性制御機構とその機能の解析

松崎, 秀紀

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2001-03-31

(Date of Publication)

2013-07-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2251

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002251>

※ 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。



博士論文

タンパク質リン酸化酵素 PKB の活性制御機構と
その機能の解析

平成13年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

松崎 秀紀

目次

第1章 要旨	2
第2章 略語	5
第3章 序論	6
第4章 材料と方法	9
第5章 結果	
第1節 ストレスによる PKB の活性化	14
第2節 熱ショックによる PKB 活性化の分子機構	18
第6章 考察	22
第7章 図	26
第8章 参考文献	44
発表論文	55
謝辞	56

第 1 章 要旨

Protein kinase B (PKB) はその構造のアミノ末端側に pleckstrin homology (PH) ドメイン、カルボキシル末端側にリン酸化触媒ドメインを有するセリン／トレオニンタンパク質リン酸化酵素である。PKB は protein kinase C (PKC) に相同性の高いタンパク質リン酸化酵素として、またはウイルス性ガン遺伝子 *v-akt* の細胞性相同遺伝子として同定された。PKB は細胞増殖因子のシグナルを伝達することが知られており、PKB の生理機能としては細胞内代謝の制御、アポトーシスの抑制に関与することが報告されている。PKB の活性化機構としては細胞増殖因子刺激に伴い活性化される phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) 反応産物が直接 PKB の PH ドメインに作用すること、および PDK1 と呼ばれる上流タンパク質リン酸化酵素が PKB をリン酸化することが報告されている。一方、細胞増殖因子のみならず過酸化水素処理や熱ショックなどの種々のストレスによっても PKB が活性化されることが明らかにされている。このように PKB は細胞増殖因子のみならずストレスによっても活性化を受けることから、ストレスによる PKB 活性化の分子機構とその機能を解析することによりストレス応答の分子機構だけではなく細胞増殖因子のシグナル伝達機構について重要な手がかりが得られることが期待される。そこで、本研究では細胞増殖因子およびストレスによる PKB 活性制御の分子機構を解析した。

実験としてはまず、細胞増殖因子および各種のストレスによる PKB 活性化機構の比較検討を行った。PKB 活性化に対する PI 3-kinase 阻害剤の効果の検討および細胞内 PI 3-kinase 反応産物の測定を行ったところ、PI 3-kinase が過酸化水素処理により活性化されることが明らかとなり、過酸化水素処理は細胞増殖因子と同様に PI 3-kinase を介して PKB を活性化することが示された。PI 3-kinase が種々の受容体刺激により活性化されることは知られていたが、この実験により過酸化水素処理によっても PI 3-kinase が活性化されることが見いだされた。これに対して、熱ショックは一部は PI 3-kinase を介して PKB を活性化するものの、PI 3-kinase とは独立の経路を介しても PKB を活性化することが示された。

そこで、熱ショックによる PKB 活性化の分子機構を詳細に解析した。細

細胞増殖因子による PKB 活性化には PH ドメインへの PI-3-kinase 反応産物の作用、および PKB リン酸化反応の両方が必要だと考えられている。即ち、PH ドメイン内の Arg25 を Cys に置換した変異体は PI 3-kinase 反応産物が結合せず、細胞増殖因子による活性化を受けないことが報告されている。また、PKB のリン酸化部位としては、Ser124、Thr308、Thr450、Ser473 が報告されている。これらリン酸化部位のうち Thr308、Ser473 は細胞増殖因子によりリン酸化が亢進し、特に Thr308 のリン酸化は PKB 活性化に必須であると考えられている。一方、Ser124、Thr450 のリン酸化は細胞刺激による誘導を受けず、酵素活性に対する効果はないと考えられている。そこで、これらのアミノ酸残基を置換した変異体を用いて解析を行った。Arg25 を Cys に置換した変異体は細胞増殖因子により活性化されないものの、熱ショックによっては活性化された。リン酸化部位のうち Ser124、Thr450、Ser473 を Ala に置換した変異体は野生型酵素と同様に細胞増殖因子および熱ショックにより活性化された。また、Thr308 のリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化ペプチド抗体を用いて解析したところ、熱ショックによりわずかに Thr308 のリン酸化が誘導されることが明らかになった。しかし、PI 3-kinase 阻害剤により Thr308 のリン酸化は抑制されるにもかかわらず、PKB 活性化は完全には抑制されなかった。さらに、細胞を ^{32}P 正リン酸で標識し未同定のリン酸化部位の検索を行ったが、顕著なリン酸化は検出されなかった。従って、熱ショックによる PKB 活性化には Thr308 を始めとするリン酸化は必須ではないことが示された。

また、熱ショックを加えた細胞内で PKB 同士が PH ドメインを介して複合体を形成することが見いだされた。この PKB 複合体形成は細胞増殖因子刺激および過酸化水素処理を加えた細胞内では検出されなかった。ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた解析により PKB 複合体が高い酵素活性を持つことが示された。さらに、複合体形成および酵素活性は PI 3-kinase 阻害剤の影響を受けないことが確認された。そこで、PKB の PH ドメインフラグメントを全長 PKB とともに発現し PKB 複合体形成と活性化への効果を検討した。PH ドメインフラグメントは無処理細胞でも全長 PKB と結合しており、熱ショックにより結合が増加することが示されたが、PKB の活性化には影響を与えなかった。従って、PKB 複合体の形成は PKB 活性化の必須条件ではなく、活性化された PKB が複合体を形成する可能性が高い。PKB 複合体形成の役

割は不明だが、熱ショックは PKB の持続的な活性化を誘導することから PKB 活性化状態の安定化に関与しているのではないかと考えられる。

以上の結果から、PKB は細胞増殖因子だけではなくストレスによっても独立の分子機構により活性化をされることが明らかになった。細胞増殖因子がさまざまな細胞死を抑制することが知られており、その作用においても PKB が重要な役割をしていることが報告されている。PKB の高発現によりストレスによる細胞死が抑制されることから、ストレスに対するフィードバックとして PKB が活性化され細胞の生存に貢献する機構の存在が推定される。熱ショックによる PKB 活性化が長時間持続し、また PKB の細胞内局在の変化が誘導されることから熱ショックを受けた細胞内では PKB は細胞増殖因子とは異なる標的タンパク質をリン酸化することにより細胞内で機能していることが考えられる。多細胞生物は多様な細胞刺激に対応し、それぞれの刺激に応じた細胞応答を制御している。今後さらに PKB の活性制御機構、生理機能を解析することにより、多様な細胞刺激に対する特異的および共通した細胞応答が誘導される機構が明らかになることが期待される。

第 2 章 略語

HA	hemmagglutinin
PCR	polymerase chain reaction
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PDGF	platelet-derived growth factor
PH	pleckstrin homology
PI 3-kinase	phosphatidylinositol 3-kinase
PI 3,4,5-P ₃	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PI 3,4-P ₂	PI 3,4-bisphosphate
PI 4,5-P ₂	PI 4,5-bisphosphate
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C

第3章 序論

多細胞生物の個々の細胞は細胞増殖因子、ホルモンや環境変化などの多様な刺激に対応し、増殖、分化、生命の維持などの応答を制御している。細胞応答が誘導される細胞内シグナル伝達機構では多くのタンパク質がリン酸化／脱リン酸化反応によりその機能制御を受けており、細胞内シグナル伝達機構においてはタンパク質リン酸化反応を触媒するタンパク質リン酸化酵素が重要な働きをしている (Krebs, 1994)。タンパク質リン酸化酵素はほ乳類では約 2000 種類存在すると考えられており、それぞれさまざまな細胞応答に対応していることが推定されている (Hanks and Hunter, 1995, Hunter, 2000)。

Protein kinase B (PKB) は、1991 年のほぼ同時期に 3 グループから cDNA クローニングの報告がされた。Hemmings、Woodgett らの研究グループは protein kinase C (PKC) の類似リン酸化酵素のスクリーニングによりこの酵素の cDNA をクローニングした。即ち、Hemmings らはヒトの cDNA をクローニングし RAC-protein kinase と命名した (Jones *et al.*, 1991)。Woodgett らはウシの cDNA をクローニングし protein kinase B (PKB) と命名した (Coffer and Woodgett, 1991)。また、Tsichlis らはげっ歯類のレトロウイルス AKT-8 の癌遺伝子 (*v-akt*) の細胞性相同遺伝子としてマウスの cDNA をクローニングし Akt と命名した (Bellacosa *et al.*, 1991)。このように異なる動物種から独立にクローニングが行われたため本酵素の命名はいまだに統一されていないが、本稿では PKB の名称を使用する。PKB はその後、ほ乳類のみならず線虫、ショウジョウバエ、粘菌からもクローニングされている (Franke *et al.*, 1994, Andjelkovic *et al.*, 1995, Paradis, and Ruvkun, 1998)。また PKB はほ乳類では α 、 β 、 γ の 3 種類のサブタイプが同定されており分子ファミリーであることが明らかになっている (Figure 1A) (Jones *et al.*, 1991b, Cheng *et al.*, 1992, Konishi *et al.*, 1994b, 1995, Masure *et al.*, 1999, Nakatani *et al.*, 1999)。

PKB 分子ファミリーはその構造のアミノ末端側の pleckstrin homology (PH) ドメイン (Gibson *et al.*, 1994, Haslam *et al.*, 1993, Mayer *et al.*, 1993)、カルボキシル末端側のリン酸化触媒ドメイン (kinase domain) から構成されている (Figure 1B)。PH ドメインは血小板中に存在する pleckstrin 内の繰り返し配列をモチーフとしたデータベース検索により、多くのシグナル伝達に関

与するタンパク質に見いだされた機能領域であり、PKB、 β -adrenagic receptor kinase などのセリン・トレオニンタンパク質リン酸化酵素、Brtuton tyrosin kinase などのチロシンタンパク質リン酸化酵素、dynamin などの GTP 結合タンパク質、リン脂質代謝酵素 phospholipase C、細胞骨格タンパク質 spectrin などに存在する (Musacchio *et al.*, 1993、Gibson *et al.*, 1994)。これらの PH ドメインを有するタンパク質の解析から、PH ドメインは 3 量体 GTP 結合タンパク質 $\beta\gamma$ サブユニット (Kameyama *et al.*, 1993、Konishi *et al.*, 1994、Touhara *et al.*, 1994、Wang *et al.*, 1994)、PKC などのタンパク質 (Konishi *et al.*, 1994a,b, 1995、Yao *et al.*, 1994)、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI 4,5-P₂) (Harlan *et al.*, 1994)、inositol 1,4,5-trisphosphate などのイノシトールリン脂質やその代謝産物と結合することが見いだされ (Cifuentes *et al.*, 1994、Yagisawa *et al.*, 1994、Hyvönen *et al.*, 1995、Lemmon *et al.*, 1995、James *et al.*, 1996)、PH ドメインはこれらの分子と結合することにより細胞内シグナル伝達に関与すると考えられている。

PKB は遺伝子クローニングにより存在が明らかにされたため、その活性制御機構および機能は不明であったが、1995 年に insulin や platelet-derived growth factor (PDGF)、epidermal growth factor 刺激に伴い活性化される phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) の下流標的因子として活性調節を受けることが明らかにされた (Burgering, and Coffey, 1995、Cross *et al.*, 1995、Franke *et al.*, 1995、Kohn *et al.*, 1995)。PKB の活性化には、PI 3-kinase 反応産物 phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PI 3,4-P₂) または phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI 3,4,5-P₃) の PH ドメインへの結合 (Franke *et al.*, 1995, 1997、Frech *et al.*, 1997) と PKB リン酸化反応 (Cross *et al.*, 1995、Andjelkovic *et al.*, 1996、Kohn *et al.*, 1996) の両方が不可欠であることが報告されている。即ち、PH ドメインの Arg25 を Cys に置換した変異体は PI 3-kinase 反応産物への結合能を欠失しており、細胞増殖因子刺激による活性化を受けないことが示されている (Franke *et al.*, 1995)。一方、PKB のリン酸化アミノ酸残基としては Ser124、Thr308、Thr450、Ser473 が明らかにされており、Ser124 はヒンジ領域、Thr308 はリン酸化触媒領域の activation loop、Thr450、Ser473 はカルボキシル末端にそれぞれ存在する。これらのアミノ酸残基のうち Thr308 および Ser473 は細胞増殖因子刺激によりリン酸化が亢進し、特に Thr308 のリン酸化が活性化に不可欠であることが報告されている (Alessi *et al.*, 1996)。

その後、PI 3,4,5- P_3 に依存して PKB の activation loop をリン酸化し活性化することを指標として、PKB の上流リン酸化酵素 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1、別名 PKB-kinase) が同定された (Alessi *et al.*, 1997a, b, Stephens *et al.*, 1998)。現在では、PKB の活性化の分子機構として PI 3-Kinase 反応産物が PKB の PH ドメインに作用することにより PKB は細胞膜上へとリクルートされ、同時に PI 3-kinase 反応産物により細胞膜上へとリクルートされた PDK1 により activation loop のリン酸化を受け活性化されることが考えられている (Figure 2) (Alessi *et al.*, 1997b, Anderson *et al.*, 1998)。一方、PKB の機能としては細胞のさまざまな代謝の制御、増殖、タンパク質合成などに関与していることが報告されている (Cross *et al.*, 1995, Kohn *et al.*, 1996, Deprez *et al.*, 1997, Tanti *et al.*, 1997, Gingras *et al.*, 1998, Ueki *et al.*, 1998)。最近では特に細胞死を抑制し、生存に貢献することが報告され注目を集めている (Ahmed *et al.*, 1997, Dudek *et al.*, 1997, Kulik, and Weber, 1997, Philpott *et al.*, 1997, Songyang *et al.*, 1997, Crowder, and Freeman, 1998, Eves *et al.*, 1998)。即ち、PKB がアポトーシス促進因子 Bad をリン酸化し Bad の機能の抑制により、Bcl_{XL} との解離を誘導すること (Datta *et al.*, 1997, del Peso *et al.*, 1997, Blume-Jensen *et al.*, 1998)、ヒト caspase-9 をリン酸化しプロテアーゼ活性を抑制すること (Cardone *et al.*, 1998)、および Fas リガンドなどのアポトーシス促進因子の転写に関わる Forkhead ファミリー転写因子をリン酸化しその機能を抑制すること (Biggs *et al.*, 1999, Brunet *et al.*, 1999, Kops *et al.*, 1999, Takaishi *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 1999) などが報告されている。

以上のような PKB に関する研究が進められている中で、本研究により細胞増殖因子のみならず、熱ショックや過酸化水素処理などのストレスによっても PKB が活性化されることが明らかになった。以下に細胞増殖因子およびストレスによる PKB 活性化機構の比較解析の結果を紹介するとともに、熱ショックにより細胞増殖因子とは独立の分子機構で PKB が活性制御を受けることを示す。

第4章 材料と方法

1 発現プラスミド

FLAG エピトープタグを付加した PKB α (FLAG-PKB)および Lys179 を Met に置換しリン酸化酵素活性を欠失した変異体 (FLAG-PKB K179M) は pECE ベクター (Ellis *et al.*, 1986) を用いて作成した (Konishi *et al.*, 1996)。hemmagglutinin (HA) エピトープタグを付加した PKB α (HA-PKB) は PKB α をコードする cDNA を pTB701-HA ベクター (Kuroda *et al.*, 1996) に導入し作成した。Arg25 を Cys に置換した変異体 (R25C)、および Ser124、Thr308、Thr450、Ser473 をそれぞれ Ala に置換した変異体 (S124A、T308A、T450A、S473A) は FLAG-PKB を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) 法により作成した。R25C/K179M は R25C を鋳型として PCR 法により Lys179 を Met に置換し作成した。Ser124、Thr450、Ser473 の 3 ヶ所を全て Ala に置換した変異体 3A は FLAG-PKB を鋳型とした PCR 法により作成した。R25C の Ser124、Thr450、Ser473 の 3 ヶ所を全て Ala に置換した変異体 R25C/3A は R25C を鋳型として PCR 法により作成した。FLAG エピトープタグを付加した PH ドメイン (FLAG-PH) は PKB α のアミノ酸残基 1-113 をコードする cDNA を PCR 法により増幅し、pECE ベクターに導入し作成した。FLAG-PH の Arg25 を Cys に置換した変異体 (FLAG-PH R25C) は、R25C のアミノ酸残基 1-113 をコードする領域を PCR 法により増幅し、pTB701 FLAG ベクター (Kuroda *et al.*, 1996) に導入し作成した。

以上の変異体 cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー (model 373A、Applied Biosystems) を用いて dideoxy 法により確認した。

2 抗体

イムノプロットおよび免疫沈降に用いた抗体は以下の会社より購入または作成した。

抗 PKB 抗体：大腸菌を宿主として発現した PKB α を抗原としてウサギに免疫し作成した (Konishi *et al.*, 1994b)。

抗 FLAG 抗体：Sigma

抗 HA 抗体：Roche

抗 PKB リン酸化 Thr308 抗体、抗 PKB リン酸化 Ser473 抗体：New England Biolabs

抗 PKB リン酸化 Thr450 抗体：PKB α のアミノ酸残基 445-455 に相当するペプチドのアミノ末端側に Cys を付加した合成リン酸化ペプチド (CQMITIpTPPDQD、pT はリン酸化 Thr を示す) を Keyhole Limpet hemocyanin にカップリングし、ウサギに免疫した。CNBr-activated Sepharose (Pharmacia) にリン酸化ペプチド CQMITIpTPPDQD をカップリングしたアフィニティーカラムに抗血清を添加し、結合した抗体を溶出した。さらに、CNBr-activated Sepharose に非リン酸化ペプチド CQMITITPPDQD をカップリングしたアフィニティーカラムに添加し、非リン酸化ペプチドを認識する抗体を除き、リン酸化ペプチドのみを認識する抗体を調整した (Nishikawa *et al.*, 1991)。

Alkaline phosphatase 融合抗マウス抗体、Alkaline phosphatase 融合抗ウサギ抗体：Chemicon

3 動物培養細胞および遺伝子導入

COS-7 細胞は 10% 牛胎児血清 (GIBCO BRL)、100 unit/ml ペニシリン G (GIBCO BRL)、100 μ g/ml ストレプトマイシン (GIBCO BRL) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。トランスフェクションは Gene pulser (Bio Rad) を用いて行った。トランスフェクション後さらに 36 時間培養を行い、培地を 0.1% BSA を含む DMEM に交換し 16-18 時間の培養の後、各実験を行った。PI 3-kinase 阻害剤による前処理は各刺激の前に 200 nM wortmannin (Sigma) を含む培地で 15 分の培養を行った。CHO 細胞は 10% 牛胎児血清、35 μ g/ml プロリン、100 unit/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。FLAG-PKB 高発現細胞の樹立には pRc/CMV ベクターシステムを用いた。高発現 CHO 細胞を用いた実験は血清を含まない DMEM で 24 時間の培養の後に行った。

4 免疫沈降

免疫沈降の各手順はすべて 4°C または氷上で行った。細胞を PBS で洗浄し

た後、lysis buffer (20 mM Tris-HCl at pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM 2-mercaptoethanol、1% Triton-X100、150 mM NaCl、10 mM NaF、1 mM Na_3VO_4 、50 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride) に溶解し、 $18,000\times g/10$ 分の遠心を行った。上清 (500-600 μg protein) に各種抗体 (2 μg) を加え 60 分のインキュベートの後、Protein A-Sepharose (Pharmacia) を加えさらに 30 分インキュベートした。遠心によりレジンを回収し、wash buffer (20 mM Tris-HCl at pH 7.5、150 mM NaCl、1% Triton-X100) で 4 回洗浄した。

5 PKB 精製

COS-7 細胞に FLAG-PKB 発現プラスミドをトランスフェクションし、血清を含む培地中で 48 時間培養を行った。発現細胞 (細胞数、約 10^7 個) を lysis buffer を用いて可溶化し、 $18,000\times g/10$ 分の遠心を行った。上清を 20 mM Tris-HCl at pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM 2-mercaptoethanol、150 mM NaCl、10 mM NaF、1 mM Na_3VO_4 、50 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride で平衡化した FLAG M2 アフィニティーカラム (Kodak) に添加した。カラムを wash buffer で洗浄した後、1 ml の 0.1 M glycine-HCl at pH 3.0 を用いて FLAG-PKB を溶出し、1 M Tris-HCl at pH 7.5 の添加により pH を中性に調整した。

6 ゲルろ過クロマトグラフィー

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞を 20 mM Tris-HCl at pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM 2-mercaptoethanol、1 mM MgCl_2 、150 mM NaCl、10 mM NaF、1 mM Na_3VO_4 、50 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride 中で、テフロン・グラスホモジナイザーを用いて破碎した。細胞抽出液を $100,000\times g/30$ 分遠心し、上清を Superdex-200 (SMART system、Pharmacia) に添加した。各フラクションから抗 FLAG 抗体を用いて PKB を免疫沈降した。

7 イムノブロット

免疫沈降物または精製標品に SDS-sample buffer を加え 2 分間煮沸した後、SDS-PAGE を行いタンパク質を展開した。展開したタンパク質を polyvinylidene difluoride 膜 (Millipore) に転写し、各種抗体と反応を行った。2 次抗体として Alkaline phosphatase を融合した抗マウスまたは抗ウサギ抗体

を用いて nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate を基質とした発色法によりタンパク質の検出を行った。

8 リン酸化酵素活性測定

PKB のリン酸化酵素活性は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP から core histone を基質タンパク質とする放射活性の転位反応または自己リン酸化反応により測定した。

A) 免疫沈降物を用いたリン酸化酵素活性測定

免疫沈降物を 20 mM Tris-HCl at pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM 2-mercaptoethanol、50 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride で洗浄し、Triton-X 100、NaCl を除いた。免疫沈降物に反応液 25 μl (20 mM Tris-HCl at pH 7.5、10 mM MgCl_2 、20 μM ATP、15-20 kBq $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP、200 $\mu\text{g/ml}$ core histone) を加え、30 $^{\circ}\text{C}$ / 30 分インキュベートした。自己リン酸化活性測定の場合は、core histone を含まない反応液を用いた。SDS-sample buffer を加えてリン酸化反応を停止し、基質タンパク質を SDS-PAGE により展開した。Bioimaging analyzer BAS2000 (Fuji) を用いて基質タンパク質または PKB への放射活性の取り込みを検出および定量した。

B) 精製酵素を用いたリン酸化酵素活性測定

精製 FLAG-PKB (100 ng) を上述の反応液中で 30 $^{\circ}\text{C}$ / 30 分インキュベートした。イノシトールリン脂質を添加する場合は、それぞれの脂質 (最終濃度 10 nM-100 μM) 存在下でリン酸化反応を行った。リン脂質には PI 4,5- P_2 (Roche)、PI 3,4,5- P_3 (Watanabe, *et al.*, 1994) を用いた。リン酸化タンパク質の検出は 1) と同様に行った。

9 細胞の標識

イノシトールリン脂質測定に際しては、COS-7 細胞を ^{32}P 正リン酸 (37 MBq / ml) を含む phosphate-free DMEM 中で標識した。細胞を刺激した後、培地を除き、MeOH : 1N HCl (1 : 1) を加え反応を停止した。脂質をクロロホルムを用いて抽出し、メチルアミンにより脱アシル化を行った。調整したサンプルを Partisphere 5-SAX カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーに添加し、それぞれの glycerophosphoinositide を分離してその放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した (Fukui *et al.*, 1989)。タンパク質の標識に際しては、COS-7 細胞を ^{32}P 正リン酸 (18.5 MBq / ml) を含む

phosphate-free DMEM 中で標識した。刺激の後、抗 FLAG 抗体を用いて各 PKB を免疫沈降し、SDS-PAGE およびイムノブロットを行った。各タンパク質のリン酸化を Bioimaging analyzer BAS2000 を用いて視覚化した。

10 試験管内での脱リン酸化

免疫沈降物を protein phosphatase λ 反応液 (50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 5 mM dithiothreitol, 2 mM MnCl_2 , 0.1% BSA) で 2 回洗浄した後、100 U protein phosphatase λ (Calbiochem) を含む protein phosphatase λ 反応液を加え 30℃ / 10 分インキュベートした。反応後、免疫沈降物を wash buffer で洗浄し protein phosphatase λ を除き、イムノブロットおよびリン酸化酵素活性測定を行った。

第5章 結果

第1節 ストレスによる PKB 活性化

1 熱ショックによる PKB 活性化

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞に PDGF 刺激および 42℃の熱ショックを加えた後、FLAG-PKB を免疫沈降しリン酸化酵素活性測定を行った (Figure 3)。血清刺激により Swiss 3T3 細胞内で PKB が時間依存的に活性化されることが報告されている (Andjelkovic *et al.*, 1996)。COS-7 細胞では PDGF 刺激により 10 分間で PKB の最大活性化が誘導された (Figure 3A)。これに対し熱ショックでは、培地の温度は2分以内に42℃に上昇するにも関わらず、PKB 活性は緩やかに上昇し、20 分後に最大活性化が検出された (Figure 3B)。また、熱ショックの温度を比較したところ、40℃でも活性化は検出され、42℃で最大活性化が誘導された。さらに高温にしてもそれ以上の活性上昇は見られなかった (Figure 3C)。従って、熱ショックは PDGF 刺激に比べ緩やかに PKB を活性化することが示された。なお、熱ショックによる PKB 活性化の最大値は PDGF 刺激による活性化に比べやや低い値であった。

2 熱ショックと細胞増殖因子による活性化の比較

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞、CHO 細胞を用いて細胞増殖因子として血清刺激および熱ショックによる活性化の比較を行った (Figure 4)。COS-7 細胞だけではなく、CHO 細胞においても熱ショックにより PKB が活性化された。なお、結果は本稿には示していないが、NIH 3T3 細胞の内在性 PKB も熱ショックにより活性化された。従って、熱ショックによる PKB 活性化が細胞特異的な現象ではなく一般的な応答であることが確認された。なお、CHO 細胞において熱ショックと血清刺激を同時に作用させた場合でも、それぞれを単独に作用させた場合以上の顕著な PKB 活性化は誘導されなかった。

3 PKB の精製

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞から抗 FLAG 抗体を結合したアフィニティーカラムを用いて FLAG-PKB の精製を行った。無処理細胞、熱ショッ

ク細胞から精製した標品を CBB 染色により確認したところ、ほぼ単一のタンパク質のみ検出され顕著な他のタンパク質は検出されなかった (Figure 5A)。このタンパク質が FLAG-PKB であることを抗 PKB 抗体を用いたイムノブロットにより確認した (Figure 5A)。この精製標品を用いて自己リン酸化、core histone を基質としたリン酸化酵素活性測定を行ったところ、熱ショック細胞から精製した酵素は無処理細胞から得た酵素に比べ高いリン酸化酵素活性を有することが示された (Figure 5B)。なお、結果は示していないが ATP 結合部位 Lys179 を Met に置換することにより酵素活性を欠失した変異体、FLAG-PKB K179M を同様の手順により精製した標品にはリン酸化酵素活性は検出されないことから、以上の実験で示されたリン酸化酵素活性は PKB の活性であることが確認された。従って、無処理細胞および熱ショック細胞からそれぞれ不活性型、活性型酵素を分離することができた。

4 PKB 酵素活性に対するイノシトールリン脂質の効果

PKB の活性化機構として、PI 3-kinase により産生される PI 3,4,5- P_3 が PKB の PH ドメインに直接作用することが提唱されている。そこで、精製 PKB を用いて PKB リン酸化酵素活性に対する PI 3,4,5- P_3 の効果を検討した (Figure 6)。対照として PI 4,5- P_2 を用いた。PI 3,4,5- P_3 は不活性型、活性型酵素のリン酸化酵素活性に影響を与えなかった。従って、PKB 活性化機構は PI 3,4,5- P_3 が PH ドメインに直接結合することにより活性化されるという単純な機構ではないことが示された。なお、PI 4,5- P_2 が濃度依存的に活性型酵素のリン酸化酵素活性を阻害したことから、分子機構は不明だが PI 4,5- P_2 が PKB に結合し活性調節に関与する可能性が示された。

5 各種ストレスによる PKB 活性化

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞を用いて、熱ショック以外のストレスの効果を検討を行った。熱ショックのみならず過酸化水素処理、CdCl₂、ヒ素、高浸透圧によっても PKB は活性化されることが示された (Figure 7)。そこで、これらのストレスと PI 3-kinase の関係を検討することが必要になった。

6 細胞内 PI 3-kinase 反応産物の測定

PKB を活性化するストレスのうち、熱ショックと過酸化水素処理について

PKB 活性化経路の解析を行った。COS-7 細胞を用いて PKB 活性化に対する PI 3-kinase の強力な阻害剤である wortmannin の効果を検討した (Figure 8A)。その結果、過酸化水素処理による PKB 活性化は wortmannin により抑制された。そこで、細胞内 PI 3-kinase 反応産物の測定を行ったところ、過酸化水素処理により PI 3,4,5-P₃、PI 3,4-P₂ が共に著しく増加することが見いだされた (Figure 8B)。従って、過酸化水素処理は PI 3-kinase を活性化し、その結果 PKB 活性化を誘導することが示された。一方、熱ショックによる PKB 活性化はほとんど wortmannin の影響を受けなかった (Figure 8A)。細胞内 PI 3-kinase 反応産物のうち PI 3,4,5-P₃ のみが増加したが、PI 3,4,5-P₃ の増加は wortmannin により抑制された (Figure 8B)。従って、熱ショックは PI 3-kinase とは独立の機構を介して PKB を活性化しうることが示された。

7 PKB 複合体の解析

PKB が PH ドメインを介して会合することが報告されている (Datta *et al.*, 1995)。そこで、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、PKB 複合体の解析を行った (Figure 9)。無処理細胞では、PKB は 1 次アミノ酸配列による推定分子量 60 kDa よりわずかに高分子量側ではあるが、おそらく単量体と考えられる分子量約 70 kDa のフラクションに溶出された。過酸化水素処理細胞では PKB は分子量約 70 kDa のフラクションに溶出され、高い酵素活性を有することが示された。この PKB 活性上昇は wortmannin 前処理により抑制された。これに対して、熱ショック細胞では、PKB は分子量 70 kDa のフラクションだけではなく分子量約 200 kDa のフラクションにも溶出された。即ち、熱ショックにより分子量 200 kDa の PKB 複合体形成が誘導されることが明らかになった。PKB 複合体は高い酵素活性を持ち、この PKB 複合体形成およびその酵素活性は wortmannin の影響を受けなかった。なお、熱ショック細胞から分離された PKB 単量体も高い酵素活性を有していたが、wortmannin によりその酵素活性は抑制された。従って、熱ショックは一部は PI 3-kinase を介して PKB を活性化するものの PI 3-kinase とは独立の機構により PKB を活性化し、その活性化には PKB 複合体形成を伴うことが示された。

以上の実験により PKB が細胞増殖因子のみならず熱ショックや過酸化水素処理を始めとするストレスにより活性化を受けることが見いだされた。スト

レスのうち過酸化水素処理は PI 3-kinase 活性上昇を誘導し、PKB を活性化することが明らかになった。これに対して、熱ショックは一部は PI 3-kinase を介して PKB 活性化を引き起こすものの、PKB 複合体形成を伴う PI 3-kinase とは独立の機構により PKB を活性化することが明らかになった (Figure 10)。

第2節 熱ショックによる PKB 活性化の分子機構

1 各種 PKB 変異体を用いた解析

細胞増殖因子による PKB 活性化には PH ドメインへの PI 3-kinase 反応産物の作用および PKB リン酸化の両者が必要であると考えられている (Franke *et al.*, 1995, 1997、Cross *et al.*, 1995、Alessi *et al.*, 1996、Andjelkovic *et al.*, 1996、Kohn *et al.*, 1996、Frech *et al.*, 1997)。一方、前節では PKB が熱ショックにより PI 3-kinase とは独立にされることが示された。そこで、熱ショックによる PKB 活性化の詳細な機構を解析するためにまず、イノシトールリン脂質結合能を欠失し、細胞増殖因子による活性化を受けないことが報告されている PH ドメイン内の Arg25 を Cys に置換した変異体、PKB のリン酸化部位、Ser124、Thr308、Thr450、Ser473 を Ala に置換した変異体を作成し PDGF 刺激および熱ショックによる活性化を比較検討した (Figure 11)。野生型 PKB は前節で述べたように PDGF 刺激および熱ショックにより活性化された。PDGF 刺激による活性化は wortmannin により完全に抑制され、熱ショックによる活性化は一部は阻害されるものの完全には抑制されなかった。R25C は報告されているように PDGF 刺激によっては活性化を受けなかったものの、熱ショックによっては活性化され、この活性化は wortmannin の影響を受けなかった。ATP 結合部位 Lys179 を Met に置換した変異体 K179M は酵素活性を欠失しており、R25C に同じ変異を導入した R25C/K179M の免疫沈降物中にもリン酸化酵素活性は検出されなかった。従って、観察された R25C のリン酸化酵素活性は発現した PKB 変異体の酵素活性であることが確認された。リン酸化部位の変異体のうち T308A は酵素活性を欠失していることが報告されており (Alessi *et al.*, 1996)、この解析でも PDGF 刺激、熱ショックを加えても免疫沈降物中にリン酸化酵素活性は検出されなかった。S124A は野生型と同様に PDGF 刺激、熱ショックにより活性化された。T450A、S473A は PDGF 刺激、熱ショックにより活性化されるが、これらの変異体は野生型に比べ PDGF 刺激による活性化が弱く、また熱ショックによる活性化は wortmannin の影響をほとんど受けなかった。従って、Thr450、Ser473 のリン酸化は活性化の必須条件ではないが、最大活性化に必要であることが示唆された。Ser124、Thr450、Ser473 の3ヶ所を全て変異した 3A は T450A、S473A と同様に PDGF

刺激による活性化の程度が低く、また熱ショックによる活性化は wortmannin の影響をほとんど受けなかった。R25C/3A は R25C と同様に PDGF 刺激による活性化を受けなかったものの、熱ショックによつては活性化され、wortmannin の影響を受けなかった。以上の結果から、熱ショックによる PKB 活性化にはこれまでに明らかにされているリン酸化アミノ酸残基のうち、Ser124、Thr450、Ser473 のリン酸化は必須ではなく、また熱ショックによる PKB 活性化にはイノシトールリン脂質の PH ドメインへの作用も不可欠ではないことが示された。なお、結果は示していないが PKB のリン酸化触媒ドメインのみを発現した場合には、PDGF 刺激および熱ショックによる活性化を受けないことから、熱ショックによる PKB 活性化には完全な PH ドメインは必要ないものの、イノシトールリン脂質結合能以外の PH ドメインの機能が必要だと考えられる。

2 細胞内での PKB リン酸化

変異体を用いた解析では T308A が酵素活性を欠失しているため、Thr308 のリン酸化の意義を解析できなかった。そこで、細胞内での PKB のリン酸化をそれぞれのリン酸化部位を認識する抗リン酸化ペプチド抗体を用いて解析した (Figure 12)。野生型 PKB は無処理細胞では Thr308 のリン酸化はほとんど検出されず、PDGF 刺激により Thr308 のリン酸化が検出された。PDGF 刺激による Thr308 リン酸化および活性化は wortmannin により抑制された。一方、熱ショック細胞では PDGF 刺激に比べると程度は低いものの Thr308 のリン酸化が検出された。しかし、wortmannin により活性化は完全には抑制されないにもかかわらず、Thr308 のリン酸化は検出されなくなった。また、R25C では PDGF 刺激、熱ショックのどちらでも Thr308 のリン酸化は検出されなかった。従つて、熱ショックによる PKB 活性化には Thr308 のリン酸化も必須ではないことが明らかになった。また、Ser473 はこの実験では無処理状態でもリン酸化が検出され、PDGF 処理、熱ショックによりリン酸化が亢進した。Ser473 のリン酸化の亢進は wortmannin により抑制されたが、完全には消失しなかった。Thr450 は野生型、R25C の両方で常にリン酸化されており刺激によりリン酸化の程度は変化しなかった。

3 細胞内での PKB リン酸化

上述のように熱ショックによる PKB 活性化には Thr308 を始めとする既知の4ヶ所のアミノ酸残基のリン酸化は必須ではないことが示された。次に、熱ショックによ PKB 活性化にこれら以外の未同定のアミノ酸残基のリン酸化が関与している可能性を検討するために、野生型または変異体 PKB を発現した COS-7 細胞を ^{32}P 正リン酸標識し、PKB のリン酸化を解析した (Figure 13)。野生型 PKB は無処理細胞でもリン酸化されており、熱ショックによりわずかにリン酸化が亢進した。なお、wortmannin 前処理によりリン酸化の亢進は抑制された。一方、R25C は常にリン酸化されており、熱ショックを加えてもリン酸化の変化は見られなかった。R25C/3A はほとんどリン酸化されておらず、熱ショックを加えてもリン酸化は検出されなかった。従って、無処理細胞内で検出される野生型 PKB および R25C のリン酸化は Ser124、Thr450、Ser473 のリン酸化に由来し、野生型 PKB の熱ショックによるリン酸化の亢進は、Thr308、Ser473 に由来すると考えられる。以上の結果から、熱ショックはリン酸化を介さずに PKB を活性化する可能性が示された。

4 細胞内での PKB 不活性化

次に、熱ショックまたは PDGF 刺激により活性化された PKB の細胞内での不活性化を比較検討した (Figure 14)。即ち、FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞に PDGF 刺激および熱ショックを加えた後、培地を 0.1% BSA を含む DMEM に交換、または温度を 37℃ に戻して細胞を培養し、細胞内での PKB の不活性化および Thr308 の脱リン酸化を解析した。PDGF 刺激により活性化された酵素は速やかに Thr308 が脱リン酸化され、酵素活性も低下した。これに対して、熱ショックにより活性化された酵素の酵素活性は PDGF 刺激に比べ緩やかに低下した。Wortmannin 前処理を行い熱ショックを加えた場合はほとんど酵素活性は低下せず、60 分後でもほとんど不活化は見られなかった。

5 試験管内での PKB 不活性化

COS-7 に発現した PKB を免疫沈降し、PKB リン酸化および酵素活性に対する protein phosphatase λ 処理の効果を検討した (Figure 15)。PDGF 刺激細胞より回収した PKB は phosphatase 処理により Thr308、Thr450、Ser473 は全て脱リン酸化され、酵素活性も消失した。熱ショック細胞より回収した酵素は

Thr308 が脱リン酸化されるものの、酵素活性は完全には消失しなかった。Wortmannin 前処理を行った熱ショック細胞から回収した PKB の酵素活性は phosphatase 処理を行っても変化しなかった。R25C の酵素活性も同様に phosphatase 処理の影響を受けなかった。以上の結果からも、熱ショックはリン酸化を介さずに PKB を活性化することが強く示唆される。なお、Thr450 のリン酸化は、無処理細胞、PDGF 処理細胞から回収した酵素では phosphatase 処理により完全に脱リン酸化されるものの、熱ショック細胞から回収された酵素では完全には脱リン酸化されなかった。熱ショックにより PKB の立体構造の変化が誘導され、Thr450 の配置が phosphatase 耐性の場所に移動していると考えられる。

6 PKB 複合体の形成

前節に記述したように熱ショックにより PKB 同士が会合し複合体を形成することが明らかにされている。そこで、PH ドメインフラグメントと全長 PKB を COS-7 細胞に共発現し細胞内での PKB 同士の会合を検討した (Figure 16)。PH ドメインフラグメントは無処理細胞でも全長 PKB と結合しており、熱ショックにより結合が亢進したが、PDGF および熱ショックによる活性化には影響を与えなかった。従って、PKB 複合体の形成は活性化の必須条件ではなく、活性化された分子同士が結合することが示唆される。R25C 変異を導入した PH ドメインフラグメントも野生型 PH ドメインフラグメントと同様に全長 PKB と会合することから、PKB 複合体の形成に完全な PH ドメインの構造は必要ないことが示された。なお、PH ドメインが PKB のドミナントネガティブとして機能することが報告されているが (Khwaja *et al.*, 1997)、この実験ではその効果は観察されなかった。

以上の結果から、熱ショックによる PKB 活性化には Thr308 を始めとする PKB リン酸化、PI 3-kinase 反応産物の結合は必須ではないことが示された。熱ショックは PKB の構造変化を介して、PKB 複合体形成および活性化を誘導すると考えられる。(Figure 17)

第 6 章 考察

PKB は遺伝子のクローニングにより存在が明らかにされたため、その機能および活性制御機構が不明であった。一方、細胞刺激にともない PI 3-kinase が活性化され 3 位にリン酸化を受けたイノシトールリン脂質が産生されることが知られていた。PI 3-kinase 反応産物は細胞内代謝を始めとする多くの細胞応答に関与することから注目されていたが、その標的因子は長い間不明であった (Carpenter and Cantley, 1996)。1992 年に PKB が PI 3-kinase の下流標的因子であることが提唱され、以来、PKB に関する多くの研究が行われている (Coffer *et al.*, 1998, Chan *et al.*, 1999)。このような PKB に関する研究が進展するなかで、本研究では、PKB が細胞増殖因子のみならず熱ショックや過酸化水素処理などの種々のストレスによっても PKB が活性化されることを明らかにし、細胞増殖因子およびストレスによる活性化経路ならびに分子機構の解析を行った。本研究を開始した当時は、PKB が PI 3-kinase の下流標的因子として活性化を受けることが明らかにされていたがその活性化機構の詳細は明らかではなかった。即ち、PKB 活性化の分子機構として PI 3-kinase 反応産物が直接 PKB に結合すること (Franke *et al.*, 1995, 1997, Frech *et al.*, 1997) および PKB が未同定の上流リン酸化酵素によりリン酸化を受けること (Cross *et al.*, 1995, Andjelkovic *et al.*, 1996, Kohn *et al.*, 1996) がそれぞれ提唱されていた。不活性型酵素に PI 3,4,5-P₃ を加えても活性化は検出されず、PKB 活性化には PI 3-kinase 反応産物の直接の結合ではなく PKB の修飾が重要であることが示された (Figure 8)。その後、Alessi らにより細胞増殖因子刺激により PKB の Thr308 のリン酸化が誘導され PKB が活性化を受けることが明らかにされ、さらに PKB 上流リン酸化酵素 PDK1 が同定された (Alessi *et al.*, 1997ab, Stephens *et al.*, 1998)。現在では、PKB の活性化機構として (Figure 2) のモデルが考えられている。

本研究においてストレスによる PKB 活性化経路の解析から、過酸化水素処理は PI 3-kinase を介して PKB を活性化することが明らかになった。過酸化水素を始めとする活性酸素は細胞内シグナル伝達経路で重要な働きをしていることが知られている (Finkel and Holbrook, 2000)。例えば、細胞増殖因子刺激により細胞内で活性酸素が産生されることが知られており、細胞増殖

因子刺激により誘導される mitogen-activated protein kinase 活性化がラジカルスカベンジャーにより抑制されることなどが報告されている (Sundaresan *et al.*, 1995)。活性酸素が関与すると考えられているシグナル伝達経路は多数あり、多くの標的因子が存在すると考えられている (Finkel and Holbrook, 2000)。今回の研究により過酸化水素処理により PI 3-kinase が活性化を受けることから、PI 3-kinase も活性酸素の標的因子の一つであることが明らかになった。

一方、熱ショックによる PKB 活性化は PI 3-kinase を介した経路と PI 3-kinase とは独立の経路を介していることが示された。即ち、熱ショックによる活性化は PI 3-kinase 阻害剤により完全には抑制されないこと、および細胞増殖因子刺激による活性化を受けない Arg25 を Cys に置換した変異体が熱ショックによっては活性化を受けることが明らかになった。PKB の活性化には触媒ドメインの activation loop に存在する Thr308 のリン酸化が不可欠であると考えられている。Thr308 をリン酸化する上流リン酸化酵素としては PDK1 のみならず、神経細胞では calmodulin kinase kinase が直接 PKB の Thr308 をリン酸化することが報告されている (Yano *et al.*, 1998)。また、最近 cyclicAMP 増加にともない PKB の未同定のアミノ酸残基がリン酸化され、PKB が活性化されることも報告されている (Sable *et al.*, 1997、Filippa *et al.*, 1999)。しかし、今回の解析により、熱ショックによる PKB 活性化には Thr308 のリン酸化をはじめとする PKB リン酸化は必須ではないことが示された。なお、カルボキシル末端側に存在する Thr450、Ser473 のリン酸化は酵素活性にあまり効果がないことが報告されていたが (Alessi *et al.*, 1996)、変異体を用いた解析からこれらのリン酸化は、活性化には必須ではないものの PKB が最大活性を発揮することに寄与していることが示された (Figure 11)。これらの変異体を用いて細胞増殖因子刺激後の不活性化の時間経過を比較したところ、S473A は野生型酵素と同様の時間経過で不活性化され、T450A は野生型酵素に比べ速やかに不活性化された (data not shown)。従って、Ser473 のリン酸化は最大活性化に必須であり、Thr450 のリン酸化は活性化状態の安定化に寄与していることが考えられる。

また、熱ショックにより活性化された酵素は、細胞増殖因子刺激により活性化された酵素に比べ、Thr308 の脱リン酸化が遅く、不活性化の時間経過が緩やかであった (Figure 14)。さらに、細胞増殖因子により活性化された酵素は phosphatase 処理により脱リン酸化、不活性化されるのに対し、熱シヨ

ック細胞から回収した酵素は phosphatase 処理を行っても不活性化されなかった (Figure 15)。以上の結果から、熱ショックは PKB の構造変化を介して PKB 活性化を引き起こす事が強く示唆される。熱ショック細胞ではが高い酵素活性を有する PKB 複合体が形成されることが明らかになった。PKB 複合体形成と活性化の関係を検討しところ、PH ドメインフラグメントは全長 PKB と無処理状態でも会合しており、熱ショックによりその結合は増加した (Figure 16) (Datta *et al.*, 1995)。しかし、PDGF 刺激および熱ショックによる PKB 活性化は PH ドメインフラグメントの結合の影響を受けなかった。従って、熱ショックにより PKB 同士が PH ドメインを介して会合し複合体を形成することは、PKB 活性化には必須ではないことが示唆された。異なるエピトープタグを付加した全長 PKB 同士を用いて PKB 複合体形成の解析を行ったところ、無処理状態では PKB 複合体は検出されず、熱ショック細胞でのみ複合体形成が観察された。また、最近になり PH ドメイン結合タンパク質として TCL1 と呼ばれるタンパク質が見いだされている。TCL1 は PH ドメインに作用し、PKB 複合体形成を誘導し PKB を活性化することが報告されている (Laine *et al.*, 2000)。また、試験管内で PI 3,4-P₂ により PKB が活性化されることが報告されている (Franke *et al.*, 1995)。これらの結果から、不活性な状態では PH ドメインは触媒ドメインと作用しており、PH ドメインに他の因子が結合することにより触媒ドメインから PH ドメインが外れ、PKB 酵素活性が発揮されることが考えられる。熱ショックにおいても何らかの結合因子により PH ドメインと触媒ドメインの相互作用が外れ、遊離した PH ドメイン同士が結合し PKB 複合体を形成することが考えられる。

以上の結果から、PKB が細胞増殖因子のみならず種々のストレス刺激によっても独立の機構により活性化されることが明らかになった。細胞増殖因子がさまざまな細胞死を抑制することが知られており、その作用においても PKB が重要な役割をしていることが報告されている。PKB の高発現によりストレスによる細胞死が抑制されることから、ストレスに対するフィードバックとして PKB が活性化され細胞の生存に貢献していると推定される。細胞増殖因子は細胞の生存だけではなく刺激は細胞は増殖、糖代謝、細胞の生存などの細胞応答を誘導する。これに対して、ストレスは細胞増殖因子とは異なる細胞応答を誘導する。従って、PKB が活性化刺激の違いにより細胞内で異なる機能をしていることが推定される。PKB が生存に重要な役割をして

いることが知られていることから、PKB がストレスに対するフィードバックとして活性化され、細胞の防御機構に機能していると考えられる。ストレスと細胞増殖因子刺激では、PKB はそれぞれの刺激で共通の標的因子のリン酸化を介して細胞応答に貢献するとともに、それぞれの刺激により異なる標的タンパク質をリン酸化することにより刺激に特異的な細胞応答の制御にも関与すると考えられる。細胞内の PKB の局在を観察したところ、熱ショック細胞では PKB が核膜周辺に局在することが見いだされており、PKB は活性化機構の違いにより細胞内の異なる部位に移行し、それぞれの刺激特異的な標的因子をリン酸化している可能性が高い。

今後さらに PKB の活性制御機構、標的タンパク質の検索を通じて生理機能の解析を行うことにより、細胞応答の特異性が生じる機構が明らかにされるだけでなく、ストレスの受容機構の解明にも多くの手掛かりが得られると考えられる。

第 7 章 図

- Figure 1 PKB クローンと構造
- Figure 2 細胞増殖因子による PKB 活性化機構と機能
- Figure 3 PDGF 刺激と熱ショックによる PKB 活性化
- Figure 4 血清刺激と熱ショックによる PKB 活性化
- Figure 5 FLAG-PKB の精製
- Figure 6 PKB 酵素活性に対するイノシトールリン脂質の効果
- Figure 7 各種ストレスによる PKB 活性化
- Figure 8 ストレス細胞の PKB 活性化と PI 3-kinase 反応産物の測定
- Figure 9 PKB 複合体
- Figure 10 ストレスによる PKB 活性化経路とリン酸化アミノ酸残基
- Figure 11 PKB 変異体の活性化
- Figure 12 抗リン酸化ペプチド抗体を用いた PKB リン酸化の解析
- Figure 13 細胞標識による PKB リン酸化の解析
- Figure 14 細胞内での PKB 脱リン酸化と不活性化
- Figure 15 試験管内での PKB 脱リン酸化と不活性化
- Figure 16 PH ドメインを介した PKB 複合体形成
- Figure 17 熱ショックによる PKB 活性化の分子機構

A

	PKB α	PKB β	PKB γ
<i>Homo sapiens</i>	NM005163	NM004103	NM005465, AL117525
<i>Mus musculus</i>	NM009652 X65687	NM011785	NM011785
<i>Rattus norvegicus</i>	D30040	D30041	D49836
<i>Gallus gallus</i>	AF18126	AF181260	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	AF07239, AF072380	AF072381	
<i>Drosophila melanogaster</i>		X83510	
<i>Dictyostelium discoideum</i>		AF093877	

B

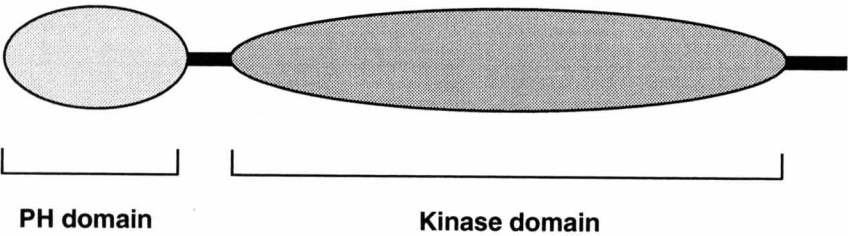


Figure 1 A) 登録されている各種生物の PKB クローン (accession number)
B) PKB の構造の模式図

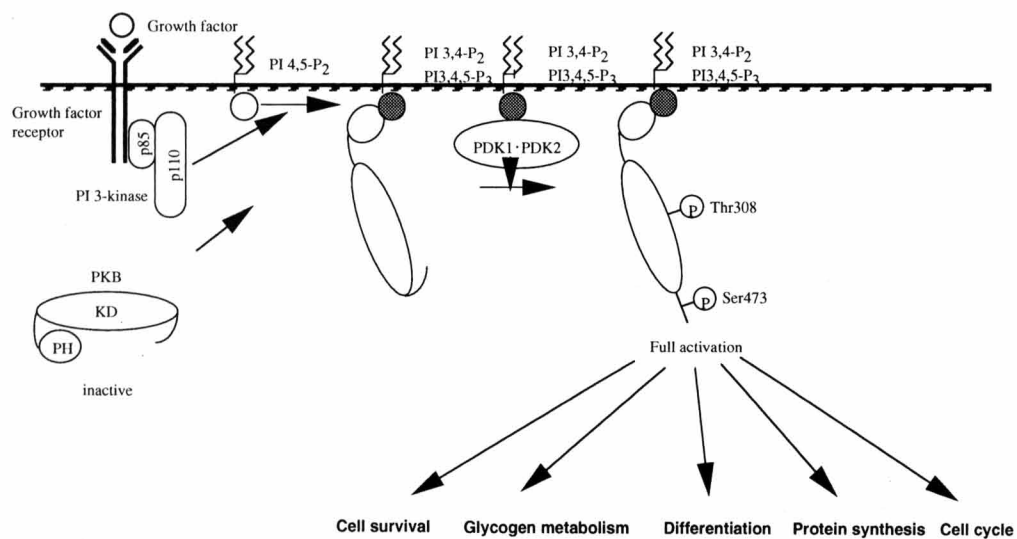


Figure 2 細胞増殖因子による PKB 活性化の分子機構と機能

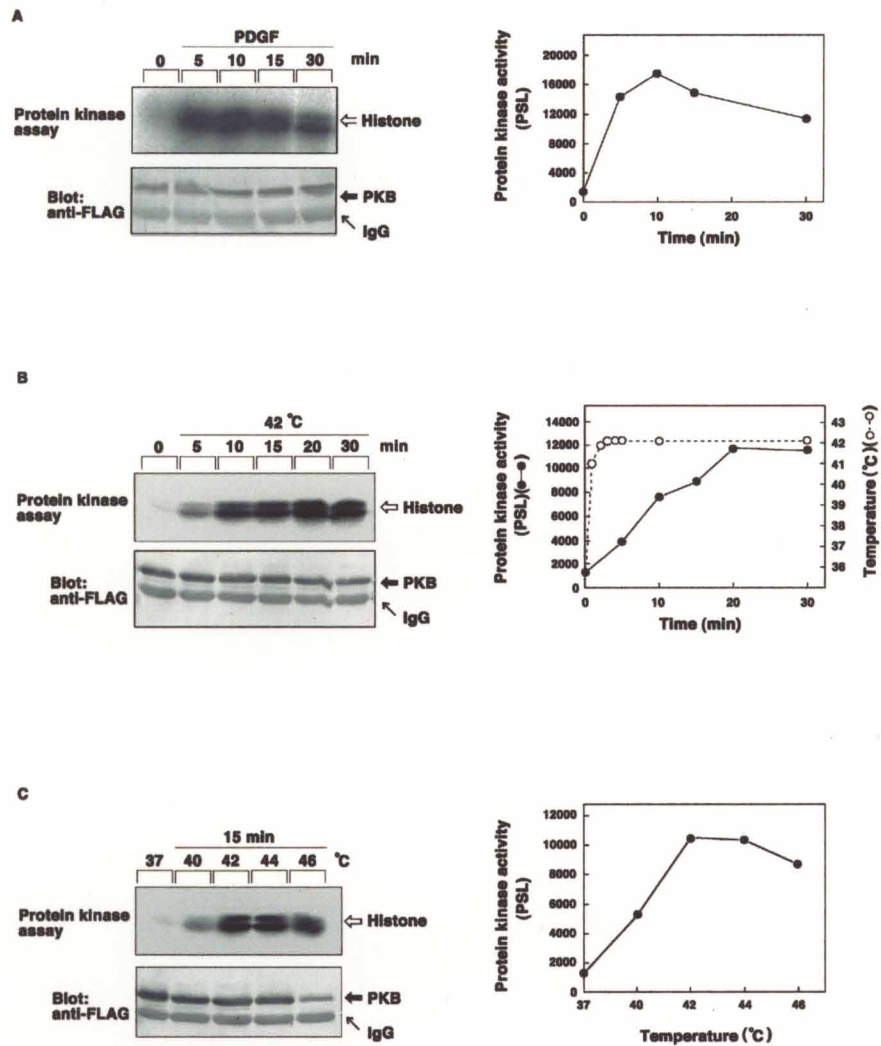


Figure 3 PDGF 刺激と熱ショックによる PKB 活性化

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞に PDGF 刺激または熱ショックを加えた。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-PKB を免疫沈降し、core histone を基質としてリン酸化酵素活性測定を行った。

A) PDGF 刺激 (20 ng/ml) を図に示した時間加えた。

B) 熱ショック (42°C) を図に示した時間加えた。

C) を図に示した温度の熱ショック (15 分) を加えた。

右) (パネル上) リン酸化酵素活性測定

(パネル下) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

左) 右の定量および培地の温度

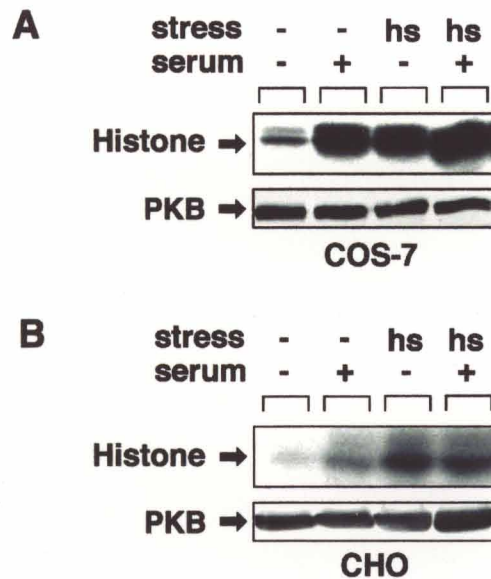


Figure 4 血清刺激と熱ショックによる PKB 活性化

FLAG-PKB を発現した培養細胞に血清刺激 (10% / 20 分) (FCS) および熱ショック (45°C / 20 分) (hs) を単独または同時に加えた。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-PKB を免疫沈降し、core hitone を基質としてリン酸化酵素活性測定を行った。

A) COS-7 細胞

B) CHO 細胞

(パネル上) リン酸化酵素活性測定

(パネル下) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

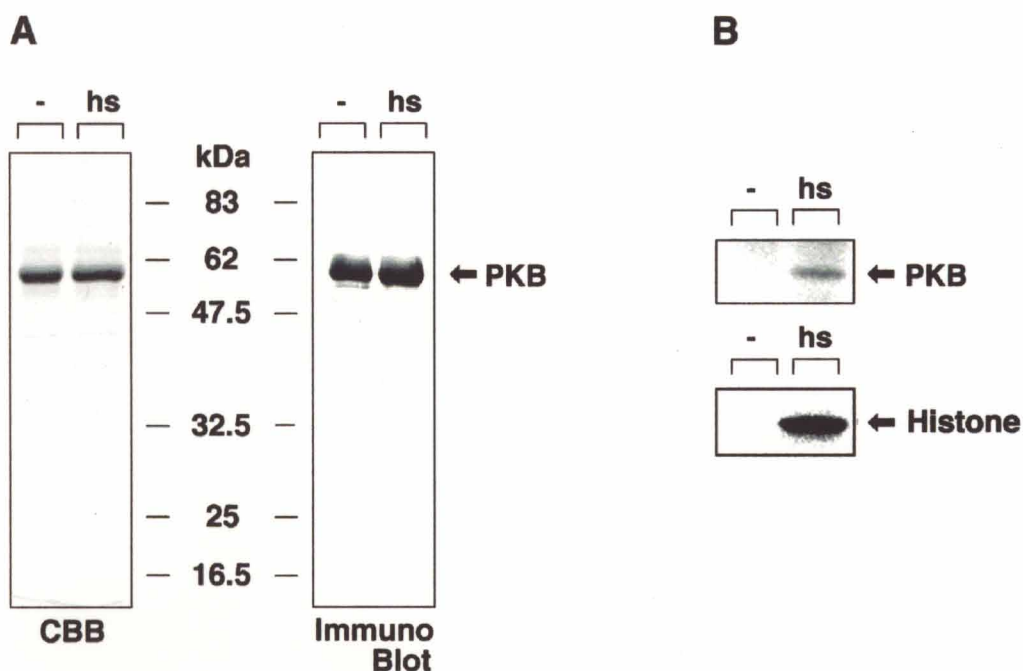


Figure 5 FLAG-PKB の精製

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞に熱ショック (45°C/20 分) (hs) を加えた。無処理細胞を (-) で示している。それぞれの細胞から FLAG アフィニティーカラムを用いて FLAG-PKB を精製した。

A) 精製 FLAG-PKB の確認

(パネル左) CBB 染色

(パネル右) 抗 PKB 抗体によるイムノプロット

B) 精製 FLAG-PKB (100 ng) を用いたリン酸化酵素活性測定

(パネル上) 自己リン酸化反応

(パネル下) core histone を基質とした活性測定

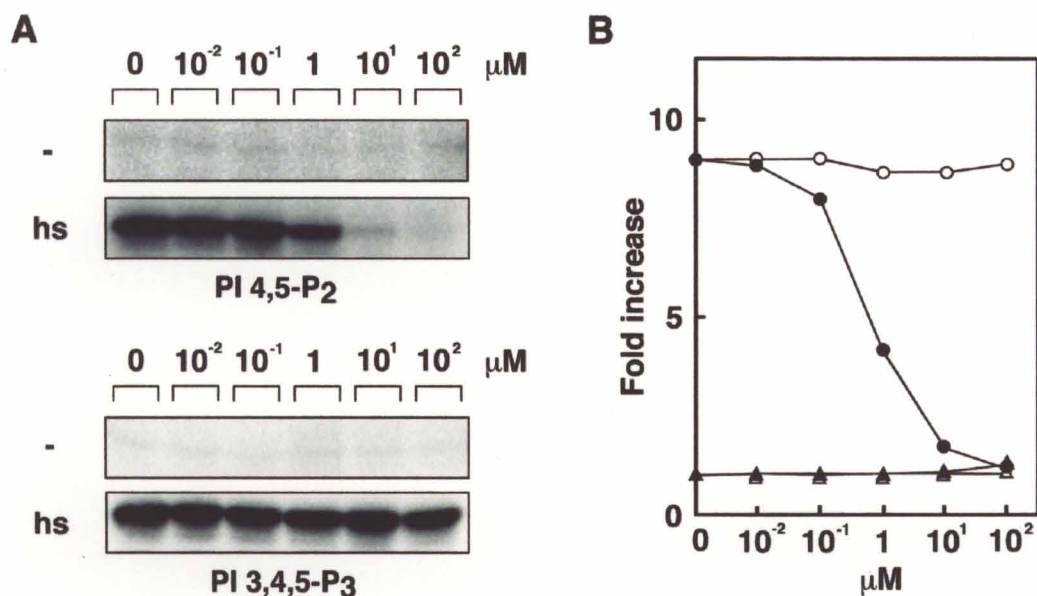


Figure 6 精製 PKB 酵素活性に対するイノシトールリン脂質の効果

無処理細胞または熱ショック細胞よりそれぞれ精製した不活性型 (-)、活性型 (hs) PKB を用いて、図中に示した濃度の PI 4,5-P₂、PI 3,4,5-P₃ 存在下で core histone を基質としたリン酸化酵素活性測定を行った。

A) リン酸化酵素活性測定

(パネル上 2 段) PI 4,5-P₂ の効果

(パネル下 2 段) PI 3,4,5-P₃ の効果

B) A の定量 不活性型 PKB のリン酸化酵素活性を基準としている。活性型 PKB に対する PI 4,5-P₂、PI 3,4,5-P₃ の効果 (●および○)、不活性型 PKB に対する PI 4,5-P₂、PI 3,4,5-P₃ の効果 (▲および△)

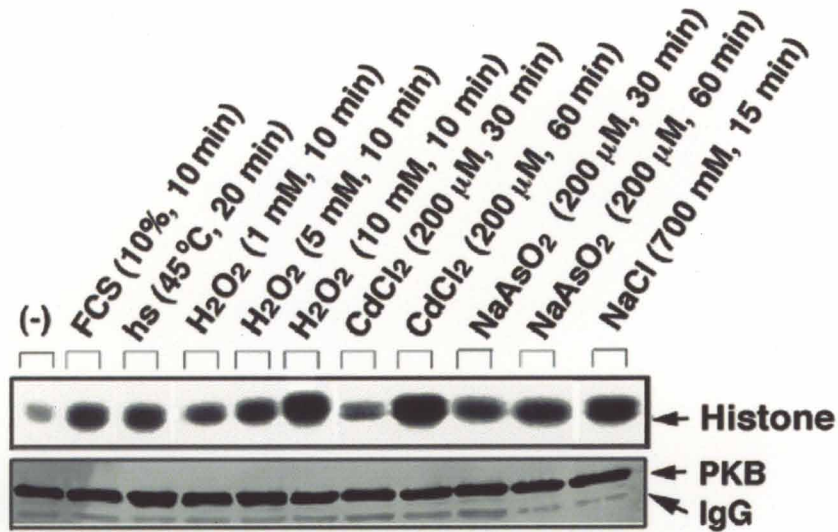


Figure 7 各種ストレスによる PKB 活性化

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞にそれぞれ血清 (FCS)、熱ショック (hs)、過酸化水素 (H₂O₂)、カドミウム (CdCl₂)、ヒ素 (NaAsO₂)、NaCl による高浸透圧処理を加えた。無処理細胞を (-) で示している。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-PKB を免疫沈降し、core histone を基質としてリン酸化酵素活性測定を行った。

(パネル上) リン酸化酵素活性測定

(パネル下) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

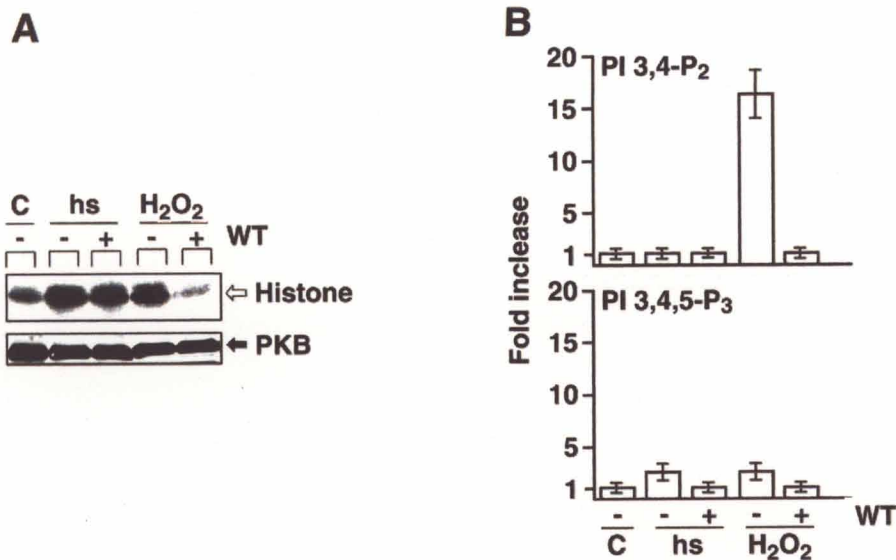


Figure 8 ストレス細胞の PKB 活性化と PI 3-kinase 反応産物の測定
 A) PKB 活性化に対する PI 3-kinase 阻害剤の効果。FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞に熱ショック (42℃/20 分) (hs) および過酸化水素 (10 mM/10 分) を加えた。無処理細胞を (C) で示している。Wortmannin (WT) 前処理の有無を (+) および (-) で示している。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-PKB を免疫沈降し、core histone を基質としてリン酸化酵素活性測定を行った。

(パネル上) リン酸化酵素活性測定

(パネル下) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

B) 細胞内 PI 3-kinase 反応産物の測定。細胞を ³²P 正リン酸で標識し、A) と同様の処理を行った。無処理細胞に対するそれぞれの glycerophosphoinositide 放射活性を相対値で示している。

(パネル上) PI 3,4-P₂

(パネル下) PI 3,4,5-P₃

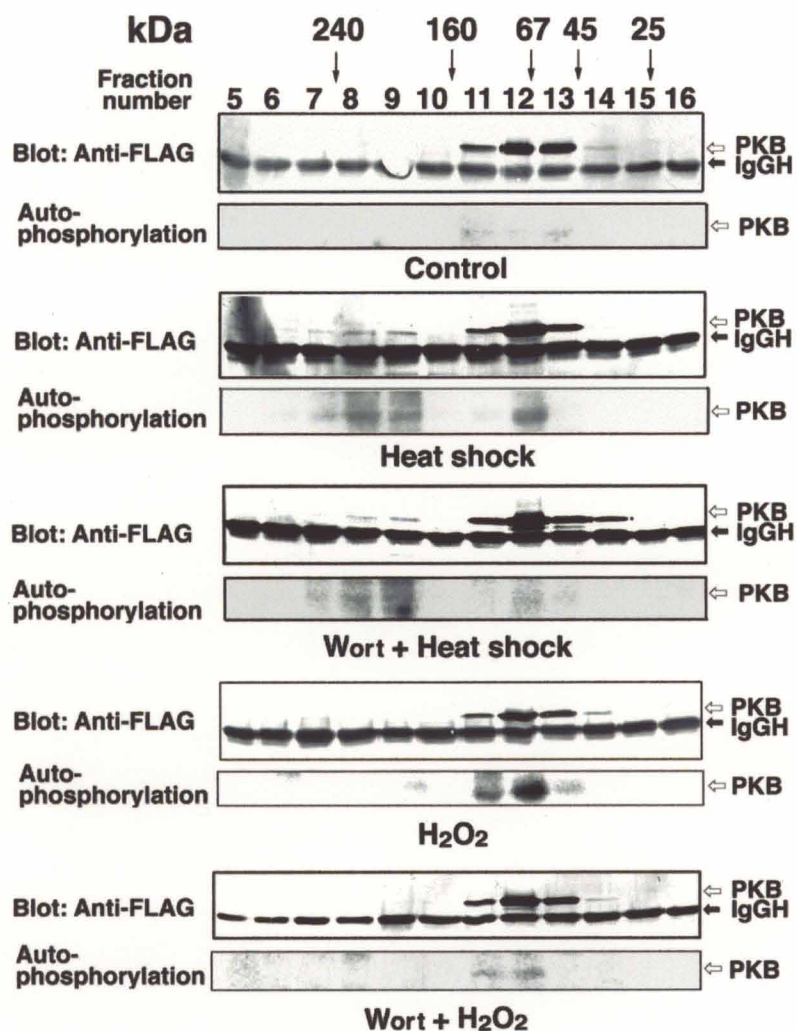


Figure 9 PKB 複合体

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞に熱ショック (45°C/20 分) または、過酸化水素 (10 mM/10 分) を加えた。無処理細胞を (Control) で示している。Wortmannin 前処理を Wort で示している。細胞質画分を調整し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。抗 FLAG 抗体を用いて各フラクションから FLAG-PKB を免疫沈降し、自己リン酸化反応による酵素活性測定を行った。

(パネル上) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノプロット

(パネル下) リン酸化酵素活性測定

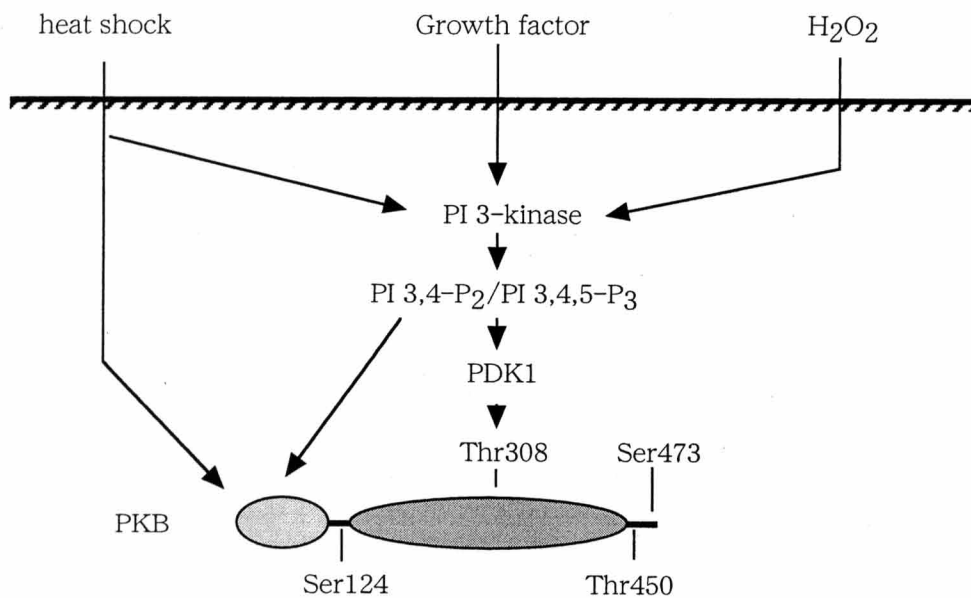


Figure 10 ストレスによる PKB 活性化経路とリン酸化アミノ酸残基

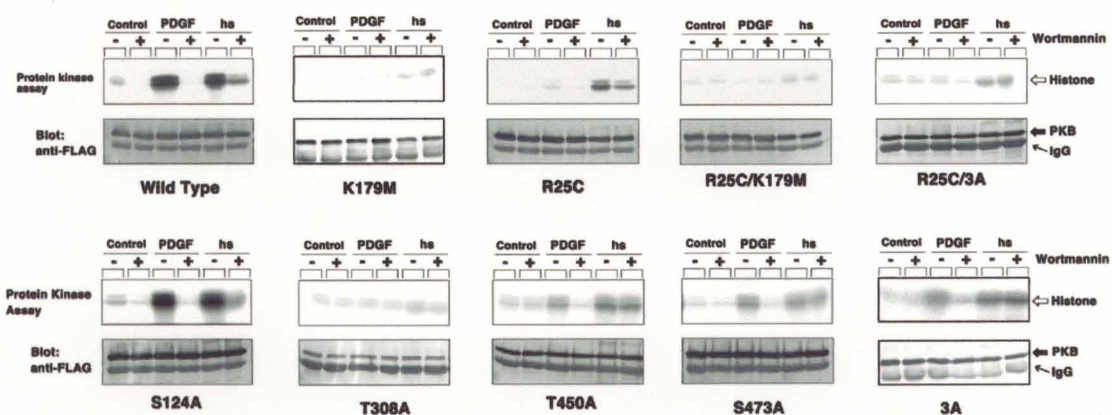


Figure 11 PKB 変異体の活性化

FLAG-PKB (wild type) または各種 PKB 変異体を発現した COS-7 細胞に、PDGF 刺激 (20 ng/ml/10 分) および熱ショック (42°C/15 分) (hs) を加えた。無処理細胞を (Control) で示している。Wortmannin 前処理の有無を (+) または (-) で示している。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-PKB および各種 PKB 変異体を免疫沈降し、core histone を基質としてリン酸化酵素活性測定を行った。

(パネル上) リン酸化酵素活性測定

(パネル下) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

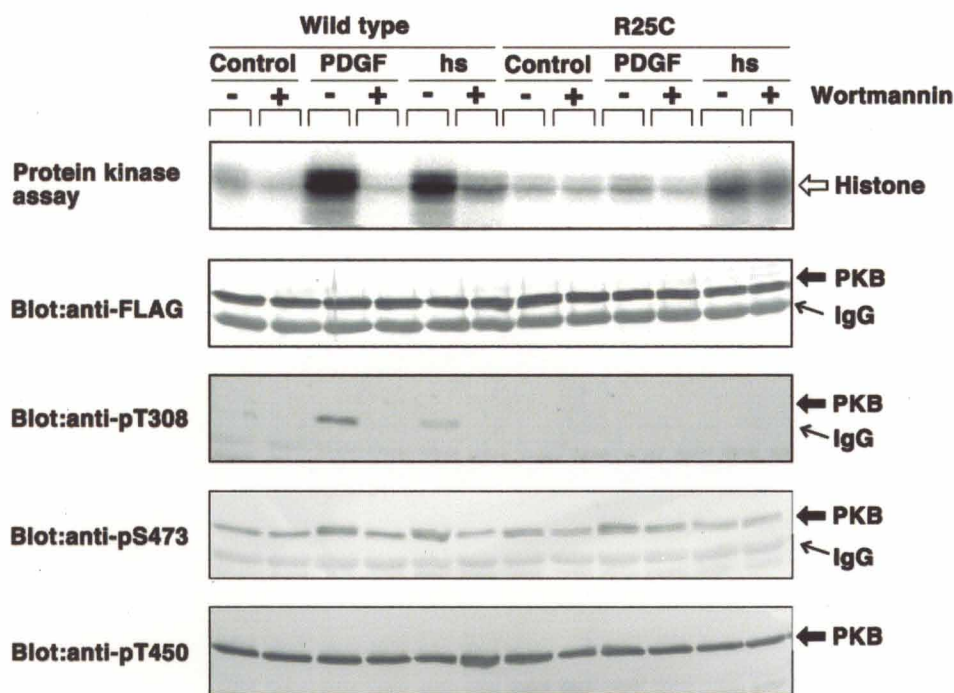


Figure 12 抗リン酸化ペプチド抗体を用いた PKB リン酸化の解析

FLAG-PKB (wild type) および R25C を発現した COS-7 細胞に PDGF 刺激 (20 ng/ml/10 分) および熱ショック (42℃/15 分) (hs) を加えた。無処理細胞を (Control) で示している。Wortmannin 前処理の有無を (+) および (-) で示している。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-PKB および R25C を免疫沈降し、core histone を基質としてリン酸化酵素活性測定を行った。

(パネル最上段) 免疫沈降物を用いたリン酸化酵素活性測定

(パネル下 4 段) 抗 FLAG 抗体、抗リン酸化 Thr 308 抗体、抗リン酸化 Thr 450 抗体および抗リン酸化 Ser 473 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

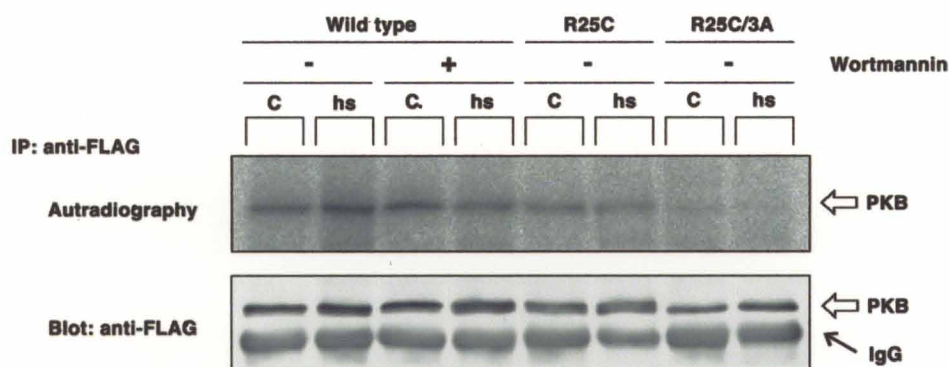


Figure 13 細胞標識による PKB リン酸化の解析

FLAG-PKB (wild type)、R25C、R25C/3A をそれぞれ発現した COS-7 細胞を ^{32}P 正リン酸で標識した後、熱ショック ($42^\circ\text{C}/15$ 分) (hs) を加えた。無処理細胞を (C) で示している。Wortmannin 前処理の有無を (+) または (-) で示している。FLAG-PKB および各種 PKB 変異体を抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。

(パネル上) 免疫沈降物のオートラジオグラフィー

(パネル下) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

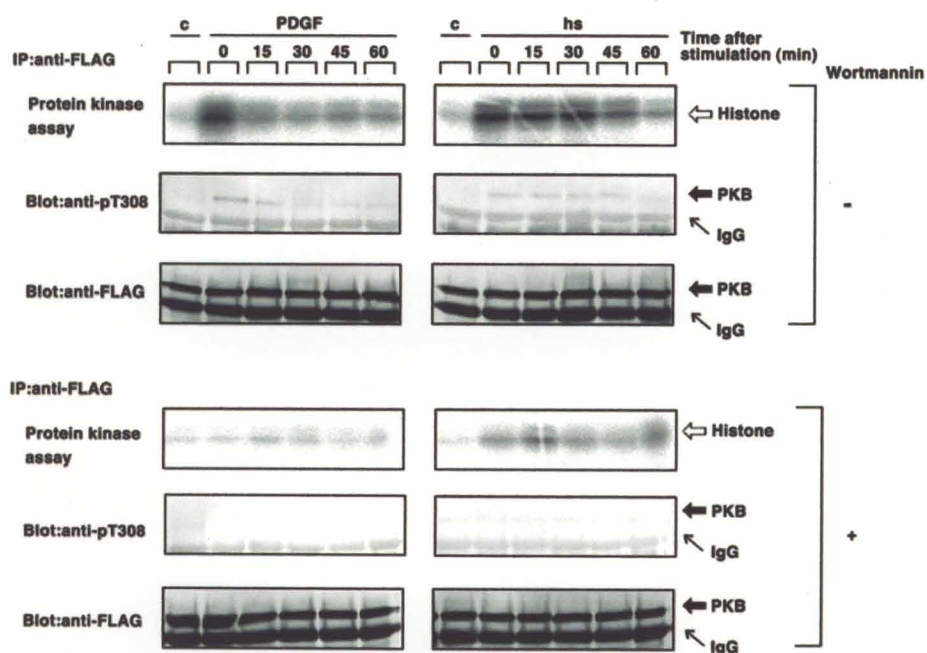


Figure 14 細胞内での PKB 脱リン酸化と不活性化

FLAG-PKB を発現した COS-7 細胞に PDGF 刺激 (20 ng/ml/10 分) および熱ショック (42℃/15 分) (hs) を加えた。無処理細胞を (C) で示している。Wortmannin 前処理の有無を (+) または (-) で示している。処理後、培地を 0.1% BSA を含む DMEM に交換し、37℃で図に示した時間培養を行った。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-PKB を免疫沈降し、core histone を基質としたリン酸化酵素活性測定を行った

(パネル上) リン酸化酵素活性測定

(パネル中) 抗リン酸化 Thr308 抗体を用いた免疫沈降物の
イムノブロット

(パネル下) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

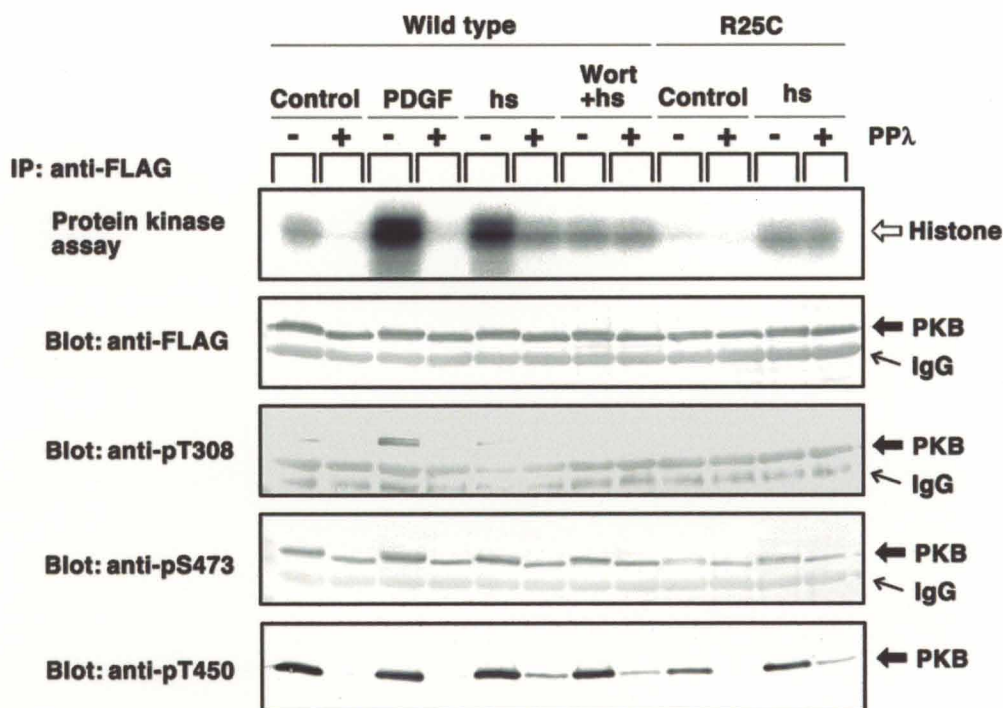


Figure 15 試験管内での PKB 脱リン酸化と不活性化

FLAG-PKB (wild type) または R25C を発現した COS-7 細胞に PDGF 刺激 (20 ng/ml/10 分) および熱ショック (42℃/15 分) (hs) を加えた。無処理細胞を (Control) で示している。Wortmannin 前処理を (Wort) で示している。抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-PKB または R25C を免疫沈降し、その後の protein phosphatase λ (PPλ) 処理の有無を (+) または (-) で示している。

(パネル最上段) 免疫沈降物を用いたリン酸化酵素活性測定

(パネル下 4 段) 抗 FLAG 抗体、抗リン酸化 Thr 308 抗体、抗リン酸化 Ser 473 抗体、および抗リン酸化 Thr 450 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

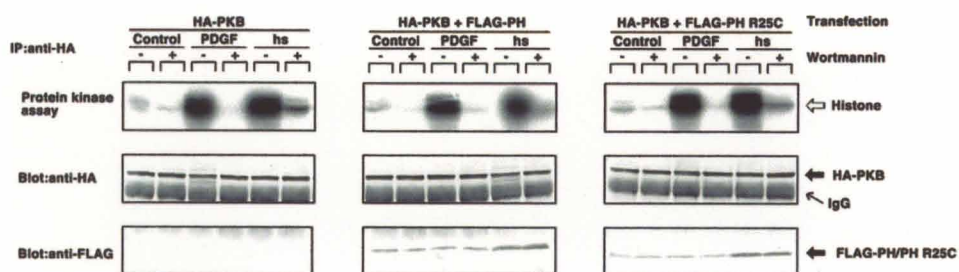


Figure 16 PH ドメインを介した PKB 複合体形成

HA-PKB を単独、あるいは FLAG-PH または FLAG-PH R25C と共発現した COS-7 細胞に PDGF 刺激 (20 ng/ml/10 分) および熱ショック (42℃/15 分) (hs) を加えた。無処理細胞を (Control) で示している。Wortmannin 前処理の有無を (+) または (-) で示している。抗 HA 抗体を用いて HA-PKB を免疫沈降し、core histone を基質としたリン酸化酵素活性測定および FLAG-PH、FLAG-PH R25C との結合の解析を行った。

(パネル上) リン酸化酵素活性測定

(パネル中) 抗 HA 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

(パネル下) 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降物のイムノブロット

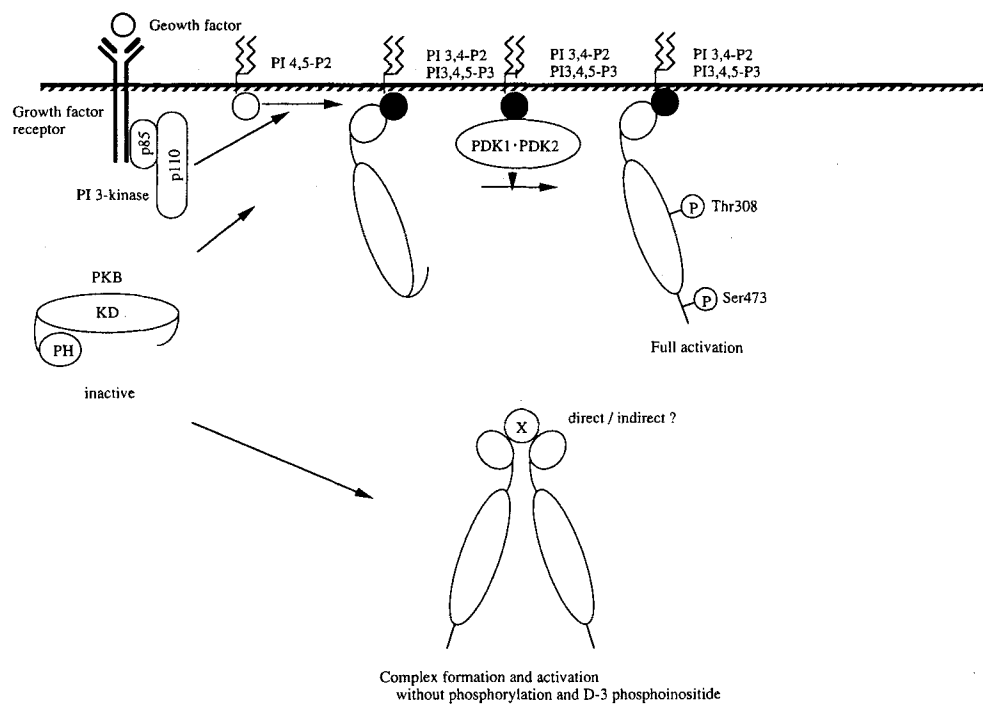


Figure 17 熱ショックによる PKB 活性化の分子機構

第 8 章 参考文献

- Ahmed, N.N., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Chan, T.O., and Tsichlis, P.N. (1997) Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 15, 3627-3632.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541-6551.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A., and Bownes, M. (1997a) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* 7, 776-789.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997b) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* 7, 261-269.
- Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (1998) Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* 8, 684-691.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.F., Han, J.W., and Hemmings, B.A. (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphataseinhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5699-5704.

- Andjelkovic, M., Jones, P.F., Grossniklaus, U., Cron, P., Schier, A.F., Dick, M., Bilbe, G., and Hemmings, B.A. (1995) Developmental regulation of expression and activity of multiple forms of the *Drosophila* RAC protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 4066-4075.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., and Tsichlis, P.N. (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277.
- Biggs, W.H.III, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7421-7426.
- Blume-Jensen, P., Janknecht, R., and Hunter, T. (1998) The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.* 8, 779-782.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Burgering, B.M.T., and Coffey, P.J. (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599-602.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Carpenter, C.L., and Cantley, L.C. (1996) Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1288, M11-M16.

- Chan, T.O., Rittenhouse, S.E., and Tsichlis, P.N. (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 965-1014.
- Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N., and Testa, J.R. (1992) AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9267-9271.
- Cifuentes, M.E., Delaney, T., and Rebecchi, M.J. (1994) D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate inhibits binding of phospholipase C- δ 1 to bilayer membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 1945-1948.
- Coffer, P.J., Jin, J., and Woodgett, J.R. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* 335, 1-13.
- Coffer, P.J., and Woodgett, J.R. (1991) Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.* 201, 475-481.
- Cross, D.A.E., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Crowder, R.J. and Freeman, R.S. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 2933-2943.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

- Datta, K., Franke, T.F., Chan, T.O., Makris, A., Yang, S.I., Kaplan, D.R., Morrison, D.K., Golemis, E.A., and Tsichlis, P.N. (1995) AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2304-2310.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., and Rider, M.H. (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J. Biol. Chem.* 272, 17269-17275.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.
- Ellis, L., Clauser, E., Morgan, D.O., Edery, M., Roth, R.A., and Rutter, W.J. (1986) Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell* 45, 721-732.
- Eves, E.M., Xiong, W., Bellacosa, A., Kennedy, S.G., Tsichlis, P.N., Rosner, M.R., and Hay, N. (1998) Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2143-2152.
- Filippa, N., Sable, C.L., Filloux, C., Hemmings, B., and Van Obberghen, E. (1999) Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4989-5000.

- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- Franke, T.F., Tartof, K.D., and Tsichlis, P.N. (1994) The SH2-like Akt homology (AH) domain of c-akt is present in multiple copies in the genome of vertebrate and invertebrate eucaryotes. Cloning and characterization of the *Drosophila melanogaster* c-akt homolog Dakt1. *Oncogene* 9, 141-148.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., and Tsichlis, P.N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736.
- Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Reddy, K.K., Falck, J.R., and Hemmings, B.A. (1997) High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 8474-8481.
- Fukui, Y., Kornbluth, S., Jong, S.M., Wang, L.H., and Hanafusa, H. (1989) Phosphatidylinositol kinase type I activity associates with various oncogene products. *Oncogene Res.* 4, 283-292.
- Gibson, T.J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M., and Birney, E. (1994) PH domain: the first anniversary. *Trends. Biochem. Sci.* 19, 349-353.
- Gingras, A.C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N., and Hay, N. (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* 12, 502-513.

- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576-596.
- Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S., and Fesik, S.W. (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371, 168-170.
- Haslam, R.J., Koide, H.B., and Hemmings, B.A. (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature* 363, 309-310.
- Hunter, T. (2000) Signaling-2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127.
- Hyvönen, M., Macias, M.J., Nilges, M., Oschkinat, H., Saraste, M., and Wilmanns, M. (1995) Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J.* 14, 4676-4685.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B., and Alessi, D.R. (1996) Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem. J.* 315, 709-713.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., and Hemmings, B.A. (1991a) Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4171-4175.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., and Hemmings, B.A. (1991b) Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell. Regul.* 2, 1001-1009.
- Kameyama, K., Haga, K., Haga, T., Kontani, K., Katada, T., and Fukada, Y. (1993) Activation by G protein $\beta\gamma$ subunits of β -adrenergic and muscarinic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 7753-7758

- Khwaja, A., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P.H., and Downward, J. (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* 16, 2783-2793.
- Kohn, A.D., Kovacina, K.S., and Roth, R.A. (1995) Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J.* 14, 4288-4295.
- Kohn, A.D., Takeuchi, F., and Roth, R.A. (1996) Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 271, 21920-21926.
- Konishi, H., Kuroda, S., and Kikkawa, U. (1994a) The pleckstrin homology domain of RAC protein kinase associates with the regulatory domain of protein kinase C ζ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1770-1775.
- Konishi, H., Kuroda, S., Tanaka, M., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kameyama, K., Haga, T., and Kikkawa, U. (1995) Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and $\beta\gamma$ subunits of G proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 526-534.
- Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Ono, Y., Tokunaga, C., Kuroda, S., and Kikkawa, U. (1996) Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7639-7643.
- Konishi, H., Shinomura, T., Kuroda, S., Ono, Y., and Kikkawa, U. (1994b) Molecular cloning of rat RAC protein kinase α and β and their association with protein kinase C ζ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 817-825.

- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L., and Burgering, B.M.T. (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-634.
- Krebs, E.G. (1994) The growth of research on protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 19, 439
- Kulik, G., and Weber, M.J. (1997) Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6711-6718.
- Kuroda, S., Tokunaga, C., Kiyohara, Y., Higuchi, O., Konishi, H., Mizuno, K., Gill, G.N., and Kikkawa, U. (1996) Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 271, 31029-31032.
- Laine, J., Kunstle, G., Obata, T., Sha, M., and Noguchi, M. (2000) The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol. Cell* 6, 395-407.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M., O'Brien, R., Sigler, P.B., and Schlessinger, J. (1995) Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10472-10476.
- Masure, S., Haefner, B., Wesselink, J.J., Hoefnagel, E., Mortier, E., Verhasselt, P., Tuytelaars, A., Gordon, R., and Richardson, A. (1999) Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3. *Eur. J. Biochem.* 265, 353-360.
- Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L., and Baltimore, D. (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73, 629-630.

- Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J., and Saraste, M. (1993) The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends. Biochem. Sci.* 18, 343-348.
- Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D.A., Weigel, R.J., and Roth, R.A. (1999) Identification of a human Akt3 (protein kinase B γ) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 906-910.
- Nishizawa, K., Yano, T., Shibata, M., Ando, S., Saga, S., Takahashi, T., and Inagaki, M. (1991) Specific localization of phosphointermediate filament protein in the constricted area of dividing cells. *J. Biol. Chem.* 266, 3074-3079
- Paradis, S., and Ruvkun, G. (1998) *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev.* 12, 2488-2498.
- Philpott, K.L., McCarthy, M.J., Klippel, A., and Rubin, L.L. (1997) Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons. *J. Cell Biol.* 139, 809-815.
- Sable, C.L., Filippa, N., Hemmings, B., and Van Obberghen, E. (1997) cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. *FEBS Lett.* 409, 253-257.
- Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L.C., Kaplan, D.R., and Franke, T.F. (1997) Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11345-11350.

- 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. (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710-714.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 296-299.
- Takaishi, H., Konishi, H., Matsuzaki, H., Ono, Y., Shirai, Y., Saito, N., Kitamura, T., Ogawa, W., Kasuga, M., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1999) Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11836-11841.
- Tang, E.D., Nunez, G., Barr, F.G., and Guan, K.L. (1999) Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J. Biol. Chem.* 274, 16741-16746.
- Tanti, J.F., Grillo, S., Gremeaux, T., Coffey, P.J., Van, Obberghen, E., and Le Marchand-Brustel, Y. (1997) Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 138, 2005-2010.
- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J.A., Shaw, G., and Lefkowitz, R.J. (1994) Binding of G protein $\beta\gamma$ -subunits to pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* 269, 10217-10220.
- Ueki, K., Yamamoto-Honda, R., Kaburagi, Y., Yamauchi, T., Tobe, K., Burgering, B.M.T., Coffey, P.J., Komuro, I., Akanuma, Y., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. (1998) Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 273, 5315-5322.

- Wang, D.S., Shaw, R., Winkelmann, J.C., and Shaw, G. (1994) Binding of PH domains of β -adrenergic receptor kinase and β -spectrin to WD40/ β -transducin repeat containing regions of the β -subunit of trimeric G-proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 29-35.
- Watanabe, Y., Hirofuji, H., and Ozaki, S., (1994) Synthesis of a phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Tetrahedron Lett.* 35, 123-124
- Yagisawa, H., Hirata, M., Kanematsu, T., Watanabe, Y., Ozaki, S., Sakuma, K., Tanaka, H., Yabuta, N., Kamata, H., Hirata, H., Nojima, H. (1994) Expression and characterization of an inositol 1,4,5-trisphosphate binding domain of phosphatidylinositol-specific phospholipase C- δ 1. *J. Biol. Chem.* 269, 20179-20188.
- Yano, S., Tokumitsu, H., and Soderling, T.R. (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396, 584-587.
- Yao, L., Kawakami, Y., and Kawakami, T. (1994) The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9175-9179.

発表論文

- Matsuzaki, H., Konishi, H., Tanaka, M., Ono, Y., Takenawa, T., Watanabe, Y., Ozaki, S., Kuroda, S., and Kikkawa, U. (1996) Isolation of the active form of RAC-protein kinase (PKB/Akt) from transfected COS-7 cells treated with heat shock stress and effects of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on its enzyme activity. *FEBS Lett.* 396, 305-308.
- Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Kuroda, S., Ono, Y., and Kikkawa, U. (1997) Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein hsp27. *FEBS Lett.* 410, 493-498.
- Konishi, H., Fujiyoshi, T., Fukui, Y., Matsuzaki, H., Yamamoto, T., Ono, Y., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Kikkawa, U. (1999) Activation of protein kinase B induced by H₂O₂ and heat shock through distinct mechanisms dependent and independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biochem.* 126, 1136-1143.
- Matsuzaki, H., Louie, R.K., Ymamoto, T., Ono, Y., and Kikkawa, U. Molecular mechanism of heat shock-induced activation of protein kinase B independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* submitted

謝辞

本研究を行うにあたりご指導、激励を頂きました、神戸大学バイオシグナル研究センター 吉川 潮教授、小野功貴教授、小西博昭助手に心から感謝いたします。

貴重なサンプルを供与して頂きました、東京大学医科学研究所 竹縄忠臣教授、愛媛大学工学部 渡辺 裕教授、尾崎庄一郎教授、共同研究を行って頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科 福井泰久教授に深く感謝いたします。

共に吉川研究室で研究を行ってきた吉川研究室のみなさま、多くの助言、励ましを頂いた神戸大学バイオシグナル研究センター、遺伝子実験施設、理学部のみなさまにお礼を申し上げます

最後に、これまでさまざまな面で支えていただいた家族と友人に感謝いたします。

平成 13 年 1 月
松崎 秀紀