



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。



【228】

氏名・(本籍) 松崎 秀紀 (広島県)

博士の専攻分野の名称 博士 (理学)

学位記番号 博い第155号

学位授与の要件 学位規則第条第1項該当

学位授与の日付 平成13年3月31日

【学位論文題目】

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

審査委員

主査 教授 小野 功貴

教授 大川 秀朗 教授 吉川 潮

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。

論文審査の結果の要旨

氏名	松崎 秀紀		
論文題目	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		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	小野 功 晋
	副査	教授	大川 香 郎
	副査	教授	吉 川 潮
	副査		
要 旨			
<p>生体は刻々と変化する外界環境の変動に対応し、多細胞生物個体内では生理活性物質のシグナルがそれぞれの細胞の応答をもたらす生体機能が統御されている。これらの生体機能、例えば物質の代謝、輸送、形態の維持、運動、細胞の増殖、分化といった細胞の動的役割は酵素を代表とするタンパク質により営まれておりタンパク質の機能調節は生体制御の極めて重要な過程である。一方、哺乳類遺伝子にコードされる約10万種類のタンパク質のうちには、2,000種類以上ものタンパク質リン酸化酵素が存在すると推定されており、タンパク質リン酸化/脱リン酸化反応は生体を制御するシグナル伝達の主要な分子機構であることが示されている。本研究では、タンパク質リン酸化酵素 PKB の活性制御機構を明らかにすることにより、本酵素の生体における機能を解</p>			

明することを目的として以下の研究を行った。

タンパク質リン酸化酵素 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酵素触媒領域を持つ。そして、PKB は細胞増殖因子の直接の作用点の一つであるホスファチジルイノシトール (PI) 3-キナーゼの反応産物とその PH ドメインに作用すること、および上流酵素 PDK 1 によるリン酸化を受けることにより活性化され、各種の基質タンパク質をリン酸化することにより細胞増殖因子のシグナルを伝達していることが提唱されている。本申請者は、まず PKB をエピトープタグ付加分子として培養細胞に発現し、様々な条件で処理された細胞から免疫沈降法により PKB を分離し、そのタンパク質リン酸化酵素活性を試験管内で測定することにより PKB の活性化を誘導する細胞刺激の検索を行った。その結果、細胞増殖因子のみならず、熱、過酸化水素、高浸透圧、重金属といった様々な細胞ストレスによって PKB が活性化を受けることを見出した。次いで、これらの細胞ストレスのうち熱ショックと過酸化水素処理について詳細に解析を行い、過酸化水素処理による PKB の活性化は PI 3-キナーゼ阻害剤として知られる wortmannin による抑制を受けないこと、および過酸化水素処理により細胞内で PI 3-キナーゼ反応産物が増加することが明らかになった。従って、過酸化水素処理は細胞増殖因子と同様の機構で PKB の活性化を誘導すると結論された。なお、この過酸化水素による PI 3-キナーゼ反応の亢進は、これまでに知られていなかった新たなシグナル経路である。これに対して、熱ショックは軽度に PI 3-キナーゼ反応を亢進するものの、熱ショック細胞からは PKB の少なくとも一部がタンパク質複合体として回収されることが示され、熱ショックは PI 3-キナーゼとは独立した機構で PKB の活性化をもたらすことが見出された。

そこで、本申請者は細胞増殖因子として血小板由来増殖因子 (PDGF) を用い、PDGF と熱ショックによる PKB 活性化の分子機構の比較検討を行った。細胞増殖因子による PKB 活性化の分子機構としては、その PH ドメインへの PI 3-キナーゼ反応産

物の結合ならびに PKB 分子自身へのリン酸化の両者が重要であることが報告されている。また、PKB 分子のリン酸化部位としてはリン酸化酵素触媒領域の活性化ループ内の Thr-308、カルボキシル末端側領域の Thr-450、Ser-473、および PH ドメインとリン酸化酵素触媒領域との間の Ser-145 の合計 4 カ所が同定されており、これらのうち、Thr-308 および Ser-473 のリン酸化は細胞増殖因子により誘導され、ことに前者は上流酵素 PDK 1 によるリン酸化であり PKB 活性化に重要であるとされている。本申請者は、まず PH ドメイン内の PI 3-キナーゼ反応産物の結合に重要であると推定されている Arg-25 を置換した R25C 変異体を作製し、本変異体は PDGF によっては活性化を受けないものの、熱ショックにより活性上昇がもたらされ、この活性上昇は wortmannin による抑制を受けないことを明らかにした。なお、観察している活性が R25C 変異体自身に由来することは、R25C 変異体にさらにリン酸化酵素活性を失うアミノ酸置換を導入することによってその酵素活性が消失することにより確認している。次いで、各リン酸化アミノ酸残基を Ala に置換した変異体を作製しその活性化を検討した。その結果、Thr-308 変異体はもはやリン酸化酵素活性を持たず、これに対して Ser-145、Thr-450、Ser-473 のそれぞれ、および 3 カ所を全て点変異した分子では野生型とほぼ同様に PDGF および熱ショックにより活性化を受け、wortmannin は前者による活性上昇を抑制するものの後者による活性化には影響を与えなかった。また、R25C 変異体にこれら 3 カ所の点変異を導入しても基本的に R25C 変異体と同じく熱ショックによってのみ活性上昇がもたらされた。従って、これら 4 カ所のリン酸化部位のうち、Thr-308 の変異はリン酸化酵素活性の消失をもたらすものの、その他の残基のリン酸化は PKB の酵素活性に必須ではないことが明らかとなった。また、熱ショックによる PKB 活性化における Thr-308 のリン酸化の役割を明らかにするために、リン酸化を受けた Thr-308 を特異的に認識する抗リン酸化抗体を用いた検討を行った。その結果、野生型 PKB は熱ショックにより Thr-308 のリン酸化を受けるものの、

wortmannin により Thr-308 のリン酸化が消失しても、なお酵素活性は完全には抑制を受けず、また R25C 変異体は熱ショックにより活性化を受ける際にもその Thr-308 のリン酸化を伴っていないことが明らかになった。

従って、熱ショックは PH ドメインへの PI 3-キナーゼ反応産物の結合および PKB 分子自身のリン酸化のいずれにも依存せずに PKB の活性化を誘導すると考えられる。そこで、本申請者は細胞を PDGF および熱ショックにより刺激した後に、PDGF 非存在下、常温で培養し、それぞれの刺激の後の PKB の不活性化の経時的変化を比較観察した。その結果、PDGF 刺激により活性化された PKB は急速に Thr-308 の脱リン酸化とともにその活性が低下するのに対して、熱ショックにより誘導された PKB 活性は PDGF 刺激に比して長時間に渡り持続することが示された。また、PDGF および熱ショックにより刺激した細胞から回収した PKB を試験管内でホスファターゼ処理を行っても、細胞内と同様に後者は前者よりもホスファターゼに抵抗性を示し、ホスファターゼ処理後も高い酵素活性を示した。

以上の結果から、PKB はこれまでに報告されている PI 3-キナーゼの標的として PI 3-キナーゼ反応産物の結合およびリン酸化反応により活性化を受けるのみならず、各種の細胞ストレスによっても活性化を受け、ことに熱ショックは PI 3-キナーゼとは独立の機構でおそらく PKB の立体構造の変化による活性化を誘導すると考えられる。なお、本申請者は熱ショックにより PKB が細胞質から細胞核周辺に移行することを示す結果も得ていることから、PKB は細胞増殖因子と熱ショックによる異なる生体機能の制御に関与することが強く示唆される。本研究はタンパク質リン酸化酵素 PKB について、従来、知られていなかった細胞内での活性化機構と役割を示すとともに、細胞増殖因子のシグナル伝達と環境ストレスに対する細胞応答の相関について新たな視点を与えるものでありその意義は大きい。よって学位申請者 松崎秀紀は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。