



Spatiotemporal Analysis of the Molecular Interaction between PICK1 and PKC

升川, 健司

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4035

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004035>

※ 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。



【 1 4 1 】

氏 名・（本 籍） 升川 健司 （ 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1839号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

Spatiotemporal Analysis of the Molecular Interaction between
PICK1 and PKC

（PICK1とPKCの間における分子相互作用の時空間解析）

審 査 委 員

主 査 教 授 春日 雅人

教 授 横野 浩一

教 授 吉川 潮

PICK1 (protein interacting with protein kinase C) は yeast two-hybrid system にて α PKC 結合タンパク質として単離されたタンパク質である。PICK1 はその PDZ 領域を介して PKC と結合し、複合体を形成する。この複合体は、さらにレセプターやトランスポーターなどの細胞膜タンパクと結合することにより、種々の細胞膜の機能タンパク質を制御していることが知られている。最近の研究でこのほかにも神経伝達物質レセプターのクラスターリングや、シナプスでのレセプターの制御において、PDZ 領域を含有するタンパク質の重要性が報告されているが、PICK1 においては、Eph レセプターチロシンキナーゼと ephrin-B リガンド、AMPA レセプターの GluR2/3/4c サブユニット、mGluR7a レセプター、ドーパミンやノルエピネフリントランスポーターと相互に作用することが明らかにされている。さらに、PICK1 は、ニューロンにおいては α PKC と mGluR7 を含む複合体を形成することも報告されている。しかしながら、PICK1 と α PKC がいつ・どこで結合するのかは明らかにされていない。

本研究においては、PICK1 の結合パートナーとして PKC の機能的な役割を説明するために、live imaging techniques によって細胞内での PICK1 と α PKC の時間的・空間的な相互作用を検討した。それにより、PKC 依存的な PICK1 の動態、およびその制御メカニズムを明らかにすることを試みた。

α PKC とともに PICK1 を HEK293 細胞に発現させたときには TPA 刺激によって PICK1 は細胞質膜へトランスロケーションしたが、PICK1 を単独で過剰発現したときには TPA 刺激は PICK1 を移動させなかった。 β PKC や γ PKC のような他の PKC サブタイプは、それら自身は α PKC と同様に TPA 刺激によって細胞膜へのトランスロケーションを示した。しかし、TPA による PICK1 のトランスロケーションは α PKC 以外の他の PKC サブタイプとの共発現では認められず、 α PKC による特異的な現象と判断された。

TPA 刺激による PKC の細胞膜へのトランスロケーションは、PKC 阻害剤 (Go 6983) によっても阻害されなかったが、PICK1 のトランスロケーションは PKC 阻害剤によって完全に抑制された。これらの現象は PICK1 の TPA 刺激によるトランスロケーションが、 α PKC の過剰発現に加えて α PKC の活性化を必要とすることを示した。

次に α PKC の活性化がどのように必要であるのかについて調べた。そのためにまず α PKC による PICK1 のリン酸化が α PKC と PICK1 のトランスロケーションのために必要である可能性を検討した。PICK1 は、PKC によりリン酸化されうる部位を3箇所所有しているため、そのリン酸化部位 (T82、T227、T249) をアラニン残基に変異させて、TPA 刺激による PICK1 変異体の動態を観察した。その結果、T227 と T249 の変異では認められた PICK1 のトランスロケーションが、T82 をアラニン残基に変異させた PICK1 では見られなかった。

それらのことは、T82 のリン酸化が PICK1 のトランスロケーションには重要であることを示唆した。しかしながら、T82 は PICK1 の PDZ 結合領域に存在しており、T82 の変異がリン酸化の抑制ではなくて、PICK1 の PDZ 結合領域と α PKC の相互作用を妨げることによって、PICK1 のトランスロケーションを妨げている可能性もあった。もし、T82 のリン酸化が PICK1 のトランスロケーションのための反応に重要ならば、リン酸化状態を模倣した状態の PICK1-T82E (T82 をグルタミン酸への置換した変異体) は、TPA 刺激がなくても細胞膜にトランスロケーションすると考えられた。しかし、PICK1-T82E は TPA の存在下、非存在下に関わらず、トランスロケーションを示さなかった。これらの結果は、T82 が PICK1 と α PKC の間の相互作用にとって重要であることを示唆したが、T82 のリン酸化の必要性については証明することができなかった。

TPA 刺激による α PKC と PICK1 のトランスロケーションは非常にゆっくりとしたものであり、細胞質膜に α PKC と PICK1 が結合してから移動するのか、あるいは移動してから結合するのかどちらが先行して行われているのかどうかについて確認することが困難であった。そこで、我々は α PKC の一時的な膜への移動を誘発する UTP による刺激にて、 α PKC と PICK1 の移動における時間の差について調べた。その結果、UTP 刺激にて PICK1 より先に α PKC が細胞質膜へ移動し、その後、 α PKC が PICK1 より先に細胞質膜から離れることがわかった。そのことは、UTP 刺激は α PKC を活性化し、PICK1 は活性化した α PKC と結合することによりリン酸化され、細胞質膜に移行し、その後細胞膜で α PKC から PICK1 が分離することを示唆した。このことから、活性化した α PKC が PICK1 を細胞質膜に移動させるために必要であるけれども、細胞質膜上で PICK1 が存在するためには α PKC との結合は必要ではないことが示唆された。つまり、一旦、PICK1 が細胞質膜に移動すると、 α PKC との相互作用は PICK1 の細胞膜局在のために必要でないことがわかった。このことから、 α PKC による PICK1 のリン酸化がレセプターのような細胞質膜上にある未知のタンパクと結合する可能性が示唆された。これらの結果は、 α PKC と PICK1 の間の相互作用が一時的で、膜上では必ずしも PICK1 による、または、 α PKC によるレセプター/トランスポーターの制御のためには相互作用が必要でないかもしれないことも示唆した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 182 / 号	氏 名	升川 健司
論文題目 Title of Dissertation	Spatiotemporal analysis of the molecular interaction between PICK1 and PKC PICK1 と PKC の間における分子相互作用の時空間解析		
審査委員 Examiner	主 査 春日 雅人 Chief Examiner 副 査 横野 浩一 Vice-examiner 副 査 吉川 潮 Vice-examiner		
審査終了日	平成 19 年 3 月 14 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

PICK1 (protein interacting with protein kinase C) は yeast two-hybrid system にて α PKC 結合タンパク質として単離されたタンパク質である。PICK1 はその PDZ 領域を介して PKC と結合し、複合体を形成する。この複合体は、さらにレセプターやトランスポーターなどの細胞膜タンパクと結合することにより、種々の細胞膜の機能タンパク質を制御していることが知られている。最近の研究でこのほかにも神経伝達物質レセプターのクラスターリングや、シナプスでのレセプターの制御において、PDZ 領域を含有するタンパク質の重要性が報告されているが、PICK1 においては、Eph レセプターチロシンキナーゼと ephrin-B リガンド、AMPA レセプターの GluR2/3/4c サブユニット、mGluR7a レセプター、ドーパミンやノルエピネフリン トランスポーターと相互に作用することが明らかにされている。さらに、PICK1 は、ニューロンにおいては α PKC と mGluR7 を含む複合体を形成することも報告されている。しかしながら、PICK1 と α PKC がいつ・どこで結合するのかは明らかにされていない。

本研究においては、PICK1 の結合パートナーとして PKC の機能的な役割を説明するために、live imaging techniques によって細胞内での PICK1 と α PKC の時間的・空間的な相互作用を検討した。それにより、PKC 依存的な PICK1 の動態、およびその制御メカニズムを明らかにすることを試みた。

α PKC とともに PICK1 を HEK293 細胞に発現させたときには TPA 刺激によって PICK1 は細胞質膜へトランスロケーションしたが、PICK1 を単独で過剰発現したときには TPA 刺激は PICK1 を移動させなかった。 β PKC や γ PKC のような他の PKC サブタイプは、それら自身は α PKC と同様に TPA 刺激によって細胞膜へのトランスロケーションを示した。しかし、TPA による PICK1 のトランスロケーションは α PKC 以外の他の PKC サブタイプとの共発現では認められず、 α PKC による特異的な現象と判断された。TPA 刺激による PKC の細胞膜へのトランスロケーションは、PKC 阻害剤 (Gö6983) によっても阻害されなかったが、PICK1 のトランスロケーションは PKC 阻害剤によって完全に抑制された。これらの現象は PICK1 の TPA 刺激によるトランスロケーションが、 α PKC の過剰発現に加えて α PKC の活性化を必要とすることを示した。

次に α PKC の活性化がどのように必要であるのかについて調べた。そのためにまず α PKC による PICK1 のリン酸化が α PKC と PICK1 のトランスロケーションのために必要である可能性を検討した。PICK1 は、PKC によりリン酸化されうる部位を3箇所所有しているため、そのリン酸化部位 (T82、T227、T249) をアラニン残基に変異させて、TPA 刺激による PICK1 変異体の動態を観察した。その結果、T227 と T249 の変異では認められた PICK1 のトランスロケーションが、T82 をアラニン残基に変異させた PICK1 では見られなかった。それらのことは、T82 のリン酸化が PICK1 のトランスロケーションには重要であることを示唆した。しかしながら、T82 は PICK1 の PDZ 結合領域に存在しており、T82 の変異がリン酸化の抑制ではなくて、PICK1 の PDZ 結合領域と α PKC の相互作用を妨げることによって、PICK1 のトランスロケーションを妨げている

可能性もあった。もし、T82のリン酸化がPICK1のトランスロケーションのための反応に重要ならば、リン酸化状態を模倣した状態のPICK1-T82E(T82をグルタミン酸への置換した変異体)は、TPA刺激がなくても細胞膜にトランスロケーションすると考えられた。しかし、PICK1-T82EはTPAの存在下、非存在下に関わらず、トランスロケーションを示さなかった。これらの結果は、T82がPICK1と α PKCの間の相互作用にとって重要であることを示唆したが、T82のリン酸化の必要性については証明することができなかった。

569 TPA刺激による α PKCとPICK1のトランスロケーションは非常にゆっくりとしたものであり、細胞質膜に α PKCとPICK1が結合してから移動するのか、あるいは移動してから結合するのかどちらが先行して行われているかどうかについて確認することが困難であった。そこで、我々は α PKCの一時的な膜への移動を誘発するUTPによる刺激にて、 α PKCとPICK1の移動における時間の差について調べた。その結果、UTP刺激にてPICK1より先に α PKCが細胞質膜へ移動し、その後、 α PKCがPICK1より先に細胞質膜から離れることがわかった。そのことは、UTP刺激は α PKCを活性化し、PICK1は活性化した α PKCと結合することによりリン酸化され、細胞質膜に移行し、その後、細胞質膜で α PKCからPICK1が分離することを示唆した。このことから、活性化した α PKCがPICK1を細胞質膜に移動させるために必要であるけれども、細胞質膜上でPICK1が存在するためには α PKCとの結合は必要ではないことが示唆された。つまり、一旦、PICK1が細胞質膜に移動すると、 α PKCとの相互作用はPICK1の細胞膜局在のために必要でないことがわかった。このことから、 α PKCによるPICK1のリン酸化がレセプターのような細胞質膜上にある未知のタンパクと結合する可能性が示唆された。これらの結果は、 α PKCとPICK1の間の相互作用が一時的で、膜上では必ずしもPICK1による、または、 α PKCによるレセプター/トランスポーターの制御のためには相互作用が必要でないかもしれないことも示唆された。

価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。