

論文の内容の要旨

論文題目

Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is regulated through phosphorylation response by extracellular stimuli.

和訳

ホスファチジルイノシトール4リン酸 (PIP) 5キナーゼ のリン酸化による活性制御機構

指導教官 竹縄忠臣教授

東京大学大学院医科学研究科

平成9年4月入学

医学博士過程

病因・病理学専門

氏名 朴 宣奏

ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) キナーゼはホスファチジルイノシトール (4, 5) ニリン酸 (PIP₂) 合成の律速酵素であり PIP₂ 量を規定する重要な酵素である。イノシトールリン脂質情報伝達系は細胞外刺激を受けて PIP₂ がホスホリパーゼ C (PLC) により分解されイノシトール三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DG) という2つのセカンドメッセンジャーを産生することを基本とするが、その際セカンドメッセンジャー産生を持続するためには相補的な PIP₂ 合成が不可欠である。しかし、様々な細胞外刺激に伴う PIP₂ 合成の上昇や PIP キナーゼの活性化などは報告されているものの、その分子レベルでの PIP キナーゼの活性制御機構や生体内における重要性など、多くが未解明のままであった。

NIH 3T3 細胞内に発現させた PIP5 キナーゼ type 1 (PIPKI) 蛋白質はウェスタンブロット上で複数のバンドとして検出された。³²P-無機リン酸によるアイソトープラベルを行なった結果、PIPKI はリン酸化蛋白質として細胞内で存在することが明らかになった。

細胞内で PIPKI をリン酸化するキナーゼを同定するために、種々のプロテインキナーゼ阻害剤を使用し検討したところ、PIPKI が cAMP 依存性のプロテインキナーゼ A(PKA)によりリン酸化されることを *in vivo* で確認した。チロシンキナーゼやカルシウム依存性のキナーゼ (CaMK)、プロテインキナーゼ C (PKC) の阻害剤ではリン酸化の変化は認められなかった。また、PKA 阻害剤処理により、PIPKI のリン酸化を抑制したところ、PIPKI の脂質キナーゼ活性が 50%まで低下した。

次に、GST 融合蛋白質を用いて、*in vitro* でのリン酸化を調べた。type1 の 3 つのアイソフォーム (α, β, γ) とも PKA によってリン酸化され、その活性はともに抑制されることが明らかになった。さらに、細胞から免疫沈降させた PIPKI をアルカリホスファターゼ (CIAP)により脱リン酸化処理すると、酵素活性は 170%以上増加した。しかし、この免疫沈降物を逆に PKA によってリン酸化したところ、追加的なリン酸化は認められるものの、活性の変化は認められなかったことから、活性の制御と無関係な *in vitro* のみのリン酸化部位が存在することも示唆された。PKA リン酸化における PIPKI 活性に対する阻害を経時的に調べた結果、リン酸化の上昇に相関して、活性の低下が観察された。

PKA による PIPKI のリン酸化部位を同定するため、まずリン酸化アミノ酸分析を行ない、*in vivo* においてセリン残基のみにリン酸化が起きていることを確認した。また、C 末端からの欠損変異体を作製し、*in vitro* でリン酸化反応を行ったところ、175 番から 260 番までの約 85 アミノ酸の領域でリン酸化が起きていることが分かった。次にこの領域において、全ての PIPKI アイソフォームで保存されているセリン残基をアラニンに置換した変異体を作製し、リン酸化実験を行った結果、214 番目セリン残基が *in vitro* での主要なリン酸化部位であることが明らかになった。さらに、この変異体と野生型 (wild type) の peptide mapping 比較により、214 番目のセリン残基が唯一の細胞内におけるリン酸化部位であることが確認された。また、細胞を cAMP で刺激し PKA を活性化させるなどの実験では新たなリン酸化部位の出現や 214 番残基のリン酸化の変化はなく、PIPKI は全て 214 セリン残基でリン酸化された状態で細胞内で存在すると判断された。

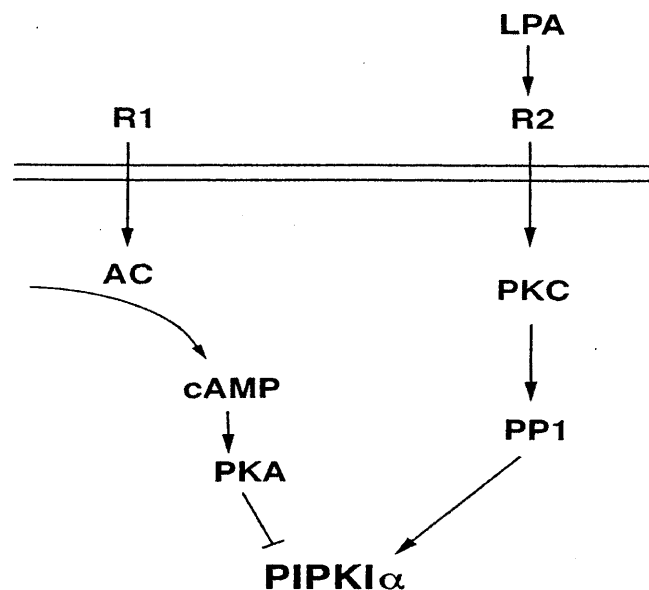
リン酸化により抑制されている PIPKI を活性化させるホスファターゼを同定する目的で、発現させた細胞に種々な刺激を加え、リン酸化の変化を調べた。

その結果、リゾホスファチジン酸 (LPA) による PIPKI の脱リン酸化が確認された。また、脱リン酸化された PIPKI は 150% の活性の増加を示した。

EDTA や BAPTA、または ionophore などによるカルシウム濃度変化によっては脱リン酸化は見られなかった。しかし、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化剤、phorbol ester(PMA)は PIPKI を脱リン酸化させること、また PKC 阻害剤が LPA による脱リン酸化を完全に抑制することから、LPA による脱リン酸化にはカルシウム非依存性かつ、PKC 依存性のホスファターゼが関与していることが明らかになった。

さらに、セリン、スレオニンホスファターゼの阻害剤、オカダ酸(OA)で処理した細胞でも、LPA による PIPKI の脱リン酸化は抑制された。PKA で GST 融合 PIPKI をリン酸化させた後、OA-依存性のホスファターゼ (PP1/PP2A) と反応させたところ、プロテインホスファターゼ 1 (PP1) は PKA でリン酸化された PIPKI を脱リン酸化した。さらに、PP1 による脱リン酸化は PIPKI の活性化を誘導したことから、LPA 下流で PIPKI を脱リン酸化する PKC 依存性のホスファターゼが PP1 であることが強く示唆された。

現在まで、cAMP によるイノシトールリン脂質情報伝達系へのクロストークに関しては PKA による PLC の抑制作用のみが報告されていた。本研究の成果は、このクロストークに PKA による PIPKI の抑制機構が関与することを示している。また、LPA 刺激に伴う PIPKI の脱リン酸化による活性化は細胞外刺激による相補的な PIP₂ 合成の分子機構を示す初めての知見である。



Model of PIPKI α activation in response to extracellular stimuli.

PIPKI α is dynamically regulated through phosphorylation of PKA and dephosphorylation by PP1 in response to LPA.