

別紙 2

審査の結果の要旨

氏名 朴 宣 奏

本研究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 量を最終的に規定するホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) 5-キナーゼのリン酸化による活性制御機構や生体内における重要性について検討したもので下記の結果を得ている。

1. 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、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、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。
2. 種々のプロテインキナーゼ阻害剤を使用し、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、また 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 150%まで上昇することを *in vivo* で確認した。
3. GST 融合蛋白質を用いて、*in vitro* でのリン酸化を調べたところ、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。
4. 細胞から免疫沈降させた PIPKI を 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。
5. 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こっていることを確認した。C末端からの欠損変異体の *in vitro* リン酸化反応を行い、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こっていることが分かった。また、この領域に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り、活性制御に掛っていることが確認された。

6. リン酸化により抑制されている PIPKI はリゾホスファチジン酸 (LPA) による脱リン酸化で 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。プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化は 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。

7. 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。また、プロテインホスファターゼ 1 (PP1) が PKA でリン酸化された PIPKI を脱リン酸化し、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。

以上、本論文は 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 PIPKI のリン酸化による抑制機構が関与していることを明らかにした。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り、イノシトールリン脂質情報伝達系の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。