

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 G タンパク質共役受容体キナーゼ (GRK2) による
チュブリンのリン酸化

指導教官 井原康夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程
脳神経医学専攻
氏名 吉田典弘

G タンパク質共役受容体キナーゼ (GRK2) は、アゴニストを結合した G タンパク質共役受容体のみを特異的にリン酸化する。アゴニスト結合受容体と G 蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットが相乗的に GRK2 を活性化することで、厳密な基質特異性を示すと考えられる。GRK2 がアゴニスト結合受容体以外にチュブリン、シヌクレイン、フォスデューシンという 3 種のタンパク質をリン酸化することが最近見いだされた。

本研究では、GRK2 によるチュブリンのリン酸化部位の同定を目的とした。同時に、基質特異性の厳しい GRK2 がチュブリンをリン酸化するのは何故か、生体内でもチュブリンはリン酸化されているのか、という疑問に関わる実験をいくつか行った。

チュブリンは、ブタ脳から重合・脱重合を 3 回繰り返した後、ホスホセル

ロースカラムを用いて精製した。GRK2 でリン酸化したチュブリンを *Achromobacter protease I* で消化し、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてリン酸化ペプチドを単離した。分子量が約 6 kDa のリン酸化ペプチドが得られ、その N 末端の配列は AFLHWYTGGEG- であった。この配列は、ブタ β -チュブリンの C 末端領域の配列に一致した。このペプチドを endoproteinase Asp-N で消化後、C₁₈ 逆相クロマトグラフィーに添加し 2 種類のリン酸化ペプチドを単離した。それぞれのペプチドのアミノ酸配列は ⁴⁰⁴DEMEF⁴⁰⁹TEAE⁴¹³SNMN⁴¹⁶ と ⁴¹⁷DLV⁴²⁰SEYQQYQ⁴²⁶ であった。最初のペプチドの加水分解物からは ³²P-Thr が、次のペプチドからは ³²P-Ser のみが検出された。これらの結果から、GRK2 によるチュブリンの主要なリン酸化部位が β -チュブリン C 末部分の ⁴⁰⁹Thr と ⁴²⁰Ser であると結論した。

チュブリンには β_1 , β_{II} , β_{III} , β_{IV} という 4 種のアイソフォームがあるが、内在性リン酸化部位としては β_{III} -チュブリンの ⁴⁴⁴Ser のみが報告されている。⁴⁰⁹Thr と ⁴²⁰Ser は β_1 から β_{IV} -チュブリンに共通に存在するが、⁴⁴⁴Ser は β_{III} -チュブリンのみに存在する。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) と β_I -チュブリン (GST- β_I -チュブリン)、GST と β_{III} -チュブリン (GST- β_{III} -チュブリン)、および GST とそれぞれのチュブリン変異体との融合蛋白質を大腸菌で発現させ、GRK2 によるリン酸化を検討した。GST- β_I -チュブリン、GST- β_{III} -チュブリンとも GRK2 によってリン酸化された。 β_I -チュブリンの変異体 T409A、S420A は GRK2 によるリン酸化量が野生型の約半分であった。さらに 2 重変異体 T409A/S420A はほとんどリン酸化されなかった。 β_{III} -チュブリンの 2 重変異体 T409A/S420A は野生型 β_{III} -チュブリンと比較してリン酸化量が約 30 % で、3

重変異体 T409A/S420A/S444A はほとんどリン酸化されなかった。以上の結果から、GRK2 によるチュブリンのリン酸化部位が ⁴⁰⁹Thr, ⁴²⁰Ser および β_{III} -チュブリンでの ⁴⁴⁴Ser の 3 ヶ所に限定されることが明らかになった。

GRK2 でリン酸化したチュブリンをグリセロールもしくはタクソール存在下で重合させ遠心分離を行うと、リン酸化されたチュブリンはすべて沈殿画分に回収された。また脳から精製したチュブリンをタンパク質脱リン酸化酵素 (PP2A) で処理し、チュブリンの微小管形成を濁度測定法により測定した。その結果、GRK2 によるリン酸化依存的に微小管形成の増加が見られた。GRK2 によるチュブリンのリン酸化が、微小管形成を促進することが明らかになった。

チュブリンの 3 次元構造の結果と照らし合わせると、チュブリンのリン酸化部位が微小管の外側に位置していることが分かった。この領域はキネシンや MAPs (Microtubule Associated Proteins) との結合に関わることから、GRK2 によるチュブリンのリン酸化が MAPs 等との相互作用に影響を与える可能性が考えられる。

GRK2 がアゴニスト結合受容体のみをリン酸化するのは、受容体中の塩基性部分 (細胞内第 2 ループ、第 3 ループ、第 4 ループの膜直近部分) が GRK2 に作用して活性化するためと考えられている。事実、ムスカリン受容体の GRK2 によるリン酸化部位を含む細胞内第 3 ループは、それ単独では GRK2 のよい基質ではない。チュブリン中にも、このような塩基性の活性化部分が存在する可能性が考えられる。そこで塩基性アミノ酸をほとんど含まない β_I -チュブリンの C 末端部分 (393-455) と GST との融合タンパク質 (GST- β_I -チュブリン C) を調製した。予想に反して、GST- β_I -チュブリン C は GST- β_I -チュブリンと

同程度にリン酸化された。この結果は、アゴニスト結合型 G タンパク質共役受容体とは異なった機構で、チュブリンが GRK2 によってリン酸化されていることを示唆している。最近報告された、シヌクレイン、フォスデューシンもチュブリンと同様に酸性アミノ酸が非常に多い C 末端部分がリン酸化されている。これらの酸性アミノ酸部分が GRK2 の活性化に関与している可能性が考えられる。

GRK2 によってリン酸化されたチュブリンは、プロテインフォスファターゼ 2A (PP2A) によって脱リン酸化された。脳から精製したチュブリンを PP2A で脱リン酸化処理すると、GRK2 によるチュブリンのリン酸化量が約 2 倍に増加した。この結果は、 β -チュブリンの ⁴⁰⁹Thr, ⁴²⁰Ser, ⁴⁴⁴Ser のいずれかが脳内でリン酸化されていることを示唆する。GRK2 を HEK293 tsA201 細胞に過剰発現させて共焦点顕微鏡で観察したところ GRK2 は微小管上に存在し、抗 GRK2 抗体で免疫沈降を行うと β -チュブリンも共沈した。また、野生型 GRK2 を過剰発現すると、内在性チュブリンのリン酸化が増加した。以上の結果は、培養細胞において GRK2 が β -チュブリンと結合し、GRK2 がチュブリンのリン酸化に関与していることを示唆している。生体内でも GRK2 がチュブリンのリン酸化に関与している可能性が考えられる。脳内での GRK2 によるチュブリンのリン酸化の実証、その生理的意義の解明が今後の課題である。