

蛋白質リン酸化酵素群のシグナリング・ネットワーク

Signaling Network by Protein Kinases

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96L00306)

プロジェクトリーダー

小野 功貴 神戸大学バイオシグナル研究センター・教授



1. 研究目的

本プロジェクトにおいては、細胞内情報伝達機構において重要な役割を担っている蛋白質リン酸化酵素の活性調節機構の詳細な検討、および生理的基質蛋白質の探索などを行うと同時に、これら蛋白質リン酸化酵素と直接的、間接的に相互作用することによりシグナリングを制御している分子の同定を行い、既知のシグナリング分子との関連も含めて、複雑なシグナリングネットワークの解明の一助とすることを目的とした。

2. 研究成果概要

蛋白質リン酸化酵素 P K N は、プロテインキナーゼ C (P K C) の分子ファミリーに関する研究の過程で、P K Cファミリーとその触媒領域において高い相同性を持ちながら、その制御領域に蛋白質 / 蛋白質の相互作用に重要な機能を担っていると考えられるロイシンジッパー様配列の繰り返しを含む特徴的な構造を有する新規のセリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素として見出されたものである。種々の解析により、P K N は P K C と類似した基質特異性を示すが、P K C の活性化因子であるリン脂質・ホルボールエステル・ Ca^{2+} では活性化されず、低濃度のアラキドン酸等の不飽和脂肪酸や、L P A 等のリゾリン脂質により活性化されること、細胞骨格の構築に重要な役割を担っていると考えられる低分子量 G T P 結合蛋白質 R h o が、G T P 依存的に P K N に結合・活性化することなどから細胞内情報伝達機構においてなんらかの重要な機能を担っていることが期待されている。P K N の生理機能を探る一つの方法として相互作用する因子を探索した結果、ニューロフィラメント・ビメンチンなどの中間径フィラメントやアクチン架橋蛋白質である α -アクチニン等、細胞骨格系の蛋白質が見出され、R h o による活性化と合わせて考慮すると P K N が細胞骨格系の調節に関わっている可能性が示唆された。また、ある種の培養細胞にアポトーシス刺激を加えた際に P K N の断片化が起こり、触媒領域のみを含む活性型断片が生じることを明らかにしており、アポトーシスの過程にも P K N が関与している可能性が示唆されている。さらに、通常の状態では P K N は細胞質中に存在するのに対して、熱な

どのストレスにより速やかに核に移行すること、分裂期の進行に中心的な役割を持つ Cdc2/cyclinB 活性を制御する Cdc25C を P K N が直接リン酸化することによりその活性を阻害し、分裂期の進行を遅らせることも明らかにし、P K N が、遺伝子発現制御、細胞周期制御を含む核内でのイベントにも何らかの機能を持っている事が示唆されている。

以上のように、P K N は情報伝達機構において、かなり多機能な蛋白質リン酸化酵素として働いていることが明らかになりつつあり、今後の更なる解析が期待されている。

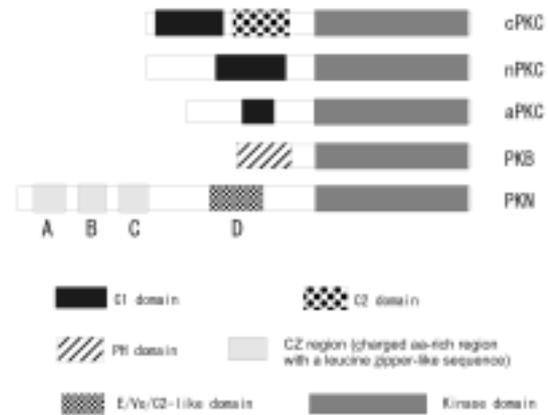


図1 PKN および関連蛋白質リン酸化酵素の構造の模式図

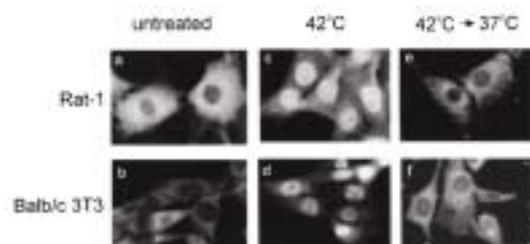


図2 熱刺激による PKN の細胞質から核への移行

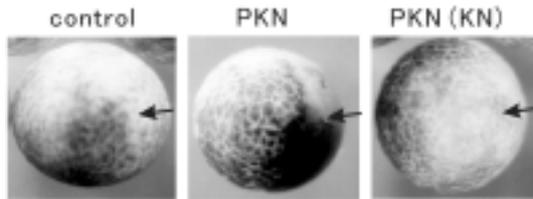


図3 活性型 PKN の微量注入によるアフリカツメガエル卵の分裂阻害

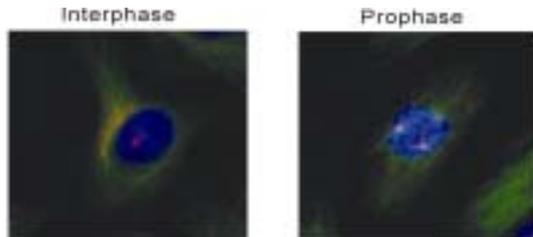


図4 PKN 結合蛋白質 CG-NAP の中心体およびゴルジ体への細胞内局在

3 . 主な発表論文

1. Mukai, H., and Ono, Y. (1994) A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 897-904
2. Amano, M., Mukai, H., Ono, Y., Chihara, K., Matsui, T., Hamajima, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996) Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase, PKN. *Science*, **271**, 648-650
3. Mukai, H., Miyahara, M., Sunakawa, H., Shibata, H., Toshimori, M., Kitagawa, M., Shimakawa, M., Takanaga, H., and Ono, Y. (1996) Translocation of PKN from the cytosol to the nucleus induced by stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10195-10199
4. Mukai, H., Toshimori, M., Shibata, H., Takanaga, H., Kitagawa, M., Miyahara, M., Shimakawa, M., and Ono, Y. (1997) Interaction of PKN with γ -actinin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4740-4746
5. Takahashi, M., Mukai, H., Toshimori, N., Miyamoto, M., and Ono, Y. (1998) Proteolytic activation of PKN by Caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11566-11571
6. Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H., and Ono, Y. (1999) Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17267-17274
7. Takahashi, M., Mukai, H., Oishi, K., Isagawa, T., and Ono, Y. (2000) Association of immature hypo-phosphorylated protein kinase C ϵ with an anchoring protein CG-NAP. *J. Biol. Chem.*, **275**, 34592-34596