

蛋白リン酸化酵素 PASK 研究の現状

宇城啓至

Current opinions on Proline- and Alanine-rich Ste20-related Protein Kinase (PASK)

Hiroshi Ushiro

1 はじめに

Ste20 類縁キナーゼは、酵母 Ste20 蛋白リン酸化酵素と触媒部位の構造が類似した一群の蛋白リン酸化酵素で、真核細胞全般に見出されている (1-3)。このキナーゼファミリーのメンバーは、分子構造の特徴から、PAK/Ste20 グループと SPS1/GC kinase グループに大別されており、いずれも細胞ストレスなど外界からの刺激に応答する細胞内シグナル伝達に関わっている (4)。

蛋白リン酸化酵素 PASK は、ラット脳からクローニングされた Ste20 類縁キナーゼであり、SPS1/GC kinase グループに属している (5)。しかしながら、PASK は、ほかの蛋白リン酸化酵素にはみられない特徴的な細胞分布をしており、脳の脈絡叢上皮細胞や胃底腺壁細胞など、電解質輸送の活発な細胞に強く発現している。PASK の機能については不明な点が多いが、PASK が F-アクチン結合能をもち、高温や高張 NaCl などの細胞ストレス刺激に応じてサイトゾルから細胞骨格面分へ移行することから、PASK は細胞ストレス応答時の細胞骨格制御に関与していると考えられる (6)。

最近、PASK (SPAK) は、ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオンの輸送に関わる Na-K-2Cl 共輸送体 (NKCC1) に結合して (7)、その機能を制御していることが明らかにされ、PASK が細胞のかたちとイオン濃度の調節に関与している可能性が示唆されている。本稿では、PASK の構造と細胞分布の特徴を述べ、その機能について最近の研究成果について紹介する。

2 PASK のクローニングと構造

PASK は、まったく別の蛋白を研究中发现された。ポリ ADP リボース合成酵素の脳における動態を調べる目的で、抗ヒト・ポリ ADP リボース合成酵素モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、本来 116 kDa であるポリ ADP リボース合成酵素のバンド (8) 以外に、66 kDa の蛋白バンドがラットの成長とともに増加してくることを見出した。この抗体を用いたスクリーニングにより、66 kDa 蛋白の cDNA をクローニングし、そのアミノ酸配列を決定した (5)。

66 kDa 蛋白は新しい蛋白であり、その N 末端寄りに酵母 Ste20 の触媒 (キナーゼ) ドメインと類似した構造がみられた。N 末端の非触媒領域は、71 アミノ酸残基のうちアラニンが 30 残基、プロリンが 17 残基と、プロリンとアラニンの含有量が非常に多いため、Proline-Alanine-rich Ste20-related Kinase (PASK) 名付けた (図 1)。

Ste20 類縁キナーゼは、触媒ドメインが C 末端に位置して調節ドメインが N 末端に位置する PAK/Ste20 グループと、触媒ドメインが N 末端に位置して調節ドメインが C 末端に位置する SPS1/GC kinase グループに大別されている。PASK は、N 末端近くに触媒ドメインがあり、C 末端側に長い調節

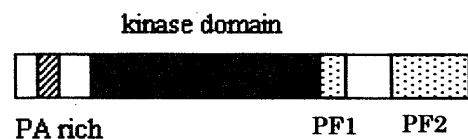


図 1. PASK 構造模式図

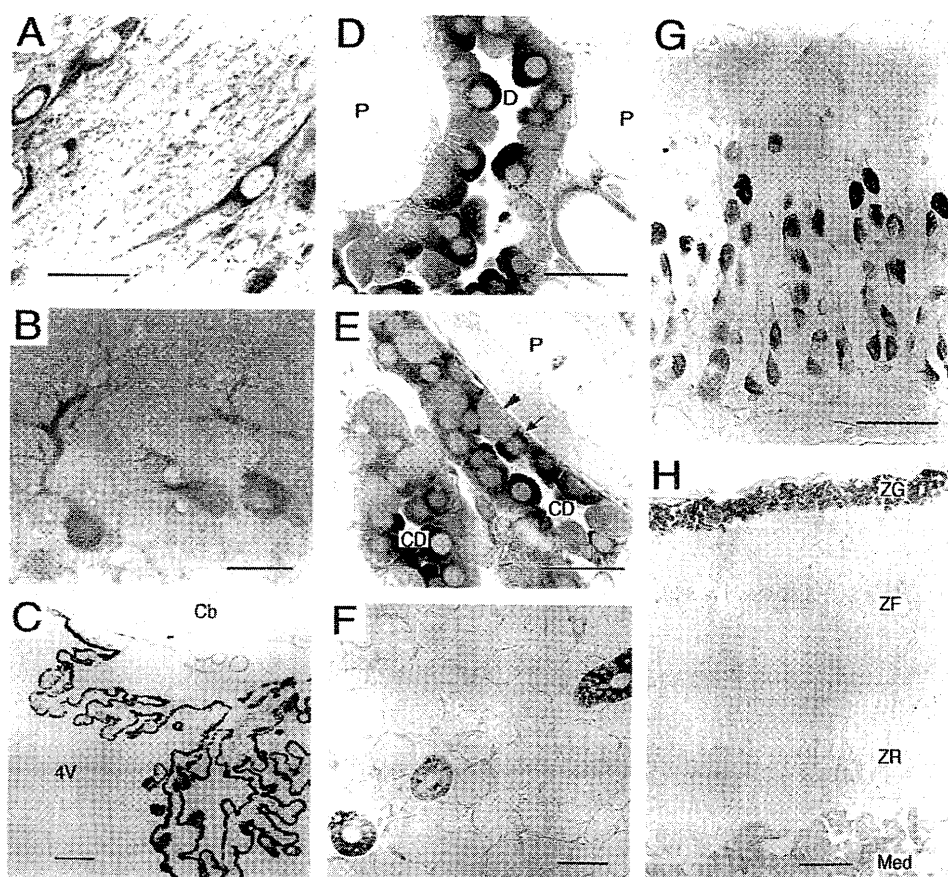


図2. ラット組織中のPASKの免疫組織化学的染色(5). (A) 中脳被蓋. (B) 小脳皮質(C) 第4脳室脳室脈絡叢. 4V, 第4脳室; Cb, 小脳. (D) 腎臓. D, 遠位尿細管; P, 近位尿細管. (E) 腎臓. CD, 皮質集合管; P, 近位尿細管; 矢印, 主細胞; 矢頭, 介在細胞. (F) 舌下腺. (G) 胃底腺. 上方が胃内腔. (H) 副腎. ZG, 球状帯; ZF, 束状帯; ZR, 網状帯; Med, 髄質. A, B, D, and E: bars= 25 micrometers; C and H: bars = 100 micrometers; F and G: bars = 50 micrometers.

領域を含む非触媒領域があるので、後者のSPS1/GC kinase グループに属している。このキナーゼグループのなかで、PASKはOSR1 (oxidative stress-responsive 1) (9, 10) とともに、ショウジョウバエの蛋白リン酸化酵素 Fray (11) の homolog として GCK-VI サブファミリーを形成している。

PASKのC末端の非触媒領域には、FrayとOSR1に共通して保存されているペプチド配列PF1 (アミノ酸残基347-399)とPF2 (アミノ酸残基460-553)が含まれている。このうちPF2がcation chloride 共輸送体(NKCC1, NKCC2, KCC3)と相互作用することが示されている(7)。なお、PASKとポリADPリボース合成酵素には、11アミノ酸残基のきわめて類似したペプチド配列があり(12)、上記の抗体とはこのペプチド部分で反応したと考えられた。

3. PASKの組織分布

PASKは、ほかのSte20類縁キナーゼにはみられない、特徴的な組織分布をしている。ラット組織のPASK mRNAの発現は精巣でもっとも多く、ついで脳、

副腎、心臓、腎臓に発現しており、小腸や胸腺、卵巣、肺、脾臓にも少量ながら発現がみられた。肝臓と骨格筋にはほとんど発現していない。

抗PASK抗体を用いたウェスタンブロッティングでPASKの組織分布をみると、PASKは、唾液腺、脳、精巣、副腎、腎臓、消化管、脾臓、卵巣、子宮など広汎な組織に検出されたが、PASK mRNA発現と同様に、肝臓や骨格筋ではほとんど検出できなかった。

PASK蛋白の発現が見られた臓器のうち、脳、腎臓、唾液腺(舌下腺)、胃、副腎について、免疫組織化学的方法でPASK蛋白を染色したところ、中脳の大型神経細胞と神経路の軸索が強く染まり(図2A)、小脳のプルキンエ細胞や副腎髄質細胞は中程度に染まった(図2B、H)。特徴的なのは、脳の脈絡叢上皮細胞(図2C)、腎臓の遠位尿細管(図2D)と集合管の主細胞(図2E)、舌下腺導管(図2F)、胃底腺壁細胞(図2G)、副腎皮質球状帯細胞(図2H)が選択的に強く染色されたことである。同じ臓器でも、これら以外の細胞にPASKは発現していない。

図3にPASKが発現している組織をまとめた。脈絡

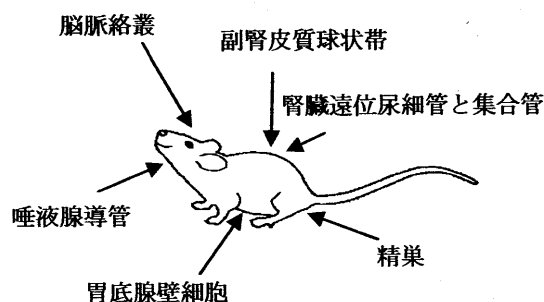


図3. PASK の組織分布

叢上皮細胞は脳脊髄液の分泌、腎臓の遠位尿管と集合管は水とナトリウムの再吸収、胃底腺の壁細胞は胃液塩酸の分泌と、いずれも電解質と水を活発に輸送して、脳脊髄液、尿、胃液のイオン組成を調節している。唾液腺の導管は唾液の濃度を調整しており、精巣液を吸収して精子の濃度をあげている精巣上体管にも PASK が強く発現している。副腎皮質球状帯細胞は、アルドステロン分泌を通して、細胞外液のナトリウムと水分の貯留の調整をしている。以上のことから、PASK はこれらの細胞の機能を調整することによって、体液のイオン組成の調節に関わっている可能性が考えられる。

4. PASK の細胞骨格への会合

ラット組織中の PASK は、細胞質上清に存在するとともに、一部は細胞骨格に結合している。臓器によってその割合は異なるものの、脳では PASK の約 50% が細胞骨格に結合している。抗 PASK 抗体を使った共沈殿実験から、ラット脳で PASK と結合している主な蛋白はアクチンとチューブリンであった (6)。そこで、GST (glutathione S-transferase)-PASK 融合蛋白を用いて、アクチン、チューブリンとの結合様式を解析したところ、PASK は F-アクチンとチューブリン両者に結合する活性をもつが、アクチンモノマーである G-アクチンとは結合しないことが明らかとなった。PASK 部分欠損融合蛋白を用いた実験から、PASK の F-アクチンとの結合部位は、アミノ酸残基 245-424 のペプチド配列にあった (図4)。

PASK は、微小管とチューブリン α , β -ヘテロダイマー両者に結合し、微小管重合を促進する活性をもっている (13)。興味深いことに、微小管結合部位と微小管重合促進活性は、F-アクチン結合部位と同

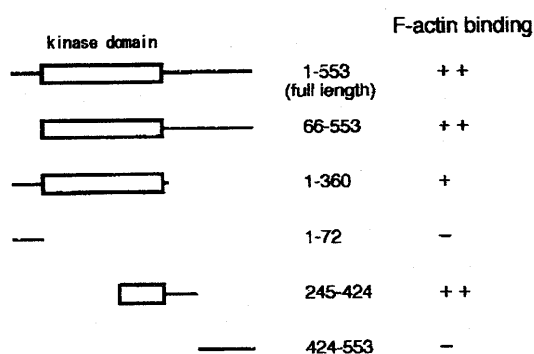


図4. PASK の F-アクチン結合部位 (6)

じく PASK の触媒ドメインの後半と PF1 領域を含む、アミノ酸残基 245-424 のペプチド配列にあった。

PASK と細胞骨格との結合は、細胞内でも誘導できる。培養 PC12 細胞中の PASK は全量が細胞質上清にあるが、細胞に熱、高張食塩、過酸化水素などの強い細胞ストレスを加えると、PASK の大部分が細胞骨格に結合するようになる (図5)。PASK は細胞内でリン酸化されているが、細胞骨格に結合した PASK はリン酸化の程度が低くなる。これらのことから、PASK が細胞ストレス応答に際しての細胞骨格再構築に関与し、そして、それが PASK 自身のリン酸化によって制御されていることが考えられる。

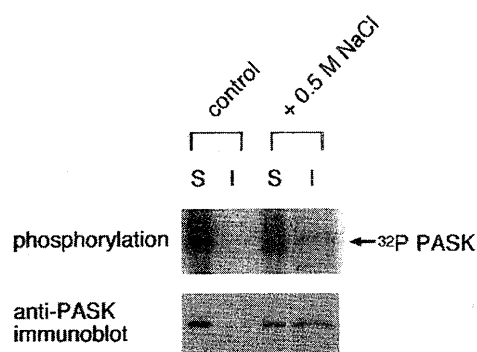


図5. PC12 細胞 PASK のリン酸化と細胞骨格への結合 (6). PC12 細胞を ^{32}P 無機リン酸で標識し、高張 NaCl (+0.5 M NaCl) または等張 (control) で 1 時間処理した。PASK を細胞質上清 (S) と細胞骨格画分 (I) から免疫沈降し、SDS-PAGE で分離してオートラジオグラフィ (上パネル) と PASK の免疫ブロッティング (下パネル) を行った。

5. PASK の機能

PASK (SPAK) が、Na-K-2Cl 共輸送体である NKCC1 と NKCC2、KCl 共輸送体である KCC3 と結合する (7) ことが示されてから、PASK による細胞のイオン輸送の制御が注目されている。NKCC や、KCC、NCC (Na-Cl 共輸送体) は、形質膜を通して Na イオン、K イオン、Cl イオンが輸送されるときに働く蛋白である。PASK は、NKCC1、NKCC2、NCC をリン酸化して活性化し (14-18)、KCC2 をリン酸化して不活化すること (18)、そして、PASK 自身は、別の蛋白リン酸化酵素である WNK1 と WNK4 によってリン酸化されて活性化されることが明らかにされている (16, 18, 19)。

PASK 類縁の OSR1 も PASK と同じ機能を果している (7, 17, 19)。WNK1 と WNK4 から、PASK または OSR1 を経て cation chloride 共輸送体へと至る細胞内シグナル伝達経路は、細胞が高張ショックなどの細胞ストレスに応じてイオン輸送を制御するときに、重要な機能を果たしているものと考えられる。

このほか、PASK は、男性ホルモン作用の細胞内シグナル伝達経路に関与すること (20)、また、プロテインキナーゼ C シータ (PKC θ) によって PASK がリン酸化されて AP-1 を活性化するという、T リンパ細胞活性化の細胞内シグナル伝達経路を構成することが示唆されている (21)。

6. おわりに

PASK の構造と組織分布の特徴と、その機能について、細胞骨格との相互作用、イオン輸送の制御を中心に述べた。PASK は、細胞のタイプは限られているとはいえ、広汎な組織で発現している。組織によって相互作用する分子が異なる可能性、またそれにより PASK の作用も違ったあらわれ方をする可能性がある。このような観点からも、生体内での PASK の機能を解明するためには、PASK を欠失した動物について、その影響を解析することが必要であり、現在、PASK 欠失マウスの解析がなされている。

7. 文献

1. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S., and Lim, L. (1994) *Nature* **367**, 40-46
2. Wu, C., Whiteway, M., Thomas, D.Y., and Leberer, E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15984-15992
3. Katz, P., Whalen, G., and Kehrl, J.H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16802-16809
4. Kyriakis, J.M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5259-5262
5. Ushiro, H., Tsutsumi, T., Suzuki, K., Kayahara, T., and Nakano, K. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 233-240
6. Tsutsumi, T., Ushiro, H., Kosaka, T., Kayahara, T., and Nakano, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9157-9162
7. Piechotta, K., Lu, J., and Delpire, E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 50812-50819
8. Ushiro, H., Yokoyama, Y., and Shizuta, Y. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2352-2357
9. Tamari, M., Daigo, Y., and Nakamura, Y. (1999) *J. Hum. Genet.* **44**, 116-120
10. Chen, W., Yazicioglu, M., and Cobb, M.H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11129-11136
11. Leiserson, W.M., Harkins, E.W., and Keshishian, H. (2000) *Neuron* **28**, 793-806
12. Kurosaki, T., Ushiro, H., Mitsuuchi, Y., Suzuki, S., Matsuda, M., Matsuda, Y., Katunuma, N., Kangawa, K., Matsuo, H., and Hirose, T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15990-15997
13. Kosaka, T., Tsutsumi, T., Ushiro, H., Kayahara, T., Kimura, K., and Mizoguchi, A. manuscript in preparation
14. Dowd, B.F., and Forbush, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 27347-27353
15. Piechotta, K., Garbarini, N., England, R., and Delpire, E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 52848-52856
16. Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., Matsumoto, K., and Shibuya, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 42685-42693
17. Gagnon, K.B., England, R., and Delpire, E. (2006) *Mol. Cell Biol.* **26**, 689-698
18. Gagnon, K.B., England, R., and Delpire, E. (2006) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**, C134-C142
19. Vitari, A.C., Deak, M., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (2005) *Biochem. J.* **391**, 17-24
20. Qi, H., Labrie, Y., Grenier, J., Fournier, A., Fillion, C., and Labrie, C. (2001) *Mol. Cell. Endocrinol.* **182**, 181-192
21. Li, Y., Hu, J., Vita, R., Sun, B., Tabata, H., and Altman, A. (2004) *EMBO J.* **23**, 1112-1122