

# The Amino-Terminal Domain of $\alpha$ -Chain of Pig Stomach $H^+,K^+$ -ATPase is A Hot Spot for Protein Kinases-Dependent Phosphorylation.

(豚胃  $H^+,K^+$ -ATPase  $\alpha$  鎖のアミノ末端領域に観察される種々のリン酸化)

## 学位論文内容の要旨

胃壁細胞から分泌される胃酸は胃内部を酸性状態に保ち、食物消化の上で重要な役割を果たしている。 $H^+,K^+$ -ATPase は胃壁細胞に特異的に発現するプロトンポンプであり、胃酸分泌の最終段階を担う。壁細胞が休止状態にあるとき、 $H^+,K^+$ -ATPase は細胞内小胞に存在するが、酸分泌時には、小胞が細胞膜と融合するのに伴い、細胞表面へ移行する。この移行過程は  $H^+,K^+$ -ATPase の活性化に必要不可欠であると考えられている。

壁細胞の受容体を直接刺激する因子としてはガストリン、アセチルコリン、ヒスタミン、EGF 等が明らかになっており、これらを介して細胞内イノシトールリン脂質代謝の活性化およびプロテインキナーゼ C (PKC)、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA)、チロシンキナーゼ (PTK) など種々のリン酸化酵素系の活性化が促される。

胃酸の分泌はこれらシグナル伝達系のクロストークにより複雑に調節されてると考えられるが、一方、その最終段階である小胞の移行過程の分子機構についての報告は少なく、ほとんど解明されていない。

本研究では、 $H^+,K^+$ -ATPase を含む細胞内小胞を研究材料として調製し、その分子機構の解明を目的として、主にそのリン酸化に焦点を当て研究を進めてきた結果、以下の事実が明らかになった。

$H^+,K^+$ -ATPase を含む細胞内小胞標品を豚胃より調製した。この標品には膜結合型のキナーゼが内在し、 $1mMVO_4^{3-}$ 存在下において  $H^+,K^+$ -ATPase の  $\alpha$  鎖のチロシン残基とセリン残基を特異的にリン酸化した。またこれらのリン酸化は同じく標品に内在するホスファターゼにより脱リン酸化され、細胞内小胞における  $H^+,K^+$ -ATPase の  $\alpha$  鎖に対する可逆的なリン酸化システムの存在が明らかとなった。

これらのリン酸化部位を検討した結果、 $\alpha$  鎖のアミノ末端近傍に存在する

Tyr10、Tyr7 および Ser27 であった。

また、標品内在性のチロシンキナーゼによるリン酸化は Tyr10、Tyr7 の順番に生じることが明らかになった。このチロシンキナーゼは界面活性剤処理により  $\alpha$  鎖に対する特異性を失うことから、小胞膜上において本来  $\alpha$  鎖の近傍に存在している可能性が示唆された。

$\text{VO}_4^{3-}$  に代わるリン酸化促進因子として  $\text{Ca}^{2+}$  の効果を検討したところ、その濃度に依存 ( $K_{1/2} = 5.8 \mu\text{M}$ ) して  $\alpha$  鎖のリン酸化量が増加した。一方、内在性ホスファターゼによる  $\alpha$  鎖の脱リン酸化については、 $\text{Ca}^{2+}$  の有無で有意な変化が観察されず、 $\text{Ca}^{2+}$  はリン酸化の際にのみ特異的に機能していることが明らかとなった。このリン酸化はカルモジュリンによって何ら影響を受けず、内在性のセリンキナーゼは PKC である可能性が示唆された。

Ser27 は外来性の PKA、PKC によってもリン酸化されることから細胞内において種々のセリンキナーゼによるリン酸化のターゲットとして機能しうる可能性が示唆された。

本研究により検出されたリン酸化部位はあらゆる哺乳動物の  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase において完全に保存されており、生理的に重要な機能を担っている可能性が考えられる。また、チロシン残基とセリン残基のリン酸化が同一分子内で生じていないことから、それらが互いに競合しあう形で機能していることが考えられる。

胃壁細胞では酸分泌に際して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が報告されている。従って、このアミノ末端部のリン酸化は  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルと共役して胃酸分泌の調節系に組み込まれている可能性が考えられ、これまで不明であった酸分泌の初期段階のシグナル伝達系と小胞移行過程の分子機構との関連を今後解明していく上で重要な切り口になると思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 口 和 彌  
副 査 教 授 矢 澤 道 生  
副 査 教 授 菊 池 九 二 三  
副 査 教 授 田 村 守

## 学位論文題名

### The Amino-Terminal Domain of $\alpha$ -Chain of Pig Stomach $H^+,K^+$ -ATPase is A Hot Spot for Protein Kinases-Dependent Phosphorylation.

(豚胃  $H^+,K^+$ -ATPase  $\alpha$  鎖のアミノ末端領域に観察される種々のリン酸化)

$H^+,K^+$ -ATPase は胃壁細胞に特異的に発現するプロトンポンプであり、胃酸分泌の最終段階を担う。本研究では、 $H^+,K^+$ -ATPase を含む細胞内小胞を研究材料として調製し、その分子機構の解明を目的として、以下の事実を明らかにした。

$H^+,K^+$ -ATPase を含む細胞内小胞標品を豚胃より調製した。この標品には膜結合型のキナーゼが内在し、 $1mMVO_4^{3-}$  存在下において  $H^+,K^+$ -ATPase の  $\alpha$  鎖のチロシン残基とセリン残基を特異的にリン酸化した。またこれらのリン酸化は同じく標品に内在するホスファターゼにより脱リン酸化され、細胞内小胞における  $H^+,K^+$ -ATPase の  $\alpha$  鎖に対する可逆的なリン酸化システムの存在が明らかとなった。これらのリン酸化部位は、 $\alpha$  鎖のアミノ末端近傍に存在する Tyr 10, Tyr 7 と Ser27 であった。また、標品内在性のチロシンキナーゼによるリン酸化は Tyr10, Tyr7 の順番に生じることが明らかになった。このチロシンキナーゼは界面活性剤処理により  $\alpha$  鎖に対する特異性を失うことから、小胞膜状において本来  $\alpha$  鎖の近傍に存在している可能性が示唆された。

$VO_4^{3-}$  に代わるリン酸化促進因子として  $Ca^{2+}$  の効果を検討したところ、その濃度に依存 ( $K_{1/2}=5.8 \mu M$ ) して  $\alpha$  鎖のリン酸化量が増加した。内在性のセリンキナーゼは PKC である可能性が示唆された。Ser 27 は外来性の PKA, PKC によってもリン酸化されることから細胞内において種々のセリンキナーゼによるリン酸化のターゲットとして機能しうる可能性が示唆された。

本研究により検出されたリン酸化部位はあらゆる哺乳動物の  $H^+,K^+$ -ATPase において完全に保存されており、生理的に重要な機能を担っている可能性が考えられる。また、チロシン残基とセリン残基のリン酸化が同一分子内で生じていないことから、それらが互いに競合しあう形で機能していることが考えられる。胃壁細胞では酸分泌の際して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が報告されている。従って、このアミノ末端部のリン酸化は  $Ca^{2+}$  シグナルと共役して胃酸分泌の調節系に組み込まれている可能性が考えられ、これまで不明であった酸分泌の初期段階のシグナル伝達系と小胞移行過程の分子機構との関連を今後解明していく上で重要な切り口になると思われる。

本研究に依って P-型 ATPase の分野で初めてチロシンリン酸化と脱リン酸化がポンプ本体で生じることが証明された。これら分野の研究の発展の突破口となった。よって申請者は北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。