学位論文題名

Tyrosine Phosphorylation of the H/K-ATPase
in Gastric Parietal Cells

(胃壁細胞における H/K-ATPase のチロシンリン酸化)

学位論文内容の要旨

胃壁細胞に発現する H/K-ATPase は胃酸分泌に関与する酵素で、ATP の加水分解と共役して細胞内の H^+ (胃酸) を細胞外へ、細胞外の K^+ を細胞内へと能動輸送し、酸分泌を維持する。本酵素の調節異常は消化性潰瘍などの疾患をもたらす。H/K-ATPase は触媒活性を有す 10 回膜貫通型の α 鎖と、その機能的発現に必須の β 鎖から成る。胃酸分泌休止時において、H/K-ATPase は細胞内小胞に局在する。酸分泌の刺激で小胞が頂端膜と融合し、H/K-ATPase が細胞膜上に表出され、胃酸分泌が生ずる。酸分泌を促進する内因性物質としてヒスタミン、アセチルコリン、ガストリンが知られており、これらは壁細胞上に発現する受容体を介した情報伝達経路のトリガーとなる。ヒスタミンは細胞内 cAMP 濃度を上昇させ protein kinase A を活性化し、また、アセチルコリン、ガストリンはホスファチジルイノシトール代謝回転を促進し、 Ca^{2+} 依存キナーゼを活性化することが知られている。しかし、リン酸化の標的タンパク質やその生理機能に関する知見は少なく、酸分泌調節の詳細な分子機構については不明の点が多い。1995 年、H/K-ATPase の α 鎖の Tyr⁷、Tyr¹⁰ と Ser²⁷ が H/K-ATPase 標品 (G1 膜画分) に内在するキナーゼ、ホスファターゼによって可逆的にリン酸化されることが発見され、酸分泌を直接担う本酵素のリン酸化が酸分泌調節機構に関与する可能性が示唆された。本研究では、H/K-ATPase α 鎖の可逆的リン酸化の生理機能を理解するために、 α 鎖をリン酸化するキナーゼの性質と胃壁細胞内で H/K-ATPase の可逆的リン酸化が生ずるか否かを研究した。

まず、 α 鎖のリン酸化のモデルタンパク質として、 α 鎖 N 末端領域を maltose binding protein あるいは glutathione S-transferase との融合タンパク質として大腸菌内で発現させ、人工基質とした。G1 膜画分による人工基質のリン酸化は反応液中に界面活性剤が存在することで大きく増加した。野生型と部位特異的変異体融合タンパク質のリン酸化の結果から、融合タンパク質のリン酸化部位は α 鎖のリン酸化部位に相当することが示唆された。以上より作成した融合タンパク質は内在性キナーゼの基質となることが示された。また、G1 膜画分による外来性基質のリン酸化は、界面活性剤存在下で増加したことより、内在性キナーゼは膜中において α 鎖の N 末端領域近傍に位置することが示唆された。

次に、G1 膜画分、融合タンパク質を用いて α 鎖をリン酸化する内在性キナーゼの性質を検討した。ブタ胃 G1 膜画分を Mg^{2+} 、 $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ 存在下、 Ca^{2+} の有無でリン酸化した結果、 α 鎖のセリンリン酸化は Ca^{2+} に依存して増加したが ($K_{0.5} = 0.9 \mu\text{M}$)、チロシンリン酸化は Ca^{2+} に依存しなかった。G1 膜画分、あるいは界面活性剤処理した G1 膜画分と、Tyr⁷ と Tyr¹⁰ を Phe に変異させた融合タンパク質を Ca^{2+} 存

在下、protein kinase C (PKC)阻害剤の有無でリン酸化すると、 α 鎖および融合タンパク質のリン酸化量は PKC 阻害剤によって減少した。G1 膜画分をチロシンキナーゼ阻害剤 genistein、又は quercetin 存在下でリン酸化したところ、 α 鎖のチロシンリン酸化が阻害された。更に、キナーゼに対する特異抗体を用いた Western blotting により、G1 膜画分中に抗 PKC α 抗体、抗 PKC β II抗体と反応する 80-kDa のタンパク質が、抗 c-Src 抗体と反応する 50~60-kDa のタンパク質が検出された。抗 PKC 抗体、抗 c-Src 抗体を用いた可溶化 G1 膜画分からの免疫沈降物は、融合タンパク質のセリン、チロシン残基をそれぞれリン酸化した。以上より、 α 鎖の Ser²⁷は内在性 PKC α 、 β II により Ca²⁺に依存して、Tyr¹⁰と Tyr⁷は内在性 c-Src によって Ca²⁺に依存せずリン酸化されることが示された。

次に *in vitro* と *in vivo* の α 鎖のチロシンリン酸化を比較するために、まず、細胞レベルの実験との比較が可能なラット、ウサギの α 鎖の *in vitro* におけるチロシンリン酸化を検討した。ラット、ウサギの G1 膜画分はブタ標品の場合と同様に内在性 c-Src を含み、 α 鎖の Tyr⁷と Tyr¹⁰のリン酸化が観察された。

更に、 α 鎖の壁細胞内におけるチロシンリン酸化の検出を試みた。細胞内でチロシンホスファターゼ (PTPase)を不可逆的に阻害する pervanadate (PV)で、ラット、ウサギ、ブタそれぞれの胃組織を処理した後、膜画分を調整し、抗チロシンリン酸抗体を用いた Western blotting を行ったところ、SDS-ゲル上で α 鎖と移動度が一致するタンパク質を含む種々のチロシンリン酸化タンパク質が検出された。この膜画分を可溶化し、抗チロシンリン酸抗体結合樹脂に添加後、樹脂に結合したタンパク質をフェニルリン酸溶液、ついでグリシン-塩酸緩衝液(pH 2.3)で溶出したところ、いずれの溶出試料においてもチロシンリン酸化された α 鎖が検出された。また、PV 処理した組織より調整した α 鎖のアミノ酸配列分析を行ったところ、Tyr¹⁰の回収量が未処理の場合に比し約 50%減少した。これらの結果は、 α 鎖の Tyr¹⁰が細胞内でチロシンリン酸化されること示す初めての証拠である。

細胞内での α 鎖のチロシンリン酸化の機能を調べるために、PTPase 阻害剤あるいは c-Src 阻害剤の細胞内チロシンリン酸化と酸分泌に及ぼす効果を検討した。酸分泌は壁細胞への [¹⁴C]aminopyrine (AP)の蓄積量を指標として評価した。ラット胃壁細胞を PV で処理すると、 α 鎖のチロシンリン酸化が検出されたが、AP の蓄積量は著しく阻害された。PV は H/K-ATPase 活性も阻害することから、リン酸化と酸分泌の関連を検討するのに不相当だと考えられた。そこで、c-Src family 選択的阻害剤である 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP1)の効果を検討した。壁細胞を PP1、次いで PV で処理したところ、1 μ M 以下の PP1 により α 鎖のチロシンリン酸化が阻害された。壁細胞を 1 μ M 以上の PP1 で処理すると、dbcAMP で促進される AP 蓄積量の増加が観察された。この実験条件において α 鎖のチロシンリン酸化と cAMP によって促進される AP 蓄積量との関連性は直接示唆されなかったが、*in vivo*においても c-Src が α 鎖をチロシンリン酸化することが示され、c-Src 活性が cAMP によって促進される酸分泌に関与する可能性が示唆された。

本研究により、H/K-ATPase α 鎖の N 末端領域近傍に PKC α 、 β II、及び c-Src が存在し、 α 鎖の Ser²⁷、及び Tyr¹⁰と Tyr⁷をそれぞれリン酸化することが示された。更にチロシンホスファターゼ阻害剤を用いることで、H/K-ATPase α 鎖の胃壁細胞内でのチロシンリン酸化が初めて検出された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 口 和 弥
副 査 教 授 菊 池 九 二 三
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 助 教 授 嘉 屋 俊 二

学 位 論 文 題 名

Tyrosine Phosphorylation of the H/K-ATPase in Gastric Parietal Cells

(胃壁細胞における H/K-ATPase のチロシンリン酸化)

胃壁細胞に発現する H/K-ATPase は胃酸分泌に関与し、ATP の加水分解と共役して細胞内の H⁺を細胞外へ、細胞外の K⁺を細胞内へと能動輸送し、適切な酸分泌を維持する。胃酸分泌休止時において、H/K-ATPase は細胞内小胞に局在する。酸分泌の刺激で小胞が頂端膜と融合し、H/K-ATPase が細胞膜上に表出され、胃酸分泌が生ずる。1995 年、H/K-ATPase の α 鎖の Tyr⁷, Tyr¹⁰ と Ser²⁷ が H/K-ATPase 標品 (G1 膜画分) の内在性キナーゼ、ホスファターゼによって可逆的にリン酸化されることが発見され、酸分泌を直接担う本酵素の可逆的リン酸化と酸分泌調節機構の関連が示唆された。本研究では、H/K-ATPase α 鎖の可逆的リン酸化の生理機能を理解するために、 α 鎖をリン酸化するキナーゼの性質と胃壁細胞内で H/K-ATPase の可逆的リン酸化が生ずるか否かを研究した。

まず、 α 鎖のリン酸化のモデルタンパク質として、 α 鎖 N 末端領域と maltose binding protein あるいは glutathion *S*-transferase との融合タンパク質を作成、人工基質とした。これを用いた結果融合タンパク質のリン酸化部位は α 鎖のリン酸化部位に相当することが示された。G1 膜画分による外来性基質のリン酸化は、界面活性剤存在下で顕著に増加したことより、内在性キナーゼは膜中において α 鎖の N 末端領域近傍に位置することが示唆された。

ブタ胃 G1 膜画分を Mg²⁺、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下、Ca²⁺の有無でリン酸化した結果、 α 鎖のセリンリン酸化は Ca²⁺に依存して増加したが ($K_{0.5} = 0.9 \mu\text{M}$)、チロシンリン酸化は Ca²⁺に依存しなかった。G1 膜画分、あるいは界面活性剤処理した G1 膜画分と、Tyr⁷ と Tyr¹⁰ を Phe に変異させた融合タンパク質を Ca²⁺存在下、protein kinase C (PKC) 阻害剤の有無でリン酸化すると、 α 鎖および融合タンパク質のリン酸化量は PKC 阻害剤によって減少した。G1 膜画分をチロシンキナーゼ阻害剤 genistein、又は quercetin 存在下でリン酸化したところ、 α 鎖のチロシンリン酸化が阻害された。更に、G1 膜画分中に抗 PKC α 抗体、抗 PKC β II 抗体と反応する 80-kDa のタンパク質が、抗 c-Src 抗体と反応する 50~60-kDa のタンパク質が検出された。抗 PKC 抗体、抗 c-Src 抗体を用いた可溶化 G1 膜画分からの免疫沈降物は、融合タンパク質のセリン、チロシン残基をそれぞれリン酸化した。以上より、 α 鎖の Ser²⁷ は内在性 PKC α 、 β II により Ca²⁺に依存し

て、Tyr¹⁰とTyr⁷は内在性c-SrcによってCa²⁺に依存せずリン酸化されることが示された。

*in vivo*の α 鎖のチロシンリン酸化を研究するために、まず、細胞レベルの実験との比較が可能なラット、ウサギの α 鎖の*in vitro*におけるチロシンリン酸化を検討した。ラット、ウサギのG1膜画分はブタ標品の場合と同様に内在性c-Srcを含み、 α 鎖のTyr⁷とTyr¹⁰をリン酸化した。

α 鎖の壁細胞内におけるリン酸化の検出を試みた。細胞内でチロシンホスファターゼ(PTPase)を不可逆的に阻害するpervanadate(PV)で、ラット、ウサギ、ブタそれぞれの胃組織を処理した後、膜画分を調整し、抗チロシンリン酸抗体を用いたWestern blottingを行ったところ、SDS-ゲル上で α 鎖と移動度が一致するタンパク質を含む種々のチロシンリン酸化タンパク質が検出された。この膜画分を可溶化し、抗チロシンリン酸抗体結合樹脂に添加後、樹脂に結合したタンパク質を溶出したところ、チロシンリン酸化された α 鎖が検出された。また、PV処理した組織より調整した α 鎖のアミノ酸配列分析を行ったところ、Tyr¹⁰の回収量が未処理の場合に比し約50%減少した。これらの結果は、 α 鎖のTyr¹⁰が細胞内でチロシンリン酸化されることを初めて示したものである。

α 鎖のチロシンリン酸化の機能を調べるために、PTPase阻害剤あるいはc-Src阻害剤の細胞内チロシンリン酸化と酸分泌に及ぼす効果を検討した。酸分泌は壁細胞への[¹⁴C]aminopyrine(AP)の蓄積量を指標として評価した。ラット胃壁細胞をPVで処理すると、 α 鎖のチロシンリン酸化が検出されたが、H/K-ATPase活性とAPの蓄積量は著しく阻害された。c-Src family 選択的阻害剤である4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine(PP1)の効果を検討した。壁細胞をPP1、次いでPVで処理したところ、1 μ M以下のPP1により α 鎖のチロシンリン酸化が阻害された。壁細胞を1 μ M以上のPP1で処理すると、dbcAMPで促進されるAP蓄積量の増加が観察された。この実験条件において α 鎖のチロシンリン酸化とcAMPによって促進されるAP蓄積量との関連性は直接示唆されなかったが、*in vivo*においてもc-Srcが α 鎖をチロシンリン酸化することが示され、c-Src活性がcAMPによって促進される酸分泌に関与する可能性が示唆された。

本研究により、H/K-ATPase α 鎖のN末端領域近傍にPKC α 、 β II、及びc-Srcが存在し、 α 鎖のSer²⁷、及びTyr¹⁰とTyr⁷をそれぞれリン酸化することが示された。更にチロシンホスファターゼ阻害剤を用いることで、H/K-ATPase α 鎖の胃壁細胞内でのチロシンリン酸化が初めて検出され、これら分野の研究の発展の突破口となった。よって著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。