慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Pyk2 activation is integral to acid stimulation of sodium/hydrogen exchanger 3
Sub Title	酸による腎臓NHE-3活性化系に果たすPyk2の役割の検討
Author	佐藤, 聡一郎
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.34-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050602-0034

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Pyk2 activation is integral to acid stimulation of sodium/hydrogen exchanger 3.

（酸による腎臓NHE-3活性化系に果たすPyk2の役割の検討）

佐　藤　　聡　一　郎

内容の要旨

生体の酸塩基平衡は恒常性を保たれており、アシドーシスでは種々の臓器が協調して細胞外のpHを正常化する方向に働く。中でも腎臓の役割は重要で、近位尿細管上皮細胞由来の培養細胞系OKP（opossum kidney P）ではsodium/hydrogen exchanger 3（NHE-3）を介して細胞膜内外のNa^+-H^+交換がなされる。アシドーシスのOKP細胞では、c-Src、ERK（extracellular-regulated kinase）が活性化され、その下流で*c-fos*、*c-jun*、*junB*、*egr-1*の発現が増加して、結果としてNHE-3の活性化がおり、特にc-SrcはERKおよびNHE-3活性化に必要であることが分かっている。本研究の目的は、アシドーシスにおける細胞内情報伝達系でのPyk2（proline-rich tyrosine kinase 2）が果たす役割を明らかにしようとするものである。

（方法）

酸性培養液に暴露したOKP細胞から免疫沈降法でPyk2を単離し、イムノブロットによりそのリン酸化を定量化し、酸刺激によるPyk2活性調節を検討した。Pyk2活性が阻害された系を検討するため、dominant negative（DN）Pyk2変異および、small interfering pyk2 RNAを発現させたOKP細胞を酸で刺激しNHE-3活性を観察した。次にOKP細胞から単離したPyk2を種々のpH条件のcell-free systemで反応させ、Pyk2の自己リン酸化および*in vitro*キナーゼ活性を観察した。活性化されたPyk2とc-Srcとの結合を検討するため、酸で刺激したOKP細胞を抗Pyk2抗体および抗Src抗体で共沈降し、イムノブロットを行った。c-Srcとの結合能を阻害させた変異pyk2を一過性に発現したOKP細胞を観察することにより、この結合がNHE-3活性化に必要かどうか検討した。DNPyk2発現OKP細胞のSrcキナーゼ活性を観察することで、Pyk2活性が酸によるSrc活性に必要かどうかを検討した。

（結果と考察）

OKP細胞を酸で刺激すると、Pyk2は一過性にリン酸化をうけて活性化され、30秒後に最大となった。またPyk2とc-Srcとの結合も増加し、刺激後90秒に最大となった。cell-free systemでの観察では、酸性pH条件下でPyk2の自己リン酸化とPyk2キナーゼ活性化を認めた。さらに、Pyk2阻害系OKP細胞では、酸によるNHE-3活性化およびc-Srcキナーゼ活性化は阻害された。

以上から、本研究では、1）アシドーシスの腎近位尿細管細胞においてPyk2は一過性に活性化されること、2）Pyk2活性化はc-SrcおよびNHE-3活性化に必要であり特異的であること、3）cell-free systemでの観察から、Pyk2が他の因子に依存せず、pHセンサーとして働き、酸によるNHE-3活性制御系の細胞内伝達カスケードを開始する因子（イニシエータ）になりうることが示された。

論文審査の要旨

腎臓は酸塩基調節において重要な役割を果たしており、アシドーシスでは、近位尿細管細胞に存在するprotein-rich tyrosine kinase 2（Pyk2）が、細胞内情報伝達にきわめて重要な役割を果たしている考えられているが、その詳細は明らかでない。そこで腎臓の近位尿細管上皮細胞由来の培養細胞であるopossum kidney（OKP）細胞を用いて、細胞内アシドーシスにおいてPyk2が酸で活性化されるか、活性化された場合にc-Srcキナーゼ活性化とNa^+/H^+交換体３型（NHE-3）の活性化に特異的に重要であるのか等を検討した。その結果、Pyk2の活性化は細胞内アシドーシスによって制御されていること、Pyk2の活性化は細胞内情報伝達因子であるc-SrcからNHE-3に至る経過において必要であること、さらにPyk2は細胞内で直ちにプロトン濃度を感知して活性化されており、細胞内pHセンサとして、酸刺激に誘導される情報伝達機構の開始因子の候補であること等を明らかにした。

このような研究に関して、まずFAKチロシキナーゼ・ファミリーの中でPyk2に着目した理由が問われた。腎臓の近位尿細管細胞にかなり存在し、c-Srcの上流にあって酸により活性化されるという報告が出されたことから、Pyk2に注目したとされた。Pyk2の生体内における存在部位に関しても質疑があり、現在のところ腎臓のほか、中枢神経系や血液系の細胞さらに心血管系の細胞にも存在する事が判明してきたとされた。

最も注目された点は、OKP細胞内のPyk2がpH0.2というわずかな酸性化で、30秒間でリン酸化を受けて活性化されることである。この点がPyk2が酸刺激に誘導される情報伝達機構の開始因子の１つと考えられる点であるとされた。なおリン酸化による活性化機序の詳細な検討は今後の研究課題とされた。

このほかPyk2の酸による活性化がcell-free systemでみられ、そのリン酸化の増加の程度が細胞内での変化とかなり異なることも興味がもたれた。この差は、細胞内のPyk2の周囲にはc-Srcが存在して活性化するために、cell-free systemのPyk2よりもなお自己リン酸化とその結果としてさらなる残基のリン酸化が起こりやすいためと考えた。Cell-free systemでのPyk2キナーゼ活性化はpHで制御され、またATP親和性の増加も関連づけられるが、Michaelis Mentenの式によるKmの実験値が、実際のwhole cellでのATP濃度値と相違していることについて質疑があった。この点に関しては、in vivoとin vitroでのATPの局在や濃度が異なるためではないかとされた。さらにPyk2の構造上において、pHが感知される部位についても興味がもたれたが、今後の検討課題とされた。

本研究は学位申請論文としてまとめられたが、その書き方にいくつかの問題点が指摘され、その訂正が求められたが、研究内容は、腎臓における酸塩基調節における細胞内pHセンサの候補蛋白としてPyk2を明らかにした点で、大変重要な研究であると高く評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　猿田　享男
　　医化学　末松　　誠　　泌尿器科学　村井　　勝
　　病理学　岡田　保典
学力確認担当者：北島　政樹、末松　誠
　　審査委員長：末松　誠

試問日：平成17年 3月 5日