



# 蛍光蛋白質融合プロテインキナーゼC(PKC)を用いた PKCの機能解析 (研究)

酒井, 規雄  
白井, 康仁  
斎藤, 尚亮

---

**(Citation)**

神戸大学医学部神緑会学術誌, 18:88-92

**(Issue Date)**

2002-08

**(Resource Type)**

departmental bulletin paper

**(Version)**

Version of Record

**(JaLCD0I)**

<https://doi.org/10.24546/81007748>

**(URL)**

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007748>



## 蛍光蛋白質融合プロテインキナーゼ C (PKC) を 用いた PKC の機能解析

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 神経・精神薬理学教室 酒井規雄 (61年卒, 教授)  
神戸大学バイオシグナル研究センター 分子薬理分野 白井康仁 (神戸大学農学部63年卒)  
神戸大学バイオシグナル研究センター 分子薬理分野 斎藤尚亮 (55年卒)

### 1. はじめに

プロテインキナーゼ C (PKC) は, 1977年に発見されたセリン・スレオニンリン酸化酵素で, 受容体刺激に伴う脂質代謝産物により活性化される. PKCの活性化に関与する最もよく知られた脂質代謝産物は, ジアシルグリセロール (DG) とイノシトール3リン酸 ( $IP_3$ ) であり, 両者はフォスファチジルイノシトール4, 5, 二リン酸 ( $PIP_2$ ) がフォスホリパーゼ C (PLC) により分解されることにより生じる. PKCの活性化は, DGと $IP_3$ によって細胞内ストアから動員される  $Ca^{2+}$ により促されることがよく知られている. その後, フォルボールエステルがPKCの特異的な活性化剤であることが明らかになり, フォルボールエステルを用いた研究により, PKCは, 様々な生命現象, 生理機能に関与していることが明らかにされてきた<sup>1-4)</sup>.

PKCは, その分子クローニングにより, 哺乳類では少なくとも11種類のサブタイプがあることが解り, その一次構造の違いから, cPKC(classical PKC), nPKC (novel PKC), aPKC (atypical PKC) の3種に大別される<sup>5,6)</sup> (図1). これら11種類のサブタイプ間で活性化機構や, 組織分布, 細胞内分布が異なることから, 生体内では, 各サブタイプは, 異なった生理機能を持つものと予想されたが, その酵素学的特徴は非常に類似し, 基質特異性も低いため, 生化学的手法で, それぞれのサブタイプの特異的な特徴を見いだすことは困難であった. そこで, 免疫電顕法などを用いて, PKC各分子種の詳細な細胞内局在を検討することにより, それらの特異的な基質や機能を明らかにする試みがなされた<sup>7)</sup>. しかしながらPKCは, その活性化の際に, 細胞質から細胞膜あるいは, 他の細胞内器官に局在が変化する (トランスロケーションする) ことが明らかになり<sup>8)</sup>, PKCとその特異的な基質との空間的関連を解析し, PKCの分子種特異的な機能を解明するにはこのトランスロケーション現象を考慮に入れる必要が生じ

てきた.

PKCを含む細胞内情報伝達系の形態学的な解析は, 従来, そのほとんどが, 固定された分子の光学顕微鏡, あるいは電子顕微鏡を用いた解析であり, 生体内でのPKCの動態を解析するには限界があった. そこで, 我々は, 1994年に分子クローニングされた Green Fluorescent Protein (GFP) に着目し<sup>9,10)</sup>, GFP標識した種々のPKC分子種を, その本来の酵素学的特性を損なわず培養細胞に発現させ, 種々の細胞外刺激による各PKCのトランスロケーション現象を生細胞内で経時的に観察し, 各PKCサブタイプが, どのような刺激の際に, どのような時間経過で, その標的に到達するか (ターゲティング) を明らかにすることにより, PKCの機能解析を試みている<sup>11)</sup>. 本稿では, 蛍光蛋白質融合PKCを用いて明らかにされたPKCターゲティングを指標としたPKCの機能解析の知見を解説する.

### 2. 生細胞内での蛍光蛋白質融合プロテインキナーゼ C (PKC-GFP) の発現と動態 (トランスロケーション) の観察

GFP (Green Fluorescent Protein) は, 1994年に北米シアトル沖の太平洋に生息するオワンクラゲから分子クローニングされた<sup>10)</sup>. その発表以来, GFPは多くの生命科学の研究に利用されたきた. その理由として, GFPが, 1)カルシウムなどの因子を必要とせず, 蛍光を発すること, 2)細胞毒性が低いこと, 3)非常に安定なタンパク質であること, 4)遺伝子組換え技術の利用により, 様々な研究領域に応用されうること, などがあげられる<sup>9)</sup>.

クローニングされたGFPは, クラゲのコドンを用いて発現する蛋白質であったため, 哺乳動物細胞に発現させた際に, 発現レベル, 蛍光強度も低く, 培養も低温 [25-30度] で行う必要があった. しかし, その後の点変異体GFPの作製と哺乳動物のコドンへの変

異によって、哺乳動物細胞内で37度で発現できる蛍光強度の高いGFPが得られた。さらに、excitationとemissionの波長の異なる変異体が作製され、今日ではBFP (Blue Fluorescent Protein), CFP (Cyan Fluorescent Protein), YFP (Yellow Fluorescent Protein) などが入手可能である。また、最近、インゲンチャクから、赤色蛍光蛋白質のDsRedが開発され、これらを用いることにより、異なる蛍光波長で標識された複数のタンパク質を生細胞内で同時に観察することが可能になってきた。

我々は、これらの蛍光蛋白質とPKCのC末端に融合させた蛍光蛋白融合PKCを様々な培養細胞に発現させ(図1), PKCを活性化させるであろう様々な刺激を加えて生細胞でのPKCのターゲティングを共焦点レーザー顕微鏡でリアルタイムに観察した<sup>11)</sup>。

CHO-K1細胞に発現した $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ の3種のPKC分子種は、それぞれ特有の細胞内分布を示した。つまり、 $\gamma$ PKC-GFPは主に細胞質に発現し、核内にも少量存在した。一方、 $\epsilon$ PKC-GFPは細胞質のみに発現し、 $\delta$ PKC-GFPは細胞質及び核質とも同程度存在した(図2)<sup>12)</sup>。

CHO-K1細胞はG蛋白質と共役したATP受容体を有していることから、各融合蛋白質を発現させた細胞をATPで刺激し、そのトランスロケーションを解析した。ATPの投与により、 $\gamma$ PKC-GFPは細胞質から細胞質膜へすばやくトランスロケーションし、その後1-2分で刺激前の状態に戻った。核内のPKCに変化は認められなかった。 $\epsilon$ 及び $\delta$ PKC-GFPについても、ATPの投与によりほぼ同様のトランスロケーションが観察された(図2)<sup>12)</sup>。これに対し、PKCの活性化剤であるTPAで細胞を刺激すると、すべての分子

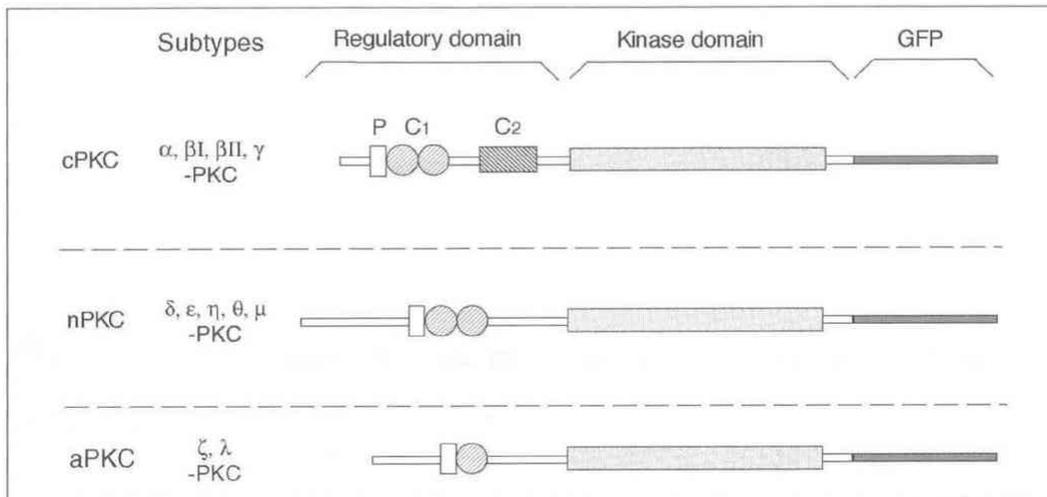


図1 GFP融合PKCサブタイプの構築と特性の解析  
 PKCファミリーの分類とGFP融合PKCサブタイプの構築  
 PKCファミリーは、regulatory domain (調節ドメイン)の構造の違いにより、3つのサブグループに分類される。我々は、いくつかのPKCサブタイプのC末端側にGFPが付加するように構築を作製した。P:偽基質領域, C1:システインリッチドメイン, C2:Ca<sup>2+</sup>結合ドメイン

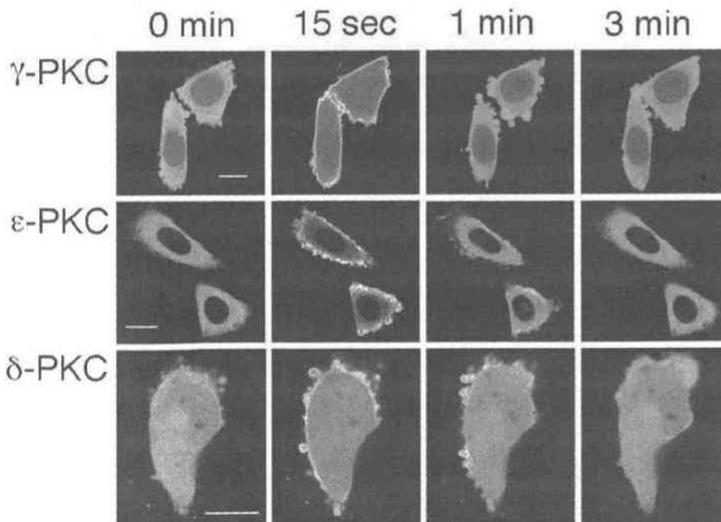


図2 ATP受容体刺激によるGFP融合 $\gamma$ -,  $\epsilon$ -,  $\delta$ -PKCのトランスロケーション  
 GFP融合 $\gamma$ -,  $\epsilon$ -,  $\delta$ -PKCをCHO-K1細胞に発現させ、ATP受容体(purinergic受容体)を100 $\mu$ M ATPで刺激し、トランスロケーションを観察した。いずれの分子種も、素早く細胞質から形質膜にトランスロケーションし、1-2分後には元の状態に戻った。スケール10 $\mu$ m

種において、細胞質のPKCがゆっくりと(3-5分)細胞質膜へトランスロケーションし(図3A), 30分後も膜に留まったままであった(図3B). このように、同じ細胞質から細胞膜への局在の変化も、時間経過が異なることが、GFP融合PKCの動態を観察することにより、簡単にしかも明瞭に観察することが可能であった. さらに、ATPによるトランスロケーションのように生細胞内での素早い動きは、従来の生化学的方法や、固定標本などでは観察不可能であった所見であり、GFPを用いた方法のもっとも有効な点といえる.

PKCは、*in vitro*で様々な脂肪酸によって活性化することが知られている. また、PKC各分子種間で脂肪酸に対する感受性も異なることが知られている. そこで、我々は、脂肪酸がPKC-GFPをトランスロケーションさせるかを検討したところ、種々の脂肪酸はPKC-GFPのトランスロケーションを誘導し、*in vitro*の活性化の結果と同様に、その感受性は分子種間で異なることが明らかになった<sup>13)</sup>. また、同じ脂肪酸でもPKC分子種が異なると異なったターゲティング先にトランスロケーションさせることが解った. 例えば、飽和脂肪酸のトリデカン酸は、 $\gamma$ -PKC-GFP、 $\epsilon$ -PKC-GFPとともに細胞質から形質膜に速やかに、かつ一過性にトランスロケーションさせるが、不飽和脂肪酸のアラキドン酸は、 $\gamma$ -PKC-GFPを細胞質から形質膜に素早くトランスロケーションさせるのに対し、 $\epsilon$ -PKC-GFPに対しては、核方向への比較的ゆっくりとしたトランスロケーションを引き起こした(図4)<sup>13)</sup>. この、アラキドン酸による $\epsilon$ -PKC-GFPのターゲティング先は主にゴルジ体であることが、ゴルジ体のマーカーであるWheat Germ Agglutinin (WGA)との二重染色で明らかになった<sup>13)</sup>. また、 $\delta$ -PKC-GFPは、トリデカン酸、アラキドン酸によってトランスロケーションを示さなかった.

以上の結果から、1) 刺激の種類が異なると、同じサブタイプであってもターゲティング機構(部位、時間経過)が異なること、2) 同じ刺激に対しても、各サブタイプは、異なるターゲティング機構を有すること、さらに3) サブタイプ間で、種々の刺激に対する感受性が異なる

ことが推測できた.

また、最近の我々の検討から、1) PLCにより産生される脂質代謝産物以外に、フォスホオリパーゼA2により産生される脂質代謝産物が<sup>14)</sup>、あるいは、DGとともに脂質メデイエーターとして知られているセラミドがPKCのトランスロケーションを引き起こす<sup>15)</sup>. 2) セラミド、アラキドン酸によるPKCのターゲティングには、そのC1Bドメインが重要な役割を担っている<sup>16)</sup>. 3) PKCのターゲティングは、その基質のリン酸化に必須の現象である<sup>17)</sup>. 4) PKCのC1ドメインは、PKCが形質膜にターゲティングした際に、PKCを形質膜に留めるのに重要な役割をしている(未発表データ). 5) cPKCは、細胞内のカルシウム濃度の変動に伴い、細胞質と細胞膜を行き来するオシレーションを引き起こす(未発表データ). 等のPKCのターゲティングに関する新たな機能が次々と明らかになってきた.

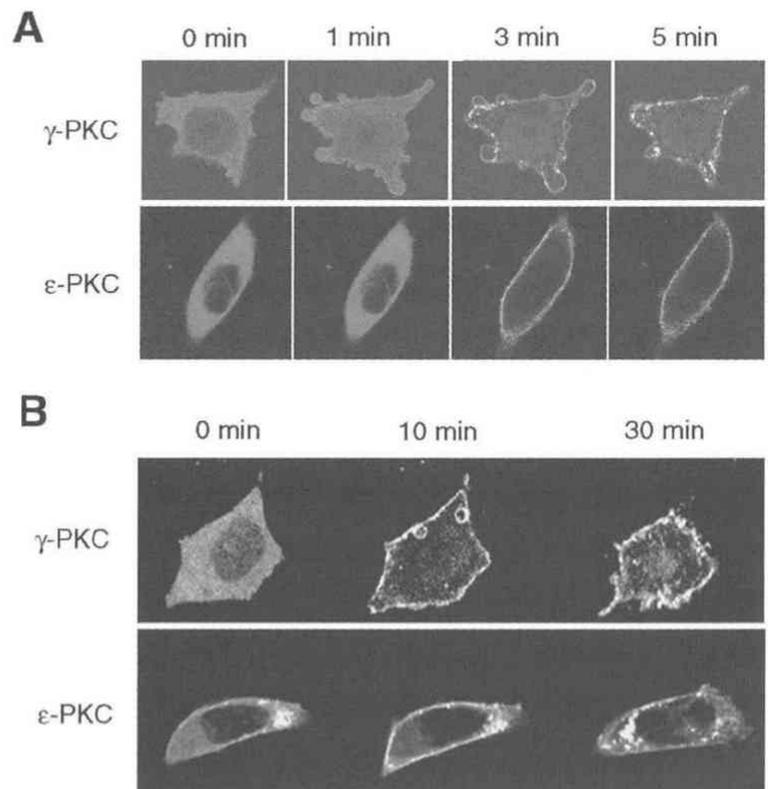


図3 TPAによるGFP融合 $\gamma$ -, $\epsilon$ -PKCのトランスロケーション  
GFP融合 $\gamma$ -, $\epsilon$ -PKCをCHO-K1細胞に発現させ、フォルボールエステル(TPA)で刺激し、トランスロケーションを観察した.

- A: TPA刺激では、ATP刺激と異なり、GFP融合 $\gamma$ -, $\epsilon$ -PKCはゆっくりと(3-5分で)細胞質から形質膜にトランスロケーションした.
- B: また、ATPで刺激した際と異なり、いったん形質膜にトランスロケーションしたGFP融合PKCは、細胞質に戻ってくることはない. スケール10 $\mu$ m

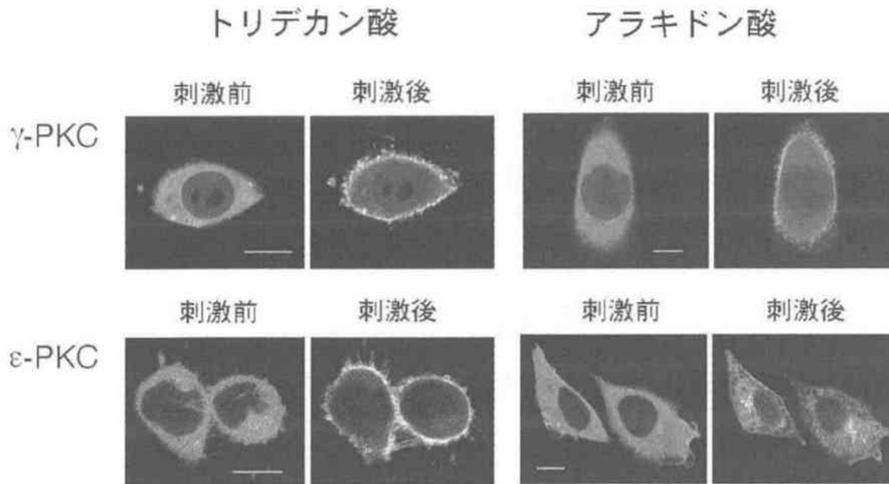


図4 脂肪酸（トリデカン酸、アラキドン酸）による GFP 融合  $\gamma$ -, $\epsilon$ -PKC のトランスロケーション  
飽和脂肪酸であるトリデカン酸は、 $\gamma$ -, $\epsilon$ -PKC とともに細胞質から形質膜への素早いトランスロケーションを引き起こした。それに対し、不飽和脂肪酸のアラキドン酸は、 $\gamma$ -PKC-GFP を細胞質から形質膜に素早くトランスロケーションさせるのに対し、 $\epsilon$ -PKC-GFP に対しては、核方向への比較的ゆっくりとしたトランスロケーションを引き起こした。スケール10 $\mu$ m

このように、GFP 融合 PKC を用いたそのターゲットのイメージングは、PKC 自身の機能解明ばかりでなく、PKC が関わる様々な細胞内情報伝達の新しい側面を見いだす上でも非常に有用な研究方法であるといえる。

### 3. 今後の展開

GFP 融合蛋白質を用いて PKC のトランスロケーションを生細胞内で可視化することにより、PKC の細胞内の動態は想像をはるかに超えたダイナミックなものであることが明らかになった。また、各 PKC 分子種が多様なトランスロケーション機構を有していることを示し、PKC のターゲット機構の解析という新しい研究領域を拓いた<sup>18)</sup>。今後、PKC の各分子種特異的なターゲット機構を更に詳細に検討するためには、各分子種が内在性に発現し、特異的な機能を持っていると思われる細胞系、例えば、生体内での機能をより反映していると考えられる初代培養の細胞を使った研究が重要性を増してくる。そのためには、PKC-GFP を発現するためのウイルスベクターが必要となってくる。また、細胞レベルだけでなく、個体レベルで PKC ターゲティング機構の重要性を検討するにはトランスジェニックマウスの作製が今後、必要になってくるものと思われる。

現在、我々はウイルスベクターで PKC-GFP を発現させた培養初期神経細胞や脳部位特異的に PKC-GFP

を発現するトランスジェニックマウスを用いて、蛍光蛋白質融合 PKC のターゲットングを指標に神経可塑性における PKC の役割を明らかにしようと試みている。

### 文 献

- 1) Nishizuka, Y. (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature (Lond.)*, 308, 693-698.
- 2) Nishizuka, Y. (1986): Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233, 305-312.
- 3) Nishizuka, Y. (1988): The molecular heterogeneity of protein kinase C and implications for cellular regulation. *Nature*, 334, 661-665.
- 4) Nishizuka, Y. (1992): Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258, 607-614.
- 5) 黒木登志夫, 千田和宏. (1996): シグナル伝達の鍵をにぎる C キナーゼ. 別冊日経サイエンス, 116, 26-32.
- 6) Parker, P., and Dekker, L. V, Protein Kinase C: pp 1-9., R. G. Landes Comp, Austin USA, 1997
- 7) Tanaka, C. and Nishizuka, Y (1994): The protein kinase C family for neuronal signaling. *Ann. Rev. Neurosci.* 17, 551-567.
- 8) Kraft A.S., W.B. Anderson, H.L. Cooper and J.J.

- Sando.(1982): Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of ELA 4 thymoma cells. *J. Bio. Chem.*, 257, 13193-13196.
- 9) Cubitt A.B., R. Heim, S.R. Adams, A.E. Boyd, L.A. Gross and R.Y. Tsien. (1995): Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 20, 448-55.
- 10) Prasher D.C., V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast and M.J. Cormier. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111, 229-33.
- 11) Sakai, N., Sasaki, K., Ikegaki, N., Shirai, Y., Ono, Y., and Saito, N. (1997): Direct visualization of the translocation of the  $\delta$ -subspecies of protein kinase C in living cells using fusion protein with green fluorescent protein. *J. Cell Biol.*, 139, 1465-1476
- 12) Ohmori, S., Shirai, Y., Sakai, N., Fujii, M., Konishi, H., Kikkawa, U., and Saito, N. (1998): Three distinct mechanisms for translocation and activation of  $\delta$ -subspecies of protein kinase C. *Mol. Cell Biol.*, 18, 5263-5271
- 13) Shirai, Y., Kashiwagi, K., Yagi, K., Sakai, N. and Saito, N. (1998): Distinct effects of fatty acids on translocation of  $\delta$ - and  $\epsilon$ - protein kinase C. *J. Cell Biol.*, 143, 511-521
- 14) Shirai, Y., Kashiwagi, K., Sakai, N. and Saito, N. (2000): Phospholipase A2 and its products are involved in the purinergic receptor-mediated translocation of protein kinase C in CHO-K1 cells. *J. Cell Sci.*, 113, 1335-1343
- 15) Kajimoto, T., Ohmori, S., Shirai, Y., Sakai, N. and Saito N. (2001): Subtype-specific translocation of  $\delta$ -subtype of protein kinase C and its activation by tyrosine phosphorylation induced by ceramide in HeLa cells. *Mol. Cell Biol.*, 21, 1769-1783
- 16) Kashiwagi, K., Shirai, Y., Kuriyama, M., Sakai, N. and Saito, N. (2002): Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of PKC. *J. Biol. Chem.* in press
- 17) Ohmori, S., Sakai, N., Shirai, Y., Yamamoto, H., Miyamoto, E., Shimizu, N. and Saito, N. (2000): Importance of PKC targeting for the phosphorylation of its substrate, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) *J. Biol. Chem.*, 275, 26449-26457
- 18) 斎藤尚亮, 酒井規雄, 白井康仁. (1999) : プロテインキナーゼCのターゲティング機構の解析. *実験医学*17, 1867-1873

