



Formation of a phorbol ester-binding fragment from protein kinase C by proteolytic digestion

星島, 正彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0795

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000795>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	星 鷺 正 彦 (岡山県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第618号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	平成元年3月31日
学位論文題目	Formation of a Phorbol Ester-binding Fragment from Protein Kinase C by Proteolytic Digestion (Cキナーゼのホルボールエステル結合フラグメントの限定分解による産生)
審査委員	主査 教授 高井 義美 教授 福崎 恒 教授 藤原 美定

論文内容の要旨

[序文]

Cキナーゼはセリンリン脂質 (PS) と生理的濃度の Ca^{2+} の存在下にジアシルグリセロール (DG) によって活性化される蛋白質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ) である。種々の細胞外シグナルが細胞膜受容体に作用すると、ホスホリパーゼCが活性化されてイノシトールリン脂質が加水分解され、DGとイノシトール三リン酸の2つの細胞内情報伝達物質が産生される。DGはCキナーゼを活性化し、イノシトール三リン酸は小胞体から細胞質への Ca^{2+} 動員を引き起こす。一方、強力な発癌プロモーターである12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetateやphorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) などのホルボールエステルはDGと同じ様式でCキナーゼを活性化する。これらのホルボールエステルはPS、 Ca^{2+} とCキナーゼの三者複合体を受容体とし、Cキナーゼの活性化を介してその生理作用を発現する。Cキナーゼは分子量約8万の単一ペプチドであり、試験管内で Ca^{2+} 依存性プロテアーゼやトリプシンなどの蛋白質分解酵素によって限定分解されると、分子量が約5.1万の触媒フラグメント (Mキナーゼ) が産生される。MキナーゼはCキナーゼとほぼ同じ酵素活性を有するが、その活性化にはPS、 Ca^{2+} やDGを必要としない。また、Cキナーゼは Ca^{2+} の存在下に細胞膜に結合するが、Mキナーゼはもはやこの結合能を有さない。これらのことから、Cキナーゼには、細胞膜に結合する活性調節ドメインと親水性の触媒ドメインが存在し、DGやホルボールエステルはこのうちの活性調節ドメインに作用して触媒活性を促進するという作業仮説が提示されている。しかし、この活性調節ドメインを有するフラグメントはこれまでに単離されていない。そこで、本研究では [^3H] PDBu 結合活性を指標として、Cキナーゼより活性調節ドメインを含むフラグメントを単離し、Cキナーゼ分子内の機能的構造を明確にすることを試みた。

[方法]

ヒト洗浄血小板は Baenziger と Majerus の方法により調整した。C キナーゼはラット大脳の可溶性画分より DEAE - cellulose、threonine - Sepharose と phenyl - Sepharose の3つのカラムクロマトグラフィーによって精製した。 $[^3\text{H}]$ PDBu 結合活性は、検体を PS と Ca^{2+} の存在下に $[^3\text{H}]$ PDBu と 37°C で反応させた後に、グラスフィルターで濾過してフィルター上に捕捉される放射活性を計測して測定した。C キナーゼと M キナーゼの酵素活性は、それぞれ PS、 Ca^{2+} と DG の存在下と非存在下に $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ ATP から HI ヒストンに取り込まれる ^{32}P の放射活性を計測して測定した。

[結果]

(1) ヒト洗浄血小板における $[^3\text{H}]$ PDBu 結合フラグメントの産生

ヒト洗浄血小板を EGTA 存在下に超音波にて破砕し、可溶性画分と膜画分に分離したところ、ほとんどの C キナーゼ活性は可溶性画分に回収された。 $[^3\text{H}]$ PDBu 結合活性もまたこれと平行して可溶性画分に回収された。しかし、M キナーゼ活性はこれらのどちらの画分にもほとんど検出されなかった。次に血小板をあらかじめ Ca^{2+} イオノフォアである A23187 で 37°C 、5 分間前処理したのち同様の操作をおこなった。この前処理によって細胞内のプロテインキナーゼ活性は対照の約半分にまで減少し、そのほとんどは PS、 Ca^{2+} や DG に依存しない M キナーゼ活性であった。

また、この M キナーゼ活性はほとんど可溶性画分に回収された。一方、 $[^3\text{H}]$ PDBu 結合活性はこの前処理によって約 $1/4$ が失われたのみであり、そのほとんどの活性は膜画分に回収された。さらに、A23187 の作用の時間依存性を検討したところ、A23187 の処理によって C キナーゼ活性が 20 分以内にほとんど失われると共に M キナーゼ活性が一過性に上昇した。これに対して $[^3\text{H}]$ PDBu 結合活性は C キナーゼや M キナーゼの活性が全く失われた後もその約 $3/4$ の活性が保たれていた。

(2) 精製 C キナーゼからの $[^3\text{H}]$ PDBu 結合フラグメントの産生

ラット大脳より精製した C キナーゼを $[^3\text{H}]$ PDBu と Ca^{2+} の存在下の PS のリポソームに結合させた後、 37°C でトリプシン消化をおこなった。このトリプシン処理により C キナーゼ活性は 20 分以内にほぼ完全に消失した。これに対して $[^3\text{H}]$ PDBu 結合活性はトリプシン添加後の 20 分を越えても対照とほぼ同程度に保たれていた。このとき検体の一部を SDS ポリアクリルアミド電気泳動にて分離してクーマシー染色をおこなったところ、分子量約 8 万の C キナーゼの染色バンドが時間依存性に消失すると共に、分子量約 3.5 万のバンドが新たに形成された。さらに、トリプシン添加後 20 分ではこの分子量約 3.5 万のほぼ単一のバンドのみが認められた。

[考察]

血小板を用いた実験より、 Ca^{2+} イオノフォアを用いて血小板の細胞質に Ca^{2+} を動員すると、血小板中に大量に存在する Ca^{2+} 依存性プロテアーゼが活性化されて C キナーゼが限定分解を受け、可溶性の触媒フラグメント (M キナーゼ) と膜結合型の $[^3\text{H}]$ PDBu 結合フラグメントが産生さ

れることが示唆された。一方、精製Cキナーゼをトリプシンで消化すると、 $[^3\text{H}]$ PDBu結合活性は有するが酵素活性は持たないCキナーゼのフラグメントが産生されることが明らかとなった。また、このフラグメントのSDSポリアクリルアミド電気泳動での推定分子量は約3.5万であった。これら今回の実験結果と、試験管内でCキナーゼを Ca^{2+} 依存性プロテアーゼまたはトリプシンで限定分解すると分子量が約5.1万のMキナーゼが産生されるという先の報告を考えあわせると、分子量約8万のCキナーゼは分子量が約3.5万の活性調節ドメインと分子量約5万の触媒ドメインから構成されていると推測される。さらに、Mキナーゼは細胞膜に結合せず、一方 $[^3\text{H}]$ PDBu結合フラグメントはEGTAの存在下でも膜画分に回収されることから、Cキナーゼは活性調節ドメインを介して細胞膜に接着していると考えられる。また、細胞外シグナルによって細胞膜で産生されたDGはこのPS、 Ca^{2+} とCキナーゼの三者複合体と結合し、活性調節ドメインに作用してアロステリック効果で触媒ドメインの酵素活性を促進するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

プロテインキナーゼC (Cキナーゼ) は最初 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼによって限定分解をうけて活性化される蛋白質分解酵素として発見された。その後、Cキナーゼがホルモンや神経伝達物質などの細胞外シグナルによって引き起こされるイノシトールリン脂質代謝と共役して活性化されることが見出され、細胞外シグナルの細胞膜受容伝達機構に果す本酵素の広範な役割が明らかにされて来た。さらに、Cキナーゼが発癌プロモーターであるホルボールエステルの受容体として細胞増殖や癌化の過程においてきわめて重要な役割を果していることが明らかとなり、本酵素の重要性が一層強く認識されるようになってきている。分子量約8万の単一ペプチドであるCキナーゼは試験管内で Ca^{2+} 依存性プロテアーゼやトリプシンなどの蛋白質分解酵素によって限定分解されると、分子量が約5.1万の触媒フラグメント(Mキナーゼ)を産生することはすでに明らかにされていた。MキナーゼはCキナーゼとほぼ同じ酵素活性を有するが、Cキナーゼとは異なりその酵素活性は常に活性化されている。また、Cキナーゼは細胞膜に結合することができるが、Mキナーゼはもはや細胞膜に結合できない。これらのことから、Cキナーゼには細胞膜に結合する活性調節ドメインが存在し、この活性調節ドメインによって触媒活性が制御されていると想像されていた。しかし、この活性調節ドメインを有するフラグメントはこれまでに単離されていなかった。本研究ではホルボールエステルのひとつである $[^3\text{H}]$ Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu)結合活性を指標として、Cキナーゼよりこの活性調節ドメインを含むフラグメントを単離することを試みている。

本研究者はまず血小板に Ca^{2+} イオノフォアを作用させ、細胞外より細胞質に Ca^{2+} を動員し、血小板中に大量に存在する Ca^{2+} 依存性プロテアーゼを活性化することでCキナーゼを細胞内で限定分解することを試みている。その結果、血小板内でCキナーゼより可溶性のMキナーゼと膜結合型の $[^3\text{H}]$ PDBu結合フラグメントが産生されたことを示唆する成績を得ている。次に本研究者は精製したCキナーゼを特定条件下に試験管内でトリプシンで消化し、 $[^3\text{H}]$ PDBu結合活性は有

するが酵素活性は持たないCキナーゼのフラグメントが産生されることを明らかにしている。また、このフラグメントの分子量をSDSポリアクリルアミド電気泳動上約3.5万と推定している。これら実験結果から、本研究者は、分子量約8万のCキナーゼは分子量約3.5万の活性調節ドメインと分子量約5万の触媒ドメインから構成されており、この活性調節ドメインによって触媒ドメインの酵素活性が制御されているものと推測している。さらに、 $[^3\text{H}]$ PDBu結合フラグメントは血小板の膜画分に回収されることから、Cキナーゼは活性調節ドメインを介して細胞膜に接着していると推定している。

以上、本研究はCキナーゼからその活性調節ドメインを含むフラグメントを初めて単離したものであり、Cキナーゼの分子内のドメイン構築を明らかにする上にも、また発癌プロモーターの作用機作を分子レベルで明確にする上にも重要な知見を呈した価値ある業績であると考えられる。よって、本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。