



Expression of protein kinase C subspecies in human leukemia-lymphoma cell lines

澤村, 悟

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0883

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000883>

※ 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)	さわむら 澤村 悟 (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第672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2年3月31日
学位論文題目	Expression of protein kinase C subspecies in human leukemia-lymphoma cell lines (ヒト白血病, リンパ腫細胞株におけるプロテインキナーゼC 亜種の解析)
審査委員	主査 教授 西 塚 泰 美 教授 廣 畑 和 志 教授 藤 原 美 定

論文内容の要旨

緒 言

Protein kinase C (以下PKC) は, 細胞膜の受容伝達機構に関与しており, 細胞の増殖・分化過程に重要な役割を果たすと考えられている。最近, PKCの分子クローニングの解析から, 当初単一と考えられていたこの酵素は, 少なくとも4種類のPKC, α , β I, β II, γ が存在することが明らかとなっている。また, ハイドロキシアパタイトカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより, ラット脳組織のPKCは3種類のサブタイプ, Type I, II, IIIに分離され, Type I は γ , Type II は β I および β II の混合, Type III は α に相当することがわかっている。

一方, 多種のヒト白血病・リンパ腫培養株が今日樹立されているが, 複数のマーカーによる分析 (Multiple Marker Analysis) により, 各々の細胞株は, 単一クローン起源であること, 細胞分化の進行がある分化段階で停止し, 長期間安定な状態を維持していることが実証されている。

本研究はヒト白血病・リンパ腫細胞株をモデルとし, 増殖・分化におけるPKC各亜種の果たす役割について解析を行った。

実験方法および結果

1. 細胞株

本研究で使用したヒト白血病・リンパ腫細胞株は, 次のグループに分類される。

T-cell leukemia-lymphoma cell lines: HPB-All, MOLT-3, MOLT-15

B-cell leukemia-lymphoma cell lines: NALM-6, U-698-M, RAMOS

non-T/non-B cell leukemia-lymphoma cell lines: KM-3

myelomonocytic leukemia cell lines: KG-1, ML-2, HL-60

erythroleukemia cell lines: SPI-802, HEL

T細胞系, B細胞系の細胞株については, これらをその分化段階により, さらに細分類 (stage分類) する事ができ, 例えば, HPB-ALL, NALM-6は各々T細胞系, B細胞系の中でも未分化なものである。

細胞株は全て, 37°C, 5 % CO₂の下, 5 % heat inactivated fetal calf serum を加えた RPMI-1640培養液の中で培養した。

2. ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによるPKC亜種の解析

細胞株は各々, 約 5×10^8 個の細胞を 0 - 4°C 下で 2 ml homogenate buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.25 M sucrose, 10mM EGTA, 2mM EDTA, 20 μ g/ml leupeptin) sonicationにより破碎し, 100,000gで60分間遠沈した。上清をDE-52 カラムに添加し, Buffer A (20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5mM EGTA, 0.5mM EDTA, 10mM 2-mercaptoethanol) にて洗浄後, 200mM NaClを含むBuffer AにてPKCを溶出した。得られた溶出液をハイドロキシアパタイトカラムに添加し, Buffer B (20mM potassium phosphate pH 7.5, 0.5mM EGTA, 0.5mM EDTA, 10% glycerol, 10mM 2-mercaptoethanol) にて洗浄後, 20mM-215mMのリン酸濃度勾配で溶出した。溶出液は1 mlずつ採取し, 一部をPKC活性測定に用いた。PKCの活性は, 0.5mM Ca²⁺, 8 μ g/ml phosphatidylserine, 0.8 μ g/ml dioleinの存在下における [γ -³²P] ATPよりH1 ヒストンへと放射活性の転移により測定した。ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーの結果, PKCの酵素活性はほぼ全ての細胞株に於て, 2つのピークとして溶出された。この2つのピークは, 各々, ラット脳PKCのType IIとType IIIに相当する位置に溶出された。PKCの比活性では, T細胞系の細胞株の活性が高く, Type IIIは細胞分化の進行につれ活性の低下を示した。B細胞系ではType II活性がT細胞系に比し低く, RAMOS (Burkittリンパ腫起源) では, Type IIに相当するピークは溶出されなかった。Myelomonocytic leukemia細胞株の中で, KG-1 とHL-60においてType II, Type IIIのピークに加えて41-46分画に活性ピークを認めた。また, Erythroleukemia起源の細胞株HELでは, Type II, Type IIIは溶出されず, 46-50分画に異なった単一ピークを溶出した。

3. Immunoblot法によるPKC亜種の解析

各々の細胞株より溶出したPKC分画をLaemmli法に従って, SDSポリアクリルアミドに電気泳動をし, Western blot法によりニトロセルロース膜に転写した。これにPKCの特異抗体を反応させ, アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法による発色した。用いた抗体は, PKCのアミノ酸配列の一部と同じ配列の合成ペプチドに対して作った抗体であり, α , β I, β II, γ すべてに反応するCKpC1 β -a, α , β I, β IIと各々特異的に反応するCKpV1 α -a, CKpV5 β I-a, CKpV5 β II-aである。

各種細胞株のType II及びType III分画は, 全てCKpV5 β I-aと反応し, 分子量は約80kDであった。T細胞系のType II分画は, CKpV5 β I-a (β Iに対する特異抗体) CKpV5 β II-a (β

Ⅱに対する特異抗体) 双方と反応したが β Ⅱ優位であり(β Ⅱの方がよく染まり), β Ⅰは少量存在するのみであった。

4. 免疫細胞染色

各種細胞株の固定は1% paraformaldehydeを用いて、室温下、30分間行った。次いでスライドグラス上にスメアし、4時間乾燥後、4℃下で1時間0.3% triton X-100処理し、1% H_2O_2 を含むMetanolに10分間 incubateした。これらの細胞株を、PKCのType Ⅱ(β Ⅱ)およびType Ⅲ(α)に対する特異抗体と4℃下 overnightで反応させたビオチン-ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ法により染色し、光顕的観察を行った。

T細胞系を中心に数種類の細胞株の染色を行ったが、全て、PKCの α 、 β Ⅱに対する特異抗体(CKpV 1 α -a, CKpV 5 β Ⅱ-a)にて染色し得た。 β Ⅰに対する特異抗体(CKpV 5 β Ⅰ-a)での染色は β Ⅱに比し低かった。細胞内では、細胞質内がよく染まり、またT細胞系、特にMOLT-15細胞株などでは細胞膜への染色の局在性が観察された。

考 察

PKCには、現在7種の(α 、 β Ⅰ、 β Ⅱ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ)の亜種が存在し、各々が酵素化学的性質、組織、細胞内分布の点において異なった特徴を備えている。Type Ⅲ(α)はあらゆる組織に存在するのに対し、Type Ⅰ(γ)は中枢神経系組織にのみ存在している。本研究において、ほとんどヒト白血球・リンパ腫細胞株がType ⅡとType Ⅲの両方を有し、この2つの亜種の比率が、細胞株によって大きく異なることがわかった。T細胞系細胞株は、他の細胞系に比しPKCの活性が高く、T細胞系の中でも、分化段階の進んだもの程TypeⅢの酵素活性は減少していた。これに比し、 β 細胞系細胞株は活性が低く、RAMOS細胞株には、TypeⅡ酵素は存在しなかった。他方、myelomonocytic leukemia, erythroleukemia細胞系のいくつかの細胞株には、TypeⅡ、TypeⅢとは異なった小さなピークが存在し、erythroleukemia起源のHEL細胞株では、TypeⅡもTypeⅢもなく異種の単一ピークのみ存在した。これらの酵素は、cDNAクローニングの結果、最近明白となったPKCの亜種 δ 、 ϵ 、 ζ に相当する可能性があるが、またその関連性は明瞭となっていない。Myelomonocytic leukemia細胞株のHL-60は、以前の報告ではPKCのTypeⅠ、Ⅱ、Ⅲいずれも有するとされていたが、本研究の結果からは、TypeⅡ、TypeⅢおよび、まだ明確となっていないもう一つの亜種が存在すると考えられた。本研究においては、細胞の増殖・分化の過程に大きな役割を果たすと考えられるPKCのヒト白血球・リンパ腫細胞株における亜種の分布、酵素活性測定、免疫細胞染色の解析を行う事により、若干の成果は得られたが、増殖・分化過程に大きく影響すると考えられるPKC亜種の酵素化学的性質、細胞内における局在性などは、今後の主要な課題である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

最近、種々の細胞成長因子による増殖の調節機構の研究が行われ、ことにprotein kinase C (P

KC) の果たす役割が検討されている。リンフォカインによるリンパ球の増殖、活性化の機序は、こうした研究のモデル系としても格好な材料であり、ホルボールエステルやジグリセリドを用いてPKCと遺伝子発現との関係が解析されている。

一方、PKCは最近の研究から、非常に多くの分子種から構成されている酵素集団であることが明らかとなり、現在少なくとも7種のPKC分子種の全構造が決定された。

本学位申請者は、リンパ球に存在するPKC分子種の同定と、その細胞内の存在様式、及び動態を知る目的から、ヒトの白血球に由来し、その分化程度の異なる数多くの細胞クローンを用いて、PKCの分析を行った。用いたクローン系として、Tリンパ球系の3株、Bリンパ球系3株、non-T, non-B系の1株、骨髓細胞系3株、赤芽球系2株の合計12株について、PKCの生化学的及び免疫組織学的解析を実施した。

その結果を要約すると、Tリンパ球系のPKC活性は著しく高いが、これらの全細胞株を通じて、そのPKC種には α 、 β I、 β II、及び構造の未同定のPKC分子種が分化程度を異にする細胞株に多数出現する。また、これらの分子種の相対比や細胞内の存在様式は、細胞株によって一定の傾向を示すことはないが、 γ 種PKCは出現することはない、 α 種PKCが常に多量に存在していることや、 α 種PKCのみを有する細胞株が存在することなどから、 α 種PKCが細胞の増殖機能の調節にもっとも重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

また、Tリンパ球系を用いて、インターロイキン2受容体の発現やDNA合成とPKCの活性化現象との関係を見ると、当初の予想よりも遥かに長時間、数時間にわたるPKCの活性化が必要であることが判明している。現在、リンパ球におけるインターロイキン2受容体、インターロイキン2などの遺伝子活性の発現とPKCとの関係は、もっとも研究人口の多い領域の一つであるが、本学位申請者は、クローン化した多くの細胞株について分析し、従来不明であったPKC分子種の決定、未同定の多くのPKC分子種の存在、及び細胞の活性化に際してのそれらの変動について検討し、細胞機能の調節に果たすPKCの役割についての価値ある知見を得たものである。よって、本申請者は医学博士の学位を得るに値すると認める。