



Selective increase of the α -subspecies of protein kinase C and inhibition of melanogenesis induced by retinoic acid in melanoma cells

岡, 昌宏

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1052

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001052>

※ 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)	おか 岡	まさ 昌	ひろ 宏	(兵庫県)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)			
学位記番号	博い第775号			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
学位授与の日付	平成4年3月31日			
学位論文題目	Selective Increase of the α -Subspecies of Protein Kinase C and Inhibition of Melanogenesis Induced by Retinoic Acid in Melanoma Cells (培養黒色腫細胞におけるレチノイン酸によるプロテインキナーゼCの α 分子種の選択的増加とメラニン生成抑制との関連)			
審査委員	主査 教授	三 嶋	豊	
	教授	西 塚 泰 美	教授	田 中 千賀子

論文内容の要旨

緒言

プロテインキナーゼC(以下PKC)は、細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしており、多彩な生物学的作用の発現に関与していることが明らかとなっている。PKCには分子多様性があることが判明し、現在までに少なくとも α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η の8つの分子種の存在が確認されており、これら各分子種の特異機能を解明することは現在のPKC研究の大きな課題となっている。

培養B16マウス黒色腫細胞においてレチノイン酸はメラニン生成を抑制することが報告されている。また、同じくB16黒色腫細胞においてレチノイン酸処理によりPKC活性が増加することが報告されたが、この時の各PKC分子種のレベルの変動は調べられていない。そこで本論文ではB16黒色腫細胞に発現しているPKC分子種、およびレチノイン酸処理によって変動する分子種を同定し、レチノイン酸によるメラニン生成抑制におけるPKC分子種の関与について検討した。

実験方法

培養B16マウス黒色腫細胞を1 μ Mのレチノイン酸(all-trans型)で48時間処理したものを処理細胞とし、コントロールとしてレチノイン酸の溶媒であるエタノールで48時間処理した細胞を用いた。この時処理細胞とコントロール細胞は細胞数に有意な差は認められなかった。

メラニン量は、細胞を可溶化した後、470nmの吸光度により測定した。

チロシナーゼ活性は、細胞を可溶化した後、チロシナーゼの基質であるドーバを加え、ドーパクロ

ムの生成能を475nmの吸光度で求めることにより測定した。

PKCの活性は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPから、PKCに特異的な合成ペプチド基質であるMBP₄₋₁₄への放射活性の転移により測定した。

PKC活性の変動は、B16黒色腫細胞の細胞質画分および膜画分についてそれぞれ Mono Qカラムクロマトグラフィーを行なって測定した。

PKCの分子種別の活性の変動をみるためにB16黒色腫細胞の細胞質画分についてDE52、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーを行なって、ラット脳のPKCのハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによる溶出パターンと対比させた。

PKCの分子種別の蛋白量の変動を各分子種に対する抗体を用いて、ウェスタンブロット分析により解析した。

PKCの酵素学的性質を細胞質画分の Mono Qカラムクロマトグラフィーで得られたPKC画分を用いて、PKCの活性化剤であるフォスファチジルセリン、ジオレイン存在下および非存在下でカルシウムの濃度を変えてPKC活性を測定して解析した。

PKCの分子種別のmRNAの変動を各分子種に対するcDNAを用いて、ノーザンブロット分析により解析した。

結果

レチノイン酸処理細胞のメラニン含量、チロシナーゼ活性は、コントロールに比しそれぞれ約35%、65%抑制されていた。

処理細胞のPKC活性は、細胞質画分ではコントロール細胞の約2倍に増加していたが、膜画分ではコントロール細胞との有意な差は認められなかった。

処理細胞およびコントロール細胞の細胞質画分のハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによるPKCの溶出ピークは1つであり、その位置はラット脳の α 分子種の溶出ピークの位置と一致していた。またこのハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにおけるPKC活性測定においても、処理細胞の活性はコントロールの約2倍に増加していた。

ウェスタンブロット分析により処理細胞、コントロール細胞とも α 分子種が検出され、処理細胞の α 分子種含量はコントロールより明らかに増加していた。 β 、 γ 分子種は、処理細胞、コントロール細胞のどちらにおいても検出されなかった。

PKCの酵素学的性質は、処理細胞、コントロール細胞とも高カルシウム濃度においてフォスファチジルセリン、ジオレインの両存在下でよく活性化され、この性質はラット脳より得られた α 分子種の性質と一致していた。

ノーザンブロット分析により、処理細胞、コントロール細胞とも α 、 δ 、 ε 、 ζ 分子種のmRNAが検出された。このうち α 分子種はウェスタンブロット分析と同様に処理細胞ではコントロール細胞に比し著明な増加が認められたが、 δ 、 ε 、 ζ 分子種については有意な変動は認められなかった。 β 、 γ 分子種のmRNAは処理細胞、コントロール細胞のどちらにおいても検出されなかった。

考察

以上の結果より、黒色腫細胞においてレチノイン酸はPKC分子種のうち α 分子種のみ選択的にそのmRNAおよび蛋白を増加させることが明らかとなった。またこの時メラニン生成およびチロシナーゼ活性は抑制されていた。

レチノイン酸は細胞内の特異受容体に作用したのち特定遺伝子内に存在するいわゆるレチノイン酸応答エレメントに結合し、その遺伝子の転写を促進あるいは抑制することによって生物学的作用を現わすとされている。本研究の結果よりB16黒色腫細胞のPKCの α 分子種遺伝子内にはレチノイン酸応答エレメントが存在し、 α 分子種はレチノイン酸により遺伝子レベルで調節されている可能性が示唆された。

PKCを直接活性化させるホルボール12-ミリステート13-アセテート及びリノール酸は共にB16黒色腫細胞のメラニン生成を抑制する。本論文の結果によりPKCの α 分子種蛋白が増加した場合もメラニン生成は抑制されることが示された。これらの事実よりB16黒色腫細胞においてPKCとメラニン生成抑制機構は何らかの接点を有していると考えられる。さらにレチノイン酸によるメラニン生成抑制にはPKC分子種のうち α 分子種が作用していると示唆される。レチノイン酸によるメラニン生成抑制現象におけるPKCの正確な役割は不明であるが、1つの可能性としてレチノイン酸により増加した α 分子種蛋白により、ある機能性蛋白が磷酸化の亢進をうけ、その活性が変化することによってメラニン合成系に抑制性的変化が及ぶことが考えられる。

従来メラニン生成抑制機構は色素細胞に特異的に発現しているメラニン合成系に直接作用する物質に焦点を当てて論じられてきた。しかしながら本研究によりメラニン生成はPKCを中心とした細胞内情報伝達系によっても抑制されうる可能性が示され、メラニン生成制御機構を細胞間の応答レベルから検討する視点が提供された。

本研究で示されたレチノイン酸によるPKCの α 分子種の選択的増加現象は、 α 分子種の特異機能を解析するモデル系として発展しうると考えられる。今後B16黒色腫細胞の α 分子種のさらなる機能の解析により、一層正確なメラニン生成制御機構が明らかになるであろう。

論文審査の結果の要旨

Protein kinase C (以下PKC) は細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしており、多彩な生物学的作用の発現に関与している。PKCには分子多様性があり、現在までに α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η の8つの分子種の存在が確認されている。これら各分子種の特異機能を解明することは現在のPKC研究の大きな課題の一つとなっている。

一方、色素細胞はメラニン蛋白を特異的酵素 tyrosinase により premelanosome と呼ばれる細胞内小器官で生成し、この生成活性の制御因子およびそれらの細胞内局在もよく解明されている。かつ我々の研究により色素細胞内には高いPKC活性が見いだされるとともに、本活性の変動と共にメラニン生成活性を抑制ないし亢進させる物質が種々見出されている。そこで本研究者はこの系を用い、

PKC分子種の機能を追及した。

培養B16マウス黒色腫細胞においてレチノイン酸はメラニン生成を抑制し、PKCの活性を増加させることが報告されている。しかし、各PKC分子種のレベルの変動はいまだ報告されていない。本研究者はB16細胞に発現しているPKC分子種およびレチノイン酸処理によって変動する分子種をそれぞれ同定した。B16細胞を1 μ Mのレチノイン酸で48時間処理すると細胞の増殖能に変化を与えずにメラニン生成が顕著に抑制されるとともにPKCの α 分子種のみが、その活性および蛋白量ともに増加を招来することが見いだされた。さらにmRNAのうち、 δ 、 ε 、 ζ 分子種については不変であるが、 α 分子種のmRNAのみ選択的な増加を認めた。

本研究はレチノイン酸によりPKCの α 分子種を選択的増加とともにメラニン生成抑制作用を誘導することを見いだしたもので、従来より課題であったPKC各分子種の特異機能の解析に応用できるモデル系についても重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。