



Expression of protein kinase C subspecies in rat retina

藤澤, 直子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1149

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001149>

※ 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)	ふじ さわ なお こ 藤 澤 直 子	(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824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5年3月31日	
学位論文題目	Expression of protein kinase C subspecies in rat retina ラット網膜における PKC 分子種の発現	

審 査 委 員	主査 教授	西 塚 泰 美
	教授	山 本 節 教授 藤 原 美 定

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

プロテインキナーゼC (PKC) は種々の細胞内情報伝達において重要な役割を担っていることが明らかとなっている。現在哺乳類では遺伝子クローニングにより、少なくとも10種類 (α , β I, β II, γ , δ , ε , ζ , η , θ , λ) の PKC 分子量が確認され、それぞれが異なる情報伝達系において機能する可能性が示唆されている。

PKC は牛の網膜では視細胞外節に多く存在し、光受容伝達経路に重要な役割を果たすロドプシン、アレスチンのリン酸化反応に関与していることが示唆されている。また、 α PKC、 β PKC については網膜において異なる局在部位を示すことが免疫組織学的解析によって明らかとなっている。

視覚系における PKC 各分子種の役割を明らかにするため、今回我々はラット網膜に存在する PKC 分子種を分離同定した。ハイドロキシアパタイトカラムによりラット網膜の PKC 分子種を分離した後、各 PKC 分子種に対する特異抗体により同定を行ない、その酵素化学的性質を明らかにした。

その結果、ラット網膜には α , β , γ , δ , ε , ζ , η の各 PKC 分子種が存在すると共に、構造未同定の PKC 分子種の存在が明らかになった。

実験方法

(1) ハイドロキシアパタイトカラムによる PKC 分子種の分離

ラット網膜 (680mg wet weight) を 0.5% Triton X-100, 10 mM EGTA 存在下でホモジナイズし、その 100,000 g 上清を Mono Q カラムにかけ、PKC 活性を有した全てのフラクションを収集し

た。次に収集したフラクションをハイドロキシアパタイトカラムにかけ、 KPO_4 の直線的濃度勾配 (20-215mM) によって PKC 分子種を分離した。

(2) PKC 活性の測定

PKC 活性は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ からミエリン塩基性タンパク質へのリン酸化能を種々の活性化因子 (リン脂質、ジアシルグリセロール (DG)、カルシウムイオン) の存在下にて測定した。

(3) 免疫学的分析

各フラクションを SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行なった後、immobilon に転写し、ウェスタンブロッティング法にて免疫学的分析を行なった。一次抗体には各 PKC 分子種に特異的なペプチドを抗原とし、作製したポリクロナール抗体を用い、peroxidase- H_2O_2 -diaminobenzidine により発色させた。また、各 PKC 分子種の authentic marker として、 α 、 β 、 δ PKC はラット脳より精製したものを、 δ 、 ε 、 ζ は CHO 細胞に発現させた産物を用いた。

実験結果及び考察

(1) 抗体の特異性

PKC 分子種特異抗体の特異性を明らかにするために各 PKC 分子種の authentic marker を用いて免疫学的解析を行なった。

その結果、 α PKC に対する抗体は 81KDa の α PKC を、 β PKC に対する抗体は 80KDa の β PKC を、 γ PKC に対する抗体は 81KDa の γ PKC を、 δ PKC に対する抗体は 76KDa と 78KDa の δ PKC を、 ε PKC に対する抗体は 90KDa と 93KDa の ε PKC を、 ζ PKC に対する抗体は 76KDa の ζ PKC を各種特異的に認識した。

(2) PKC 分子種の分離

ラット網膜の PKC 活性はハイドロキシアパタイトカラムにより peak I, peak II, peak III, peak IV の 4 つのピークに大きく分離された。ラット脳では peak I は γ PKC 分子種、peak II は β PKC 分子種、peak III は α PKC 分子種の溶出位置に各々一致していた。また、peak IV はその溶出位置より α 、 β 、 γ PKC 以外の分子種の活性であると考えられた。

種々の PKC 活性化因子の存在下で各フラクションをリン酸化した結果 peak I と peak III は明らかにカルシウム依存性を示していた。peak II は前半のカルシウム依存性のピークと後半のカルシウム非依存性のピークの混合物であった。また、前半のピークが Ptd Ser (PS)、カルシウムの存在下で活性化を受けるのに対して、後半のピークではその活性化に diolein (DO) が必須であった。peak IV の PKC 活性は部分的にカルシウム依存性であった。

(3) PKC 分子種の同定

各フラクションを各 PKC 分子種に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析を行なった。peak II には β PKC 分子種だけでなく、 ε PKC、 δ PKC、 ζ PKC 分子種の存在が検出された。peak III はそのほとんどが α PKC 分子種によって構成されていたが、 ζ PKC 分子種も混在していた。また、peak I は抗体による検出はなされなかった。

(4) PKC分子種の酵素化学的性質

PKC分子種にはカルシウム依存性 (α , β , δ PKC) とカルシウム非依存性 (δ , ε , ζ , η PKC) の2つのグループが存在する。さらに α , β , δ PKC分子種はその活性化に高濃度のカルシウム存在下ではリン脂質のみでも最大活性を示しうが、 δ , ε PKC分子種はカルシウムの存在に無関係にリン脂質、DOの共存が必須である。

peak IIはカルシウム、PSの存在下で活性を受けるピークと、その活性化にDOを必要とするピークの混合物である。両者の酵素化学的性質を調べた結果、前者はカルシウム依存性のPKC分子種に類似の性質を示し、後者はカルシウム非依存性の酵素化学的性質を示した。このことはウエスタンブロッティングにより同定された結果と一致しており、前者は主として β PKC分子種と少量の ε PKC分子種、後者は ε , δ , β PKC分子種の混合である。

以上の様に網膜は、哺乳類において現在までに知られているPKC分子種の大部分のものが存在する特有の組織であることが明らかになった。また、 η , θ , λ PKC分子量は未だ同定されていないが、peak IVに含まれているのではないかと考えられる。

更に免疫組織学的解析では δ PKCは錐体杆体層に、 ε PKCは神経節細胞層に、各々局在し、各PKC分子種は網膜内で異なる局在を示し、異なる役割を果たしているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞内情報伝達機構のネットワークに関する研究は、現在注目を集める研究領域である。ことに脳神経系における研究は、cyclic AMP、カルシウムイオン、プロテインキナーゼC (PKC) などの相互関係を中心に、伝達物質の放出、長期増幅等の生化学的機構をめぐる競争が解析が進められている。PKCは現在合計10種類の構造が決定され、脳神経系組織内でのそれぞれの局在、活性化機構の様相、性質について、生化学的、組織学的な解析が進められている。

網膜組織においては、PKCはことに視細胞外節に多く存在し、ロドプシン、アレステチン等のリン酸化反応に関与するところから、光受容の伝達における役割が示唆されている。しかし、これまでのところ、網膜組織におけるPKC各分子種に関する解析結果は報告されていない。

本研究者は、網膜における光受容機構の解析を目的とし、まずラットの網膜に存在するPKC各分子種の酵素化学的分析を行った。方法としては液体クロマトグラフィーを主とする微量酵素の分析に加えて、それぞれのPKC分子種に特異的に反応する抗体を作成し、それらの抗体を使用した免疫化学的手法を併せて同定を行った。その結果、細胞は、他の組織と異って、 α , β I, β II, γ , δ , ε , ζ , η 種のPKCがすべて存在する特有の組織であることを明らかにした他、他の組織には認められない特殊の分子種が存在することも明らかにした。続いてこれらの各分子種について酵素化学的解析を実施し、これまで動物組織より分離されていなかった ε -及び η -分子種について、その性格を解析し、PKCには大きく分類して3群、すなわち α , β I, β II, γ の第1群、 δ , ε などの第

2 群、 ζ などの第3 群に分類されること、それぞれが、細胞膜の異なった脂質によって活性調節を受ける可能性を示した。

以上の結果は、これまで分子クローニングの結果からのみ確定されていた多数の PKC 分子種についても、実際に酵素蛋白質として存在すること、それが網膜組織にはほとんどすべての分子種が実在することを確めたものである。網膜の各細胞種毎における存在、組織化学的研究は今後の課題であるが、光受容における情報伝達の解明に一つの貢献をしたものとして価値ある業績と認める。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。