



Importance of c1b domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase c

柏木, 香保里

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2751

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002751>

※ 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。



【 103 】

氏 名 ・(本 籍) 柏 木 香保里 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1498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15年3月31日

【 学位論文題目 】

Importance of C1B Domain for Lipid Messenger-
induced Targeting of Protein Kinase C
(脂質メッセンジャーによるPKCターゲティングには
C1Bドメインが重要である)

審 査 委 員

主 査 教 授 齋 藤 尚 亮

 教 授 吉 川 潮

 教 授 真 鍋 俊 也

結論

プロテインキナーゼC (Protein Kinase C: PKC)は、リン脂質依存性のセリン/スレオニンリン酸化酵素で、細胞内情報伝達機構において重要な働きをしている。PKC には 10 数種のサブタイプが存在し、一次構造の違いから3つのサブファミリー、conventional PKC(cPKC)、novel PKC(nPKC)およびatypical PKC(aPKC)に分類されている。cPKC に属する α 、 β および γ サブタイプはアミノ末端側の制御ドメインにC1とC2という特徴的な機能ドメインを持つ。C1 ドメインにはシステインリッチモチーフが2つ存在し(C1A および C1B)、ジアシルグリセロールや、ホルボールエステル的一种で発ガンプロモーターであるTPAが結合する。C2 ドメインはカルシウムイオン結合部位である。nPKC に属する δ 、 ϵ 、 η および θ サブタイプはC2 ドメインを持たず、aPKC に属すると λ / ι サブタイプはC2 ドメインを欠きシステインに富んだ配列は一つしか持たない。これらサブタイプは活性化機構に違いがあり、また特徴的な組織および細胞内分布を示すことから、生体内ではそれぞれ独自の機能を果たしていると推測されているが、個々のサブタイプ特異的機能は未だ明らかにされていない。また、PKC はジアシルグリセロール、セラミドやアラキドン酸などの脂質メッセンジャーによって活性化される事が知られている。これまでに、蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein: GFP)を融合させたPKCを用いた解析から、これら脂質メッセンジャーがPKCの細胞内局在を変化(トランスロケーション)させること、また脂質メッセンジャーの種類によりPKCが異なる標的部位にトランスロケーションすること、さらに同一の刺激でもサブタイプによって標的部位が異なることが報告されている。例えば、TPAは ϵ PKC及び δ PKC 両サブタイプを細胞質から細胞質膜へトランスロケーションさせ、アラキドン酸は ϵ PKCを細胞質からゴルジ体にトランスロケーションさせるが、 δ PKCの局在は変化させず、セラミドは ϵ PKC および δ PKCを細胞質からゴルジ体にトランスロケーションさせる。つまり、個々の脂質メッセンジャーがPKC各サブタイプを特異的にトランスロケーションさせるターゲティング機構(特定の場で下流にシグナルを伝達する機構)が存在し、このことがPKCの機能に多様性を持たせるために重要であると考えられる。しかし、どのような分子機構によって同一刺激に対して各サブタイプがそれぞれ違ったトランスロケーションを示すのかや、またどのような分子機序で特定のサブタイプが種々の刺

激毎に異なるトランスロケーションを惹起されるのか、その詳細は未だ不明な点が多い。

目的

そこで本研究ではPKCのターゲティングを制御する機構を分子レベルで解明することを目的とし、GFP標識したPKCの細胞内動態を指標に脂質メッセンジャー刺激に応答する分子内領域の解析を行った。

方法

野生型 ϵ PKCに加え、 ϵ PKCのアミノ末端および各ドメインを欠損させた変異体(アミノ末端から順に欠損領域を広げた変異体4種、および制御領域内のドメイン構造を一つずつ欠損させた変異体4種)、点変異を導入した ϵ PKC(C1AとC1Bへのホルボールエステル結合能を変化させた変異体4種)、 ϵ PKCおよび δ PKCのC1Bドメインだけを入れ替えたキメラ変異体、それぞれのカルボキシル末端側にGFPを融合させたタンパク質を構築しCHO-K1細胞に発現させ、TPA、アラキドン酸およびセラミドによるトランスロケーションをコンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて解析した。以下にGFP融合 ϵ PKCの構造を示す。

V1 PS C1A C1B kinase domain GFP



(V1: variable region 1, PS: pseudosubstrate region, C1: conserved region1)

結果

アラキドン酸およびセラミドは共に ϵ PKCを細胞質からゴルジ体へトランスロケーションさせたが、両刺激によるトランスロケーション機構が以下の点で異なっていることが明らかになった。セラミドで刺激後ゴルジ体に局在する ϵ PKCをさらにTPAで刺激したところ、 ϵ PKCは25分ではほぼ完全に細胞質膜にトランスロケーションしたが、アラキドン酸刺激後の ϵ PKCはTPA刺激後40分経過してもゴルジ体に残っていた。また、photobleaching後の蛍光復活を指標とした解析から、アラキドン酸刺激後の ϵ PKCはゴルジ体と強い相互作用をしているが、セラミド刺激後の ϵ PKCはゴルジ体とは弱い相互作用しかせず、細

胞質とゴルジ体を行き来していることが明らかとなった。さらに、アラキドン酸刺激によりゴルジ体に局在する ϵ PKC は、その後のセラミド刺激で一旦細胞質に戻り再びセラミド単独刺激後の局在を示した。一方、セラミド刺激後のゴルジ体の ϵ PKC はその後のアラキドン酸刺激には応答しなかった。これらの結果からアラキドン酸とセラミドは異なる分子機構で ϵ PKC をゴルジ体へトランスロケーションさせていることが示唆された。

次に、アラキドン酸およびセラミド刺激によるトランスロケーションに関わる ϵ PKC の分子内領域が異なるのではという仮説の元、種々の欠損変異体を構築し、両刺激によるトランスロケーションを検討した。 ϵ PKC のN末端からC1Aドメインまで欠損させてもTPA、アラキドン酸及びセラミド刺激に対して野生型と同様のトランスロケーションを示したが、C1Bドメインまで欠損させるといかなる刺激にも応答しなくなった。各ドメインのみをそれぞれ欠損させた変異体において、C1Aのみを欠損させた変異体(Δ C1A)はアラキドン酸でもセラミド刺激でもトランスロケーションしたがC1Bのみを欠く変異体(Δ C1B)及びC1AとC1B両方を欠損させた変異体(Δ C1A-C1B)は応答しなかった。TPA刺激に対して Δ C1A及び Δ C1Bは応答したが Δ C1A-C1Bはトランスロケーションを示さなかった。これらの結果から、アラキドン酸およびセラミド刺激によるトランスロケーションに関わっているのは共にC1Bドメインであり、TPA刺激によるトランスロケーションにはC1A、C1Bドメイン両方が関与しており、どちらかがあれば応答できることが示唆された。

欠損変異体の実験結果から脂質メッセンジャーによる ϵ PKC のターゲティングにはC1Bドメインが重要であることが示されたが、さらにアラキドン酸によってトランスロケーションする ϵ PKC と応答しない δ PKC それぞれのC1Bドメインを入れ替えたキメラ[$\delta(\epsilon$ C1B): ϵ PKC のC1Bをもつ δ PKC、 $\epsilon(\delta$ C1B): δ PKC のC1Bをもつ ϵ PKC]を構築し、各サブタイプが持つC1Bドメインの脂質メッセンジャーへの応答性を検討した。セラミド刺激には両キメラ共に応答したがアラキドン酸によってトランスロケーションしたのは $\delta(\epsilon$ C1B)のみであった。すなわち、 ϵ C1Bはセラミドおよびアラキドン酸両刺激に応答可能であり、 δ C1Bはセラミドのみに反応を示すことが明らかになった。このことは、サブタイプそれぞれのC1Bドメインが刺激に応じて異なる反応を示し、その応答の違いが分子種特異的機能の発現に関わっていることを示唆して

いる。

まとめと考察

アラキドン酸およびセラミドはC1Bドメインを介し異なる機構で ϵ PKC を細胞質からゴルジ体へトランスロケーションさせることが明らかになった。一方TPAによる細胞質膜へのトランスロケーションには ϵ PKC のC1AまたはC1Bドメインどちらか一方の関与で十分であることが明らかになった。また、 ϵ PKC と δ PKC のアラキドン酸刺激への感受性の差はC1Bドメインの僅かな違いによるものであることが解った。これらの結果から、様々な脂質メッセンジャーに応じてPKCの異なるドメインを介してトランスロケーションが制御されていること、さらに各サブタイプそれぞれの特徴的なドメインの性質がサブタイプ特異的なターゲティングを惹起し、それによって多様な生理機能を生んでいる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1516 号	氏名	柏木香保里
論文題目	Importance of C1B Domain for Lipid Messenger-induced Targeting of Protein Kinase C 脂質メッセンジャーによる PKC ターゲティングには C1B ドメインが重要である		
審査委員	主 査 斎藤 尚亮 副 査 吉川 朝 副 査 真鍋 俊也		
審査終了日	平成 10 年 1 月 27 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

プロテインキナーゼ C (PKC)は、ジアシルグリセロール、セラミドやアラキドン酸などの脂質メッセンジャーによって活性化される事が知られている。これまでに、蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein: GFP)を融合させた PKC を用いた解析から、これら脂質メッセンジャーが PKC の細胞内局在を変化(トランスロケーション)させること、また脂質メッセンジャーの種類により PKC が異なる標的部位にトランスロケーションすること、さらに同一の刺激でもサブタイプによって標的部位が異なることが報告されている。個々の脂質メッセンジャーが PKC 各サブタイプを特異的にトランスロケーションさせるターゲティング機構(特定の場で下流にシグナルを伝達する機構)が存在し、このことが PKC の機能に多様性を持たせるために重要であると考えられる。しかし、どのような分子機構によって同一刺激に対して各サブタイプがそれぞれ違ったトランスロケーションを示すのかや、またどのような分子機序で特定のサブタイプが種々の刺激毎に異なるトランスロケーションを惹起されるのか、その詳細は未だ不明な点が多い。

本研究では PKC のターゲティングを制御する機構を分子レベルで解明することを目的とし、GFP 標識した野生型 PKC および様々な変異体の細胞内動態を指標に脂質メッセンジャー刺激に応答する分子内領域の解析を行った。アラキドン酸およびセラミドは共にεPKC を細胞質からゴルジ体へトランスロケーションさせたが、両刺激によるトランスロケーション機構が以下の点で異なることが明らかになった。セラミド刺激後、ゴルジ体に局在するεPKC をさらに TPA で刺激したところ、εPKC は 25 分でほぼ完全に細胞質膜にトランスロケーションしたが、アラキドン酸刺激後のεPKC は TPA 刺激後 40 分経過してもゴルジ体に残っていた。また、photobleaching 後の蛍光復活を指標とした解析から、アラキドン酸刺激後のεPKC はゴルジ体と強い相互作用をしているが、セラミド刺激後のεPKC はゴルジ体とは弱い相互作用しかせず細胞質とゴルジ体を行き来していることが明らかとなった。以上の結果からアラキドン酸とセラミドは異なる分子機構でεPKC をゴルジ体へトランスロケーションさせていることが示唆された。次に、アラキドン酸およびセラミド刺激によるトランスロケーションに関わるεPKC の分子内領域を種々の欠損変異体を用いて解析した。その結果、アラキドン酸およびセラミド刺激によるトランスロケーションに関わっているのは共に C1B ドメインであり、TPA 刺激によるトランスロケーションには C1A、C1B ドメイン両方が関与し、どちらかがあれば応答できることが示唆された。さらにアラキドン酸によってトランスロケーションするεPKC と応答しないδPKC それぞれの C1B ドメインを入れ替えたキメラタンパクを用いた実験から、εC1B はセラミドおよびアラキドン酸両刺激に応答可能であり、δC1B はセラミドのみに反応を示すことが明らかになった。このことは、サブタイプそれぞれの C1B ドメインが刺激に応じて異なる反応を示し、その応答の違いが分子種特異的機能の発現に関わっていることを示唆している。

以上の結果から、様々な脂質メッセンジャーに応じて PKC の異なるドメインを介してトランスロケーションが制御されていること、さらに各サブタイプそれぞれの特徴的なドメインの性質がサブタイプ特異的なターゲティングを惹起し、それによって多様な生理機能を生んでいる可能性が示唆された。

本研究は、PKC の新たな機能について研究したものであるが、従来、ほとんど行われなかった多彩な PKC トランスロケーションの分子機構について重要な知見を得た。

のとして価値ある集積であると認める。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。