



Ceramide-induced apoptosis by translocation, phosphorylation and activation of protein kinase C δ at Golgi complex

梶本, 武利

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2980

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002980>

※ 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。



【 130 】

氏 名・(本 籍) 梶本 武利 (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1590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16年3月31日

【 学位論文題目 】

Ceramide-induced apoptosis by translocation,
phosphorylation and activation of protein kinase C δ
at Golgi complex

(プロテインキナーゼCのゴルジ体へのトランスロケーション
及びゴルジ体上でのリン酸化を介したセラミドによる
アポトーシス誘導機構)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一
教 授 山村 博平
教 授 米澤 一仁

緒論

プロテインキナーゼ C (PKC) は、細胞内情報伝達における重要なリン酸化酵素の一つであり、細胞増殖、分化、神経可塑性など様々な細胞応答に関与していることが知られている。この PKC は、脂質メディエーターによって活性調節を受けるリン酸化酵素として 1977 年に発見された。その後の詳細な研究から、PKC には少なくとも classical PKC (α 、 β I、 β II、 γ)、novel PKC (δ 、 ϵ 、 η 、 θ)、atypical PKC (ζ 、 ι) の 3 グループに分類され、10 種類の分子種が存在することが明らかとなり、さらにそれぞれの分子種が種特異的な調節機構を持っていることが分かってきた。PKC の特徴としては、通常細胞質に多く存在している PKC が、シグナルの種類によってダイナミックに様々な細胞内小器官へトランスロケーションすることが挙げられる。しかし、この PKC のトランスロケーション現象についてはまだ明らかになっていないシグナル因子が多く残されていると思われる。そこで、PKC を調節する脂質メディエーターとして新たに注目されているセラミド (セラミドはスフィンゴミエリンの中間代謝産物であり重要な脂質メディエーターとして、アポトーシス、分化などに関与している) に焦点を当て、トランスロケーション現象を中心としたセラミドによる PKC の調節機構の詳細を明らかにすることを目的として研究を行なったところ、セラミドは、HeLa 細胞において novel PKC である δ PKC 分子種特異的に、ゴルジ体へのトランスロケーションを引き起こし、チロシンリン酸化を介してその活性化を引き起こしていることが示された (Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(5), 1769-1783)。PKC のトランスロケーション現象において特に興味深い点は、同じ PKC 分子種でもシグナルの種類が異なれば、異なる細胞内動態を示すことである。このことは PKC がシグナルによって異なる場所へトランスロケーションし、トランスロケーション先で活性化し、トランスロケーション先の目的のターゲットのみをリン酸化するターゲティング機構が、シグナル伝達上重要な働きを担っている可能性があることを示唆している。

目的

そこで本研究では、この PKC のターゲティング機構に注目し、先に見出したセラミドによる PKC のゴルジ体へのトランスロケーション及び活性化現象がどのような生理現象に関与しており、さらにその生理現象がターゲティング依存的なのかどうかを調べることを目的として研究を行なった。

方法

実験には、ヒトの子宮頸部扁平上皮癌細胞由来の細胞株である HeLa 細胞を用いた。この HeLa 細胞に、様々な δ PKC の C 末端側に GFP を融合させた δ PKC-GFP を発現させて実験を行った。セラミドは膜透過性のセラミドアナログを用いた。細胞内動態の系時的観察にはコンフォーカルレーザー顕微鏡を用いた。また、アポトーシスは、Hoechst を用いた DNA の蛍光染色によってクロマチンの断片化を可視化することによって検出した。

結果

まず、セラミド刺激時の細胞応答の一つとして知られているアポトーシス誘導現象において、 δ PKC が関与しているかどうかを調べるために、 δ PKC 特異的阻害剤であるロットレリンの効果を観察した。その結果、HeLa 細胞にセラミドのみを処置した場合には、24 時間後、約 80% の細胞にアポトーシス誘導現象が観察されるのに対して、ロットレリンを前処置した場合にはその現象が約 20% 程度まで抑えられることが分かった。また HeLa 細胞に内在性に存在する δ PKC を RNAi 法によってノックダウンした後、セラミドを処置した場合にもこのアポトーシス現象が抑制されることが確かめられた。この結果から、 δ PKC がセラミドによるアポトーシス誘導機構に関与していることが示唆された。

次に、セラミド刺激時の δ PKC の活性化機構について詳細に調べた。 δ PKC の点変異体 (チロシン \rightarrow フェニルアラニン) を用いた実験および抗リン酸化 δ PKC 特異的抗体を用いた実験から、 δ PKC はセラミド刺激時に 311 番目及び 332 番目のチロシン残基がリン酸化を受けることが分かった。また、Src ファミリーキナーゼ阻害剤を用いた実験から、 δ PKC のチロシンリン酸化は Src ファミリーチロシンキナーゼによるものであることが示唆された。さらに、311 番目及び 332 番目の点変異体を用いて、これらチロシン残基のリン酸化と活性化との関係を調べたところ、これらのチロシン残基のリン酸化はセラミドによる δ PKC の活性化には不可欠であり、また 311 番目及び 332 番目の両方のチロシン残基がリン酸化されて初めて活性化状態になることが明らかとなった。

次に、セラミドによる δ PKC の 311 番目及び 332 番目のチロシンリン酸化と δ PKC の局在変化との関係を調べた。まず、点変異型 δ PKC のセラミドによるトランスロケーションを観察したところ、野生型との差異は見られなかった。このことから、セラミドによる δ PKC のゴルジ体へのトランスロケーションにはチロシンリン酸化 (ひいては活性化) は関与していない

ことが示された。そこで次に、チロシンリン酸化は細胞質中（トランスロケーション前）、またはゴルジ体上（トランスロケーション後）、のどちらで行われるかを調べた。内在性の δ PKCの影響が懸念されたため、前述のRNAi法によって内在性の δ PKC（ヒト由来）をノックダウンしたHeLa細胞を用いて実験を行った。RNAi処置した細胞に野生型、点変異型 δ PKC（ラット由来）をそれぞれ発現させ、セラミド処置後（野生型、点変異型共、ゴルジ体へトランスロケーションしている）、チロシンリン酸化抗体による免疫染色を行ったところ、野生型 δ PKCを発現させた場合のみ、ゴルジ体上にチロシンリン酸化蛍光が観察された。細胞質中のチロシンリン酸化像に変化は認められなかったが、 δ PKCはリン酸化と同時に速やかにゴルジ体へトランスロケーションし、免疫染色法では細胞質中のチロシンリン酸化の微妙な変化が観察できなかった可能性がある。よってこの結果からは、少なくともトランスロケーション後のゴルジ体上の δ PKCはリン酸化されていることが示される。 δ PKCがチロシンリン酸化を受ける細胞内領域を決定するために、セラミドによって局在変化を示さないが、311番目及び332番目のチロシンリン酸化能は保持している変異体（ Δ C1B）を作製し、次のような実験を行った。セラミドと同様に δ PKCの311番目及び332番目のチロシンリン酸化を引き起こす刺激として、過酸化水素が知られているが、この過酸化水素は δ PKCの局在変化を引き起こさない。つまり、過酸化水素は、細胞質中で δ PKCの311番目及び332番目のチロシン残基をリン酸化して活性化へ導く。 Δ C1B変異体をHeLa細胞に発現させ、セラミドおよび過酸化水素刺激を行ったところ、過酸化水素刺激では変異体のチロシンリン酸化および活性化は野生型と同程度だったが、セラミド刺激ではチロシンリン酸化、活性化とも認められなかった。これらの結果から、 δ PKCはセラミド刺激によって、ゴルジ体上でチロシンリン酸化を受け、活性化状態になることが示唆された。

最後に、上記のようなセラミドによる δ PKCのゴルジ体へのターゲティング機構（トランスロケーションと活性化）が、セラミドによる δ PKCを介するアポトーシス誘導機構に関与しているかどうかを調べた。内在性の δ PKCの影響をなくすために、RNAi法によって内在性の δ PKC（ヒト由来）をノックダウンしたHeLa細胞を用いて実験を行った。まず、RNAi処置した細胞に野生型、点変異型 δ PKC（ラット由来）をそれぞれ発現させ、セラミドによるアポトーシス誘導を観察したところ、野生型 δ PKCを発現させるとセラミドによるアポトーシス誘導能が回復した。しかしながら、311番目及び332番目のチロシンリン酸化を受けない点変異型 δ PKCを発現させ

ても、アポトーシス誘導能は回復しなかった。また、過酸化水素刺激によって細胞質中で δ PKCを311番目及び332番目のチロシンリン酸化を介して活性化させた場合にはアポトーシス誘導現象は観察されなかった。これらの結果から、セラミドによる δ PKCを介するアポトーシス誘導には、 δ PKCの311番目及び332番目のチロシンリン酸化を伴うゴルジ体へのターゲティング機構が必要不可欠であることが示された。

結論

本研究により、セラミドによるアポトーシス誘導現象において、 δ PKCのゴルジ体へのターゲティング機構（トランスロケーションと活性化）が重要な役割を担う、新たなシグナル伝達経路が見出された。つまり、 δ PKCはセラミドにより分子種特異的にゴルジ体へトランスロケーションし、ゴルジ体上でチロシンリン酸化を受けて活性化になり、その下流でアポトーシスの誘導に関与していることが明らかになった。また、細胞外からのシグナルに応じてPKCが関与する目的の細胞応答を引き起こされるためには、単にPKCが活性化するだけでは不十分であり、トランスロケーションを伴う目的の細胞内領域へのターゲティングが必要不可欠であるという、ターゲティング機構の重要性が示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1600号	氏名	梶本武利
論文題目	Ceramide-induced apoptosis by translocation, phosphorylation and activation of protein kinase C δ at Golgi complex プロテインキナーゼCのゴルジ体へのトランスロケーション及びゴルジ体上でのリン酸化を介したセラミドによるアポトーシス誘導機構		
審査委員	主査 中村俊一 副査 山本博平 副査 米澤一仁		
審査終了日	平成16年 2月 25日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

プロテインキナーゼC (PKC) は、少なくとも1.0種類の分子種が存在し、細胞内情報伝達における重要なリン酸化酵素の一つとして、細胞増殖、分化、神経可塑性など多様な細胞応答に関与していることが知られている。これまでの研究から、脂質メディエーターであるセラミドが、 δ PKC分子種特異的に、ゴルジ体へのトランスロケーションを引き起こし、チロシンリン酸化を介してその活性化を引き起こしていることが示された。このことはPKCがシグナルによって目的の場所へトランスロケーションし、トランスロケーション先で活性化し、トランスロケーション先の目的のターゲットのみをリン酸化するターゲティング機構が、シグナル伝達上重要な働きを担っている可能性があることを示唆していた。そこで、このPKCのターゲティング機構に注目し、セラミドによるPKCのゴルジ体へのトランスロケーション及び活性化現象がどのような生理現象に関与しており、さらにその生理現象がターゲティング依存的なのかどうかを調べることを目的として研究を行なった。

まず、セラミド刺激時の細胞応答の一つとして知られているアポトーシス誘導現象において、 δ PKCが関与しているかどうかを調べるために、 δ PKC特異的阻害剤であるロットレリンの効果を観察したところ、HeLa細胞のセラミドによるアポトーシス誘導現象が、ロットレリンの前処置によって抑えられることが分かった。またHeLa細胞に内在性に存在する δ PKCをRNAi法によってノックダウンした場合にも同様の結果が得られた。この結果から、 δ PKCがセラミドによるアポトーシス誘導機構に関与していることが示唆された。

次に、セラミド刺激時の δ PKCの活性化機構について詳細に調べたところ、 δ PKCの点変異体(チロシン→フェニルアラニン)を用いた実験および抗リン酸化 δ PKC特異的抗体を用いた実験から、 δ PKCはセラミド刺激時に3.1.1番目及び3.3.2番目のチロシン残基がリン酸化を受けることが分かった。また、Srcファミリーキナーゼ阻害剤を用いた実験から、 δ PKCのチロシンリン酸化はSrcファミリーチロシンキナーゼによるものであることが示唆された。

更に、セラミドによる δ PKCの3.1.1番目及び3.3.2番目のチロシンリン酸

化と δ PKCの局在変化との関係を検討した。3.1.1番目及び3.3.2番目のチロシン残基の点変異型 δ PKCを用いた解析から、セラミドによる δ PKCのゴルジ体へのトランスロケーションにはチロシンリン酸化は関与していないことが示された。また、抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫染色、およびC1Bドメイン欠失変異体（セラミドによって局在変化を示さないが3.1.1番目及び3.3.2番目のチロシンリン酸化/活性化能は保持している）を用いた解析から、 δ PKCはセラミド刺激によって、ゴルジ体上でチロシンリン酸化を受け、活性化状態になることが示された。

最後に、上記のようなセラミドによる δ PKCのゴルジ体へのターゲティング機構（トランスロケーションと活性化）が、セラミドによる δ PKCを介するアポトーシス誘導機構に関与しているかどうかを検討した。RNAi法および点変異型 δ PKCを用いた解析から、セラミドによる δ PKCを介するアポトーシス誘導には、 δ PKCの3.1.1番目及び3.3.2番目のチロシンリン酸化を伴うゴルジ体へのターゲティング機構が不可欠であることが示された。

以上、ゴルジ体での δ PKCの活性化からアポトーシスへ至る経路については今後の検討課題であるが、 δ PKCがセラミドにより分子種特異的にゴルジ体へトランスロケーションし、ゴルジ体上でチロシンリン酸化を受けて活性型になり、その下流でアポトーシスの誘導に関与していることが明らかになった。

本研究は、セラミドによるPKCの調節機構について研究したものであるが、新たなシグナル伝達経路が見出されたと同時に、ターゲティング機構の重要性を示す有力な知見を得たものとして価値ある集積と認める。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。