



Activation and translocation of PKC δ is necessary for VEGF-induced ERK activation through KDR in HEK293T cells

Kuriyama, Masamitsu

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-02-28

(Date of Publication)

2013-02-26

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3231

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003231>

※ 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。



【 85 】

氏 名・(本 籍) 栗山 雅光 (奈良県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第1638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17年2月28日

【 学位論文題目 】

Activation and translocation of PKC δ is necessary for
VEGF-induced ERK activation through KDR in HEK293T
cells

(HEK293T 細胞における KDR を介した VEGF 誘導の
ERK の活性化にはPKC δ の活性化とトランスロケーション
が必要である)

審 査 委 員

主 査 教 授 吉川 潮
教 授 米澤 一仁
教 授 中村 俊一

血管成長因子 (vascular endothelial growth factor-A[VEGF])は正常な血管新生だけでなく、腫瘍や糖尿病網膜症、リウマチ性関節症のような病的な血管新生を誘導する。VEGFは代表的な二つの機能、血管内皮細胞の増殖の促進し、毛細血管の浸透性を増加させる機能、さらに、VEGFはcell migrationやprotease production、cell survival、NOやプロスタサイクリンの産出を促進する機能を有する。しかし、VEGFによるこれらの調節メカニズムは不明である。

VEGFは主にFlt-1とKDR/Flk-1の二つのチロシンキナーゼレセプターを活性化し、Flt-1とKDRはともに血管内皮細胞に発現しており構造的にPDGFレセプターファミリーに類似しているが、これまでの知見からFlt-1は内皮細胞の増殖抑制に、KDRは内皮細胞の増殖促進に寄与していることが予測されている。そこで内皮細胞の増殖を促進するVEGF-KDRシグナルに着目し、そのシグナル伝達メカニズムの解明を試みた。

KDR はほかの receptor tyrosine kinase のように Ras を介して Raf-MEK-ERK カスケードを活性化するのではなく、phospholipase C γ (PLC γ)を活性化し PKC を介して Raf-MEK-ERK カスケードを活性化することが特徴である。内皮細胞を含むいくつかの細胞で VEGF 刺激により活性化される PKC 分子種が報告されているが、VEGF-KDR 刺激の下流で活性化し Raf-MEK-ERK カスケードを活性化する PKC 分子種は不明である。

そこで本研究において、私は VEGF-KDR-PLC γ -PKC-Raf-MEK-ERK シグナルカスケードに関わる PKC 分子種を明らかにし、その活性化メカニズムの検討を試みた。また、本実験には KDR を一過性に発現させた HEK293T 細胞を用いて実験を行った。

VEGF 刺激を KDR を発現した HEK293T 細胞に行うと、3分-5分をピークに ERK のリン酸化が認められ、刺激後30分までわずかに減少していった。ここに PKC の阻害剤 Go6983 を処理すると VEGF の応答した ERK のリン酸化が抑制されることが認められた。このことから KDR を一過性に発現させた HEK293T 細胞においても VEGF-KDR 刺激に応答した ERK のリン酸化は PKC 依存的であることが認められた。この細胞モデル系を用いて、まず、VEGF-KDR の下流で ERK を活性化する PKC 分子種の同定を試みた。Western blotting により HEK293T 細胞には主に β I、 β II、 δ 、 ζ 分子種が主に発現しており、 α 分子種も弱く発現していた。そこで PKC δ 分子種特異的な阻害剤、rottlerin で処理すると VEGF-KDR 刺激に応答した ERK のリン酸化を抑制した。一方、cPKC 阻害剤、Go6976 では影響がなかった。以上のことから PKC δ 分子種が VEGF-KDR 刺激に応答した ERK のリン酸化に関与していることが考えられた。しかし、rottlerin の阻害特異性は低く、さらに siRNA 法を用いて PKC δ であることの確認を行った。 human の PKC δ の 603-621

残基に相当する領域を標的に siRNA を設計し導入した結果、HEK293T 細胞において、 δ 分子種特異的に knock-down することに成功した。この human PKC δ siRNA を用いて、 δ 分子種特異的に knock-down すると、VEGF-KDR 刺激に応答した ERK のリン酸化がほぼ抑制された。

MARCKS は PKC によってリン酸化されると細胞質膜から細胞質にトランスロケーションする PKC の特異的基質である。これまでに生細胞において MARCKS-GFP は PKC が細胞質から細胞質膜へトランスロケーションして活性化するに伴い、リン酸化を受け、細胞質膜から細胞質にトランスロケーションすることを見いだしている。この MARCKS-GFP のトランスロケーションを指標に PKC のトランスロケーションと活性化を検討した。VEGF-KDR 刺激をすると MARCKS-GFP は細胞質膜から細胞膜へトランスロケーションした。しかし、やはり、rottlerin および human PKC δ siRNA 処理により MARCKS-GFP のトランスロケーションは阻害された。

PKC δ は DG の C1B ドメインへの結合を介して、または Tyr311 と Tyr332 の tyrosine リン酸化を介して活性化される。HEK293T 細胞において、内在性 dhuman PKC δ を Knock-down した上で、rat PKC δ を同時に遺伝子導入するレスキュー実験を行った。wild type の rat PKC δ や tyrosine リン酸化で活性化されない Tyr311/332Phe mutant は VEGF-KDR 刺激による ERK のリン酸化はレスキューしたが、C1B ドメインを欠失した mutant ではレスキューできなかった。また、wild type の rat PKC δ -GFP や Tyr311/332Phe mutant-GFP は VEGF-KDR 刺激に応答して細胞質から細胞質膜へトランスロケーションしたが、C1B ドメインを欠失した rat PKC δ -GFP はトランスロケーションしなかった。

以上のことから、VEGF-KDR-PLC γ -PKC-Raf-MEK-ERK シグナルカスケードに関わる PKC 分子種は δ 分子種であり、おそらく VEGF-KDR 刺激に応答して PLC γ により PIP2 から産出された細胞膜上の DG により、PKC δ を C1B ドメインを介して細胞膜上で活性化され、シグナルを下流の Raf-MEK-ERK カスケードに伝達していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1641号	氏名	栗山 雅光
論文題目	Activation and translocation of PKC δ is necessary for VEGF-induced ERK activation through KDR in HEK293T cells HEK293T 細胞における KDR を介した VEGF 誘導の ERK の活性化には PKC δ の活性化とトランスロケーションが必要である		
審査委員	主 査	吉川 潮	
	副 査	米澤 一仁	
	副 査	中村 俊一	
審査終了日	平成 17 年 1 月 25 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

血管成長因子(vascular endothelial growth factor-A[VEGF])は正常な血管新生だけでなく、腫瘍や糖尿病網膜症、リウマチ性関節症のような病的な血管新生を誘導する。VEGFは代表的な二つの機能、血管内皮細胞の増殖の促進し、毛細血管の浸透性を増加させる機能、さらに、VEGFはcell migrationやprotease production、cell survival、NOやプロスタサイクリンの産出を促進する機能を有する。しかし、VEGFによるこれらの調節メカニズムは不明である。

本研究において内皮細胞の増殖を促進するVEGF-KDRシグナルに着目し、そのシグナル伝達メカニズムの解明を試みた。KDRはほかのreceptor tyrosine kinaseのようにRasを介してRaf-MEK-ERKカスケードを活性化するのではなく、phospholipase C γ (PLC γ)を活性化しPKCを介してRaf-MEK-ERKカスケードを活性化することが特徴である。そこで本研究において、VEGF-KDR-PLC γ -PKC-Raf-MEK-ERKシグナルカスケードに関わるPKC分子種を明らかにし、その活性化メカニズムの検討を試みた。

VEGF 刺激を KDR を発現した HEK293T 細胞に行うと、3分-5分をピークに ERK のリン酸化が認められ、刺激後30分までわずかに減少していった。ここに PKC の阻害剤 Go6983 を処理すると VEGF の応答した ERK のリン酸化が抑制されることが認められた。このことから KDR を一過性に発現させた HEK293T 細胞においても VEGF-KDR 刺激に応答した ERK のリン酸化は PKC 依存的事であることが認められた。まず、VEGF-KDR の下流で ERK を活性化する PKC 分子種の同定を試みた。HEK293T 細胞には主に β I、 β II、 δ 、 ζ 分子種が主に発現しており、 α 分子種も弱く発現していた。そこで PKC δ 分子種特異的な阻害剤、rottlerin で処理すると VEGF-KDR 刺激に応答した ERK のリン酸化を抑制した。一方、 ϵ PKC 阻害剤、Go6976 では影響がなかった。以上のことから PKC δ 分子種が VEGF-KDR 刺激に応答した ERK のリン酸化に関与していることが考えられた。しかし、rottlerin の阻害特異性は低く、さらに siRNA 法を用いて PKC δ であることの確認を行った。human の PKC δ を標的に siRNA を設計し導入し、HEK293T 細胞において、 δ 分子種特異的に knock-down すると、VEGF-KDR 刺激に応答した ERK のリン酸化がほぼ抑制された。

MARCKS は PKC によってリン酸化されると細胞質膜から細胞質にトランスロケーションする PKC の特異的な基質である。この MARCKS-GFP のトランスロケーションを指標に PKC のトランスロケーションと活性化を検討した。VEGF-KDR 刺激をすると MARCKS-GFP は細胞質膜から細胞質へトランスロケーションした。しかし、やはり、rottlerin および human PKC δ siRNA 処理により MARCKS-GFP のトランスロケーションは阻害された。

PKC δ は DG の C1B ドメインへの結合を介して、または Tyr311 と Tyr332 の tyrosine リン酸化を介して活性化される。HEK293T 細胞において、内在性 human PKC δ を Knock-down した上で、rat PKC δ を同時に遺伝子導入するレスキュー実験を行った。wild type の rat PKC δ や tyrosine リン酸化で活性化されない Tyr311/332Phe mutant は VEGF-KDR 刺激による ERK のリン酸化はレスキューしたが、C1B ドメインを欠失した mutant ではレスキューできなかった。また、wild type の rat PKC δ -GFP や Tyr311/332Phe mutant-GFP は VEGF-KDR 刺激に応答して細胞質から細胞質膜へトランスロケーションしたが、C1B ドメインを欠失した rat PKC δ -GFP はトランスロケーションしな

かった。

以上のことから、VEGF-KDR-PLC γ -PKC-Raf-MEK-ERKシグナルカスケードに関わるPKC分子種は8分子種であり、おそらくVEGF-KDR刺激に反応してPLC γ によりPIP₂から産出された細胞膜上のDGにより、PKC δ をC1Bドメインを介して細胞膜上で活性化され、シグナルを下流のRaf-MEK-ERKカスケードに伝達していることが示唆された。

本研究はVEGFシグナルカスケードに関与するPKCのサブタイプを明らかにしたものであり、従来はほとんど行われなかったVEGFからMAPキナーゼ経路にいたる情報伝達機構について、時・空間解析により重要な知見を得たも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。