



## The complex formation of PKC $\delta$ through its C1 and C2-like regions in H2O2-stimulated cells

梶本，さやか

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3579

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003579>

※ 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。



【 100 】

氏 名・(本 籍) 梶本 さやか ( 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1722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18年3月25日

【 学位論文題目 】

The complex formation of PKC $\delta$  through its C1 and C2-like regions in H202- stimulated cells  
(過酸化水素刺激細胞におけるC1およびC2-like 領域を介した  
PKC $\delta$ 複合体形成)

審 査 委 員

主 査 教 授 斎藤 尚亮  
教 授 山村 博平  
教 授 春日 雅人

## 序文

高等生物の細胞内情報伝達機構においてタンパク質のリン酸化反応は重要な役割を担っている。タンパク質リン酸化酵素についてその構造や機能を解析することは生体内における様々な制御機構を理解する上で必須の研究課題である。プロテインキナーゼ C (PKC) は種々の細胞外刺激により活性調節を受けるセリン・トレオニンキナーゼであり、増殖因子などの受容体刺激により細胞膜イノシトールリン脂質が分解を受け生成されるジアシルグリセロールがセカンドメッセンジャーとして本酵素に作用することによりその活性上昇が誘導される。また PKC は発癌プロモーターであるホルボールエステルの標的としても作用し、細胞の増殖、分化などの制御に関わることが示されている。PKC は分子ファミリーでありその構造の相違により cPKC、nPKC、aPKC の 3 グループに分類されている。アミノ末端側には各グループにより特徴的な構造を持つ調節ドメイン、カルボキシ末端側にはキナーゼドメインを有している。PKC δ の属する nPKC グループの調節ドメインには PKC ファミリーに共通した領域が二カ所存在し、アミノ末端側からそれぞれ C2-like、C1、偽基質 (pseudosubstrate : PS) 領域と呼ばれている。C2-like 領域はリン脂質との結合部位であり cPKC グループにおいてはカルシウムとの結合部位でもあり C2 領域と呼ばれている。C1 領域にはジンクフィンガー様モティーフとよばれるシステイン残基に富んだ構造が 2 回繰り返し存在しており、それぞれ C1A および C1B 領域と呼ばれている。C1 領域はジアシルグリセロールやホルボールエステルの結合部位として知られている。同じく調節ドメインに存在する PS 領域はキナーゼドメインの基質認識部位をマスクすることにより本酵素の不活化状態を維持しているものと考えられている。PKC δ は組織普遍的に分布するが、アポトーシスを促進することが知られ、ストレス応答に関する因子の一つでもあると想定されている。すなわち、過酸化水素刺激を受けた細胞内では PKC δ のチロシンリン酸化が亢進しジアシルグリセロールに依存しない活性型への変換が見られ、その際の質量分析による解析により、311、332、512 番チロシン残基のリン酸化修飾が見い出され、さらにこれらのリン酸化残基変異体および部位特異的抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロット法によってこれらの部位は酵素活性を上昇させる主要リン酸化部位であることが明らかにされた。試験管内でも 311 番チロシンのリン酸化により活性が上昇することが観察され、同部位を

フェニルアラニンに置換することにより活性化レベルが低下することが示されてきた。これらの知見は PKC δ がセカンドメッセンジャーとは独立した活性調節を受けていることを示している。今回、細胞を過酸化水素刺激した際の PKC δ の挙動の解析によって酸化ストレス受容から PKC δ の活性型変換に至る経路の解明を目指した。

## 実験方法

FLAG および HA エピトープタグを付加したラット PKC δ (野生型) および 311、332、512 番チロシンをフェニルアラニンに置換した変異型 (Y311/332/512F) は pcDNA3、オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein : GFP) 付加 PKC δ は pTB701、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 付加 PKC δ は pEBG を発現ベクターとして構築した。調節ドメイン(RD)、キナーゼドメイン(KD)、C1 領域、C2-like 領域、PS 領域を含む発現ベクターは GFP または GST を付加した融合タンパク質として構築した。宿主細胞として 5% 二酸化炭素、37°C 環境下にて 10% 牛胎児血清添加 DMEM 培地で継代維持した COS-7 細胞を用いた。PKC δ 遺伝子の導入はリポフェクション法により行った。PKC δ および各フラグメントの発現は遺伝子導入細胞の抽出液から抗エピトープタグ抗体あるいは抗 GFP 抗体による免疫沈降、あるいはグルタチオンレジンを用いたアフィニティー精製の後、各抗体を用いたウエスタンプロット法により確認した。細胞の酸化ストレス刺激は 24 時間の血清飢餓培地による培養後、30% 過酸化水素を希釀し培養液中に添加する方法を用いた。PKC δ のチロシンリン酸化反応は抗エピトープタグ抗体による免疫沈降物を抗チロシンリン酸化抗体によるウエスタンプロット法により解析した。リン酸化酵素活性は  $[\gamma-^{32}P]ATP$  から HI ヒストンへの放射活性の転移により測定した。COS-7 細胞における内在性 PKC δ の複合体形成の解析には 5-25% ショ糖勾配分画法を用いた。分画に含まれる PKC δ は抗 PKC 抗体によるウエスタンプロット法により検出した。

## 実験結果

COS-7 細胞に野生型および主要リン酸化部位を変異させた Y311/332/512F 変異体 PKC δ を過剰発現させ 10 mM 過酸化水素処理し PKC δ のリン酸化活性測定をしたところ過酸化水素処理細胞から回収された PKC δ はジアシルグリセロールに依存

しないリン酸化酵素活性を持つという結果を得た。この時抗チロシンリン酸化抗体を用いたウエスタンプロットでは Y311/332/512F 変異体 PKC δ のチロシンリン酸化は野生型 PKC δ に比して著明に減少していた。このことより過酸化水素刺激による PKC δ の活性型変換にはこれまで主要と考えられていたチロシンリン酸化以外に、何らかの機構が存在することが想定された。そこで過酸化水素刺激細胞内の PKC δ 分子同士の関係を解析するために 2 種類の異なるエピトープタグを付加した PKC δ を同量 COS-7 細胞に共発現させた。野生型の FLAG-PKC δ と HA-PKC δ を共発現させた細胞を過酸化水素処理した後、細胞抽出液を二分しそれぞれ抗 FLAG 抗体、抗 HA 抗体で免疫沈降し同抗体でのウエスタンプロットを行ったところ、抗 FLAG 抗体での免疫沈降物から HA-PKC δ が、抗 HA 抗体での免疫沈降物から FLAG-PKC δ がそれぞれ検出された。チロシンリン酸化の関与を調べるために Y311/332/512F 変異体 PKC δ を共発現させ上記実験を行ったところ同様の結合が観察された。また、チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステインを過酸化水素刺激前に培地に加えチロシンリン酸化を阻害しても PKC δ 分子間の会合は影響を受けなかった。これらより過酸化水素刺激はチロシンリン酸化と独立した機構により PKC δ 分子間の結合を引き起こしていると考えられた。この PKC δ 分子同士の結合は過酸化水素刺激時間依存的に観察され、またその時のジアシルグリセロールに依存しない PKC δ のリン酸化酵素活性はほぼこれに比例していることを確認した。Y311/332/512F 変異体 PKC δ 同士の結合と活性型変換についても同様の結果が得られた。COS-7 細胞における内在性の PKC δ 分子については細胞抽出液をショ糖勾配分画法にて解析した。未刺激細胞では単量体の PKC δ 分子 (70kDa) に相当する分子量分画レベルに集中して PKC δ が検出された。一方、過酸化水素刺激細胞では際立ったピークは見られないものの二量体に相当する分画を中心とする高分子量側への PKC δ の分布変化が観察された。

次に様々な領域やドメインにタグを付加した欠失変異体を作成し PKC δ 分子間での結合部位を同定する実験を行った。全長の FLAG-PKC δ と GFP-PKC δ (RD)、および全長の FLAG-PKC δ と GFP-PKC δ (KD) をそれぞれ細胞に共発現させ、過酸化水素刺激後の細胞抽出液を抗 GFP 抗体で免疫沈降しその沈降物を抗 FLAG 抗体を用いたイムノプロット法にて解析した結果、GFP-PKC δ (RD) による沈降物には

FLAG-PKC δ が含まれるが GFP-PKC δ (KD) による沈降物には含まれていなかった。従って PKC δ 分子同士の結合に必要な部位は調節ドメイン内に存在すると結論された。そこで調節ドメインを構成する各領域についてタグ付きの欠失変異体 GFP-PKC δ (C1)、GST-PKC δ (C1)、GFP-PKC δ (C2-like)、GST-PKC δ (C2-like)、GFP-PKC δ (PS)、GST-PKC δ (PS) を作成し詳細な結合部位について検討した。異なったタグ付きの欠失変異体二種類を細胞に共発現させ過酸化水素刺激後の細胞抽出液を抗 GFP 抗体及び抗 GST 抗体で免疫沈降し、それぞれの抗体を用いたイムノプロット法で検出した。その結果 C1 および C2-like 領域では全長の PKC δ との結合が見られた。それに対し PS 領域は全長の PKC δ と結合しなかった。C1 領域同士の間では過酸化水素未刺激状態でも結合が見られたが過酸化水素刺激にて結合の増強がみられた。C2-like 領域同士の間では過酸化水素の刺激に関わらず結合していた。C1 領域と C2-like 領域間には過酸化水素刺激誘導的な結合が観察された。

## 考察

本研究において過酸化水素刺激下での PKC δ の活性化機構は、これまで報告されてきたチロシンリン酸化のみならず PKC δ 分子同士の結合が関わっていることが見いだされた。なお、二種類の異なったエピトープタグを付加した PKC δ を細胞に共発現させ過酸化水素刺激後に細胞抽出液から PKC δ を精製し銀染色にて観察したところ、結合に伴って現れる明らかな介在タンパク質は検出されなかった。また PKC δ 分子の複合体形成は PKC δ の活性型変換に直接結びつく反応であることが結合とリン酸化酵素活性の経時的変化からも示された。PKC δ 分子の三次元構造はまだ明らかではないが PKC δ は定常状態では調節ドメインがキナーゼドメインを覆うかたちで非活性状態に保たれており、活性化シグナルにより構造変化を経て活性型へ変化すると推定されている。過酸化水素刺激により非活性化状態が解除され C1 領域が露出した構造をとった結果、分子間の結合が引き起こされたと考えられている。また最近の報告によると過酸化水素処理は C1 領域のジンクフィンガー様モティーフから亜鉛を放出させ C1 領域の構造変化を引き起こすという知見が示されている。C1 領域自体の構造変化による C1 領域同士の結合およびそれに引き続く C2-like 領域間の相互作用が PKC δ の複合体形成に関わっている可能性が考えられる。

今回の研究により酸化ストレス下での PKCδ の活性化機構についてこれまでの知見に加え新たに複合体形成という現象が明らかになった。これまでに、PKCδのみならず他の PKC 分子種について様々な役割が組織学的、生化学的に検討されてきている。PKC ファミリー活性化機構の詳細を検討し解明を行うことは正常および病態下での細胞内シグナル伝達の理解の上で大きな重要性を持つと考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1724 号	氏名	梶本 さやか
論文題目 Title of Dissertation	The complex formation of PKCδ through its C1 and C2-like regions in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -stimulated cells 過酸化水素刺激細胞における C1 および C2-like 領域を介した PKC δ 複合体形成		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner <b>高野 尚亮</b> 副査 Vice-examiner <b>山村 博平</b> 副査 Vice-examiner <b>春日 雅人</b>		
審査終了日	平成 18 年 2 月 23 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

ゲノム計画の進展によりヒト全遺伝子中には518種類のプロテインキナーゼ遺伝子が存在することが解明され、生体内における正常な細胞内情報伝達機構および各種の病態において、リン酸化・脱リン酸化反応によるタンパク質の機能制御が重要な役割を果たしていることが知られている。プロテインキナーゼC (PKC) は9種類の遺伝子から構成されるセリン・トレオニンキナーゼファミリーである。PKC ファミリーの機能制御は分子種ごとに微妙に異なるが、受容体刺激により細胞膜リン脂質を前駆体として生じる脂質メッセンジャーにより活性化を受ける一方で、発癌プロモーターであるホルボールエステルの細胞内標的としても作用し、正常な細胞増殖の制御ならびに癌化の過程の両方に関与することが知られている。また、PKC ファミリーのうち、PKC δ はストレス刺激に際してチロシンリン酸化反応を受け活性型に変換され、細胞死を促進することが明らかにされている。

申請者は酸化ストレス下における PKC δ の作用の解析中に、本 PKC 分子種の活性型変換は必ずしもチロシンリン酸化反応を必要とはしないことを見いだした。すなわち、酸化ストレスにより PKC δ に生じる3カ所のチロシンリン酸化部位を全てフェニルアラニンに置換した Y311/332/512F 変異体 PKC δ が、過酸化水素処理を受けた培養細胞中で脂質メッセンジャーに依存しない活性型となることを示した。このチロシンリン酸化を伴わない活性型変換機構の検討において、異なるエピトープタグを付加した PKC δ 同士が発現細胞の過酸化水素処理により複合体を形成することを明らかにした。この複合体形成と活性型変換とは細胞刺激後、同一の時間経過で生じた。両者はチロシンキナーゼ阻害剤を用いて PKC δ のチロシンリン酸化反応を抑制しても影響を受けず、Y311/332/512F 変異体 PKC δ においても野生型と同様に観察された。細胞内在性の PKC δ についても、細胞抽出液をショ糖勾配分画法により複合体形成が検出された。一方、PKC δ 分子内の結合に関与する領域を各種の欠失変異体を用いて解析した結果、複合体形成は調節ドメイン内に存在する C1 および C2-like 領域を介しており、C1 領域同士、C2-like 領域同士

およびの C1 領域と C2-like 領域との間での結合が生じることを明らかにした。以上の本研究により、従来から知られている脂質メッセンジャーによる活性化およびチロシンリン酸化による活性型変換に加えて、複合体形成による PKC δ の第3の活性化機構の存在が明らかにされた。本研究の成果から、PKC δ は異なる細胞入力により特異的な分子機構を介して活性化を受け、特定の細胞機能の制御に関わることが示唆される。

本研究は、プロテインキナーゼ PKC δ について、その活性調節機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつた PKC δ の複合体形成による活性化について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。