Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Ca2+ oscillation induced by P2Y2 receptor activation and its regulation by a neuron-specific subtype of PKC(γPKC)

蘆田, 典明

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2009-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4487
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004487

※ 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	蘆田　典明
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 4487 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 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Ca2+ oscillation induced by P2Y2 receptor activation and its regulation by a neuron‐specific subtype of PKC(γPKC)
(P2Y2 受容体を介した細胞内カルシウムオシレーションと神経特異的 PKC サブタイプ（γPKC）によるその制御機構)

審　査　委　員

主　査　　教　授　寺島　俊雄
　　教　授　中村　俊一
　　教　授　西尾　久英

細胞内カルシウムオシレーション（[Ca^{2+}]i oscillation）は、種々の細胞で見られる現象であり、その強度・頻度や持続時間により多様な生理的作用が制御されることが知られている。これまでにも、グリア細胞や内皮細胞、破骨細胞においてそれぞれ見られる、神経伸長や高血圧、骨形成などといった生理現象に、[Ca^{2+}]i oscillation が重要な役割を果たしていることが報告されてきた。

プロテインキナーゼ C（PKC）は 10 種類のサブタイプからなる細胞内シグナル伝達分子で、サブタイプ特異的な種々の働きを持つことが知られている。中でもγPKC は、DAG およびカルシウムに依存的に活性化される、神経細胞に特異的に発現している PKC サブタイプで、脳虚血時に神経保護的な作用を示すことを本研究室より報告している。

P2Y プリン受容体は、G 蛋白結合型受容体スーパーファミリーに属し、細胞外ヌクレオチドによって活性化される受容体であるが、哺乳類の G(q)型プリン受容体は、P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2Y11 の 5 種類が同定されており、最終的に IP3 および DAG を産生し、PKC を始めとした様々なシグナル伝達物質を活性化する。

本研究室では、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR5)を介した[Ca^{2+}]i oscillation が、PKC のサブタイプ特異的に制御されることを以前に報告した。mGluR5 刺激により、γPKC が細胞質－細胞膜間の移動（トランスロケーション）を繰りかえす γPKC oscillation が生じる。この oscillation は 70mHz と高頻度かつ一定であり、同時に生じる[Ca^{2+}]i oscillation と一致している。更にこの[Ca^{2+}]i oscillation は、細胞外カルシウム濃度に影響を受けないことや、γPKC oscillation 自体には影響されないにかかわらず、カルシウム非依存性の PKC サブタイプであるδPKC によって抑制的に制御されることも明らかにした。そしてこれらの事実は、PKC サブタイプ特異的な[Ca^{2+}]i oscillation 制御機構が存在する可能性を示していた。

本論文では、新たに発見した‘CHO-K1 細胞における細胞外ヌクレオチド刺激により発生するγPKC（KN）oscillation’に着目し、その発生機序および PKC による制御機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

GFP で標識したγPKC(γPKC-GFP)を CHO-K1 細胞に過剰発現させ、UDP でプリン受容体刺激を行うと、γPKC-GFP は細胞膜へ一過性にトランスロケーションする。しかし、リン酸化活性を失わせたγPKC（γPKC（KN））の場合には、同様の刺激でγPKC（KN） oscillation が起こることを発見した。これは mGluR 5 刺激で生ずる oscillation とは異なっており、一定の振動ではなく、初回に振幅の大きなトランスロケーションを生じた後それに引き続いて起こる、10mHz ほどの低頻度の oscillation であった。このことはまた、γPKC のキナーゼ活性が oscillation を抑制している可能性をも示唆していた。

そこでγPKC のキナーゼ活性と oscillation の関係に注目し、γPKC-GFP を過剰発現させた CHO-K1 細胞を、PKC の広範なインヒビターである Go6983 で処置したのち UDP で刺激すると、処置前は見られなかった

γPKC-GFP oscillation が認められるようになった。更に、γPKC がカルシウム依存的に活性化されることより、このγPKC-GFP oscillation と CHO-K1 細胞内における[Ca^{2+}]i oscillation との関係に着目した。蛍光カルシウムプローブである Fura 2 を用いて細胞内カルシウム濃度を測定すると、γPKC-GFP を過剰発現させた場合には[Ca^{2+}]i oscillation は見られなかったが、γPKC(KN)-GFP や、GFP を単独で発現させた場合には[Ca^{2+}]i oscillation が認められ、その oscillation はγPKC(KN)-GFP oscillation の様子と一致していた。またこれらの現象は、UDP だけでなく、UTP や ATP 刺激でも同様に見られた。以上の結果より、このプリン受容体を介した細胞内[Ca^{2+}]i oscillation が、γPKC のキナーゼ活性により抑制的に制御されていることが示された。

この現象に関与するプリン受容体は G(q)型 P2Y 受容体と考えられるため、CHO-K1 細胞に内在性に発現している P2Y 受容体サブタイプを RT-PCR 法を用いて検索したところ、P2Y2 受容体のみが同定された。更にウエスタンブロッティング法により、CHO-K1 細胞にはα、ε、ζサブタイプが dominant に見られ、内在性のγPKC は発現していないことも確認された。

以上を受け、P2Y2 受容体阻害剤であるスラミンを用いて、oscillation と P2Y2 受容体の関係を検討するとともに、受容体に対する持続的刺激の必要性を解析した。あらかじめスラミンで処置した後に UDP で刺激を行うと、γPKC(KN)の初回のトランスロケーションも含めて oscillation は全く起こらず、更に oscillation の途中からスラミン処置を行った場合でも、その時点から oscillation は抑制された。この結果は、P2Y2 受容体を持続的に刺激することが、この oscillation には重要であることを示していた。

次に、細胞外カルシウムの影響を検討するために、カルシウムキレート剤である EGTA を用いた解析を行った。CHO-K1 細胞を、EGTA で処置した後に UDP 刺激を行うと、初回の強いトランスロケーションは残るものの、引き続いて起こる oscillation は見られなくなり、更に oscillation の途中から EGTA 処置を行った場合には、その時点から oscillation は抑制された。この結果は 2 回目以降の[Ca^{2+}]i oscillation には細胞外からのカルシウム流入が重要であることを示しており、これはmGluR 5 を介した oscillation が、EGTA の影響を受けないことと対照的である。以上の結果はまた、初回の大きなトランスロケーションは細胞内、すなわち小胞体からのカルシウム放出による可能性を示唆している。

更に、γPKC（KN）-GFP oscillation のメカニズムを詳細に検討した。γPKC(KN)-GFP にγPKC を共発現させると、oscillation は完全に抑制される。しかし、カルシウム非依存性の PKC サブタイプである δ PKC を共発現させた場合には、oscillation に変化は見られなかった。これは、mGluR 5 を介した oscillation がγPKC に影響されず、δPKC で抑制される事実とは対照的である。次に種々のカルシウムインヒビターを用い、本研究に関係するカルシウム流入経路を検証したところ、小胞体からのカルシウム放出阻害剤であるダントロレンやタプシガルジン、電位依存型膜チャネル阻害剤であるベラパミルで処置した場合には、oscillation に変化は見られなかったが、

SOC（Store-operated calcium channel）阻害剤と想定されているSKF96365 や 2ABP で処置した場合には、oscillation は抑制された。以上の結果より、本研究における[Ca^{2+}]i oscillation はγPKC のキナーゼ活性によって特異的に制御されており、その流入経路は SOC である可能性が考えられた。

CHO-K1 細胞の P2Y2 受容体を細胞外ヌクレオチドで刺激すると 10mHz の[Ca^{2+}]i oscillation が生じ、同時に起こるγPKC(KN) oscillation と一致することを見出した。この oscillation は、神経特異的 PKC サブタイプであるγPKC のキナーゼ活性によりサブタイプ特異的に制御されていることを明らかにした。更にこの oscillation には細胞外からのカルシウム流入が重要であり、そのカルシウム流入経路が SOC である可能性が示された。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1978 号	氏名	蘆田 典明
論文題目 Title of Dissertation	**Ca^{2+} oscillation induced by P2Y2 receptor activation and its regulation by a neuron-sepcific subtype of PKC (γPKC)** **P2Y2 受容体を介した細胞内カルシウムオシレーションと神経特異的 PKC サブタイプ（(γPKC）による その制御機構**		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 寺島俊雄 副 査 Vice-Examiner 中村俊一 副 査 Vice-Examiner 西尾久英		
審査終了日	平成 21 年 01 月 22 日		

（要旨は１，０００字ー２，０００字程度）

細胞内カルシウムオシレーション（[Ca^{2+}]i oscillation）は、種々の細胞で見られる現象であり、その強度・頻度や持続時間により多様な生理的作用が制御されることが知られている。これまでにも、グリア細胞や内皮細胞、破骨細胞においてそれぞれ見られる、神経伸長や高血圧、骨形成などといった生理現象に、[Ca^{2+}]i oscillation が重要な役割を果たしていることが報告されてきた。本研究では、CHO-K1 細胞における細胞外ヌクレオチド刺激により発生する[Ca^{2+}]i oscillation に着目し、その発生機序および PKC による制御機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

GFP で標識したγPKC（以下γPKC-GFP とする）を CHO-K1 細胞に過剰発現させ、UDP で P2Y2 受容体刺激を行うと、γPKC-GFP の細胞膜への一過性のトランスロケーションが観察された。しかし、リン酸化活性を失わせたγPKC（以下γPKC（KN）とする）の場合には、同様の刺激で 10mHz ほどの低頻度のγPKC（KN） oscillation が起こることを発見した。更に、蛍光カルシウムプローブである Fura2 を用いて細胞内カルシウム濃度を測定すると、γPKC(KN)-GFP を発現させた場合にはγPKC(KN)-GFP の動きと一致した[Ca^{2+}]i oscillation が認められた。以上より、プリン受容体を介して起こる細胞内[Ca^{2+}]i oscillation はγPKC のキナーゼ活性により抑制的に制御されていることが示された。

さらに P2Y2 受容体阻害剤であるスラミン存在下では、γPKC(KN)のトランスロケーションは全く起こらず、また oscillation の途中からスラミン処置は、その時点からの oscillation を抑制された。この結果は、P2Y2 受容体を持続的に刺激することが、この oscillation には重要であることを示した。

また CHO-K1 細胞を EGTA 前処置を行うと、初回の強いトランスロケーションは残るものの、その後の oscillation は観察できなかった。さらに oscillation の発生途中からの EGTA 処置により oscillation が抑制された。この結果は 2 回目以降の[Ca^{2+}]i oscillation には細胞外からのカルシウム流入が重要であることを示している。またこのカルシウム流入経路には、SOC（Store-operated calcium channel）が関与することが示された。

代謝型グルタミン酸受容体（mGluR5）を介した[Ca^{2+}]i oscillation が、PKC のサブタイプ特異的に制御されることが以前報告されている。同時にこの oscillation は 70mHz と高頻度かつ一定であり、細胞外カルシウム濃度に影響を受けないことや、γPKC 自体には影響されないにもかかわらず、δPKC によって抑制的に制御されることも示された。そこで、今回のγPKC（KN）-GFP oscillation のメカニズムと比較検討した。γPKC(KN)-GFP にγPKC を共発現させると、P2Y2 受容体を介した oscillation は完全に抑制されるが、δ PKC を共発現させても oscillation に変化は見られなかった。この結果は mGluR 5 を介した oscillation とは対照的である。

以上、本研究により、CHO-K1細胞のP2Y2受容体を細胞外ヌクレオチドで刺激すると10mHzの[Ca^{2+}]i oscillation が生じ、同時に起こるγPKC(KN) oscillationと完全に一致することを見出した。また本研究は，このoscillationは神経特異的PKCサブタイプであるγPKCのキナーゼ活性によりサブタイプ特異的に制御されていることを明らかにした。更にこのoscillationには細胞外からのカルシウム流入が重要であり、そのカルシウム流入経路がSOCである可能性が示した。従来ほとんど行われなかったγPKCサブタイプによるカルシウム・オシレーションの抑制的調節機構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。