



## Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain : subcellular distribution, purification, and properties

吉川, 潮

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1984-06-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0937

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000937>

※ 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・(本籍) 吉川 潮 (広島県)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博ろ第827号

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の日付 昭和59年6月6日

学位論文題目 **Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase from Rat Brain SUBCELLULAR DISTRIBUTION, PURIFICATION, AND PROPERTIES**  
(ラット大脳におけるカルシウム, リン脂質依存性蛋白質リン酸化酵素  
細胞内分布, 精製, および性質)

審査委員 主査教授 西塚泰美  
教授 田中千賀子 教授 岡田安弘

### 論文内容の要旨

#### 序文

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質がその標的細胞の細胞膜受容体に作用すると, カルシウムが動員されるとともに細胞膜のイノシトールリン脂質が急速な代謝回転を受けることが知られている。数年来の当研究室における解析により, このイノシトールリン脂質の代謝回転に共役して活性化される蛋白質リン酸化酵素(以後Cキナーゼと省略する)が発見された。このCキナーゼはカルシウムと細胞膜リン脂質の存在下に, イノシトールリン脂質の加水分解により生成されるジアシルグリセロールによって活性化され, Cキナーゼによる蛋白質リン酸化反応が実際に血小板の放出反応に重要な役割を果たしていることを示唆する結果が得られている。またCキナーゼは各種の組織や臓器に広く分布しており, 種特異性や臓器特異性は認められない。本論文では, ラット大脳におけるCキナーゼの細胞内分布を検討し, ラット大脳には可溶性Cキナーゼと膜結合性Cキナーゼの両者が存在することを明らかにするとともに, 可溶性Cキナーゼを単一蛋白質にまで精製しその性質を膜結合性Cキナーゼと比較解析した。

#### 実験方法

ラット大脳の細胞分画はEGTAの存在下にGrayとWhittakerの方法に従って行った。ウシ大脳のリン脂質分画はクロロホルム・メタノールにより抽出したウシ大脳の総脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーにより分離精製した。ジアシルグリセロールは合成市販品を用いた。Cキナーゼ活性はカルシウムとウシ大脳リン脂質, およびジアシルグリセロールの存在下に( $\gamma-^{32}\text{P}$ )ATPから仔

牛胸腺の HI ヒストンへの放射活性の転移により測定した。蛋白量は Lowry らの方法、および SDS ポリアクリルアミド電気泳動法の後、染色した蛋白質バンドのデンシトメトリーにより定量した。

### 実験結果

ラット大脳においては EGTA の存在下に、C キナーゼの 3 分の 1 が細胞質画分に回収される。残りの C キナーゼは顆粒画分に回収され、この顆粒画分に回収される C キナーゼのうち大部分はシナプス膜に結合している。C キナーゼはカルシウム依存性に細胞膜リン脂質に結合することからこの C キナーゼの細胞内分布は C キナーゼの生体内における局在を必ずしも反映していない可能性が考えられる。しかし、この膜結合性 C キナーゼは EGTA 処理、高張処理、低張処理、超音波処理によっても膜より抽出されず、界面活性剤を用いることによりはじめて可溶化される。また膜結合性 C キナーゼは何らかの機構によりその活性を抑制されており、外から加えた基質蛋白質をリン酸化せず可溶化することにより酵素活性を示す。従ってこの膜結合性 C キナーゼと細胞質に回収される可溶性 C キナーゼとは明らかに細胞内局在が異なると考えられる。

そこで、可溶性 C キナーゼと膜結合性 C キナーゼをそれぞれラット大脳より精製することを試みた。可溶性 C キナーゼは DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー、セファデックス G-150 によるゲル汎過、等電点電気泳動、ブルーセファロースおよびフェニルセファロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより約 800 倍の精製を行い、均一蛋白質にまで精製した。膜結合性 C キナーゼは Triton X-100 による可溶化の後に、可溶性 C キナーゼと同様の方法で DEAE セルロースおよびセファデックス G-150 を用いたカラムクロマトグラフィーにより部分精製した。精製した可溶性 C キナーゼの分子量は SDS ポリアクリルアミド電気泳動法、ゲル汎過性、ショ糖密度勾配法によりそれぞれ、約 82,000, 87,000, 77,000 とほぼ同一であると推定されることから、C キナーゼはサブユニット構造を持たない単一ポリペプチド鎖から成ると考えられる。また C キナーゼはカルシウム受容蛋白質であるカルモジュリンを含まず、カルモジュリンによって酵素活性は影響されない。精製 C キナーゼは多彩な触媒活性を有し各種の蛋白質をリン酸化し、従来部分精製 C キナーゼを用いて得られた結果と同一の機構で活性化される。即ち、C キナーゼの活性化にはカルシウムとリン脂質が必要であり、リン脂質のうち最も有効なものはセリンリン脂質である。ジアシルグリセロールは C キナーゼのリン脂質およびカルシウムに対する親和性を増大し、C キナーゼは  $10^{-6}$  M 程度の低濃度のカルシウムの存在下で最大活性を発揮する。可溶化の後、部分精製した膜結合性 C キナーゼは可溶性 C キナーゼと、物理的、酵素力学的性質およびその触媒作用において差異は見られない。これらの解析結果から、C キナーゼはラット大脳においては少なくとも二つの異なる部分に存在しており、それぞれが何らかの機能を営んでいることが示唆される。また、C キナーゼは従来報告されている蛋白質リン酸化酵素とは異なる新しい種類の蛋白質リン酸化酵素であると結論された。

### 考 察

1955 年に Hokin と Hokin によりイノシトールリン脂質の急速な分解と合成が報告されて以来、多くの研究がなされてきたがこのリン脂質の代謝回転の生理的意義は不明であった。数年来の当研究室における解析によりイノシトールリン脂質の代謝回転が C キナーゼ活性を調節していることが示さ

れ、本研究によりこのCキナーゼ自身がジアシルグリセロールによって活性化されることが確認された。

Cキナーゼは各種の組織や臓器に広く分布しているがラット大脳においてはシナプス膜に膜結合性Cキナーゼが多く存在する。シナプスにおいてもイノシトールリン脂質の代謝回転が生じることが知られており、Cキナーゼが何らかの形で神経機能に関与している可能性が高い。また多くの蛋白質がCキナーゼの基質となることが知られている。これらの基質蛋白質の性質およびその役割の解明が今後の重要な課題となっている。

### 論文審査の結果の要旨

神経伝達物質、ホルモン等、多岐にわたる生理活性物質の情報受容と伝達の機構は、昨今の医学生理学のメインテーマの一つであるが、ことに形質膜のイノシトールリン脂質の代謝回転と情報伝達との関係がきわめて注目を集める研究領域となっている。Ca<sup>2+</sup>-activated, phospholipid-dependent protein kinase, いわゆる protein kinase C は外界シグナルによる形質膜リン脂質の急速な分解と共にその機能を発揮し、細胞内の多くの蛋白質を磷酸化して、シグナルの与えられた細胞の機能や増殖を調節する重要な酵素である。またこの酵素は発癌のプロモーター、ホルボールエステルの受容体であることが発見され、にわかにその役割に焦点が向けられてきた。

本研究者は、protein kinase C の役割を解明する目的から、まず本酵素の分離精製を志し、ラットの脳より種々の酵素化学的方法をもじいて純粋に単離することにはじめて成功した。本酵素は外界シグナルの情報伝達において中心的存在をなしているが、ことに脳に多量に存在し、その約半量がシナプスの膜に存在していることを見出した。この研究では神経組織における細胞内の存在様式をまずあきらかとし、単離精製した酵素についてその活性化の様式、ことに外界シグナルによって形質膜に生成するジグリセリドによる活性化の様式について詳細な解析を加えている。その結果、protein kinase C の生化学的、酵素化学的性質をあきらかにしたのみでなく、形質膜におけるイノシトールリン脂質の代謝回転との直接の共役の物質的基盤を与えている。本酵素によるシグナルの伝達機構は細胞機能を亢進させる点で cyclic nucleotides とは基本的に異った機構をなしており、ことに Ca<sup>2+</sup> と協調的に働いている。

本研究は protein kinase C を单一蛋白質として分離し、その詳しい性質、活性化様式を確立して、その後の研究の基礎を礎いたものであり、単に神経系における刺激伝達の研究にとどまらず、ホルモン作用やホルボールエステル、発癌プロモーターの研究への基礎をなしたものであり、価値ある業績と認める。よって医学博士の学位を得る資格があると認める。