



Localization of β II subspecies of protein kinase C in β -cells

伊藤, あつ子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-05-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1431

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001431>

※ 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)	伊藤 あ つ 子 (新潟県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1166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	平成2年5月9日
学位論文題目	Localization of β II Subspecies of Protein Kinase C in β -Cells (β 細胞におけるプロテインキナーゼC β II分子種の局在)
審査委員	主査 教授 田 中 千賀子 教授 齊 藤 洋 一 教授 西 塚 泰 美

論文内容の要旨

[緒 言]

プロテインキナーゼC (PKC) はさまざまな組織において、種々の情報伝達機構に重要な役割を果たしている蛋白質磷酸化酵素である。本酵素は分子クローニング法によって、少なくとも7種の分子種 (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ) が存在することが示されている。さらに本酵素はハイドロキシアパタイトカラムを用いると蛋白レベルからもタイプI, タイプII, タイプIIIの3種のサブタイプに分類され、それぞれ γ , β I + β II, α に対応することが証明されている。これらの分子種がPKCの多彩な機能を分担している可能性があり、それぞれの機能や局在に興味を持たれている。

膵ランゲルハンス氏島 β 細胞や、RINr インスリノーマ細胞からのインスリン分泌には、PKCが重要な役割を果たしていることが知られている。しかし両細胞からのインスリン分泌様式には、グルコース刺激に対する反応性の違いなどの差が認められる。一方、膵外分泌細胞からのアミラーゼ分泌にもPKCが関与していることが知られている。

本研究は、各分子種に特異的な抗体を用い、免疫組織化学的、生化学的に、ラット膵に存在するPKCの分子種を同定することを目的とした。さらに、正常膵 β 細胞とRINrインスリノーマ細胞におけるPKCの分布を比較検討し、PKCが両細胞のインスリン分泌様式の差に関与している可能性についても考察を加えた。

[方 法]

1. PKC抗体の作製

抗 β I - および抗 β II - PKC抗体: β I - および β II - PKCに特異的なC末端のアミノ酸配列

を持つオリゴペプチド (β I : 661-671 : SYTNPEFVINV, β II : 660-673 : SFVNSEFLKPEVK) を合成しウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体。

抗 γ -PKC抗体: ラット脳精製PKCをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体。

それぞれの抗体の特異性は、精製したタイプ I, タイプ II, タイプ III PKCおよびCOS 7 細胞にそれぞれのcDNAプラスミドをトランスフェクションして得られた α -, β I, β II, γ -PKCを用いてWestern blot 法によって証明した。

2. 試料作製

ウィスター系ラットを無処置群とストレプトゾシン処置群の2群に分けた。ストレプトゾシン処置は65mg/kgのストレプトゾシンを灌流固定24時間および36時間前に麻酔下に静脈内投与した。両群のラットを麻酔下に4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸、0.5%グルタルアルデヒド、0.1Mリン酸緩衝液を含む固定液または0.05%ピクリン酸を含むPLP固定液で灌流固定し脾を摘出した。後固定後、30%ショ糖液に浸漬し、クリオスタットにて6 μ mに薄切しスライドガラスに貼布した。

RINrインスリノーマ細胞はスライドガラス上に一層に培養後、上記固定液に浸漬固定した。

3. 免疫染色

上記方法にて作製された脾切片およびRINrインスリノーマ細胞を抗 γ -, 抗 β I-, 抗 β II-PKC抗体または各種ホルモン抗体を用いてPAP法で免疫染色し顕微鏡観察した。

4. 脾組織のPKCの生化学的分析

ラット脾組織のホモジネートからPKCを部分精製したのちハイドロキシアパタイトカラムを用いて脾PKCをタイプ別に分類し、脳PKCのタイプと比較した。

5. RINrインスリノーマ細胞よりのインスリン分泌

D-グルコース、カルバコール、ホルボールエステル (TPA) 刺激によるRINrインスリノーマ細胞からのインスリン分泌量をポリエチレングリコールラジオイムノアッセイ法によって測定した。

【結 果】

1. 抗体の特異性の検定

Western blot 法により、抗 β I-, 抗 β II-, 抗 γ -PKC抗体は相当するPKC分子種とのみ反応し他のPKC分子種および他の蛋白との交差反応性がないことが証明された。

2. 脾の免疫染色

無処置群ラットの脾組織において、抗 β II-PKC抗体を用いた免疫染色で、脾ランゲルハンス氏島に局限して免疫反応を認めた。抗 β I-, 抗 γ -PKC抗体を用いた免疫染色では免疫反応は脾組織中には認められなかった。抗インスリン、抗グルカゴン、抗ソマトスタチン、抗 β II-PKC抗体で連続切片を染色した結果から、 β II-PKC免疫反応陽性細胞はインスリン免疫反応陽性細胞の分布と非常によく一致していることがわかった。さらに β 細胞 (インスリン陽性細胞) に特異的な細胞障害性をもつストレプトゾシン処置群ラットの脾組織において、処置時間依存性にインスリン陽性細胞および β II-PKC陽性細胞は減少、消失した。

3. 膵組織のPKC生化学的分析

ハイドロキシアパタイトカラムによる分析結果から膵組織には多量のタイプⅢPKCと少量のタイプⅡPKCが存在することがわかった。

4. RINrインスノーマ細胞の免疫染色

RINrインスノーマ細胞は抗インスリン抗体によって免疫染色されたが、抗 β Ⅰ-PKC、抗 β Ⅱ-PKC、抗 γ -PKC抗体いずれによっても免疫反応は認められなかった。

5. RINrインスノーマ細胞よりのインスリン分泌

D-グルコース2.8mMから16.8mMの濃度ではインスリン分泌の増加は全く認められなかった。一方カルバコールおよびTPAは濃度依存性にインスリン分泌を増加させた。

[考 察]

膵 β 細胞では、カルシウム、サイクリックAMPとPKCが協調してグルコースや他の刺激物質によるインスリン分泌を調節していることが知られている。本研究の免疫組織化学的検討から、ラット膵においては β Ⅰ-PKC、 β Ⅱ-PKC、 γ -PKCのうち β Ⅱ-PKCのみがランゲルハンス氏島に局限して存在することが示された。さらに連続切片の染色およびストレプトゾシン処置ラット膵の染色結果から、 β Ⅱ-PKCは β 細胞に局限していることが明らかにされた。以上の結果より β Ⅱ-PKCが β 細胞でインスリン分泌に関与しているPKCの分子種であることが示唆された。さらに生化学的検討からラット膵には多量のタイプⅢPKCと少量のタイプⅡPKCが存在していることがわかった。タイプⅢPKC（すなわち α -PKC）はあらゆる組織や細胞に存在すると思われるPKCの分子種で、多くの細胞に共通の機能に関与している可能性が高いと思われる。したがって膵外分泌腺細胞に加えて β 細胞にも α -PKCが存在している可能性はある。タイプⅡPKCはWestern blot 法により大部分 β Ⅱ-PKCであることが証明され、免疫染色の結果を考え合わせると β 細胞由来であると考えられた。

一方、 β 細胞と同様にインスリン分泌にPKCが関与していることが知られているRINrインスリノーマ細胞に β Ⅱ-PKCが認められなかったことから、インスリン分泌には β Ⅱ-PKC以外の分子種のPKCが関与していることも考えられる。しかし、RINrインスリノーマ細胞はカルバコール、TPA刺激では β 細胞と同様のインスリン分泌反応を示すが、D-グルコース刺激ではインスリン分泌反応を示さなかった。

以上のことによりグルコース刺激によるインスリン分泌とカルバコール刺激によるインスリン分泌には異なった分子種のPKCが関与している可能性があり、 β Ⅱ-PKCはグルコース刺激によるインスリン分泌にのみ関与していると考えられる。

[結 語]

PKC分子種に特異的な抗体によるラット膵およびRINrインスリノーマ細胞の免疫組織化学的検討により β Ⅱ-PKCがランゲルハンス氏島 β 細胞に局限して存在することが示された。RINr

インスリノーマ細胞には β II-PKCは存在しないことがわかった。RINrインスリノーマ細胞と β 細胞におけるインスリン分泌動態の比較により、この β II-PKCはグルコース刺激によるインスリン分泌に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

プロテインキナーゼC (PKC) は広く生体に分布し、様々の情報伝達機構に重要な役割を果たしている蛋白質リン酸化酵素である。本酵素は複数の分子種の存在が明らかにされ、これらの各分子種が多様な機能を分担している可能性があり、それぞれの機能や局在に興味をもたれている。

膵ランゲルハンス氏島 β 細胞やRINrインスリノーマ細胞からのインスリン分泌や膵外分泌細胞からのアミラーゼ分泌は、その刺激分泌応答にPKCが関与していることが知られている代表的な系である。

本研究は各分子種に特異的な抗体を用い、免疫組織化学的、生化学的にラット膵に存在するPKC分子種を同定することを目的とした。更に、 β 細胞、RINrインスリノーマ細胞におけるPKC存在様式及びインスリン分泌様式を比較し、PKCがインスリン分泌にどの様に関与しているかについても検討を加えている。

α -, β I-, β II-, γ -PKCについて、それぞれの分子種に特異的な抗体を用いた免疫組織化学的検討及び生化学的検討から、ラット膵には多量の α -PKCと少量の β II-PKCが存在し、 β II-PKCは膵ラ氏島 β 細胞にのみ限局して存在することが明かとなった。更に免疫組織化学的検討からRINrインスリノーマ細胞には β II-PKCしか存在しないことがわかった。一方、 β 細胞とRINrインスリノーマ細胞におけるインスリン分泌様式を比較検討したところ、ホルボーエステル (TPA) 及びカルバコールに対しては両者とも濃度依存性にインスリン分泌を増強したのに対し、グルコースに対するインスリン分泌反応は β 細胞にのみ認められ、RINrインスリノーマ細胞では全く欠如していることがわかった。これらのことからグルコース刺激によるインスリン分泌刺激に β II-PKCが関与している可能性が示唆された。

以上、本研究は膵におけるPKC分子種の存在様式を免疫組織化学的、生化学的に初めて明らかにしたと共に β 細胞及びRINrインスリノーマ細胞を比較検討することによりインスリン分泌にどの様にこのPKC分子種が関与しているかをも示唆し、膵におけるPKCの生理的役割を解明する上で、形態学的、生化学的基盤となる価値ある業績である。

よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。