



# THE PROTEIN KINASE C ISOFORMS LEADING TO MAP-KINASE ACTIVATION IN CHO CELLS

山口, 恵造

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-08-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1952

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001952>

※ 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）	やま ぐち けい ぞう 山 口 恵 造	（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1469号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成7年8月9日	
学位論文題目	THE PROTEIN KINASE C ISOFORMS LEADING TO MAP-KINASE ACTIVATION IN CHO CELLS （チャイニーズハムスター卵巢由来繊維芽細胞系で、タンパク質リン酸化酵素Cの数タイプの分子種が、細胞増殖活性化に関与するタンパク質リン酸化酵素（MAP-KINASE）の活性化を引き起こす）	
審査委員	主査 教授 西 塚 泰 美 教授 山 村 博 平	教授 吉 川 潮

### 論文内容の要旨

#### （目 的）

哺乳類組織で確認されるタンパク質リン酸化酵素C（PROTEIN KINASE C：PKC）には、活性化に $\text{Ca}^{2+}$ が必要なcPKC と呼ばれる $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3つの分子種と、 $\text{Ca}^{2+}$ が必要ないnPKC と呼ばれる $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\mu$ の5つの分子種とaPKC と呼ばれる $\zeta$ 、 $\lambda$ の2つの分子種がある。

このようにPKC は多様な分子種を持ち、また多種な生理機能も有すると考えられている。細胞増殖機構では、増殖刺激の際活性化されるMAP-KINASE の活性化への関与に興味をもたれている。現在のところ細胞増殖機構では、PKC の中でも $\alpha$ 分子種が細胞表面受容体からMAP-KINASE への情報伝達系で機能し、細胞増殖制御に関係していると推測されている。

しかし我々は、PKC の持続的な活性化が細胞増殖・分化に影響を与えることを示唆する実験データを得ており、生体内で一過性に上昇する $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に活性化が依存する $\alpha$ 分子種だけでは、細胞増殖の制御は難しいと考えている。

今回の研究では、 $\alpha$ 分子種と同じく全組織で発現されており、尚且つ、 $\text{Ca}^{2+}$ に依存性のない $\delta$ 分子種も、MAP-KINASE を介する情報伝達系で機能し、細胞増殖・分化に関与しているのではないかと考え、チャイニーズハムスター卵巢由来繊維芽細胞（CHO 細胞）を使って、細胞増殖・分化に対するPKC の持続的活性化の影響を調べた。

#### （背 景）

成長因子受容体に付随するチロシンリン酸化酵素は、ガン遺伝子産物であるRas やRaf-1を含むタンパク質間の情報伝達を仲介とし、MAP-KINASE を活性化することが知られている。同様にGタンパク質と関連した受容体も、MAP-KINASE を活性化すること知られており、MAP-KINASE は細胞増殖・分化で重要な機能を果たしていると考えられている。一方MAP-KINASE の活性化は、PKC の活性化因子として知られるホルボルエステルの刺激でも起こることが知られている。

これらのことから、MAP-KINASE が関与する細胞増殖・分化の情報伝達はPKC を介して伝え

られていると考えられている。

現在では、細胞増殖・分化機構解明のため、PKC のどの分子種がMAP-KINASE の活性化に関与するのか興味を持たれている。今のところ、in vitro の実験系で、 $\alpha$ 分子種がMAP-KINASE を活性化するという報告がある。

我々は、遺伝子操作により $\alpha$ 、 $\delta$ 分子種PKC を大量に発現させたCHO 細胞を用い、細胞増殖・分化へのPKC 関与に関する研究を行っている。

これらの細胞ではホルボルエステル刺激により持続的なPKC 活性化が起こる。その結果、細胞はG<sub>2</sub>/M期で増殖を停止し、形態的にも多核化による細胞増殖の異常が観察されている。このため我々は、PKC の持続的活性化が細胞の増殖や分化に影響を与えており、一過性であるCa<sup>2+</sup>濃度変化に依存のないPKC 分子種の関与が、細胞の増殖や分化に必要であるという作業仮説を立てている。

### (方 法)

$\delta$ 分子種は全細胞で発現されているため、遺伝子操作により通常の45倍活性量の $\delta$ 分子種を発現させたCHO 細胞と通常量の $\delta$ 分子種を発現しているCHO 細胞で、ホルボルエステル処理によるPKC 活性化に伴うMAP-KINASE 活性変化の差を調べた。

また、これらの細胞間で、ホルボルエステル処理によるPKC 活性化後の細胞増殖についても比較し、細胞増殖におけるPKC とMAP-KINASE の関係を調べた。

#### 1. 使用細胞

dhfr遺伝子を含むベクターを使い、cDNAライブラリーからクローニングした $\delta$ 分子種遺伝子を導入したCHO 細胞(dhfr<sup>-</sup>)を、メソトレキセートが入った培地でクローニングし、 $\delta$ 分子種の遺伝子が安定に増幅されている細胞株を使用した。

発現されている $\delta$ 分子種酵素量の検定については、細胞ライセートを陽イオン交換カラムで精製後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製する通常のPKC 分離精製法と活性測定系を使用し検定を行った。

#### 2. MAP-KINASE 活性測定

ホルボルエステルで一定時間刺激後調整した各細胞ライセート、あるいはこれらのライセートの陰イオン交換カラム画分に、MAP-KINASE に特異的な基質(合成ペプチド)と[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 等を加え、MAP-KINASE に特異的な基質への<sup>32</sup>Pの取り込み量を測定し、MAP-KINASE 活性とした。

#### 3. 活性化MAP-KINASE の同定

上記陰イオン交換カラムの各画分をSDS 電気泳動後、抗MAP-KINASE 抗体と抗チロシンリン酸抗体を用いたウェスタンブロッティングで解析し、測定したMAP-KINASE 活性がチロシンリン酸化により活性化状態にあるMAP-KINASE と合致しているか確認した。

### (結果と考察)

通常量の $\delta$ 分子種発現細胞のMAP-KINASE 活性は、ホルボルエステル処理開始後10分で最大となり、その後低下して行く。ところが $\delta$ 分子種を大量に発現した細胞では、少なくとも処理開始後45分でもMAP-KINASE の持続的活性化が確認された。

このMAP-KINASE 活性は、分子量42kDa と44kDa のMAP-KINASE の活性化によるものであった。

また、ホルボールエステル処理により、通常量の $\delta$ 分子種発現細胞では正常な細胞増殖が観察されたのに対し、 $\delta$ 分子種を大量に発現した細胞では $G_2/M$ 期で細胞増殖の停止が観察され、細胞の多核化現象も確認された。

同様の結果は、遺伝子増幅手法により通常の30倍の $\alpha$ 分子種を発現したCHO 細胞でも観察した。

これらの結果から、MAP-KINASE を介する細胞増殖・分化の情報伝達には、PKC の $\alpha$ 分子種と同様に、 $\delta$ 分子種も関与していると結論された。

また、細胞増殖・分化異常については、 $\alpha$ 分子種と $\delta$ 分子種の差はなく、どちらの分子種の持続的活性化によっても引き起こされたため、細胞の正常増殖・分化には、これらのPKC の正確な活性調整の必要性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

細胞生長因子などのシグナルが細胞核へ伝達される経路は、その概略が解明されつつあるが、プロテイン・キナーゼC (PKC) はその情報伝達のネットワークの中で主要な位置をしめることが確立されている。ことにチロシンリン酸化酵素群・Ras 蛋白質を経由する情報伝達路と、G蛋白質・PKC を経由する情報伝達路とのクロストークの仕組みはなお完全には解明されていない課題であるが、いづれの伝達経路もいわゆるMAP キナーゼの活性化を通して、細胞核の機能、いわゆる遺伝子の活動を調整している。一方、PKC は今日までに11個の分子種の存在が確認されていて、それぞれの特異的生理機能が競って解明されている。この中で $\alpha$ 、 $\delta$ 、および $\gamma$ 分子種は各種の組織や細胞種に普遍的に存在しているので、細胞の増殖のような基本的機能の調節に関与している推定されているが、その証拠はなお確定的とはいいがたい。

そこで本学位申請者は、細胞核の機能調整働くMAP キナーゼの活性化現象を指標として、PKC 各分子種の役割を検討した。CHO などの細胞をホルボールエステルで刺激すると、通常MAP キナーゼは一過性に活性を発揮し、一時間以内にもとの活性に戻る。ところが、 $\delta$ 分子種、あるいは $\alpha$ 分子種のPKC を人工的に過剰に発現させたCHO 細胞について、ホルボールエステルで刺激すると、MAP キナーゼは長時間にわたってその活性上昇を維持する。 $\gamma$ 分子種のように脳神経のみに発現しているPKC ではこのような現象は認められない。また、過剰の $\alpha$ 分子種や $\delta$ 分子種によって、非生理的に長時間にわたってMAP キナーゼの活性を発揮させておくと、細胞は $G_2/M$ 相で分裂を停止、ほとんど100% 2核、あるいは4核の細胞が出現することを観察した。

これらの実現事実から本研究者は次の結論を導いている。第一に、数多くのPKC 分子種の中で、少なくとも $\alpha$ 分子種と $\delta$ 分子種はMAP キナーゼの活性を調整しうる能力を有しており、細胞核の機能を調節することが出来る。この際、 $\alpha$ 分子種は $Ca^{2+}$ を必要とし、 $\delta$ 分子種は $Ca^{2+}$ を必要としないので、シグナルを受けた細胞の長期にわたる細胞応答、ことに増殖応答には両者の関与が考えられる。第二には、細胞に与えられたシグナルが細胞核へ伝達されるに際して、MAP キナーゼの活性発揮は一過性でよく、長期におよぶ非生理的な情報の提示は細胞分裂の障害などのジスキネシスをもたらすと考えられる。

本研究では、外界シグナルが細胞核へ伝達されるネットワークの中でも各PKC 分子種の役割について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。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。