



# Phosphorylation and Up-regulation of Diacylglycerol Kinase $\gamma$ via Its Interaction with Protein Kinase C $\gamma$

山口, 泰人

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-05-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3002

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003002>

※ 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	山口 泰人
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 2040 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 20 年 5 月 9 日

【 学位論文題目 】

Phosphorylation and Up-regulation of Diacylglycerol Kinase  $\gamma$  via Its Interaction with Protein Kinase C  $\gamma$  (プロテインキナーゼ C  $\gamma$  との相互作用を介したジアシルグリセロールキナーゼ  $\gamma$  のリン酸化と正の調節)

審 査 委 員

主 査	教 授	中村 俊一
	教 授	錦織 千佳子
	教 授	古瀬 幹夫

プロテインキナーゼC (PKC)は、ヒトゲノム中に存在する 518 種類のプロテインキナーゼの中でも AGC (cAMP, cGMP, PKC)グループに分類され、少なくとも 10 種類以上の分子種から構成されるファミリーである。ジアシルグリセロール (DAG)はPKCの活性化因子であり、様々な細胞外刺激に応じてホスファチジルイノシトール 4, 5-2 リン酸がホスホリパーゼCによって加水分解されて、イノシトール 1, 4, 5-3 リン酸 (IP3)と共に産生される。IP3 は小胞体からのカルシウムイオンの遊離を誘導し、カルシウムイオンはDAGと協調してPKCを活性化する。一方、DAGキナーゼ (DGK)はDAGをリン酸化し、ホスファチジン酸 (PA)に変換する酵素であり、それゆえPKCの活性調節因子として考えられている。実際、この機能的に協同するPKCとDGKの相互作用についてはいくつかの報告があるものの、その分子間相互作用の詳細な制御機構、及び分子種特異性については解明されていない。そこで、複数存在するDGKの分子種の中でも $\gamma$ PKCと同様にカルシウム結合領域 (C1 ドメイン)を有し、共に小脳プルキンエ細胞に高発現しているDGK $\gamma$ に着目し、両酵素の機能協同を検討した。

まず、 $\gamma$ PKC-DsRed2 と GFP-DGK $\gamma$ を一過的に CHO-K1 細胞に共発現させ、ATP によりプリン受容体刺激を行い、同一細胞内での両酵素の動きを共焦点レーザー顕微鏡下でライブイメージングした。その結果、どちらも細胞膜にトランスロケーションを示すが、時間的に異なるトランスロケーションを示した。つまり、 $\gamma$ PKC-DsRed2 が刺激後直ちに細胞膜に、遅れて GFP-DGK $\gamma$ が細胞膜にトランスロケーションした。両酵素は1分程度、細胞膜上で共局在した後、まず $\gamma$ PKC-DsRed2 が細胞質にリトランスロケーションし、その後、GFP-DGK $\gamma$ が刺激前の状態に戻った。次に、両酵素の動きと細胞内での DAG と PA の量を比較する為に刺激時間ごとにそれぞれの産生量を測定したところ、 $\gamma$ PKC-DsRed2 と GFP-DGK $\gamma$ の挙動と時間的に非常に一致した結果が得られた。以上のことから、 $\gamma$ PKC と DGK $\gamma$ の細胞膜上での機能的関与が示唆された。

次に、 $\gamma$ PKC と DGK $\gamma$ の直接的な相互作用を検討する為に、大腸菌発現系と昆虫細胞発現系を用いて、様々なリコンビナントタンパク質を発現、精製し、 $\gamma$ PKC と DGK $\gamma$ の結合実験を行った。その結果、 $\gamma$ PKC と DGK $\gamma$ は DGK $\gamma$ の C 末端領域に存在するアクセサリドメイン (585-788 アミノ酸)を介して結合し、この結合はカルシウムとホスファチジルセリン/DAG により、増強されることが明らかになった。さらに、小脳ホモジネートを用いて免疫沈降実験を行い、内因性の発現レベルでの $\gamma$ PKC と DGK $\gamma$ の結合を確認した。

次に、*in vitro* で $\gamma$ PKC によって DGK $\gamma$ がリン酸化されるかを検討した結果、PKC の活性化依存的に DGK $\gamma$ がリン酸化されることが明らかとなった。32P で標識されたリン酸を用いて、FLAG-DGK $\gamma$ と $\gamma$ PKC を共発現させた COS7 細胞をラベルし、TPA 刺激後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。その結果、*In vivo*

でも DGK $\gamma$ のリン酸化と結合が TPA 刺激によって亢進することを確認した。

さらに、リン酸化されるセリンもしくはスレオニンを選定する為、まずリン酸化領域の決定を行ったところ、興味深いことに $\gamma$ PKC と DGK $\gamma$ の結合に重要なアクセサリドメインが主にリン酸化された。また、このアクセサリドメインを欠失した変異体ではこのリン酸化は消失した。そこで、質量分析計を用いて、アクセサリドメイン内のリン酸化されるセリン、もしくはスレオニンの同定を行った結果、DGK $\gamma$ の C 末端のペプチド断片、SSFFSLRRK(775~783aa)に2つのリン酸が入っていることが確認された。また、このペプチド断片に含まれる3つのセリンの内、PKC のリン酸化コンセンサス配列から Ser-776 と Ser-779 が PKC によってリン酸化されるセリンであると予想された。興味深いことに、この2つのセリンは DGK $\gamma$ に特異的で、DGK $\alpha$ ,  $\beta$ では見られなかった。さらに、このセリンはヒト、マウス、ラットで保存されていた。以上のことから、 $\gamma$ PKC による DGK $\gamma$ のリン酸化は分子種特異的な機能発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の分子間相互作用が果たして機能的にどのような意味があるのかを検討するために、 $\gamma$ PKC による DGK $\gamma$ のリン酸化が DGK $\gamma$ の活性にどのような影響を与えるのかを検討した。リン酸化されるセリンをグルタミン酸に置換した変異体では活性が増加、一方、アラニンに置換した変異体では野生型の DGK $\gamma$ とほぼ同じ活性を示した。このことから、DGK $\gamma$ は $\gamma$ PKC にリン酸化されることで、活性が上昇し、 $\gamma$ PKC が自らの不活性化さえも制御していると考えられた。

さらに、結合とリン酸化に必要な DGK $\gamma$ のアクセサリドメインを CHO-K1 細胞に過剰発現させると、 $\gamma$ PKC のプリン受容体刺激後の動きはどう影響を受けるのかを検討した。ATP で $\gamma$ PKC-DsRed2 と GFP-DGK $\gamma$  アクセサリドメインを共発現させた CHO-K1 細胞を刺激した結果、細胞質から細胞膜へのトランスロケーションは変化なく、細胞膜から細胞質へのリトランスロケーションのみが抑制された。これは内因性の DGK に対してアクセサリドメインがドミナントネガティブに働いたことによると推測される。

最後に、 $\gamma$ PKC と DGK $\gamma$ の相互作用の特異性について、 $\alpha$ PKC を用いて検討した。結合実験の結果、 $\alpha$ PKC もカルシウムとホスファチジルセリン/DAG 依存的に DGK $\gamma$ に結合することが明らかとなった。さらに、FLAG-DGK $\gamma$ と $\alpha$ PKC を共発現させた COS7 細胞内において、抗 FLAG 抗体を用いて TPA 刺激後免疫沈降を行った結果、 $\alpha$ PKC も DGK $\gamma$ と結合し、さらにリン酸化することがわかった。このことから、カルシウムとホスファチジルセリン/DAG によって制御を受ける PKC もまた直接的結合とリン酸化によって DGK $\gamma$ と相互作用しうることが示された。

以上の結果から、1.  $\gamma$ PKC と DGK $\gamma$ は DGK $\gamma$ のアクセサリドメインを介し

て直接結合し、さらにこの結合はカルシウムとホスファチジルセリン/DAGによって制御されること、2. DGK $\gamma$ のアクセサリードメイン内の Ser-776、Ser-779 が $\gamma$ PKCによって活性依存的にリン酸化されること、3. Ser-776、Ser-779 の $\gamma$ PKCによるリン酸化は DGK $\gamma$ のキナーゼ活性を亢進すること、4. DGK $\gamma$ のアクセサリードメインを過剰発現させると、 $\gamma$ PKCの細胞膜から細胞質へのリトランスロケーションが抑制されることが明らかとなった。つまり、 $\gamma$ PKCとDGK $\gamma$ の直接的な結合とリン酸化はそれぞれの細胞内局在と活性の時空間的制御に寄与し、さらに、分子種特異的なPKCとDGKの機能協関と細胞膜上のDAGシグナル伝達制御に重要な役割を果たしていると考えられる。 $\gamma$ PKCが小脳プルキンエ細胞において長期抑圧や小脳脊髄変性症に関与していることが報告されていることから、本研究で明らかになったPKCとDGKの機能協関が上記の現象にどのような機能を果たしているのか今後の検討が期待される。

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	乙 第 2043 号	氏 名	山口泰人
論文題目 Title of Dissertation	Phosphorylation and up-regulation of diacylglycerol kinase $\gamma$ via its interaction with protein kinase C $\gamma$ プロテインキナーゼ C $\gamma$ との相互作用を介したジアシルグリセロールキナーゼ $\gamma$ のリン酸化と正の調節		
審査委員 Examiner	主 査 中村 俊一 Chief Examiner 副 査 古瀬 幹夫 Vice-examiner 副 査 錦織 千恵子 Vice-examiner		
審査終了日	平成 20 年 4 月 16 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

プロテインキナーゼ C (PKC) は、少なくとも 10 種類以上の分子種から構成されるファミリーである。ジアシルグリセロール (DAG) は PKC の活性化因子であり、様々な細胞外刺激に応じてホスファチジルイノシトール 4, 5-2リン酸がホスホリパーゼ C によって加水分解されて、イノシトール 1, 4, 5-3リン酸 (IP3) と共に産生される。IP3 は小胞体からのカルシウムイオンの遊離を誘導し、カルシウムイオンは DAG と協調して PKC を活性化する。一方、DAG キナーゼ (DGK) は DAG をリン酸化し、ホスファチジン酸 (PA) に変換する酵素であり、それゆえ PKC の活性調節因子として考えられている。実際、この機能的に協働する PKC と DGK の相互作用についてはいくつかの報告があるものの、その分子間相互作用の詳細な制御機構、及び分子種特異性については解明されていない。そこで、複数存在する DGK の分子種の中でも  $\gamma$ PKC と同様にカルシウム結合領域 (C1 ドメイン) を有し、共に小脳プルキンエ細胞に高発現している DGK  $\gamma$  に着目し、両酵素の機能協働を検討した。

まず、 $\gamma$ PKC-DsRed2 と GFP-DGK  $\gamma$  を一過的に CHO-K1 細胞に共発現させ、ATP によりプリン受容体刺激を行い、同一細胞内での両酵素の動きを共焦点レーザー顕微鏡下でライブイメージングした。その結果、どちらも細胞膜にトランスロケーションを示すが、時間的に異なるトランスロケーションを示した。つまり、 $\gamma$ PKC-DsRed2 が刺激後直ちに細胞膜に、遅れて GFP-DGK  $\gamma$  が細胞膜にトランスロケーションした。両酵素は 1 分程度、細胞膜上で共局在した後、まず  $\gamma$ PKC-DsRed2 が細胞質にリトランスロケーションし、その後、GFP-DGK  $\gamma$  が刺激前の状態に戻った。以上のことから、 $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  の細胞膜上での機能的関与が示唆された。次に、 $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  の直接的な相互作用を検討する為に、 $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  の結合実験を行った。その結果、 $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  は DGK  $\gamma$  の C 末端領域に存在するアクセサリドメイン (585-788 アミノ酸) を介して結合し、この結合はカルシウムとホスファチジルセリン /DAG により、増強されることが明らかになった。さらに、小脳のホモジネートを用いて免疫沈降実験を行い、内因性の発現レベルでの  $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  の結合を確認した。次に、in vitro で  $\gamma$ PKC によって DGK  $\gamma$  がリン酸化されるかを検討した結果、PKC の活性化依存的に DGK  $\gamma$  がリン酸化されることが明らかとなった。32P で標識されたリン酸を用いて、FLAG-DGK  $\gamma$  と  $\gamma$ PKC を共発現させた COS7 細胞をラベルし、TPA 刺激後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。その結果、In vivo でも DGK  $\gamma$  のリン酸化と結合が TPA 刺激によって亢進することを確認した。さらに、リン酸化されるセリンもしくはスレオニンを同定する為、まずリン酸化領域の決定を行ったところ、興味深いことに  $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  の結合に重要なアクセサリドメインが主にリン酸化された。また、このアクセサリドメインを欠失した変異体ではこのリン酸化は消失した。そこで、質量分析計を用いて、アクセサリドメイン内のリン酸化されるセリン、もしくはスレオニンの同定を行った

結果、DGK  $\gamma$  の C 末端のペプチド断片、SSFPSLRKK (775~783aa) に 2 つのリン酸が入っていることが確認された。また、このペプチド断片に含まれる 3 つのセリンの内、PKC のリン酸化コンセンサス配列から Ser-776 と Ser-779 が PKC によってリン酸化されるセリンであると予想された。以上の分子間相互作用が果たして機能的にどのような意味があるのかを検討するために、 $\gamma$ PKC による DGK  $\gamma$  のリン酸化が DGK  $\gamma$  の活性にどのような影響を与えるのかを検討した。リン酸化されるセリンをグルタミン酸に置換した変異体では活性が増加、一方、アラニンに置換した変異体では野生型の DGK  $\gamma$  とほぼ同じ活性を示した。このことから、DGK  $\gamma$  は  $\gamma$ PKC にリン酸化されることで、活性が上昇し、 $\gamma$ PKC が自らの不活性化さえも制御していると考えられた。さらに、結合とリン酸化に必要な DGK  $\gamma$  のアクセサリドメインを CHO-K1 細胞に過剰発現させると、 $\gamma$ PKC のプリン受容体刺激後の動きはどう影響を受けるのかを検討した。ATP で  $\gamma$ PKC-DsRed2 と GFP-DGK  $\gamma$  アクセサリドメインを共発現させた CHO-K1 細胞を刺激した結果、細胞質から細胞膜へのトランスロケーションは変化なく、細胞膜から細胞質へのリトランスロケーションのみが抑制された。これは内因性の DGK に対してアクセサリドメインがドミナントネガティブに働いたことによると推測される。最後に、 $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  の相互作用の特異性について、 $\alpha$ PKC を用いて検討した。結合実験の結果、 $\alpha$ PKC もカルシウムとホスファチジルセリン /DAG 依存的に DGK  $\gamma$  に結合することが明らかとなった。さらに、FLAG-DGK  $\gamma$  と  $\alpha$ PKC を共発現させた COS7 細胞内において、抗 FLAG 抗体を用いて TPA 刺激後免疫沈降を行った結果、 $\alpha$ PKC も DGK  $\gamma$  と結合し、さらにリン酸化することがわかった。このことから、カルシウムとホスファチジルセリン /DAG によって制御を受ける PKC もまた直接的結合とリン酸化によって DGK  $\gamma$  と相互作用しうることが示された。以上の結果から、1、 $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  は DGK  $\gamma$  のアクセサリドメインを介して直接結合し、さらにこの結合はカルシウムとホスファチジルセリン /DAG によって制御されること、2、DGK  $\gamma$  のアクセサリドメイン内の Ser-776、Ser-779 が  $\gamma$ PKC によって活性依存的にリン酸化されること、3、Ser-776、Ser-779 の  $\gamma$ PKC によるリン酸化は DGK  $\gamma$  のキナーゼ活性を亢進すること、4、DGK  $\gamma$  のアクセサリドメインを過剰発現させると、 $\gamma$ PKC の細胞膜から細胞質へのリトランスロケーションが抑制されることが明らかとなった。

本研究は、 $\gamma$ PKC と DGK  $\gamma$  の直接的な結合とリン酸化はそれぞれの細胞内局在と活性の時空間的制御に寄与し、さらに、分子種特異的な PKC と DGK の機能協働と細胞膜上の DAG シグナル伝達制御に重要な役割を果たしていることを示す有力な知見を得たものとして価値ある集積と認める。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。