

学位論文題名

Regulation of protein kinase C isoform proteins in
phorbol ester-stimulated Jurkat T lymphoma cells.

(ジャーカットT細胞中のプロテインキナーゼC (PKC)
アイソフォーム蛋白のフォーボルエステル (PMA) による調節)

学位論文内容の要旨

[目的] プロテインキナーゼC (PKC) の活性化はT細胞活性化の過程中的重要な一ステップである。インターロイキン2 (IL2) レセプターの発現、IL2の産生、細胞増殖の開始などにPKCの活性化が必須であることが知られている。一般的に、PKCは細胞の細胞質分画に存在し、その活性化にともない細胞質分画から細胞膜分画に移動し、その後プロテアーゼにより分解されると考えられている。PKCは実際には単一の酵素ではなく、少なくとも8個の異なるアイソフォームよりなり、それぞれ α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η と呼ばれている。これらのアイソフォームはカルシウム・脂質依存性、各種細胞における分布などに差異があることが知られており、免疫系においてもそれぞれのアイソフォームが独自の役割を果たしている可能性がある。そこでPKC α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ に特異的な抗体を用いて、ポピュラーなヒトT細胞のモデルであるジャーカット細胞におけるPKCアイソフォームの発現とPKC活性化物質フォーボルエステル(PMA)による各アイソフォームの挙動をウエスタンブロット法にて検討した。

[方法] 細胞は主にJurkat T細胞を用いた。一部Balb/cマウス胸腺細胞を用いた。細胞は蛋白分解酵素阻害剤存在下にVortexにより破碎し遠心分離により蛋白質を分離した。蛋白濃度測定後、同一量にてポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない、ニトロセルロース膜に転写した。これに抗PKCアイソフォーム抗体を反応させ、二次抗体を用いてバンドを可視化した。

[結果] 図1：ウサギ免疫抗PKC α 、 δ 、 ϵ およびモノクローナル抗PKC β 抗体の特異性をウエスタンブロット法により示す。ジャーカット細胞よりの蛋白抽出物にて α — δ は80 kD、 ϵ は90 kDにバンドが検出された。PKC γ は検出されなかった。図2：抗PKC ζ 抗体の特異性をウエスタンブロット法により示す。購入した抗体では2本の特異的バンドがみられるが、我々の施設でアフニティー精製をおこなって得た抗体では1本のバンドがみられる。検討の結果、この1本のバンドのみがPKC ζ であることがあきらかとなった。

図3：PMA処理によりPKC α 、 β 、 δ および ϵ は用量依存性に減少するが、PKC ζ は影響されない。1—50 nMのPMAとともにジャーカットT細胞を培養したのち、細胞より蛋白質を抽出しウエスタンブロット法によりPKCアイソフォームを検出した。PKC δ および ϵ はPKC α および β と比較するとややPMA抵抗性の傾向を示した。PKC ζ はPMAによる減少はまったくみられなかった。

図4：PKCアイソフォーム蛋白の細胞内における分布。ジャーカット細胞を細胞質成分と細胞膜成分とに分画したのち、蛋白質を抽出し、ウエスタンブロット法によりPKCアイソフォームの分布を検討した。図に細胞膜分画／細胞質分画の比を画アイソフォーム別に示す。PKC δ は他のアイソフォームに比し細胞膜分画に多く分布し、またPKC ϵ にも同様の傾向がみられた。PKC ζ はほぼ全量が細胞質分画に存在した。

図5：長期PMA処理によるPKCアイソフォーム蛋白の変化。50 nMのPMA存在下にジャーカット細胞を長期にわたり培養し、その後細胞質成分と細胞膜成分とに分画したのち、蛋白質を抽出し、ウエスタンブロット法によりPKCアイソフォームの分布を検討した。PKC α および β はほぼ完全に消失した。PKC δ および ϵ は細胞膜分画にわずかに残存している。図3に示した短期培養の結果と同様、PKC δ および ϵ はPKC α および β と比較するとややPMA抵抗性の傾向を示した。PKC ζ は変化しなかった。

図6：PMA処理によるPKC蛋白の移動。300 nMのPMA処理によるPKCアイソフォームの挙動をウエスタンブロット法により検討した。PKC α 、 β 、 ϵ はPMA刺激により速やかに細胞質分画より細胞膜分画に移動した。一方、PKC δ および ζ は移動しなかった。

図7：より生理的な刺激であるPHA刺激による影響を検討するためPHAあるいは抗CD3抗体刺激によるジャーカット細胞内カルシウム濃度の測定をおこなった。抗CD3抗体による最大の細胞内カルシウム濃度上昇は5 μ g/mlで得られたが20 μ g/mlのPHA刺激より濃度上昇の程度は低かった。

図8：図6と同様にPHA刺激によるPKC蛋白の移動を検討したが、各アイソフォームとも移動はあきらかでなかった。抗CD3抗体にても同様の結果であった。

図9：PMAあるいはPHA刺激によるジャーカット細胞中のPKC活性の挙動を検討した。PHA刺激にてPMA刺激より軽度ではあるがあきらかなPKC活性の細胞質から細胞膜分画への移動が検出された。

図10：マウス胸腺細胞を用いて図6と同様に高濃度PMA刺激によるPKCアイソフォーム蛋白の挙動を検討した。ジャーカット細胞と同様にPKC α 、 β および ϵ の速やかな移動が観察されたが、PKC ζ は移動しなかった。マウス胸腺細胞にはPKC δ は検出されなかった。

[考案] PMA刺激に対しPKC α および β 蛋白はほぼ従来PKCにつき文献上記載されているとうりの挙動を示した。一方PKC δ 、 ϵ 、 ζ はそれぞれ異なった挙動を示した。PKC δ は非刺激時にすでに細胞膜分画に多く存在し当初から活性化されている可能性が考えられた。またPKC ϵ も他のアイソフォームと比し細胞膜分画に存在する比率が高く、その機能が注目される。PKC ϵ はPMA刺激に耐性であると報告されているが今回の結果では他のアイソフォーム同様、PMA刺激により速やかに細胞膜分画に移動したのち蛋白量が減少しており、以前の報告と異なっている。PKC ζ は構造上PMA結合部位を持たないことが報告されており注目されている。ジャーカット細胞、胸腺細胞の両者においてPKC ζ はPMAに影響されずフォーボルエステル以外の物質により活性化される可能性が考えられた。このようにPKCのアイソフォームがそれぞれPMA刺激により異なった挙動を示すこと、また非刺激状態での存在部位が異なっていることはこれらアイソフォームがリンパ球活性化の過程においてそれぞれ独自の役割を果たしていることを示唆する。最近我々はマウス胸腺細胞、脾T細胞、B細胞でPKCアイソフォーム蛋白の発現量が異なることを観察しており、このことも同様の可能性を示すと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Regulation of protein kinase C isoform proteins in
phorbol ester-stimulated Jurkat T lymphoma cells.

(ジャーカットT細胞中のプロテインキナーゼC (PKC)
アイソフォーム蛋白のフォーボルエステル (PMA) による調節)

PKCの活性化はT細胞活性化の過程中的重要な一ステップである。インターロイキン2 (IL2) レセプターの発現、IL2の産生、細胞増殖の開始などにPKCの活性化が必須であることが知られている。一般的に、PKCは細胞の細胞質分画に存在し、その活性化にともない細胞質分画から膜分画に移動し、その後プロテアーゼにより分解されると考えられている。PKCは実際には単一の酵素ではなく、少なくとも8個の異なるアイソフォームよりなり、それぞれ α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η と呼ばれている。これらのアイソフォームはカルシウム・脂質依存性、各種細胞における分布などに差異があることが知られており、免疫系においてもそれぞれのアイソフォームが独自の役割を果たしている可能性がある。本研究ではPKC α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ に特異的な抗体を用いて、ポピュラーなヒトT細胞のモデルであるジャーカット細胞におけるPKCアイソフォームの発現とPKC活性化物質PMAによる各アイソフォームの挙動をウエスタンブロット法にて検討した。

I. 材料と方法

細胞は主にJurkat T細胞を用いたが、一部Balb/cマウス胸腺あるいは脾細胞を用いた。細胞は蛋白分解酵素阻害剤存在下にVortexにより破碎し遠心分離により蛋白質を分離した。蛋白濃度測定後、同一量にてポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない、ニトロセルロース膜に転写した。これに抗PKCアイソフォーム抗体を反応させ、二次抗体を用いてバンドを可視化した。

II. 結果と考察

1) ジャーカットT細胞において、PKC α 、 β 、 δ 、 ϵ および ζ が検出された。PKC γ は

検出されなかった。

2) PKC α と β は主に細胞質分画に存在しPMA刺激により速やかに膜分画へ移動し、16時間後にはほぼ消失した。

3) PKC δ と ϵ はより大きな部分が膜分画に存在し、PMA刺激によりPKC ϵ の膜分画への移動が見られた。両アイソフォームとも16時間後には蛋白量の減少が見られた。

4) PKC ζ は主に細胞質分画に存在し、PMA刺激による影響を受けなかった。

5) PMA存在下に長期にわたりジャーカット細胞を培養した場合PKC α および β はほぼ完全に消失した。PKC δ および ϵ は膜分画にわずかに残存していた。PKC ζ は変化しなかった。

6) PHA刺激によっては、PKC活性の膜分画への移動は観察されたが、PKC蛋白の移動は各アイソフォームとも検出されなかった。

7) マウス胸腺細胞においてもほぼ同様の結果が得られた。ただし、PKC δ は検出されなかった。

8) マウス胸腺細胞、脾T細胞、および脾B細胞では各アイソフォーム蛋白の発現量が異なっていた。

PMA刺激に対しPKC α および β 蛋白はほぼ従来PKCにつき文献上記載されているとうりの挙動を示した。一方PKC δ 、 ϵ 、 ζ はそれぞれ異なった挙動を示した。PKC δ は非刺激時にすでに膜分画に多く存在し当初から活性化されている可能性が考えられた。またPKC ϵ も他のアイソフォームと比し膜分画に存在する比率が高く、その機能が注目される。PKC ϵ はPMA刺激に耐性であると報告されているが今回の結果では他のアイソフォーム同様、PMA刺激により速やかに膜分画に移動したのち蛋白量が減少しており、以前の報告と異なっている。PKC ζ は構造上PMA結合部位を持たないことが報告されており注目されている。ジャーカット細胞、胸腺細胞の両者においてPKC ζ はPMAに影響されずフォーボルエステル以外の物質により活性化される可能性が考えられた。このようにPKCのアイソフォームがそれぞれPMA刺激により異なった挙動を示すこと、また非刺激状態での存在部位が異なっていることはこれらアイソフォームがリンパ球活性化の過程においてそれぞれ独自の役割を果たしていることを示唆する。更にマウス胸腺細胞、脾T細胞、B細胞でPKCアイソフォーム蛋白の発現量が異なることも同様の可能性を示すと考えられる。

III. 審査の概要

口頭発表に際し皆川教授よりPKC γ の機能および検出されなかった理由に関して質疑があったが、申請者はおおむね適切な答弁をした。また、副査の皆川教授、石橋教授による本研究に関する審査と面接を受け、合格と判定された。

以上により、本論文は学位授与に値するものと判定した。