

# 興奮性細胞におけるカルシウム流入シグナルによるプロテインキナーゼ C の活性化機構と基質のリン酸化動態

最上秀夫 浜松医科大学 生理学

H. Mogami<sup>1</sup>, H. Zhang<sup>2</sup>, T. Urano<sup>1</sup>, N. Saito<sup>3</sup>, O. H. Petersen<sup>4</sup> and I. Kojima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine Hamamatsu, Japan; <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Institute for Molecular and Cellular Regulation Gunma University, Maebashi, Japan; <sup>3</sup>The Laboratory of Molecular Pharmacology Biosignal Research Center, Kobe University Kobe, Japan; <sup>4</sup>The Physiological Laboratory, University of Liverpool, Liverpool, UK

Protein kinase C (PKC) plays a pivotal role in a myriad of cellular functions. Ten isoforms of PKC have been identified so far are classified into three categories based on structural difference in the regulatory domain. Activation mechanisms of two distinct classes of PKC among them, conventional PKC (cPKC; PKC $\alpha$ ) and novel PKC (nPKC; PKC $\theta$ ), by depolarization-evoked Ca<sup>2+</sup> influx through voltage dependent Ca<sup>2+</sup> channels were examined. We monitored translocation of PKC $\alpha$ -GFP and PKC $\theta$ -GFP to the plasma membrane as a marker of PKC activity in INS-1 cells. The Ca<sup>2+</sup> influx induced translocation of both PKC $\alpha$ -GFP and PKC $\theta$ -GFP in their different kinetics. PKC $\alpha$  translocation, which was synchronous with the Ca<sup>2+</sup> spike induced by depolarization, was rapid and reversible whereas PKC $\theta$  translocation was slow and sustained. We also measured phosphorylation state of the PKC substrate, myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), as a marker of PKC activity, by monitoring translocation of MARCKS-GFP with PKC $\alpha$ -DsRed. Translocation of MARCKS-GFP to the cytosol took place as soon as PKC $\alpha$ -DsRed translocated to the plasma membrane with stimulation of the Ca<sup>2+</sup> influx. We have demonstrated that the Ca<sup>2+</sup> influx can activate cPKC as well as nPKC whose activation is independent of Ca<sup>2+</sup>.

## 1. 研究目的

真核細胞に存在する多くのプロテインキナーゼ中で、プロテインキナーゼ C(PKC)は最も詳細に研究されている酵素群のひとつである。現在では、PKC はシナプスの可塑性、神経及び内分泌そして外分泌細胞からの開口放出機構、筋収縮、細胞の増殖、分化など広範な細胞機能の調節に関与していることがわかっている。PKC は一次構造の調節ドメインの違いにより大きく3つのカテゴリーに分類される(図1)。そのうち、conventional PKC(cPKC)と novel

PKC(nPKC)はジアシルグリセロール(DG)結合部位を持ち、cPKC はさらに Ca<sup>2+</sup> 結合部位も持つ。この構造上の違いから cPKC は Ca<sup>2+</sup> と DG により、nPKC は Ca<sup>2+</sup> 非依存性に DG のみによって活性化されることが示されている[1, 2]。しかし、これまでの PKC 活性化機構の研究は、方法論的な制約により生化学的な無細胞系での実験が主流を占めており、living cell における生理的な条件下での PKC 活性化機構の検討はほとんどなされていないのが現状である。近年の遺伝子工学の発展により様々な刺激に対

するタンパク質や酵素などの局在の変化を蛍光タンパク質(GFP など)との融合タンパク質を細胞に導入することによって、living cell においてリアルタイムで検討することが可能になってきている[3, 4]。

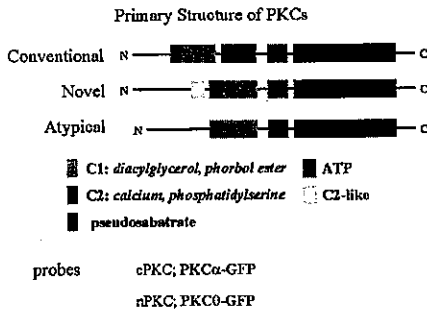


図1 プロテインキナーゼCの一次構造

そこで、本研究の目的は、上記技術を用いて生理的な条件下での PKC の活性化機構を living cell においてリアルタイムで検討することである。即ち、脱分極刺激による電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルを介した  $Ca^{2+}$  流入が PKC を活性化し基質の MARCKS がリン酸化されるかどうかをこれらと蛍光タンパクとの融合たんぱく質を用いて検討することである。

## 2. 研究経過

インスリン分泌細胞 (INS-1cell) を興奮性細胞のモデル細胞とする。インスリン分泌細胞に PKCα-GFP, PKCθ-GFP 及び PKCα-dsRed, MARCKS-GFP を lipofection により導入する。細胞内カルシウム濃度を同時にモニターするために細胞に fura-2 AM を負荷する。蛍光測定は、浜松ホトニクス社製 Aquacosmos imaging station を使用した。

## 3. 研究成果

図 2 に示すごとく、PKCαの活性化には細胞質に局在する PKCαの細胞膜へのトランスロケーションが必須である。そこで、PKCα-GFP を導入した細胞において PKCα-GFP の細胞膜へのトランスロケーションを活性化の指標とし

て、高カリウム脱分極刺激により電位依存性カルシウムチャネルを開口させたときのカルシウム流入に対する PKCα-GFP の経時的变化を検討した。

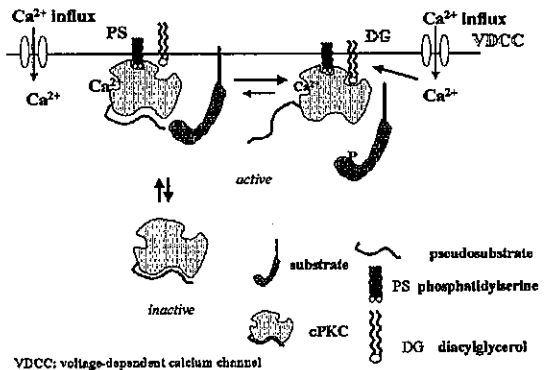


図2 PKC活性化機構の模式図

刺激前、PKCαは細胞質に局在するが、刺激に伴い一過性に細胞膜へトランスロケーションし再び細胞質に戻ってくる。これを細胞質と細胞膜に関心領域を置き蛍光強度の変化として観察した。細胞質の蛍光強度の減少が細胞膜の蛍光強度の増加に鏡像的に変化していることより、細胞質の PKCαが細胞膜へトランスロケーションしていることが確かめられた。更に、細胞を fura-2 でロードし細胞内カルシウム濃度の変化と同時測定すると、PKCαは細胞内カルシウム濃度の変化に直ちに反応して細胞膜へトランスロケーションした。そして、この脱分極刺激による PKCαのトランスロケーションは  $Ca^{2+}$  influx (カルシウム流入) に依存している。即ち、カリウムチャネルブロッカーである TEA (tetraethylammonium) による脱分極刺激にて生ずるカルシウムオシレーションと同期して PKCαのトランスロケーションもおこり、細胞外  $Ca^{2+}$  を除くと両者は消失することから  $Ca^{2+}$  influx に依存していることが確かめられた。

ここまで、電位依存性 Ca チャネルを介する  $Ca^{2+}$  influx にて PKCαのトランスロケーションが惹起されるということ述べた。

しかし、図 2 に示すようにトランスロケーショ

ンと活性化は同義ではなく、基質結合部位を覆っている pseudosubstrate がはずれて基質のリン酸化が可能になり、はじめて PKC の活性化がもたらされる。

この点を確かめるため、PKC の基質である MARCK (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) を用いて検討した。PKC の基質である MARCKS-GFP と PKC $\alpha$ -DsRed を共発現させる。MARCKS はリン酸化されると細胞膜から細胞質へトランスロケーションするので PKC 活性化の指標となる。刺激前、MARCKS(緑)は細胞膜へ PKC(赤)は細胞質へ局在している。脱分極刺激により PKC $\alpha$ が細胞膜へトランスロケーションすると直ちに MARCKS はリン酸化され細胞質へトランスロケーションした。このことから、電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルを介した Ca<sup>2+</sup> influx は PKC $\alpha$ を活性化しうるといえる。PKC $\alpha$ は、前述のように Ca<sup>2+</sup>と DAG により活性化されます。従って、脱分極刺激による Ca<sup>2+</sup> influx は細胞内カルシウム濃度の上昇だけでなく、DAG の産生にも関与していると考えられる。この点を確かめるため、カルシウム非依存的に DAG により活性化される nPKC の一つである PKC $\theta$ を発現させ、細胞膜へのトランスロケーションを PKC $\theta$ の活性化と同時に DAG 産生の指標とした。PKC $\theta$ はカルシウム非存在下でも確かにホルボールエステルである TPA により活性化された。そして、高カリウム脱分極刺激による Ca<sup>2+</sup> influx はアセチルコリンと同程度に PKC $\theta$ をトランスロケーションさせた。アセチルコリンはフォスホオリパーゼCを活性化して DAG を産生する。Ca<sup>2+</sup> influx は、これと同程度の変化をもたらすことより DAG を産生し得る事が判明した。そのトランスロケーションの kinetics は PKC $\alpha$ のように細胞内 Ca 濃度の変化と同期する速い kinetics と違いゆっくりとしたものであった。

#### 4. 今後の課題と発展

#### 本研究の生理学的意義

以上の結果より、脱分極刺激による電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルを介した Ca<sup>2+</sup> influx は細胞内カルシウム濃度の上昇をもたらすばかりでなく DAG の産生にも関与していると考えられる。これによって、Ca<sup>2+</sup> influx のみでも cPKC の活性化はもとより、構造的には Ca<sup>2+</sup>非依存的に DAG によって活性化されると考えられていた nPKC をも活性化しうることが示された。今回得られた結果は、モデル細胞として用いたインスリン産生細胞だけでなく、細胞膜の電気的興奮性をもった細胞いわゆる興奮性細胞すべて(神経細胞、骨格筋、心筋、平滑筋細胞及び内分泌細胞)に当てはまり、その機能を考える上で非常に重要である。つまり、これらの細胞は脱分極による電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルを介した Ca<sup>2+</sup> influx が trigger となり、それぞれ神経伝達、筋収縮あるいはホルモン分泌を行っている。従って、これらの細胞で活動電位が発生するときは、1) PKC の活性化が Ca<sup>2+</sup> influx と表裏一体となって惹起されていると考えられる。さらに、2) Ca<sup>2+</sup> 依存性 PKC、cPKC だけでなく Ca<sup>2+</sup>非依存的 PKC、nPKC まで活性化されうるということを常に念頭におく必要がある。

#### 今後の課題

インスリン分泌における最も重要な調節因子はグルコースである。グルコースは細胞内で ATP に変換され ATP/ADP を上昇させることにより ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネルを閉鎖し細胞膜を脱分極させる。当然、グルコースによる脱分極刺激は Ca<sup>2+</sup> influx を惹起し、PKC の活性化をもたらすが予想される。そこで、今後の課題として1) インスリン分泌細胞において、生理的グルコース刺激により PKC 特に PKC $\alpha$ 、PKC $\delta$ および PKC $\epsilon$ は活性化されうるか。2) このときどのような経路で DAG が産生されるのか(図3)。3) 活性化された各々の PKC アイソフォームのインスリン分泌における役割を検討す

ることである。そして、これらの課題を検討することにより、糖尿病の中心病態の一つであるインスリン分泌不全のメカニズムに迫りたいと考えている。

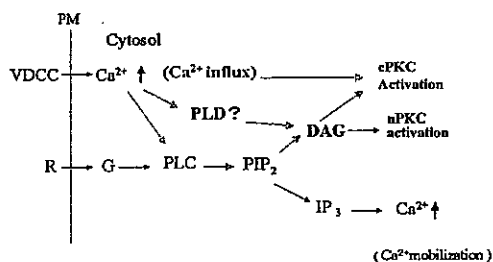


図3 Ca<sup>2+</sup>流入はePKCばかりでなくnPKCをも活性化する

## 発表論文

**Hideo Mogami**, Hui Zhang, Yuko Suzuki, Tetsumei Urano, Naoaki Saito, Itaru Kojima and Ole H. Petersen: **Decoding of Short-Lived Ca<sup>2+</sup> Influx Signals into Long-Term Substrate Phosphorylation through Activation of Two Distinct Classes of Protein Kinase C** (submitted)

## 参考文献

1. Mellor H, Parker PJ: **The extended protein kinase C superfamily.** *Biochem J* 1998, 332 ( Pt 2):281-292.
2. Nishizuka Y: **Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses.** *Faseb J* 1995, 9:484-496.
3. Oancea E, Teruel MN, Quest AF, Meyer T: **Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells.** *J Cell Biol* 1998, 140:485-498.
4. Sakai N, Sasaki K, Ikegaki N, Shirai Y, Ono Y, Saito N: **Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein.** *J Cell Biol* 1997, 139:1465-1476.