

# 論文の内容の要旨

## 論文題目      **Protein Kinase C**によるケラチノサイト 細胞周期制御機構

氏名              柏木 麻里子

**[緒言]** プロテインキナーゼ C (PKC)は 3 群に分類された 10 種類の分子種から成るセリン・スレオニンキナーゼである。それぞれの分子種の発現は細胞特異性があり、機能分担していることが推測されるが、各々の局面で観察される現象をどの分子種がシグナル伝達しているかは、多くの場合未だに不明である。しかし、近年 PKC と相互作用するタンパクが数多くクローニングされ、それぞれの分子種の役割を示唆する知見が得られつつある。

細胞周期は、周期進行を促進する cyclin/cdk 複合体、抑制する p16 ファミリー、p21 ファミリーにより制御されることが明らかとなっており、現在はこれら因子を直接・間接的に制御する因子の同定が進められている。PKC は、 $\delta$ 分子種が血管平滑筋細胞の、 $\alpha$ 分子種が小腸上皮細胞の G1 期停止に、 $\beta$ II 分子種が HL-60 細胞の、 $\theta$ 分子種が血管内皮細胞の G2/M 期移行の促進に関与しているという発表がなされている。しかし細胞周期制御機構への PKC の直接的な関与を示す知見はない。

当研究室で単離した PKC の  $\eta$ 分子種は、上皮細胞の終末分化に関与することが強く示唆されており、 $\eta$ 分子種の過剰発現により表皮角化細胞の増殖が停止し、最終分化マーカーであるトランスグルタミナーゼ 1 の発現および活性が上昇することが明らかとなっている。また、この時、細胞周期の G1 期停止が認められ、本研究では  $\eta$ 分子種による G1 期停止の制御機構について検討することとした。

## 第一章 $\eta$ 分子種による細胞周期制御機構

[方法および結果] 細胞周期の G1 期停止には、G1 中期で働く cyclin D/cdk4, 6 および G1 後期で働く cyclin E/cdk2 の活性低下が重要であり、cyclin dependent kinase inhibitor (CKI)の結合により活性阻害が起こることがわかっている。

同調培養させたマウスケラチノサイト細胞株；BALB/MK2 において、 $\eta$ 分子種の発現が G1 中期から後期にかけて上昇することより、cdk2 活性に影響を与えている可能性が考えられたため、cyclin E/cdk2 複合体に注目し実験を行った。細胞はヒト正常角化細胞 (Normal Human Keratinocyte; NHK)を用い、遺伝子導入は基本的にアデノウイルスベクター (Ax)を用いた。

$\eta$ 分子種と cyclin E/cdk2/p21 複合体の相互作用 NHK 細胞に過剰発現させた野生型および酵素活性欠如型の $\eta$ 分子種が、cyclin E/cdk2/p21 複合体と結合することが免疫沈降・ウエスタン法により明らかとなった。また、BALB/MK2 細胞において、内在性の $\eta$ 分子種が cdk2 複合体と結合することが確認された。さらには、 $\eta$ 分子種と cyclin E、cdk2 は、細胞質および核膜周辺で共局在することが確認された (図 1)。

アダプター因子； 昆虫細胞に発現させた $\eta$ 分子種は、NHK 細胞から精製した内在性の cyclin E/cdk2/p21 複合体には結合するが、昆虫細胞に発現させ精製した cyclin E/cdk2/p21 複合体には結合しないことより、 $\eta$ 分子種と cyclin E/cdk2/p21 複合体の結合にはアダプター因子が必要であることがわかった。

結合領域；  $\eta$ 分子種の deletion mutant を用いた解析により、 $\eta$ 分子種は NHK 細胞内で、C 末端側の触媒領域を介して cdk2 複合体と相互作用していることが明らかとなった。

細胞周期の G1 期において、cyclin E/cdk2 複合体は、Retinoblastoma (Rb)タンパクをリン酸化し、その機能を阻害する。 $\eta$ 分子種の結合が cdk2 活性に及ぼす影響を検討した。

in vitro kinase assay； NHK 細胞に $\eta$ 分子種を導入し、cdk2 活性を測定した。cdk2 複合体は免疫沈降により精製し、外来基質として Rb の C 末端タンパクまたは Histone H1 を用いた。野生型 $\eta$ 分子種の発現にともない、cdk2 活性が顕著に低下することがわかった。野生型 $\eta$ 分子種による cdk2 活性の低下は、 $\eta$ 分子種と cdk2 複合体を in vitro で混合した場合にも確認された。また、酵素活性欠如型の $\eta$ 分子種は、cdk2 活性を低下させないことがわかった。

リン酸化 Rb の検出； NHK 細胞に $\eta$ 分子種を導入し、Rb タンパクのリン酸化状態をウエスタン法にて検討した。野生型 $\eta$ 分子種の発現にともない、高リン酸化型の Rb タンパクが顕著に減少し、低リン酸化型の Rb タンパクが増加することがわかった。また、酵素活性欠如型の $\eta$ 分子種の発現によっては、高リン酸化型 Rb タンパクの減少は認められなかった。

cdk2 は cyclin E と結合し、160 番目の Thr (T160)がリン酸化されることで活性化する。不活化には CKI の結合、14 番目の Thr (T14)及び 15 番目の Tyr (Y15)のリン酸化、cyclin E の解離、な

が必要である。η分子種の結合による cdk2 活性の低下時には、上述のメカニズムのうち cyclin E の解離、CKI の発現及び結合の上昇は認められない。また、酵素活性欠如型η分子種は cdk2 活性を阻害しないことから、活性低下には cdk2 のリン酸化状態が関係してくる可能性が考えられた。

リン酸化 cdk2 の検出； NHK 細胞にη分子種を導入し、正リン酸で細胞を標識後、免疫沈降により cdk2 複合体を精製し、オートラジオグラフィーにてリン酸化 cdk2 を検出した。野生型η分子種の発現により、リン酸化 cdk2 が減少すること、酵素活性欠如型η分子種の発現では変化しないことが確認された。リン酸化 cdk2 の減少は 160 番目の Thr (T160) の脱リン酸化によるものであることが、リン酸化 T160-cdk2 認識抗体を用いたウエスタンにより明らかとなった。しかし、T160 をリン酸化する CAK kinase の発現、酵素活性には変化は認められなかった。

[考察] 本研究により、ケラチノサイト終末分化の際の G1 arrest は PKC のη分子種が cyclin E/cdk2 複合体に結合し、cdk2 活性を阻害、Rb 蛋白のリン酸化を抑えるためであることを見いだした。また、η分子種と cyclin E/cdk2/p21 複合体との結合にはケラチノサイト特異的なアダプター因子の存在を必要とすることがわかった。cdk2 活性の抑制には、η分子種の酵素活性が重要であり、PKCη-cyclin E/cdk2/p21 複体内に基質が存在する可能性が考えられた。

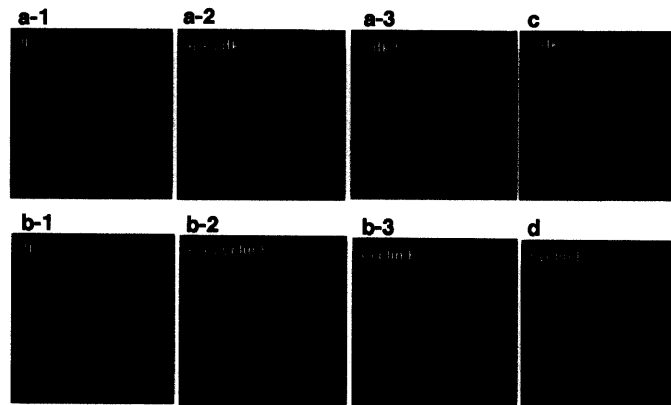


図 1 η分子種と cdk2, cyclin E の細胞内共局在

NHK 細胞に Ax-lacZ、Ax-PKCη を感染させ、36 時間後の η 分子種 (a-1, b-1) と cdk2 (a-3, c), cyclin E (b-3, d) の局在を間接蛍光染色にて観察した。融合画像を a-2, b-2 に示した。η 分子種のシグナル (赤色；ローダミン) は細胞質および核膜周辺で (a-1, b-1)、cdk2、cyclin E のシグナル (緑色；FITC) は核および細胞質 (a-3, b-3) で確認された。細胞質および核膜周辺での η 分子種と cdk2、cyclin E との共局在が観察された (a-2, b-2)。Ax-lacZ 感染細胞での cdk2 および cyclin E のシグナルは、Ax-PKCη 感染細胞と同様の核および細胞質で確認された (c, d)。

## 第二章 η分子種の基質の検索

[方法および結果]

PKCηの基質の検索； NHK細胞にη分子種を導入し、PKCη-cyclin E/cdk2/p21 複合体を精製し、

PKC の *in vitro* kinase assay を行った。野生型  $\eta$  分子種を導入した細胞で、PKC の活性化剤依存的な 20kD と 21kD のリン酸化バンドが確認された。このうち 21kD のリン酸化バンドが p21 であることが再免疫沈降により確認された。

p21 は N 末端側に cyclin/cdk と結合する部位を持ちカルボキシル末端側に PCNA と結合する部位及び核移行シグナルを持つ。また、C 末端に PKC のリン酸化コンセンサス配列が存在する。  
p21 のリン酸化部位の決定； p21 の PKC によるリン酸化サイトを決定するため、外来基質として p21 の各種ペプチドを用い *in vitro* kinase assay をおこなった。 $\eta$  分子種によるリン酸化サイトは、146番目の Ser (S146)であることがわかった。p21 は、 $\delta$  分子種によっても S146 と S153 がリン酸化されること、 $\alpha$  分子種によってはリン酸化されないことがわかった (図2)。

PCNA 結合能； S146 は、p21 の PCNA 結合部位内に位置している。S146 のリン酸化による PCNA 結合能への影響を検討した。S146-脱リン酸化型の p21 ペプチドには PCNA は結合するが、S146-リン酸化型には PCNA が結合しないことがわかった。

核移行能； S146 および S153 は、p21 の核移行シグナルに近接している。これら S のリン酸化が核移行へ及ぼす影響を p21 の擬似リン酸化変異体を用いて検討した。p21 の野生型および S146 を E に置換した変異型は、核局在が確認された。しかし、S153 を E に置換した変異型 p21 の局在は、核及び細胞質で認められた。

[考察] PKC $\eta$ -cyclin E/cdk2/p21 複合体内の p21 および 20kD のタンパクが  $\eta$  分子種によりリン酸化されることが明らかとなった。 $\eta$  分子種による p21 のリン酸化サイトは S146 であること、リン酸化によって p21 の PCNA 結合能が阻害されることが明らかとなった。

$\delta$  分子種によっても p21 の S146 と S153 がリン酸化され、S153 のリン酸化は p21 の核移行を阻害する可能性が示唆された。

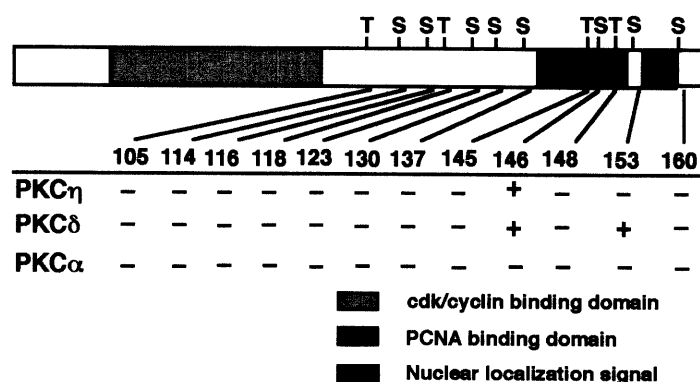


図 2 PKC による p21 のリン酸化部位(+)のまとめ