

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19390064
 研究課題名 (和文) プロテインキナーゼ C シグナル系の異常による疾患の発症メカニズム
 解明とその応用
 研究課題名 (英文) Mechanism and treatment for the disease caused by the impairment of
 PKC signaling
 研究代表者
 齋藤 尚亮 (SAITO NAOAKI)
 神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・教授
 研究者番号：60178499

研究成果の概要：脊髄小脳変性症 14 型の発症メカニズムとして、変異型 PKC γ には細胞膜に十分な時間存在する能力が欠如し TRPC チャンネルをリン酸化することができないため細胞外からの Ca²⁺ 流入を抑制する機構が働かないことを示した。この過剰な Ca²⁺ 流入が神経細胞死が招くと推測された。また他の要因として初代培養プルキンエ細胞において変異型 PKC γ は凝集体の形成・樹状突起の伸展・シナプス形成異常を引き起こす事を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：プロテインキナーゼ C、精髓小脳変性症、カルシウム、神経変性、遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ C (PKC) は 1977 年に発見されたリン酸化酵素であり、多岐にわたる細胞機能に関与し、細胞内シグナル伝達機構における重要な酵素であることはすでによく知られている。また、PKC には 10 種類に及ぶサブタイプが存在し、それぞれが異なる細胞機能に関与することが示唆されて来たが、各サブタイプの基質特異性が低いことなどから生化学的にサブタイプ特異的な機能を

解析することは困難であった。申請者らは PKC のサブタイプの特異的な機能を解析するために、PKC が「いつ」、「どこで」、「どのように」活性化されて、どのような蛋白質と共存するかを PKC の細胞内動態を指標として解析することによって、PKC サブタイプの特異的な機能を明らかにしようとしてきた。その結果、PKC サブタイプにより、「いつ」、「どこで」、「どのように」活性化されるか (ターゲティング機能) が異なっており、ま

た、同一のサブタイプでもターゲティングの差により、異なる機能を持ちうることを明らかにした。この事実は細胞機能の調節における情報伝達因子のターゲティング機構の重要性を示すものであった。

一方、PKC シグナル伝達系の異常と疾患との関連が報告されるようになり、PKC がこれらの疾患の治療薬の標的となりうることが示唆されてきた。本研究では、これらの疾患の発症メカニズムを PKC のターゲティング機構の観点から解析し、その病態を明らかにするとともに、ターゲティングの観点から見た新しい治療薬の標的を見出そうとするものである。

2. 研究の目的

本研究では ① PKC のターゲティング機構と細胞応答について検討するとともに、② PKC シグナル系の異常による疾患の発症メカニズムを解明し、③ 疾患治療薬の開発を目指した。

そのために、PKC の機能異常との関連が報告されている **脊髄小脳変性症、虚血性神経障害、糖尿病性腎症** という、現代の最も治療法が求められている3疾患（血管障害、神経障害、糖尿病）に着目し、それぞれの病態における PKC の機能異常について分子レベルで明らかにし、薬物の分子標的を見出し、治療薬の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 変異PKC γ のin vitroでの機能解析

各変異型PKC γ について、酵素学的特性の解析、神経細胞死を導くメカニズムの細胞生物学的な解析を行った

2) 変異PKC γ のモデルマウス神経細胞での機能解析

SCA14モデルマウスからの初代培養小脳プルキンエ細胞を用いて、各変異型PKC γ の動態と細胞死との関連について検討した。

3) 脊髄小脳変性症モデル動物の作製と解析

既にSCA14発症との関連が明らかにされた以下のPKC γ 分子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。作製に当た

ってはCre-lox法を用い、L7-Creマウスと交配させる事により、GFP融合変異PKC γ を小脳プルキンエ細胞に発現させた。このトランスジェニックマウスをもちいて、その病態を行動学的に検討した。

4) 神経保護作用を持つエストロゲン受容体の同定

虚血による神経細胞死に対して保護作用を示すエストロゲン受容体の同定を行った。

5) PKC作用薬の開発

Phorbol ester の誘導体から見出されたPKC サブタイプ特異的作用薬の合成とトランスロケーションを指標とした特異性検討を行った。

4. 研究成果

1) 変異PKC γ のin vitroでの機能解析

SCA14型の原因となる変異型PKC γ の酵素学的機能を検討した。野生型PKC γ 発現細胞では、非発現細胞に比べ、刺激後、一過性に上昇した細胞内Ca²⁺は酵素活性依存的に速やかに減少する。一方、SCA14変異体は、in vitro活性測定において高い酵素活性を有したが、細胞外からのCa²⁺流入時間は延長したままであった。このCa²⁺流入にはTRPCチャネルの関与が考えられたため、TRPC3チャネルを基質としてin vivo酵素活性測定を行った結果、野生型PKC γ はチャネルをリン酸化するのに対し、変異体では有意なリン酸化は確認できなかった。そこで、全反射顕微鏡を用いて、PKC γ の一分子における細胞質膜上での動態を観察したところ、変異体の膜滞在時間が野生型に比べて有意に短縮していた。これらの結果より、野生型PKC γ では刺激後、TRPCチャネルをリン酸化し、細胞外からのCa²⁺流入を止めるのに対して、変異体は細胞膜に十分な時間存在できないため、チャネルのリン酸化ができず、細胞内のCa²⁺濃度を適切に調節できないと考えられた。このような過剰なCa²⁺流入がSCA14において神経細胞死を引き起こす1つの原因になっている可能性が示唆された（論文

⑨)。これらの成果は、moonwalker mice のプルキンエ細胞死が TRPC3 のリン酸化部位の変異によるものであるというその後の論文 (PNAS, 106:6706-11, 2009) の結果とも一致するものであり、重要な論文として引用された。

また、PKC γ のトランスロケーションについて、免疫電顕法を駆使して検討した。その結果、光学顕微鏡では一見同じと思われた PKC のトランスロケーションも、電子顕微鏡で観察すると、Ca²⁺のみによる刺激による PKC の活性化は、受容体刺激による活性化と異なり、細胞膜との十分な結合が得られないことを示している。この事実は、上記の SCA14 発症機構を裏付けた (論文⑬)。

2) 変異 PKC γ のモデルマウス神経細胞での機能解析 SCA14 変異体の PKC γ を初代培養プルキンエ細胞に発現させたところ、凝集体の形成とともに、プルキンエ細胞の樹状突起の伸展やシナプス形成において異常が認められた (論文⑭)。

3) 脊髄小脳変性症モデル動物の作製と解析 複数の SCA14 変異体 (G128D, G360S など) を発現するマウスを作製し、その行動異常を観察したが、生後6ヶ月までには明らかな行動異常を認めなかった。また、プルキンエ細胞の変性なども認められなかった。今後は、老化に伴う変化、環境因子などの影響を本マウスを用いて検討を行う予定である。

4) 神経保護作用を持つエストロゲン受容体の同定

細胞膜型エストロゲン受容体の候補として、GPR30 に着目し、その神経細胞死における役割と PKC シグナル系路への影響を検討した結果、本受容体は PKC を活性化し、神経保護作用を示す受容体である可能性は低いことが分かった。

5) PKC作用薬の開発

nPKC 特異的な活性化剤の合成およびその特性について報告した。(論文①、⑭) 今後、これらの PKC 作用薬を遺伝子操作マウスに投与し、PKC 系路の以上により発症する疾患の治療薬の可能性を検討する。

6) その他

さらに、新規蛍光蛋白質 monomeric Kusabira Green システムを用いて、p40phox の分子内結合ドメインの同定を行うとともに、p67phox が Phagocytosis において p47phox から p40phox に順番に結合パートナーを替え、異なる細胞内部位で活性酸素を産生することを示した。(論文⑩)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計17件)

- ① Yu Nakagawa, Y. Yanagita, RC, Hamada, N. Murakami, A. Takahashi, H. Saito, N. Nagai, H. and Irie, K. A Simple Analog of Tumor-promoting Aplysiatoxin Is an Antineoplastic Agent rather than a Tumor Promoter: Development of a Synthetically Accessible PKC Activator with Bryostatins-like Activity. J Am. Chem. Soc., in press 査読有
- ② Shibata, Y., van der Ploeg, JR., Kozuki, T., Shirai, Y., Saito, N., Kawada, M., Takeshita, T., and Yamashita, Y Kinase activity of the *dgk* gene product is involved 1 in the virulence of *Streptococcus mutans* Microbiology 155:557–565, 2009 査読有
- ③ Seki, T.; Shimahara; T., Yamamoto; K., Abe; N., Amano, T.; Adachi; N., Takahashi, H.; Kashiwagi, K.; Saito, N., Sakai, N. Mutant γ PKC found in spinocerebellar ataxia type 14 induces aggregate-independent maldevelopment of dendrites in primary cultured Purkinje cells. Neurobiology of Disease 33:260–273, 2009 査読有
- ④ Hozumi, Y., Fukaya, M., Adachi, N., Saito, N., Otani, K., Kondo, K., Watanabe, M., and Goto, K. Diacylglycerol kinase β accumulates on the perisynaptic site of medium spiny neurons in the striatum.

- Eur. J. Neurosci. 28, 2409-2422, 2008
査読有
- ⑤ Ashida, N., Ueyama, T., Rikitake, K., Shirai, Y., Eto, M., Kondoh, T., Kohmura, E., and Saito, N. Ca^{2+} oscillation induced by P2Y2 receptor activation and its regulation by a neuron-specific subtype of PKC (γ PKC), Neurosci. Lett. 446, 123-128, 2008 査読有
- ⑥ Ohtani, Y., Harada, T., Funasaka, Y., Nakao, K., Takahara, C., Abdel-Daim, M., Sakai, N., Saito, N., Nishigori, C. and Aiba, A., Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for *in vivo* growth of melanoma. Oncogene 27:7162-7170, 2008 査読有
- ⑦ Ibi, M., Matsuno, K., Shiba, D., Katsuyama, M., Iwata, K., Kakehi, T., Nakagawa, T., Sango, K., Shirai, Y., Yokoyama, T., Kaneko, S., Saito, N., and Yabe-Nishimura, C. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. J. Neurosci. 28, 9486-9494, 2008 査読有
- ⑧ Shirai, Y., Adachi, N. and Saito, N. Minireview : Protein kinase C ϵ -function in neurons. FEBS J. 275, 3988-3994, 2008 査読有
- ⑨ Adachi, N., Kobayashi, T., Takahashi, H., Kawasaki, T., Shirai, Y., Ueyama, T., Matsuda, T., Seki, T., Sakai, N. and Saito, N. Enzymological analysis of mutant protein kinase C γ causing spinocerebellar ataxia type 14 and its dysfunction in Ca^{2+} homeostasis J. Biol. Chem. 283: 19854 – 19863, 2008 査読有
- ⑩ Sakai, N., Terami, H., Suzuki, S., Haga, M., Nomoto, K., Tsuchida, N., Morohashi, K., Saito, N., Asada, M., Hashimoto, M., Harada, D., Asahara, H., Ishikawa, T., Shimada, F., Sakurada, K.. Identification of SF-1/Ad4BP gene expression modulators by large scale gain and loss of function studies. J. Endocrinol. 198, 489-497, 2008 査読有
- ⑪ Ueyama, T., Kusakabe, T., Karasawa, S., Kawasaki, T., Shimizu, A., Son J-H, Shirai, Y., Leto, T.L., Miyawaki, A., and Saito, N. Sequential Binding of Cytosolic Phox Complex to Phagosomes through Regulated Adaptor Proteins: Evaluation Using the Novel Monomeric Kusabira-Green System and Live Imaging of Phagocytosis J. Immunol. 181:629-40, 2008 査読有
- ⑫ Merino, E. Ávila-Flores, A., Shirai, Y., Moraga, I., Saito, N. and Mérida, I. Lck-dependent tyrosine phosphorylation of DGK alpha regulates its membrane association in T cells J. Immunol. 180:5805-5815, 2008 査読有
- ⑬ Oyasu, M., Fujimiya, M., Kashiwagi, K., Ohmori, S., Imaeda, H. and Saito, N. Immunogold electron microscopic demonstration of distinct submembranous localization of the activated γ PKC depending on the stimulation J. Histochem. Cytochem. 56: 253-265, 2008 査読有
- ⑭ Yanagita, R.C., Nakagawa, Y., Yamanaka, N., Kashiwagi, K., Saito, N. and Irie, K. Synthesis, Conformational Analysis, and Biological Evaluation of 1-Hexyl-indolactam-V10 as a Selective Activator for Novel Protein Kinase C Isozymes. J. Med. Chem. 51:46-56, 2008 査読有
- ⑮ Kawasaki, T., Kobayashi, T., Ueyama, T., Shirai, Y. and Saito, N. Regulation of Clathrin Dependent Endocytosis by Diacylglycerol kinase δ -Importance of Kinase Activity and Binding to AP2 α - Biochem. J. 409:471-479, 2008 査読有
- ⑯ Seki, T., Takahashi, T., Adachi, N., Shimahara, T., Abe, N., Saito, N. and Sakai, N. Aggregate Formation of Mutant Protein Kinase C Gamma Found in Spinocerebellar Ataxia Type 14 Impairs Ubiquitin Proteasome System and Induces Endoplasmic Reticulum Stress Eur. J. Neurosci. 26:3126-3140, 2007 査読有

⑰ Shirai, Y., Murakami, T., Kuramasu, M., Iijima L., and Saito, N. A novel PIP2 binding of ϵ PKC and its contribution to the neurite induction ability. *J. Neurochem.* 102:1635-1644, 2007 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1. マウス初代培養表皮細胞における Rac3 の Rac1 代償機能 清水 彩、上山健彦、坂原瑞穂、饗場 篤、齋藤尚亮 第 82 回日本薬理学会年会、平成 21 年 3 月 16 ~18 日、横浜
2. 神経特異的ジアシルグリセロールキナーゼ DGK β の機能解析 上月 健、白井康仁、掛札賢一、大八木 篤、堀江恭二、嶋澤雅光、福永浩司、竹田潤二、齋藤尚亮、原 英彰 第 82 回日本薬理学会年会、平成 21 年 3 月 16 ~18 日、横浜
3. 気分障害と神経特異的ジアシルグリセロール 白井康仁、齋藤尚亮 第 82 回日本薬理学会年会、平成 21 年 3 月 16 ~18 日、横浜
4. 神経特異的ジアシルグリセロールキナーゼ DGK β の機能解析 白井康仁、上月健、掛札賢一、大八木 篤、堀江恭二、嶋澤雅光、竹田潤二、齋藤尚亮、原 英彰 BMB2008 (第 31 回日本分子生物学学会年会・第 81 回日本生化学大会合同大会)、平成 20 年 12 月 9 ~11 日、神戸
5. NADPH oxidase ファミリーの活性化機構とその生理機能 上山健彦 第 3 回グローバル COE 研究討論会、平成 20 年 7 月 1 ~2 日、淡路島 (兵庫)
6. RalA は η PKC によるケラチノサイトの扁平化に必須である。 白井康仁、盛岡祥子、大辻千裕、吉野健一、酒井規雄、上山健彦、齋藤尚亮 第 113 回日本薬理学会近畿部会、平成 20 年 6 月 20 日、岡山
7. P2Y 受容体を介する γ PKC のオシレーション機構の解明 芦田典明、上山健彦、力武恭子、白井康仁、衛藤三佳、近藤威、甲村英二、齋藤尚亮 第 113 回日本薬理学会近畿部会、平成 20 年 6 月 20 日、岡山

8. Sequential binding of cytosolic phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green(mKG) system and live imaging of phagocytosis. Ueyama, T., Kusakabe, T., Karasawa, S., Kawasaki, T., Shimizu, A., Son, Jeong-hyun., Leto, L. Thomas., Miyawaki, A., Saito, N. Gordon Research Conference, 平成 20 年 6 月 1 ~7 日、ボストン
9. Sequential targeting of cytosolic phox proteins to phagosomes through regulated adaptor proteins during Fc γ R-mediated phagocytosis. Ueyama, T., Kusakabe, T., Karasawa, S., Kawasaki, T., Shimizu, A., Son, Jeong-hyun., Leto, L. Thomas 第 81 回日本薬理学会年会、平成 20 年 3 月 17 ~19 日、横浜
10. Recessive embryonic lethality in mutant mice carrying a gene trap in intron 3 of RKIP-1 gene(92) Uo, M., Ohmori, S., Nakao, K., Saito, N. 第 81 回日本薬理学会年会、平成 20 年 3 月 17 ~19 日、横浜
11. Differential regulation of dual oxidase 1 by dual activator 1 splicing variants. Tsujibe, S., Ueyama, T., Shirai, Y., Leto, L. Thomas., Saito, N. 第 81 回日本薬理学会年会、平成 20 年 3 月 17 ~19 日、横浜
12. Enzymological properties of PKC γ mutants found in spinocerebellar ataxia 14(SCA14) and its involvement in neuronal death. Saito, N., Adachi, N., Takahashi, H., Kobayashi, T., Seki, T. Sakai, N. International symposium on cell signaling and gene regulation. Nov.18 ~19, 2007, Taiwan (招待講演)
13. 脊髄小脳失調症 14 型における変異 PKC γ の C1A とキナーゼドメインを介した分子間相互作用・凝集体形成傾向の重要性 高橋英之、足立直子、杉本卓弥、中北順也、関 貴弘、入江一浩、酒井規雄、齋藤尚亮 第 112 回日本薬理学会近畿部会、平成 19 年 11 月 16 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)

14. Live imaging of PKC signaling and its implication in neuronal disease Naoaki Saito 14th Congress of Ca²⁺ binding proteins & Ca²⁺ function in health & disease, Oct.16~21, 2007, La Palma Spain
 15. Dysfunction of intracellular Ca²⁺ regulation in SCA14. Adachi,N., Kobayashi,T., Seki,T., Sakai,N., Saito,N. 14th Congress of Ca²⁺ binding proteins & Ca²⁺ function in health & disease, Oct.16~21, 2007, La Palma Spain
 16. Clarification of regulatory mechanism of Orail(SOCs)by PKC. Kawasaki,T., Ueyama,T., Shirai,Y., Saito,N. 14th Congress of Ca²⁺ binding proteins & Ca²⁺ function in health & disease, Oct.16~21, 2007, La Palma Spain
 17. 緑色蛍光蛋白(GFP)発現バイオ試料の半導体レーザー超短パルス光源による 2 光子イメージング 佐藤綾耶、高島啓次郎、郭 亨長、牟禮勝仁、横山弘之、坪川 宏、齋藤尚亮 第 68 回日本応用物理学会学術講演会、平成 19 年 9 月 4~8 日、北海道
 18. c-Ab1, a tyrosine kinase involved in chronic myeloid leukemia, regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of DGK α and cell cycle. Shirai,Y., Matsubara,T., Saito,N. FASEB Summer Research Conferences, August 11 ~ 16, 2007, Indian Wells CA
 19. ヒトケラチノサイトにおける TNF- α による NGF 分泌促進作用とそのシグナル伝達機能 高岡幸二、白井康仁、齋藤尚亮 第 111 回日本薬理学会近畿部会、平成 19 年 6 月 15 日、名古屋
 20. A regulated adaptor function of p40phox : Intramolecular interaction (PX-PB1 domain)within p40phox. Ueyama,T., Tatsuno,T., Kawasaki,T., Thomas L.Leto., Saito,N. Gordon Research Conference, 平成 19 年 6 月 10~15 日、ロードアイランド
 21. 脂質代謝酵素 DGK α の核-細胞質間 shuttling 機構と細胞周期制御への関与 松原岳大、白井康仁、齋藤尚亮 第 49 回日本脂質生化学会、平成 19 年 6 月 5~6 日、北海道
 22. 核内脂質シグナル及び核移行蛋白質の可視化システムを用いた細胞周期機構の解明-DGK の核-細胞質間移行機構と核内における機能に着目して-白井 康仁、松原 岳大、齋藤尚亮 第 49 回日本脂質生化学会、平成 19 年 6 月 5~6 日、北海道
 23. DG-PKC シグナル系の可視化とその異常による疾患 齋藤尚亮、白井康仁、松原岳大、足立直子、高橋英之、酒井規雄 第 49 回日本脂質生化学会、平成 19 年 6 月 5~6 日、北海道
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
齋藤 尚亮 (SAITO NAOAKI)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・教授
研究者番号 60178499
 - (2) 研究分担者
白井 康仁 (SHIRAI YASUHIRO)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・准教授
研究者番号 60263399
 - 上山 健彦 (UEYAMA TAKEHIKO)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・講師
研究者番号 80346254
 - (3) 連携研究者