

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710268

研究課題名(和文) 脂肪酸誘導性細胞死を利用した細胞小器官に局在するPKCの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis for PKC which localized on organelle utilizing fatty acid-induced cell death

研究代表者

田村 結城(Tamura, Yuki)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・客員研究員

研究者番号：50442984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞選択的に細胞死を誘導するガンマリノレン酸(GLA)を細胞に処理し、種々PKCサブタイプの局在変化を観察した結果、PKCdeltaとzetaが核近傍に集積する様子が観察された。脂肪酸を細胞に処理すると、核近傍で観察される脂肪油滴が出現することを、脂肪油滴を染色するNile Redを用いて確認し、ラマン顕微鏡を用いた解析から、細胞死を誘導する脂肪酸は、脂肪油滴に局在する様子が観察された。しかしPKCdeltaはNile Redとの共局在は観察されなかったことから、他の細胞小器官(ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリア等)に移行していると考えている。

研究成果の概要(英文)：GLA-induced translocation of several PKC subtypes were observed under fluorescence microscope, and PKCdelta and zeta localized around the nucleus in HeLa cells. Fatty acids accumulated as lipid droplet around the nucleus, which were confirmed by using Nile Red staining and Raman microscope. However, translocated PKCdelta did not seem to co-localize with lipid droplets, suggesting that PKCdelta did not translocate to lipid droplets and might localize at the other organelles such as Golgi apparatus, Endoplasmic reticulum or mitochondria.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：プロテインキナーゼC 脂肪酸 細胞死

1. 研究開始当初の背景

高度不飽和脂肪酸(以下脂肪酸)の中には、がん細胞選択的に細胞死を誘導する脂肪酸があり、古くから副作用の少ない画期的な抗がん剤のリード化合物になると考えられてきた。ところが脂肪酸による細胞死の基礎研究は、遊離脂肪酸による脾臓ベータ細胞の細胞死研究が主流であり、抗腫瘍効果や選択性のメカニズムに関してはほとんど解明されていない。研究代表者らは、

- (1) ガンマリノレン酸が、がん細胞選択的に細胞死を誘導すること。
- (2) その細胞死には小胞体ストレス応答が関与すること。
- (3) ミトコンドリアを介した、カスパーゼ依存的なアポトーシスを含むこと。

を明らかにし、小胞体やミトコンドリアのような細胞小器官、及びそこに局在するタンパク質が、脂肪酸誘導性細胞死に関与していると考えてきた。

一方で脂肪酸は、細胞内シグナル伝達を制御するプロテインキナーゼC(PKC)を活性化することが知られている。PKCは通常不活性化型として細胞質に局在するが、活性化すると細胞内局在が変化する。興味深いことに、活性化する刺激やPKCサブタイプの違いによって移行する部位が異なることから、局在変化はPKCの多岐にわたる機能発現に重要であると考えられている。PKCは分子内の調節領域に、活性化や局在変化に重要なドメインを複数有しており、そこに結合する活性化物質(ジアシルグリセロール等)や、移行先の脂質膜との親和性が局在の差を生むと考えられる。活性化されたPKCの主な移行先は細胞膜であり、研究代表者らはこれまでに、PKCの調節領域に結合して活性を制御する低分子化合物を用いて、細胞膜上でのPKCの活性化機構を分子レベルで解明することを指向した研究を展開してきた。ところが細胞死に関与するPKCサブタイプは、核やミトコンドリア、小胞体などの細胞小器官に移行する報告が多いにも関わらず、細胞小器官へ移行するPKCの活性化機構はほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

そこで研究代表者は細胞内小器官にPKCを移行させる脂肪酸を用いれば、細胞小器官でのPKCの活性化機構を分子レベルで解明できると考えた。さらに研究代表者はPKC阻害剤が脂肪酸による細胞死を抑制することを示唆する結果を得ており、脂肪酸誘導性細胞死においてPKCは重要な役割を担っていると考えている。いち早く得たこれらの知見を発展させ、脂肪酸を利用して細胞小器官でのPKCの活性化機構と、PKCによる新しい細胞死制御機構を解明し、PKCが関与する疾患の病態解明や治療法提示への足がかりをつかみた

いと考え、本研究の着想に至った。PKCの特徴は活性化物質と調節領域を駆使した複雑な活性化機構であるが、これまでの研究は細胞膜上で活性化するPKCの研究が主流であり、細胞小器官で活性化するPKCの研究は革新的である。PKCが誘導する多彩な生命現象は、10種類以上あるサブタイプの賜物であるが、その基質特異性の低さから機能制御が困難であり、サブタイプ選択的な化合物開発が本研究分野では重要である。本研究は個々のドメインに注目して活性化機構を分子レベルで解明し、サブタイプ選択的な分子設計に有用な情報を提供する。さらに個々の細胞小器官に着目し、PKCの分子側からだけでなく局在変化する場所を制御して選択性を付与する、新しい概念の分子設計を可能にする。

PKCはがん、心筋梗塞、糖尿病、認知症など様々な難治性疾患との関連が知られている。研究代表者らの化合物開発のノウハウと本研究の成果を発展させれば、PKCや脂肪酸の基礎研究に有用なパイオプローブを提供するだけでなく、PKCが関与する疾患の病態解明や治療法提示につながる可能性があり、臨床応用研究の基盤としても、社会的要請に貢献できる意義のある研究である。

本研究では特に、脂肪酸で活性化され、細胞小器官に移行するPKCに注目し、脂肪酸によるPKC活性化の分子機構、及び脂肪酸誘導性細胞死におけるPKCの役割の二点を解明する。具体的な研究項目は、

- (1) 細胞死を誘導する脂肪酸のスクリーニング
- (2) 細胞死を誘導する脂肪酸によるPKCの局在変化の観察
- (3) 脂肪酸との結合、細胞小器官への局在変化に関与するPKCのドメインの解析
- (4) 脂肪酸処理後にPKCによるリン酸化で制御される、細胞死関連タンパク質の同定と解析

の四つである。

3. 研究の方法

- (1) 細胞死を誘導する脂肪酸のスクリーニング

(目的) 種々の脂肪酸の細胞死誘導能を比較検討する。

(方法) 培養細胞に種々脂肪酸を処理し、細胞死誘導能をMTT法、PI/Hoechst染色、フローサイトメトリーによるsub-G1、ホスファチジルセリンの検出等の細胞死判定法を用いて調べる。

- (2) 細胞死を誘導する脂肪酸によるPKCの局在変化の観察

(目的) 脂肪酸処理後の種々PKCサブタイプの局在変化を、蛍光融合タンパク質を用いた

過剰発現系を用いて評価し、脂肪酸誘導性細胞死において、PKC が機能する細胞小器官を決定する。

(方法) 種々PKC サブタイプの遺伝子クローニングと、Venus (蛍光タンパク質) 融合タンパク質の発現ベクターを作製する。PKC の細胞内局在を観察する研究では、蛍光融合タンパク質を用いた過剰発現系が利用される。抗体による蛍光染色よりサンプル調製が簡便であるだけでなく、脂肪酸処理後のタイムラプス観察が可能である。特に細胞死への関与が報告されている代表的な PKC サブタイプ (alpha, gamma, delta, epsilon, zeta) を選択し、PKC-Venus 過剰発現細胞を樹立する。既に PKCalpha に関しては、ホルボールエステル処理により細胞膜へ移行する様子を観察している。細胞に脂肪酸を処理し、PKC の局在変化を蛍光顕微鏡下で観察する。特に核やミトコンドリア等の細胞小器官に局在変化する PKC に着目し、個々の PKC サブタイプが細胞死誘導時に機能する細胞小器官を決定する。

(3) 脂肪酸との結合、局在変化に關与する PKC のドメインの解析

(目的) 脂肪酸との結合、細胞小器官への局在変化に關与する PKC のドメインを同定する。
(方法) 申請者らは、蛍光ラベル基質を用いた PKC の酵素活性の評価系を確立しており、本研究に利用できる。既にいくつかの脂肪酸が、PKCalpha を直接活性化することを確認している。また PKC は分子内の調節領域に、活性化物質との結合、局在変化に重要なドメインを複数有している。そこで個々のドメインと脂肪酸との結合を、SPR を利用した分子間相互作用解析装置 (Biacore) を用いて評価する。リン脂質単独やリン脂質に脂肪酸を加えた膜表面を作製し、大腸菌を用いて発現・精製した個々のドメインとの相互作用解析を行なう。さらにリン脂質の組成を変化させて、様々な細胞小器官の膜構造を模倣し、細胞小器官への局在変化に重要なドメインの同定と、分子レベルでの結合様式を解明する。

(4) 脂肪酸処理後に PKC によるリン酸化で制御される、細胞死関連タンパク質の同定と解析

(目的) 細胞死への関与が知られているタンパク質と、PKC が移行する細胞小器官に着目し、PKC の基質の同定と機能解析を行ない、脂肪酸誘導性細胞死における PKC の役割を解明する。

(方法) 脂肪酸を処理した細胞から細胞小器官を分画し、二次元電気泳動によりリン酸化タンパク質を検出する。既に二次元電気泳動後のスポットから質量分析によるタンパク質の同定までを行なうシステムを導入済みであり、リン酸化タンパク質の染色試薬や濃

縮法を併用することで、網羅的に、かつ効率よくターゲットを絞ることが可能である。脂肪酸誘導性細胞死に対する影響を、過剰発現やノックダウンの手法で解析する。既知の PKC の基質に関する報告や、前述の Biacore 解析の結果、または脂肪酸が間接的に PKC を活性化した場合等を考慮し、変異体の作製や、新たなタンパク質の過剰発現系の導入、*in vitro* での系の構築、当該研究室で開発された化合物を用いた解析を行ない、脂肪酸誘導性細胞死における PKC の役割を調べる。

4. 研究成果

がん細胞選択的に細胞死を誘導することが知られているガンマリノレン酸 (GLA) に関して、AlamarBlue™ assay により細胞死誘導能を評価した。さらに細胞死への関与が報告されている代表的な PKC サブタイプ (alpha, gamma, delta, epsilon, zeta) を選択し、遺伝子クローニングと、Venus (蛍光タンパク質) 融合タンパク質の発現ベクターを作製した。HeLa 細胞を用いた過剰発現系を構築し、GLA 処理後の種々 PKC サブタイプの局在変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。

AlamarBlue™ assay により細胞死誘導能を評価した結果、GLA はがん細胞選択的に細胞死を誘導した。GLA 処理後の種々 PKC サブタイプの局在変化を観察した結果、PKCalpha と gamma は特に局在変化を示さなかった。一方 PKCdelta と zeta は、GLA を長時間処理すると、核近傍に集積する様子が観察された。脂肪酸処理時に核近傍で観察される脂肪油滴 (lipid droplet) を染色する Nile Red との共局在は観察されなかったことから、他の細胞小器官 (ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリア等) に移行していると考えている。当初の計画通り、細胞死を誘導する脂肪酸が、PKC を細胞膜以外のオルガネラへ移行させることが示された。脂肪酸を細胞に処理すると、核近傍で観察される脂肪油滴 (lipid droplet) が出現することを、lipid droplet を染色する Nile Red を用いて確認した。ラマン顕微鏡を用いた解析から、細胞死を誘導する脂肪酸である GLA やドコサヘキサエン酸 (DHA) は、lipid droplet に局在する様子が観察された。

今後は細胞内局在の判定のため各種オルガネラマーカーとの共染色と、脂肪酸処理後に見られる lipid droplet との関係について調べる必要がある。また脂肪酸との結合、局在変化に關与する PKC のドメインの解析を行なうため、SPR を利用した分子間相互作用解析装置 (Biacore) を用いた評価が必要である。さらに細胞死への関与が知られているタンパク質と、PKC が移行する細胞小器官に着目し、二次元電気泳動と質量分析による PKC の基質の同定と機能解析を行ない、脂肪酸誘導性細胞死における PKC の役割の解明につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

日本ケミカルバイオロジー学会 第七回年会(京都)2012年6月7日

「新規 PKC α 活性化阻害剤 IB-15A の構造活性相関と作用機序解明研究」

田村 結城, 平井 剛, 酒井 基成, 大窪 恵, 袖岡 幹子

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 結城 (TAMURA, Yuki)

独立行政法人理化学研究所

袖岡有機合成化学研究室

客員研究員

研究者番号: 50442984