

新しいプロテインキナーゼC分子種、nPKC η
及び nPKC θ の構造と機能について

指導教官 黒木登志夫教授

昭和63年4月

東京大学大学院医学系研究科

第3種博士課程(医学)

第三基礎医学専攻 入学

長田真一

①

新しいプロテインキナーゼC分子種、nPKC η
及びnPKC θ の構造と機能について

指導教官 黒木登志夫教授

昭和63年4月
東京大学大学院医学系研究科
第3種博士課程（医学）
第三基礎医学専攻 入学
長田真一
OSADA, Shin-ichi

目 次

略語表	1
序論	2
第一章 nPKC η の構造と機能について	
第一節 nPKC η の構造とその生化学的性質	4
第二節 上皮組織におけるnPKC η の発現	13
第三節 考察	22
第二章 nPKC θ の構造と機能について	
第一節 nPKC θ の構造とその生化学的性質	25
第二節 考察	35
第三章 総括と展望	36
材料	39
方法	46
参考文献	55
謝辞	62

略 語 表

ATP	= adenosine 5'- triphosphate
BSA	= bovine serum albumin
CBB	= Coomassie Brilliant Blue
cDNA	= complementary DNA
cPKC	= conventional PKC subfamily
cRNA	= complementary RNA
DAG	= diacylglycerol
DMBA	= 7,12-dimethylbenz(a)anthracene
DMEM(-)	= Dulbecco's modified Eagle's medium without serum
DMEM(+)	= Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum
DMSO	= dimethylsulfoxide
DNA	= deoxyribonucleic acid
dNTP	= deoxynucleoside 5'-triphosphate (A = adenosine G = guanosine C = cytidine T = thymidine)
ddNTP	= dideoxynucleoside 5'-triphosphate
DTT	= dithiothreitol
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	= ethyleneglycol bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid
³ H	= tritium
HEPES	= N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IgG	= immunoglobulin G
IP ₃	= inositol 1,4,5-trisphosphate
kb	= kilobase(s)
kDa	= kilodalton
KLH	= Keyhole limpet hemocyanin
MBS	= <i>m</i> -maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester
MES	= 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MNNG	= N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MOPS	= 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
nPKC	= novel PKC subfamily
PBS	= phosphate-buffered saline
PC	= phosphatidylcholine
PDBu	= phorbol 12,13-dibutyrate
PI	= phosphatidylinositol
PIP ₂	= phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	= protein kinase C
PMSF	= phenylmethylsulfonyl fluoride
PS	= phosphatidylserine
RNA	= ribonucleic acid
SDS	= sodium dodecyl sulfate
SDS - PAGE	= SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	= Tris-buffered saline
TEMED	= N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TPA	= 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate

序 論

生体は、優れた情報処理体である。生体は、個体レベル、組織レベル、細胞レベルで適切に情報を交換、処理してホメオスタシス (homeostasis) を保っている。この情報処理機構の破綻によりホメオスタシスが崩れた状態が、様々な疾患であり、癌であると考えられる。従って、個体レベルと細胞レベルの間の情報のやり取りを担う、ホルモン、増殖因子、神経伝達物質といった多彩な情報が、細胞膜上の特異的な受容体を介して、どのように細胞内に伝達され、処理されていくかを理解することは、生命を理解するための欠くことのできないアプローチの一つである。プロテインキナーゼC (PKC) は、1977年の発見以来、この情報伝達機構の解明のための一つの要諦を担ってきた (1-3)。

PKCは、本来、カルシウム、リン脂質要求性のセリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素として同定された (4-6)。PKCの細胞内情報伝達機構における重要性が認識されるようになる大きな契機となったのは、細胞膜イノシトールリン脂質 (PI) の代謝産物の一つである、ジアシルグリセロール (DAG) が、PKCのセカンドメッセンジャーとして働くことの発見であった (7, 8)。続いて、細胞に多様な作用を引き起こす、フォルボールエステル型の発癌プロモーター、TPAによりPKCが特異的に活性化されることが発見された (9-11)。以来、生理的なPKC活性化物質のDAGのホモログとして、TPAを用いた細胞のPKC応答の解析が進められてきた。

最近、DAGの産生経路として、PI代謝のほかにフォスファチジルコリン (PC) 代謝の重要性も指摘されている (12)。即ち、PKCシステムがPC代謝系によっても作動されると考えられてきており、極めて多くのレセプター系による情報伝達に、DAG-PKCシステムが関与していることが示唆されるに至った。

一方、ここ数年の間に、PKCが複数の酵素分画に分離され (13-18)、また、主に脳のcDNAライブラリーから数種のPKC関連クローンが単離された (19-30)。これにより、従来単一蛋白質であると考えられてきたPKCは、異なる組織分布を持つ、複数の分子種からなるファミリーを形成していることが明らかになった (31-34)。我々はこれを、構造、及び生化学的性質の点から、cPKC (conventional PKC) とnPKC (novel PKC) とに分けて考えている (24, 33, 34) (図1)。

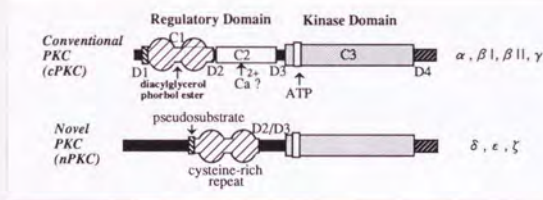


図1 cPKC, nPKC分子種の構造の模式図

但し、nPKC ζ は、cysteine-rich repeat 配列の片方を欠く。

cPKCは、 α 、 β I、 β II、 γ の4つの分子種よりなり、酵素学的には、その活性に Ca^{2+} 、リン脂質、DAGを必要とすることで、また、構造上は、3つの保存領域 (conserved region; C1, C2, C3) を持つことで特徴づけられる。C1領域は、リン脂質、DAG、フォルボールエステルの結合部位であり、特徴的な構造として、Znフィンガー様のシステイン残基に富む配列 (cysteine-rich repeat sequence) を持つ。C2領域は、 Ca^{2+} の結合領域と考えられており、C3領域は、他のプロテインキナーゼとも相同性を持つキナーゼドメインである。各C領域の間には、D領域 (divergent region; D1~D4) が存在している。 β Iと β IIは、D4領域の配列のみが異なっており、これは単一の遺伝子の alternative splicing に由来する (35-37)。nPKCとcPKCの構造上の最も大きな差は、nPKCがC2領域を欠いていることであり、これを反映して、これまでに単離されたnPKC分子種 (δ , ϵ , ζ) のキナーゼ活性は Ca^{2+} 非依存性である (24, 29, 34, 38, 85)。

私は、博士過程において、発癌プロモーションの研究の流れの中で、PKCを介する情報伝達機構の研究に携わってきた。マウスでは、皮膚を用いた発癌実験系が確立しており、この系の中で、TPAはイニシエーターによって生じた「初期の癌細胞」 (initiated cell) の増殖を促進する強力な発癌プロモーターとして知られている。

PKCの活性化物質であり、また発癌プロモーターでもあるという、TPAのもつ二面性の接点を探るべく、マウス皮膚の発癌プロモーションの過程において、どのPKC分子種が重要な役割を担っているかを調べる過程で、マウス皮膚のcDNAライブラリーより新しいPKC分子種、nPKC η (eta) と nPKC θ (theta) をクローニングした (39)。

本論文では、第一章でnPKC η 、第二章でnPKC θ の構造と機能について述べ、第三章で全体の総括と今後の展望について考察する。

第一章 nPKC η の構造と機能について

第一節 nPKC η の構造とその生化学的性質

【nPKC η の cDNA の単離】

マウス皮膚のcDNA ライブラリーをウサギのcPKC α 、 β II、 γ 、nPKC ϵ 、 ζ のcDNA断片、及びnPKC δ のオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングを行った。スクリーニングした約50万の独立したクローンのうち、インサート長が十分であり、上記のプローブのいくつかと明らかにクロスハイブリダイズする9つのクローン (A1, A6, A8, A9, A21, A24, A26, A29, A35) を選んだ。

A6, A21, A24の3つのクローンは、 $\epsilon > \beta$ II、 $\gamma > \zeta$ の順に強くハイブリダイズし、部分シーケンスの結果、これら3クローンは、同一の mRNA由来の互いに重複する cDNAクローンであることが分かった。このうち最も長い A24 のインサートは、約3.2 kbであったが、内在するEcoRI 部位を利用して、A24L (~2.2 kb) とA24S (~1.0 kb) の2つの断片に分けて解析した。クローンA24Lの5'末端側には、ATG開始コドンが2箇所認められたが(図2B、▼▼▼、▼▼▼)、より5'側のATG(▼▼▼)の方が、その周囲の配列がKozakの提唱した翻訳開始点のコンセンサス配列CCACCATG(40)により近いので、このATGのAを翻訳開始点と推定した。クローンA24Sは、3'末端側の非コード領域を含んでいたが、ポリ(A)鎖もポリ(A)シグナルも認められなかった。

図2AにクローンA24Lの制限酵素地図とシーケンシングの実際を示した。A24Lは、2,176塩基よりなり、計算上の分子量77,972の蛋白質をコードする、683個のアミノ酸からなるopen reading frame を含んでいた。このA24Lのアミノ酸配列は、後述するように、PKCファミリーのうちで、nPKC ϵ と最も高い相同性を示したが、動物種を超えて(この場合はウサギとマウス)ほぼ完全に保存されているC1、C2、C3、D4領域での相同性が高くても75%程度であったため新しい分子種と考え、nPKC η (eta)と名付けた。

残りのクローンのうち、A8はnPKC δ をコードしていた。また、A29は第二章で述べるように、新しいPKC分子種 nPKC θ をコードしていることが判明した。A1、A9、A26、A35については、PKCファミリーと同一とするに足る相同性は認められなかった。なお、ヒトの培養表皮細胞のcDNAライブラリーから、PKC-LというPKC関連遺伝子が独立にクローニングされているが、アミノ酸配列の相同性からみて、この PKC-L は nPKC η のヒトのホモログであると考えられる(41)。

【nPKC η と他のPKC分子種とのアミノ酸配列の相同性】

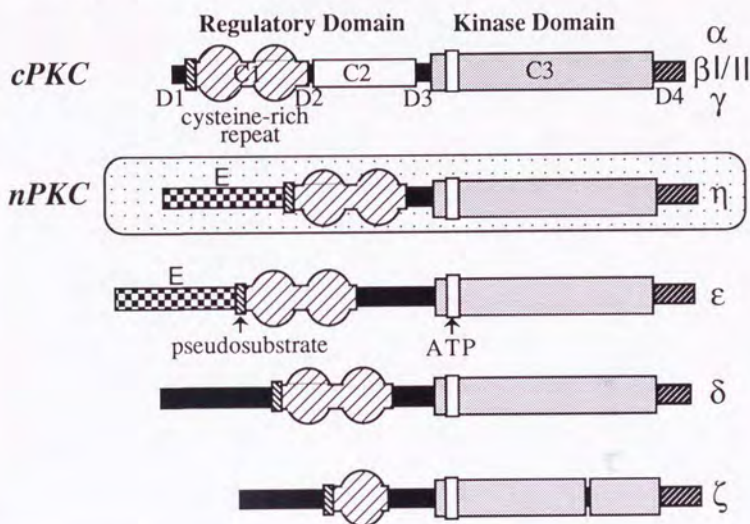


図3 nPKC η を中心としたPKC分子種の構造の模式図

図3にnPKC η を含むPKCファミリーの構造の模式図を示した。nPKC η は、C1及びC3領域を持つが、cPKCに保存されているC2領域を欠いており、構造から言って、nPKCに属すると考えられる。

表1 nPKC η と他のPKC分子種間のアミノ酸配列の相同性(%)
相同性30%以下は実線で示した。

	D 1	C 1	C 3	D 4
α	——	48.0	61.7	31.5
β I/II	——	48.6	62.4	36.0 / 34.6
γ	——	48.0	59.6	——
δ	——	45.2	60.1	37.3
ϵ	53.3	74.8	74.4	52.1
ζ	——	34.9	52.2	34.0

表1で nPKC η と他のPKC分子種間のアミノ酸配列の相同性を比較した。nPKC η は、PKCファミリーのうちで、nPKC ϵ とC1領域で74.8%、C3領域で74.4%、D4領域で52.1%と最も高い相同性を示した。更に、これまで分離されたPKC分子種間で相同性の指摘されていなかったD1領域において、nPKC η とnPKC ϵ の間に53.3%の相同性が認められ、 ϵ と ϵ にちなんでE領域と名付けた(図4A、次頁)。

nPKC η のC1領域には、PKCファミリーに共通なシステイン残基に富む配列(cysteine-rich sequence)、Cys-X₂-Cys-X₁₃₍₁₄₎-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X₇-Cys(Xは任意のアミノ酸)があり、nPKC η を除く他のPKC分子種同様、この配列が2回繰り返されている(図4B、次頁)。(但し前述のPKC-Lにおいては、後半の配列の6個のシステイン残基のうち2個が保存されていない。) また、前半の配列の2番目と3番目のシステイン残基間のアミノ酸の数が14個なのはnPKC η と nPKC ϵ のみである。

C1領域のN端には、塩基性残基に富む配列がある。cPKC α のこの部分由来の合成オリゴペプチドが競合的にキナーゼ活性を阻害する一方で、このペプチドのアラニン残基をセリン残基に変換すると、このキナーゼの良い基質になることが報告されている(42)。PKC分子種では、このアラニン残基を含む擬基質配列(pseudosubstrate)はある程度保存されているが、nPKC η と nPKC ϵ の保存性は特に高い(図4B)。

nPKC η のC3領域(キナーゼドメイン)においても、PKCファミリーを含む様々な蛋白質リナーゼ酵素に共通なATP結合部位(Gly-X-Gly-X₂-Gly-X₁₆-Lys)が保存されていた(図4C、次頁)。最近、cPKC α のキナーゼ活性において、この部位のリジン残基(Lys³⁶⁸)が必須であることが報告されている(43)。

A

nPKC α	MSSTGKMGVYLRVRCENALCQVETKNSLSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	89
nPKC ϵ	MVVVYGLAKIKICENALCQVETKNSLSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	86
nPKC δ	TFVYDHPVANCITQVETKNSLSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	154
nPKC ζ	APITDQVYANCITQVETKNSLSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	152
nPKC η	100 GKAFPLDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	117

B

	pseudosubstrate		
PKC α	RFARKEGALNQKNVHEVQKKEFIARFPKQPTFCSCDTPFNG-PGRQGQQQVCCFVHRRCHREFTVSCPGADKGPOTDPRSK-----	101	
PKC β	RFARKEGALNQKNVHEVQKKEFIARFPKQPTFCSCDTPFNG-PGRQGQQQVCCFVHRRCHREFTVSCPGADKGPOTDPRSK-----	101	
PKC γ	RFARKEGALNQKNVHEVQKKEFIARFPKQPTFCSCDTPFNG-PGRQGQQQVCCFVHRRCHREFTVSCPGADKGPOTDPRSK-----	100	
nPKC δ	RFARKEGALNQKNVHEVQKKEFIARFPKQPTFCSCDTPFNG-PGRQGQQQVCCFVHRRCHREFTVSCPGADKGPOTDPRSK-----	243	
nPKC ϵ	RFARKEGALNQKNVHEVQKKEFIARFPKQPTFCSCDTPFNG-PGRQGQQQVCCFVHRRCHREFTVSCPGADKGPOTDPRSK-----	240	
nPKC ζ	RFARKEGALNQKNVHEVQKKEFIARFPKQPTFCSCDTPFNG-PGRQGQQQVCCFVHRRCHREFTVSCPGADKGPOTDPRSK-----	228	
nPKC η	RFARKEGALNQKNVHEVQKKEFIARFPKQPTFCSCDTPFNG-PGRQGQQQVCCFVHRRCHREFTVSCPGADKGPOTDPRSK-----	195	
PKC α	--HKFKINTGSPPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	166	
PKC β	--HKFKINTGSPPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	166	
PKC γ	--HKFKINTGSPPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	165	
nPKC δ	1PKFNVNVNVPPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	310	
nPKC ϵ	1PKFNVNVNVPPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	307	
nPKC ζ	1PKFNVNVNVPPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	295	
nPKC η	1PKFNVNVNVPPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA		

C

PKC α	QKVLDTDFNPLVYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	418
PKC β	QKVLDTDFNPLVYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	421
PKC γ	QKVLDTDFNPLVYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	435
nPKC δ	QKVLDTDFNPLVYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	434
nPKC ϵ	QKVLDTDFNPLVYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	486
nPKC ζ	QKVLDTDFNPLVYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	426
nPKC η	QKVLDTDFNPLVYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	331
PKC α	YVNGGDMYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	509
PKC β	YVNGGDMYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	512
PKC γ	YVNGGDMYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	526
nPKC δ	YVNGGDMYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	525
nPKC ϵ	YVNGGDMYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	577
nPKC ζ	YVNGGDMYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	517
nPKC η	YVNGGDMYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	422
PKC α	IAYQPTKSDVNMVSPGVLYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	592
PKC β	IAYQPTKSDVNMVSPGVLYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	595
PKC γ	IAYQPTKSDVNMVSPGVLYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	609
nPKC δ	IAYQPTKSDVNMVSPGVLYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	609
nPKC ϵ	IAYQPTKSDVNMVSPGVLYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	662
nPKC ζ	IAYQPTKSDVNMVSPGVLYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	596
nPKC η	IAYQPTKSDVNMVSPGVLYVQKNSLSPKKGHO-LADNLTVSVDQVRYQGTSTKQKNTYNNKCANVTDGHLAEVPRH	513
PKC α	SHAPFRIDWKLKKEIKQPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	672
PKC β	SHAPFRIDWKLKKEIKQPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	671
PKC γ	SHAPFRIDWKLKKEIKQPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	673
nPKC δ	SHAPFRIDWKLKKEIKQPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	697
nPKC ϵ	SHAPFRIDWKLKKEIKQPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	683
nPKC ζ	SHAPFRIDWKLKKEIKQPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	736
nPKC η	SHAPFRIDWKLKKEIKQPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	673
nPKC η	SHAPFRIDWKLKKEIKQPTFCCHGSLLYG-LIHQMKCCTCDNNVHRCQVNVPSLCGMHTEKRGRIYLKA	592

図4 nPKC η と他のPKC分子種のアミノ酸配列の比較

cPKC α 、 β I/II、 γ 、nPKC ϵ はウサギ、nPKC δ 、 ζ はラットの配列を示した。nPKC η の配列と同一の残基には編目を掛けた。A: nPKC η とnPKC ϵ のD1領域の相同性。B: C1領域の相同性。■: 擬基質配列の中で保存されているアラニン残基、* cysteine-rich repeat 配列中のシステイン残基、C: C3領域の相同性。●: ATP結合部位に保存されているグリシン、及びリジン残基。

【nPKC η のmRNAの発現】

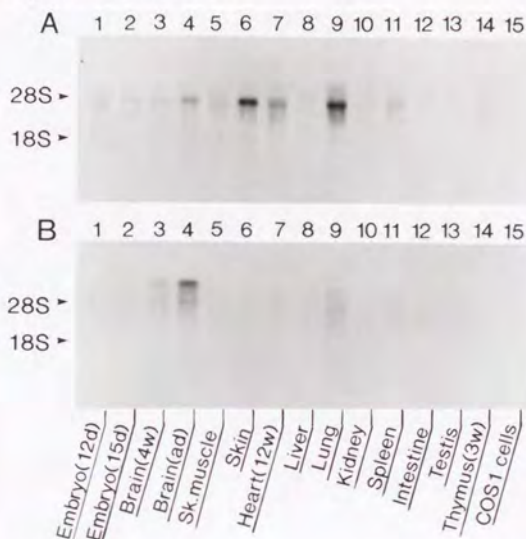


図5 ノーザンブロット分析によるnPKC η とnPKC ϵ の組織分布の比較

A: nPKC η の発現。転写産物の大きさは4.3kb。B: nPKC ϵ の発現。転写産物の大きさは7.2kb。nPKC η 、 ϵ 共に全長をコードするマウスのcDNAをプローブとして用いた。各レーンには5 μ gの全RNAを重層した。18S、28SはリボソームRNAの位置を示す。

nPKC η のmRNAの組織分布を、マウスの胎児及び諸臓器から抽出した全RNAを用いてノーザンブロット法により解析した。図5Bに、PKCファミリーのうち、nPKC η と最も相同性の高いnPKC ϵ の発現を比較として示したが、これまでに単離されたPKC分子種は、このnPKC ϵ のように、脳での発現が他の臓器に比べ高いのが特徴であった(3, 21, 22, 24, 26, 31, 34, 44, 45)。これに対して、nPKC η は、他の分子種とは異なり、脳よりもむしろ皮膚、及び肺での発現が高いという特徴的な分布を示した(図5A)。

【nPKC η のフォルボールエステル結合能】

前述したように、nPKC ξ を除くPKC分子種は、C1領域にcysteine-rich sequenceを2回繰り返して持っているが、この領域がフォルボールエステルの受容体活性を担っていると考えられており(46, 47)、実際、nPKC ξ 以外は、フォルボールエステルに結合することが確かめられている。

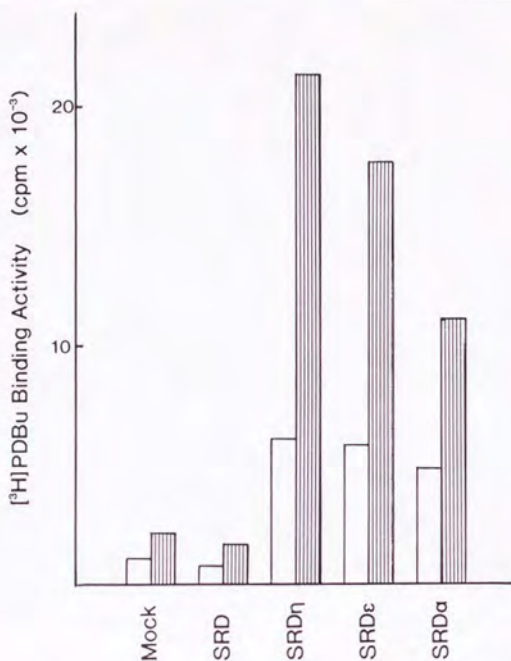


図6 nPKC η のフォルボルエステル結合活性

open column は終濃度10nMの、hatched column は終濃度50nMの $[^3\text{H}]$ PDBu存在下にアッセイした。SRDはベクターのみ、SRD η 、SRD ϵ 、SRD α は、それぞれnPKC η 、nPKC ϵ 、cPKC α の全蛋白質コード領域を含むcDNAをトランスフェクトしたことを示す。

nPKC η も、この繰り返し配列を持つことから、フォルボルエステルに結合することが予想された。そこで、COS1細胞にnPKC η のcDNAをトランスフェクトし、終濃度10nM、及び50nMの $[^3\text{H}]$ PDBu存在下で、フォルボルエステル結合能を検討した(図6)。終濃度10nMでは、nPKC η 、 ϵ 、cPKC α のcDNAをトランスフェクトしたCOS1細胞の受容体活性は、ほぼ同程度であった。終濃度50nMでは、nPKC η 、 ϵ 、cPKC α の受容体活性は、10nMの時にに対してそれぞれ、3.5倍、3.0倍、2.3倍の上昇を示した。このことは、nPKC η 、 ϵ はPDBuの濃度変化に対し、cPKC α よりも高感受性であることを示している。なお、COS1細胞には、内在性にcPKC α が存在していることが知られており、mock及びSRDベクターのみをトランスフェクトしたCOS1細胞の受容体活性は、この内在性のcPKC α の活性を反映しているものと考えられる。

【nPKC η の蛋白レベルでの同定】

nPKC η のC末端側の18アミノ酸残基に対する抗体をウサギに免疫して作製し、nPKC η の蛋白レベルでの同定に用いた。

nPKC η の全アミノ酸配列をコードするcDNA発現ベクターをCOS 1細胞にトランスフェクトしたところ、上記の抗体により、細胞質分画、Triton可溶性分画、Triton不溶性分画のいずれの分画においても、nPKC η のcDNA特異的に約82-kDaの蛋白が同定された（図7、レーン4～7）。このバンドは、コントロール血清では検出できなかった（レーン10, 11）ので、この82-kDaの蛋白質がnPKC η であると考えられる。82-kDaより分子量の小さいバンドは、この蛋白の分解産物に反応したものである。この82-kDaのバンドは、mRNAの発現が高かった肺のTriton不溶性分画においても同定することができ（レーン8）、nPKC η は、実際に細胞内蛋白としても存在していることが確認できた。

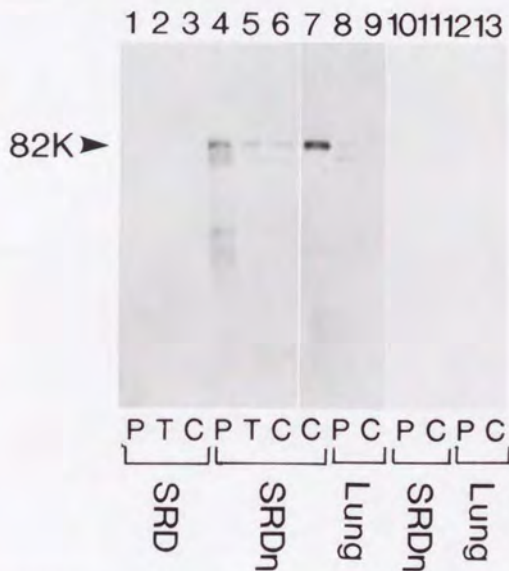


図7 ウェスタンブロットによるnPKC η の蛋白レベルでの同定

P ; Triton 不溶性分画、T ; Triton 可溶性分画、C ; 細胞質分画。SRD η は、nPKC η の全長をコードするcDNA発現ベクターをトランスフェクトしたことを示す。レーン1～9は、nPKC η 特異的抗ペプチド抗体と、レーン10～13は、コントロール血清と反応させた。

【nPKC η のキナーゼ活性】

COS1細胞中に発現させた nPKC η を、抗nPKC η 抗体で免疫沈降させ、その沈降物の自己リン酸化能を検討した。アッセイは0.1 μ M TPA、及び50 μ g/ml のPS 存在下、Ca²⁺ 非存在下で行った。図8に示したように、nPKC η のcDNA特異的に82-kDaのバンドがリン酸化され、nPKC η が蛋白質キナーゼであることが確かめられた。

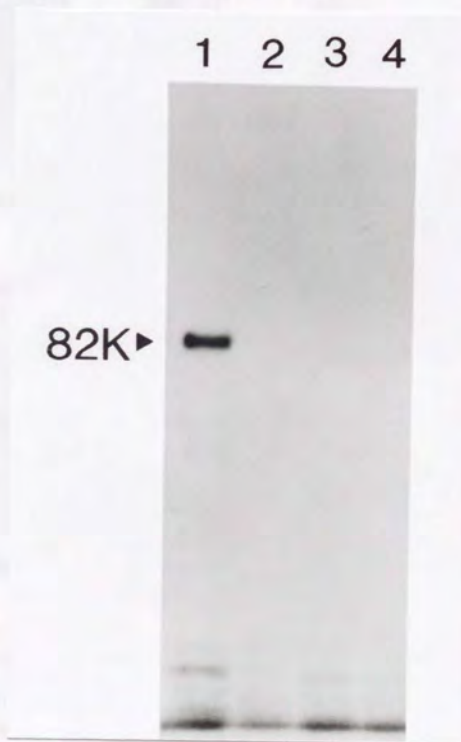


図8 nPKC η の自己リン酸化活性

nPKC η のcDNAをトランスフェクトしたCOS1細胞抽出液（レーン1, 2）とベクターのみをトランスフェクトしたCOS1細胞抽出液（レーン3, 4）を抗nPKC η 抗体（レーン1, 3）またはコントロール血清（レーン2, 4）で免疫沈降させた。免疫沈降物は、自己リン酸化反応後、SDS-PAGEにかけ、オートラジオグラフィーで検出した。

第二節 上皮組織におけるnPKC η の発現

【皮膚、及び消化管上皮におけるPKC分子種の発現】

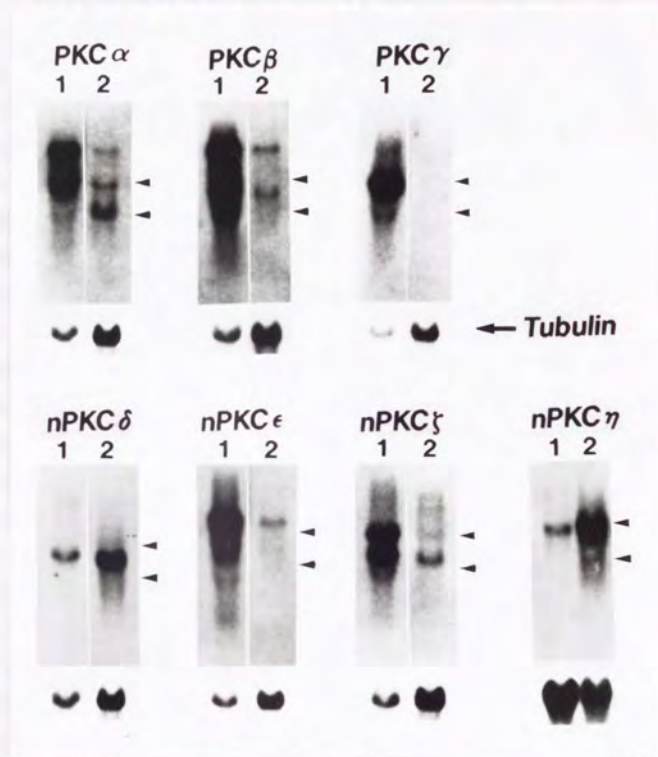


図9 マウス皮膚におけるPKC分子種の発現

レーン1；脳の全RNA、レーン2；皮膚のポリ(A)RNA。但し、nPKC η のみ全RNA。各レーンのRNA量は、チューブリンの発現量でモニターした。arrowhead は、それぞれ28S、18S のリボソームRNAの位置を示す。

我々の研究室では、発癌実験材料として有益なマウスを用いて実験を進めてきた。そこで、まず、マウスの脳、及び皮膚のcDNAライブラリーを、ウサギの既知のPKCのcDNA断片をプローブとしてスクリーニングし、PKC分子種各々についてマウスのcDNAを新たに単離した（未発表）。

こうして得たマウスのcDNAをプローブとして、発癌プロモーターの標的臓器である、マウスの皮膚におけるPKC分子種のmRNAの発現をノーザンブロット法で調べた(図9)。その結果、皮膚における主要なPKC分子種は、nPKC η とnPKC δ であることが分かった。特に、デンシトメーターによる測定の結果、nPKC η の皮膚における発現は、脳における発現の9.5倍であった(nPKC δ では1.3倍)。cPKC α 、 β 、nPKC ϵ 、 ζ の皮膚での発現は全RNAレベルでは検出できず(データ提示せず)、ポリ(A)RNAレベルでシグナルが検出できる程度であった。cPKC γ については、シグナルは認められなかった。更に、nPKC η の発現は、マウスの表皮細胞由来のBALB/MK2細胞で認められたのに対し、真皮などの結合組織を形成する線維芽細胞系の培養細胞、Balb3T3細胞や3Y1細胞等では認められなかった(データ提示せず)。

以上の結果から、nPKC η は広く上皮系の機能に関与しているのではないかと考え、この可能性を検証するため、マウスの前胃(F. Stm)、腺胃(G. Stm)、小腸、大腸といった消化管上皮からポリ(A) RNAを抽出し、ノーザンブロット法でnPKC η の発現を、他のPKC分子種のそれと比較した(図10、次頁)。その結果、nPKC η の発現は、上記の消化管上皮全てにわたって認められたが、特に、皮膚と同様角化する傾向を持ち、扁平上皮からなる前胃で最もシグナルが強かった。

nPKC δ は、nPKC η 同様全ての消化管上皮で発現が認められたが、腺胃、小腸、大腸での発現はむしろnPKC η よりも強かった。cPKC α は、消化管上皮のうちで前胃でのみ強い発現が見られた。興味深いことに、ここで見られたバンドの大きさ(2.4kb)は、これまでcPKC α のバンドとして報告されている2本のバンド(8.5kb、4.0kb)よりも小さいものであった。nPKC ζ も小腸、大腸の上皮で強い発現が見られた。脳では上下2本のバンド(4.3kb、2.3kb)はほぼ同じ程度の強度であるのに対し、小腸、大腸では、下方のバンドの方が強かった。nPKC ϵ では、消化管上皮で若干のシグナルを認めたが、cPKC β 、cPKC γ の消化管上皮での発現は認められなかった。

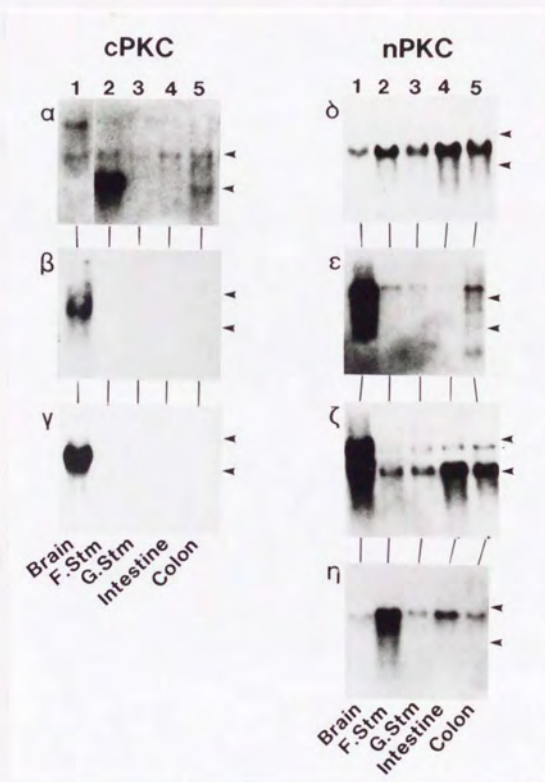


図10 マウス消化管上皮におけるPKC分子種の発現
 脳は全RNA、他の臓器はポリ(A)RNAを用いた。F. Stmは前胃、G. Stmは腺胃を表す。

【上皮におけるnPKC η の局在】

nPKC η の転写産物の上皮組織、及び脳における分布を*in situ* ハイブリダイゼーション法により検討した。プローブとしては、nPKC η のD1領域、及びD2/D3領域に相当するcRNA断片を、ジゴキシゲニン (digoxigenin) でラベルしたものを用いた。ハイブリダイゼーション後、ジゴキシゲニン化したRNAプローブは、酵素免疫化学的に発色させた。アンチセンスcRNAプローブを転写産物の検出に用い、センスcRNAプローブはネガティブコントロール用とした。

皮下組織 真皮 表皮

図11A

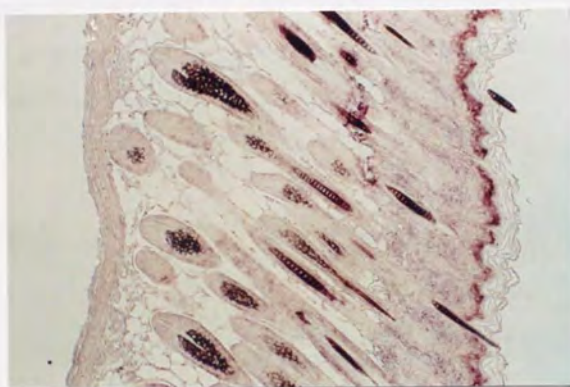


図11B

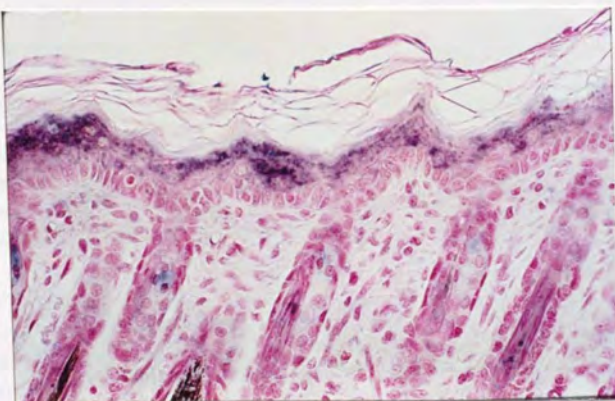


図11C

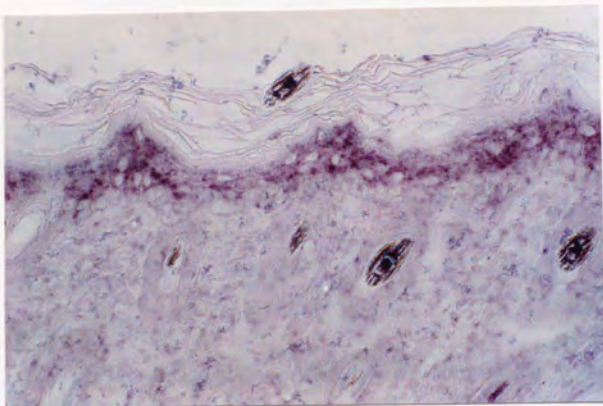


図11D

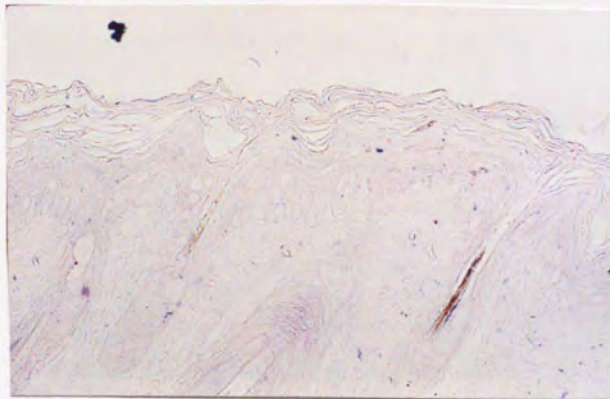


図11 皮膚におけるnPKC η の *in situ* ハイブリダイゼーション

A; 皮膚全体、B-D; 表皮。用いたプローブは以下の通りである。プローブは全てジゴキシゲニン化し、酵素免疫化学的に発色させた。A; D1領域のアンチセンスcRNAプローブ。B; Aと同様。サフランINでカウンター染色を施した。C; D2/D3領域のアンチセンスcRNAプローブ。D; D1領域のセンスcRNAプローブ。

皮膚において、nPKC η の転写産物のシグナルは、専ら表皮において認められ、真皮、皮下組織、及び毛、毛根（メラニン色素が黒く見えている）、立毛筋、汗腺、皮脂腺といった付属器では認められなかった（図11 A, B）。センスcRNAプローブでは、このシグナルは検出できなかった（図11D）。また、興味深いことに、このシグナルは、増殖の盛んな基底細胞層では認められず、それより上層の細胞層に強く現れた。この傾向は、D1、D2/D3領域双方のRNAプローブで確かめられた（図11 B, C）。

nPKC η の転写産物のシグナルは、舌の糸状乳頭、食道上皮、前胃といった、いずれも角化傾向を示す部位で強く認められた (図12 A, B, C)。また、糸状乳頭、前胃においても、皮膚と同様、基底層よりもむしろその上層の細胞層で強いシグナルが認められた。

図12A

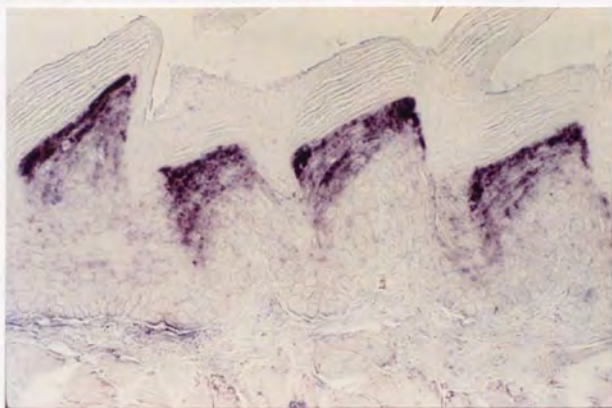


図12B

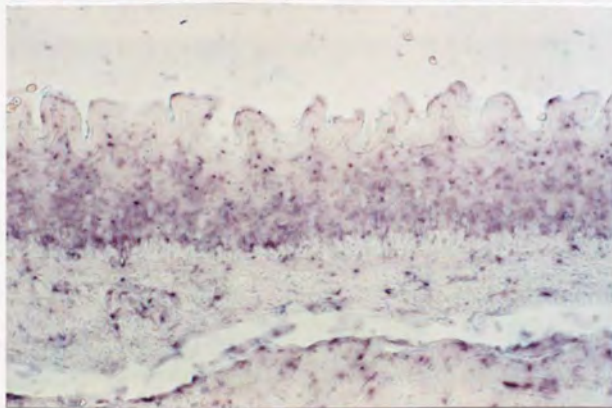
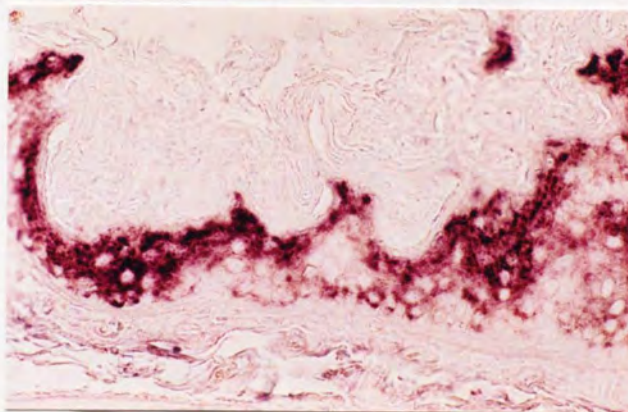


図12C



腺胃、小腸においては、ノーザンブロット分析の結果と一致して、nPKC η の強いシグナルは認められなかった。腺胃では、特定の細胞にシグナルが限局することなく、表層粘液細胞 (surface mucous cell)、頸部粘液細胞 (mucous neck cell)、胃酸を分泌する壁細胞 (parietal cell)、ペプシノーゲンを分泌する主細胞 (chief cell)などにシグナルが認められた (図12 D)。小腸では、絨毛の上皮でシグナルが認められたが、増殖の活発な陰窩 (crypt) の細胞では認められなかった (図12 E)。

図12D

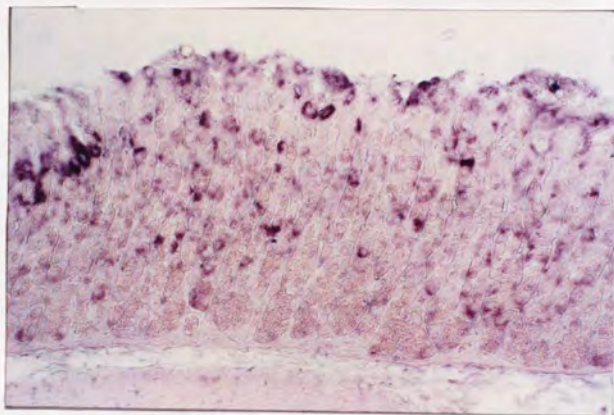


図12E



脳では、海馬の錐体細胞層 (pyramidal cell layer)、歯状回の顆粒細胞層 (granular cell layer)、小脳のプルキンエ細胞層 (Purkinje's cell layer) で nPKC η のシグナルが認められた (図12 F, G, H)。

図12F



図12G

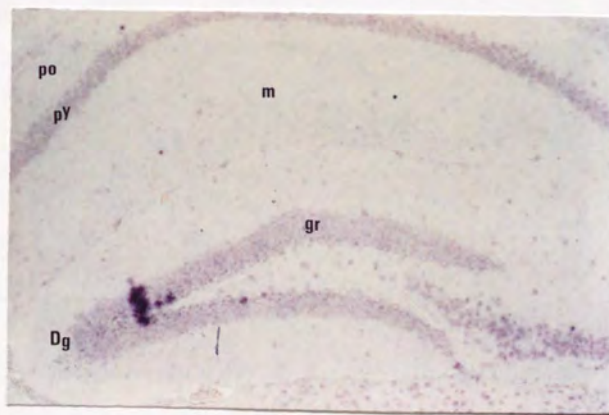


図12H

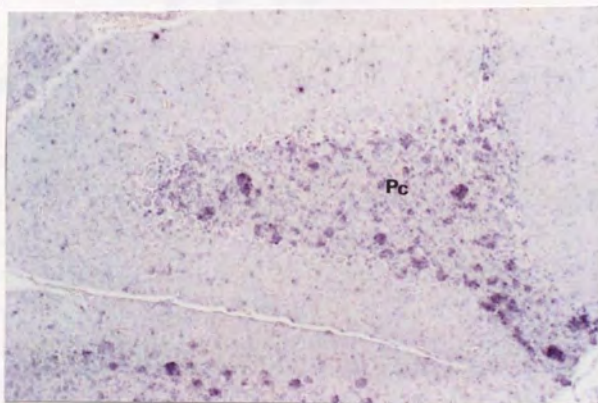


図12 消化管上皮、及び脳におけるnPKC η の*in situ*ハイブリダイゼーション
D1領域のアンチセンスcRNAをプローブとして用いた。A；舌の糸状乳頭。B；食道。C；前
胃。D；腺胃。E；小腸。cr；陰窩 (crypt)、v；絨毛 (villi)。F；脳の冠状断面。hi；海馬 (hippo-
campus)。G；海馬部の拡大図。Dg；歯状回 (dentate gyrus)、gr；顆粒細胞層 (granular cell layer)、
m；分子層 (molecular layer)、po；多形細胞層 (polymorphic layer)、py；(錐体細胞層 pyramidal cell
layer)。H；小脳。Pc；プルキンエ細胞 (Purkinje's cell)

第三節 考察

【上皮組織とnPKC η 】

nPKC η は、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、消化管上皮、特に皮膚と同様角化傾向をもつ舌の糸状乳頭、食道、前胃といった組織で高い発現が見られ、扁平上皮系とnPKC η の発現に強い関連がみられた。中でも興味深いことに、糸状乳頭におけるnPKC η の局在は、図13のanterior columnと呼ばれる部位に一致していた。anterior columnとposterior columnでは、張原フィラメント (tonofilament)、リボソーム、リン脂質、カルシウム等の含有量が異なることが知られている (48)。更に、anterior column は、皮膚の顆粒層 (stratum granulosum) に相当し (48)、上皮の分化のマーカであるケラチン (keratin) の発現パターンを見ると、anterior column では「皮膚型」のケラチンが、posterior column では「食道型」のケラチンが発現していることが報告されている (49)。

nPKC η のシグナルは、また、皮膚、糸状乳頭、前胃において、増殖の盛んな基底細胞よりも、その上層の分化の進んだ細胞層で強く認められた。この局在パターンは、nPKC η 特異的抗ペプチド抗体を用いた免疫組織染色でも確認され (未発表)、nPKC η は、増殖よりも分化に関与していることが示唆された。各組織には、それぞれ複数のPKC分子種が存在が知られているが、このような結果は、ある組織の増殖、分化といった過程にそれぞれ別のPKC分子種が関係している可能性を示している。

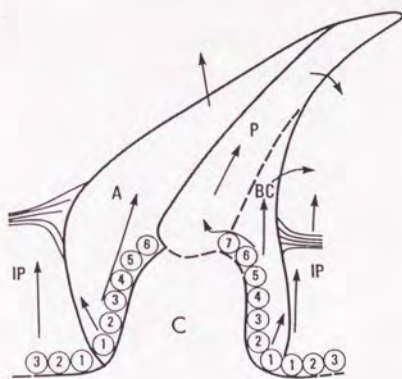


図13 舌の糸状乳頭の矢状断面の模式図

A; anterior column, BC; buttress column, C; connective tissue core, IP; interpapillary epithelium, P; posterior column.

【皮膚における主要PKC分子種とその標的蛋白】

ノーザンブロット分析により、マウスの皮膚における主要なPKC分子種は、nPKC η と nPKC δ であることが分かった。この結果は、マウスの皮膚においてCa²⁺非依存性のPKC活性 (nPKC活性) を生化学的に検出したこれまでの報告と一致している (50, 51)。nPKC δ については、正常皮膚、乳頭腫 (papilloma)、上皮腫 (carcinoma) におけるその存在が、特異抗体を用いた免疫組織染色により確かめられている (52)。

一方、*in vivo* のマウスの皮膚、及び表皮の培養細胞を用いて、TPA処理によりリン酸化の上昇する蛋白を同定し、PKCの基質を捜す試みがなされてきた。このようにして見つかった5つの蛋白のうち、4つはそれぞれ、MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) (53, 54)、核膜の裏打ち蛋白であるラミンB₂ (55)、クレアチンキナーゼB (56-58)、ストレス蛋白のhsp28 (未発表) であることが分かった。これらの蛋白が、nPKC η 、 δ の特異的な基質であるのか、あるいは、これらの蛋白のリン酸化のもたらす生理的な意味については今後の課題である。

【PKCと発癌プロモーション】

nPKC η と nPKC δ が、皮膚における主要なPKC分子種であることから、マウス皮膚におけるTPAの発癌プロモーション作用が、これらのnPKC分子種を介していることが予想された。しかし、DMBA、TPA、MNNGをそれぞれイニシエーター、プロモーター、プログレッサーとするプロトコル (59, 60) に基づいて作ったマウスの乳頭腫、上皮腫において、nPKC η 、あるいは、nPKC δ のmRNAの発現が上昇している結果は得られなかった (61)。

ところが、最近、(1) 発癌プロモーションには通常TPAを週2回、数週間にわたって塗布することが必要であり、この様な状態では、PKCはむしろダウン・レギュレーション(down regulation) されていると考えられること (62)、(2) TPA による発癌プロモーションに感受性の高い、SENCARマウスの皮膚のPKC活性は、抵抗性のC57BL/6J マウスのそれよりも低いこと、(3) マウス、ヒトの癌組織のPKC活性は周囲の正常組織より低いこと (63) などから、TPAによる発癌プロモーションは、PKCの活性化よりもむしろ、そのダウン・レギュレーションと関係があるのではないか、という仮説が提出されている (64)。前述の結果についても、乳頭腫、上皮腫においてnPKC η 、nPKC δ が必ずしも恒常的に活性化されている必要はない。PKCの活性化＝増殖の促進という見方から離れて、発癌プロモーションを考えてみる必要があると思われる。

【nPKC η の脳における発現】

nPKC η は、ノーザンブロット分析の結果、脳での発現は低かったが、*in situ* ハイブリダイゼーションでは、海馬の錐体細胞、及び小脳のプルキンエ細胞でシグナルが認められた。脳特異的なPKC分子種、cPKC γ についても、小脳のプルキンエ細胞や海馬に豊富に存在するという報告があり(65, 66)、nPKC η の脳での分布は、cPKC γ のそれと非常に類似している。

記憶や学習と密接な関係があるものとして、長期増強(LTP; Long-Term Potentiation, シナプスの伝達効率が、そのシナプスへの入力条件により長期間増強される現象)が知られている。この長期増強は、海馬において初めて報告され、長期増強の誘発のためにはPKCの賦活化が必要であることが見いだされている(67)。一方、小脳においては、長期抑制(LTD; Long-Term Depression)という現象の誘発にPKCの活性化が必要であることが、培養プルキンエ細胞を用いた実験から示唆されている(68)。nPKC η の脳における役割は今のところ不明であるが、その小脳のプルキンエ細胞や海馬における存在は、上記の現象を鑑みると非常に興味深い。

nPKC θ は、前章の nPKC η 同様、マウス皮膚の cDNA ライブラリーをウサギの cPKC α 、 β II、 γ 、nPKC ϵ 、 ζ の cDNA、及び nPKC δ のオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングを行い、nPKC δ と強く、cPKC β II、 γ 、nPKC ϵ 、 ζ とはわずかにクロスハイブリダイズするクローン A-29 として同定された。シーケンスの結果、この A-29 は nPKC θ の全長を含んでいなかったため、プローブ A (図 14A) を用いてマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし直し、nPKC θ の全蛋白質コード領域を含むクローン I-7 とこれより 3' 末端側に長いクローン I-26 を得た (図 14A)。A-29、I-7、I-26 の 3 種の cDNA クローンの部分シーケンスは完全に一致した。これら 3 種のクローンは、全体で 3,313 塩基をカバーし、計算上 81,571 の分子量を持つ 707 個のアミノ酸からなる nPKC θ 蛋白をコードしていた (図 14B)。これは、nPKC θ が PKC ファミリーの中で、nPKC ϵ に次いで大きな分子種であることを意味している。

図 14B の ATG 開始コドンの上流には、in-frame の終結コドンが含まれていなかったが、i) ATG 直前の CAACC という配列が、Kozak の提唱した翻訳開始点のコンセンサス配列 CCACCATG (40) に良く似ていること、ii) 後述するように、この cDNA (Sac II - Sac I 断片、図 14A) は COS1 細胞中で 79-kDa の蛋白に翻訳されたこと、この 2 点から図の塩基番号 1 番から 3 番までの ATG が実際の翻訳開始点であると考えられた。1,101 塩基からなる 3' 末端の非コード領域には、ポリ(A)鎖は含まれていなかったが、3 つのポリ(A)シグナルが認められた。

【nPKC θ と他の PKC 分子種とのアミノ酸配列の相同性】

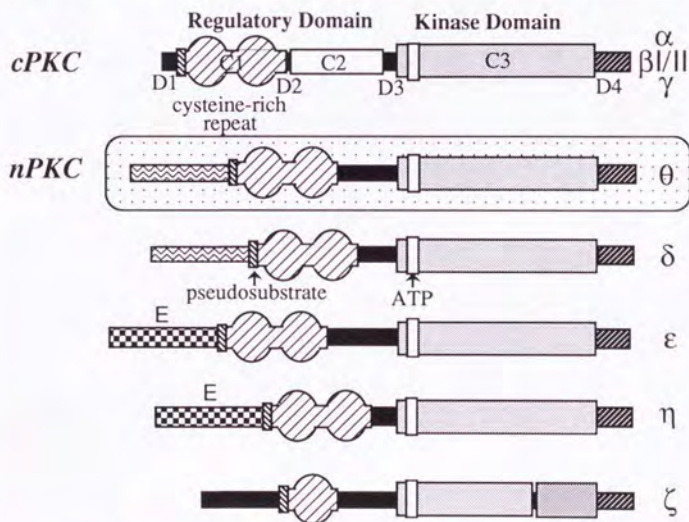


図 15 nPKC θ を中心とした PKC 分子種の構造の模式図

図15にnPKC θ を含むPKCファミリーの構造の模式図を示したが、nPKC θ もC2領域を欠く

nPKCとしての構造を持っていた。

A

nPKC θ	MSPLRLIGLSNFCSTQACQGVAVNFCVAVLKYREYSENGQMYIKKPT 51
nPKC δ	KAPFLRLISFNSTELSLQREDD-ASQFPAVVRKELTDTGRTLVKQPT 50

B

	pseudosubstrate	
nPKC α	KPARAGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC β	KPARAGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	97
nPKC γ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC δ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ϵ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ζ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC η	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC θ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ι	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC κ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC λ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC μ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ν	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ξ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC \omicron	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC π	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ρ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC σ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC τ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC υ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ϕ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC χ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ψ	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98
nPKC ω	LPKRGALQKNNVLEVKMKETAREFFQPTFSCHCTPIWG-FCQGGQCCVYVKKRCHFPVTSQD-ADKGPQDQD--	98

C

nPKC α	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	426
nPKC β	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	429
nPKC γ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	443
nPKC δ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	467
nPKC ϵ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	434
nPKC ζ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	494
nPKC η	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	442
nPKC θ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	339
nPKC ι	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	515
nPKC κ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	518
nPKC λ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	532
nPKC μ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	556
nPKC ν	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	523
nPKC ξ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	583
nPKC \omicron	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	531
nPKC π	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	428
nPKC ρ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	596
nPKC σ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	599
nPKC τ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	613
nPKC υ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	633
nPKC ϕ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	600
nPKC χ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	666
nPKC ψ	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	613
nPKC ω	LMVLKGSFGKVLGKREGEDELYAIEIKKDDVIGDDVECTMVEKRLALMDKPF--FLTLNLSCTQVTVLVEVMTVNGDLM	517

図16 nPKC θ と他のPKC分子種のアミノ酸配列の比較

nPKC α 、 β 1/II、 γ 、nPKC ϵ はウサギ、nPKC δ 、 ζ はラットの配列を示した。nPKC θ の配列と同一の残基には欄目を掛けた。A: nPKC θ とnPKC δ のD1領域の同一性。B: C1領域の相同性。■; 擬基質配列の中で保存されているアラニン残基、★; cysteine-rich repeat 配列中のシステイン残基、C: C2領域の相同性。●、▲; ATP結合部位に保存されているグリシン、及びリジン残基。

nPKC θ のC1領域では cysteine-rich repeat 配列、及び擬基質配列が(図16B)、C3領域では蛋白質リン酸化酵素に共通なATP結合部位が(図16C)、それぞれ完全に保存されており、nPKC θ はPKC分子種としての共通の構造を備えていた。

表2 nPKC θ と他のPKC分子種間のアミノ酸配列の相同性 (%)
相同性30%以下は実線で示した。

	D 1	C 1	C 3	D 4
α	——	45.2	61.4	——
β I/II	——	45.2	61.0	38.0 / ——
γ	——	45.5	58.9	——
δ	49.3	78.1	72.9	60.8
ϵ	——	47.7	59.1	31.3
η	——	47.4	55.2	37.5
ζ	——	30.1	45.3	34.0

表2でnPKC θ と他のPKC分子種間のアミノ酸配列の相同性を比較した。nPKC θ は、PKCファミリーの中で、nPKC δ とC1領域で78.1%、C3領域で72.9%、D4領域で60.8%と最も高い相同性を示した。更に、両者の間には、D1領域においても、nPKC η とnPKC ϵ の場合と同じく、49.3%とこれまでにない高い相同性が認められた(図16A)。

【nPKC θ のmRNAの発現】

図17で、マウスの諸臓器におけるnPKC θ のmRNAの発現分布を、nPKC θ と構造上最も似ているnPKC δ のそれと、ノーザンブロット法により比較した。図17Bの様に、nPKC δ のmRNAが、発現の程度に差があるものの、調べた全ての臓器で発現が見られたに対し、nPKC θ は(図17A)、骨格筋で特異的に発現しているのが特徴であった。nPKC θ は、前述した通り、マウスの皮膚のcDNAライブラリーからその全長の一部が、次いで脳のcDNAライブラリーからその全長がクローニングされたが、nPKC θ の皮膚、および脳における発現は、長時間の露光によってかすかに検出できる程度の弱いものであった。nPKC θ のバンドが2本(4.0kb、3.6kb)見えるのは、図14Bに示したように、ポリ(A)シグナルが複数あることを反映しているものと思われる。

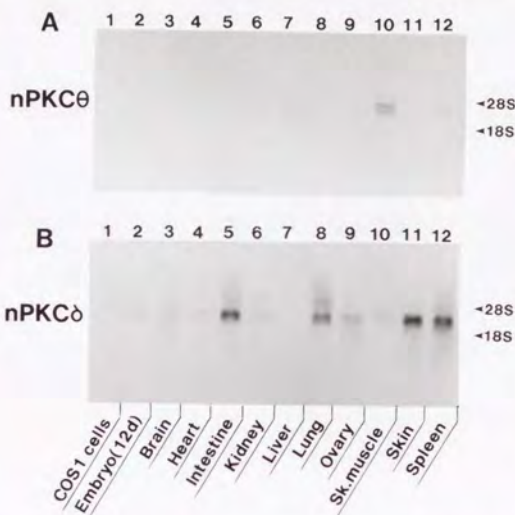


図17 ノーザンブロット分析によるnPKC θ とnPKC δ の組織分布の比較

A: nPKC θ の発現。転写産物の大きさは4.0kb、及び3.6kb。B: nPKC δ の発現。転写産物の大きさは3.2kb。nPKC θ はプローブB(図14A)を、nPKC δ は全長をコードするマウスのcDNAをプローブとして用いた。各レーンには5 μ gの全RNAを重層した。18S、28SはリボソームRNAの位置を示す。

【骨格筋におけるPKC分子種の発現】

図18は、これまでに単離された全PKC分子種の骨格筋での発現を、ポリ(A)RNAのレベルでノーザンブロット法により比較したものである。この結果、PKCファミリーの中で、nPKC θ の発現が最も骨格筋で高いことが判明した。cPKC α のシグナルも骨格筋で認められたが、その発現レベルはnPKC θ に比べはるかに低かった。他の分子種の発現は非常に弱いか、または検出できなかった。ノーザンブロット法でmRNAの正確な定量比較はできないが、RNA量、プローブの比活性、ハイブリダイゼーション等の検出条件を同じにしたことから考え、骨格筋における主要なPKC分子種は nPKC θ であると考えられる。また、nPKC θ 及びnPKC γ の脳における発現は、既に述べたように非常に低く、脳に豊富に存在する他のPKC分子種と対照を成した。

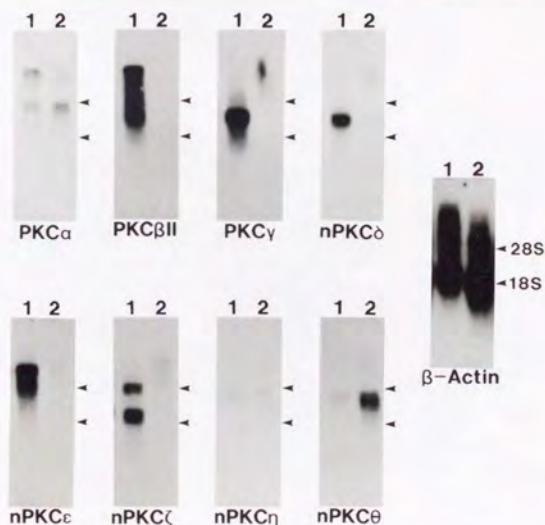


図18 マウス骨格筋におけるPKC分子種の発現

レーン1；脳のポリ(A)RNA、レーン2；骨格筋のポリ(A)RNA。各レーンには2 μ g のポリ(A) RNAを重層した。arrowhead は、それぞれ28S、18S のリボソームRNAの位置を示す。

【nPKC θ のフォルボールエステル結合能】

前章の nPKC η 同様、nPKC θ の cDNA発現ベクターをCOS1細胞にトランスフェクトし、終濃度 10nM の $[^3\text{H}]$ PDBu 存在下にフォルボールエステル結合活性を検討した。図19に示したように、nPKC θ は cPKC α とほぼ同様の親和性のフォルボールエステル結合能を示した。即ち、nPKC θ においても、その cysteine-rich repeat 配列の保存性がフォルボールエステル結合活性に反映されているものと考えられる。

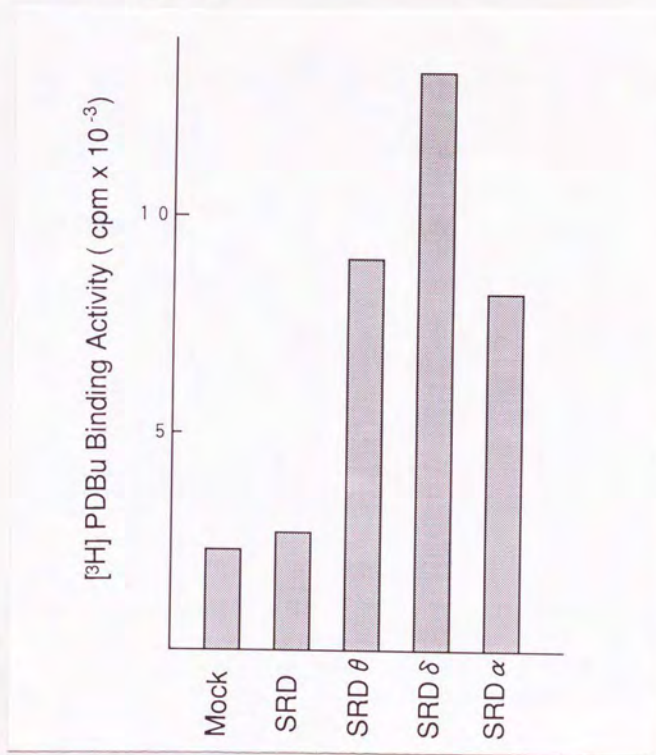


図19 nPKC θ のフォルボールエステル結合活性

SRDはベクターのみ、SRD θ 、SRD δ 、SRD α は、それぞれnPKC θ 、nPKC δ 、cPKC α の全蛋白質コード領域を含むcDNAをトランスフェクトしたことを示す。アッセイは、終濃度10nMの $[^3\text{H}]$ PDBu存在下に行った。

【nPKC θ の蛋白レベルでの同定】

nPKC θ の全アミノ酸配列をコードする cDNA発現ベクターを、COS1 細胞にトランスフェクトし、nPKC θ のD2/D3領域に対する抗ペプチド抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った(図20)。細胞質分画、Triton可溶性分画、Triton不溶性分画のいずれの分画においても、nPKC θ のcDNA、及び抗nPKC θ 抗体特異的に約79-kDaの蛋白のバンドが検出された(パネルA、レーン4~6)。この79-kDaのバンドは、mRNAの高い発現が認められた骨格筋の細胞質分画においても同定することができ(パネルB、レーン2)、nPKC θ が細胞内蛋白として存在することが確認できた。

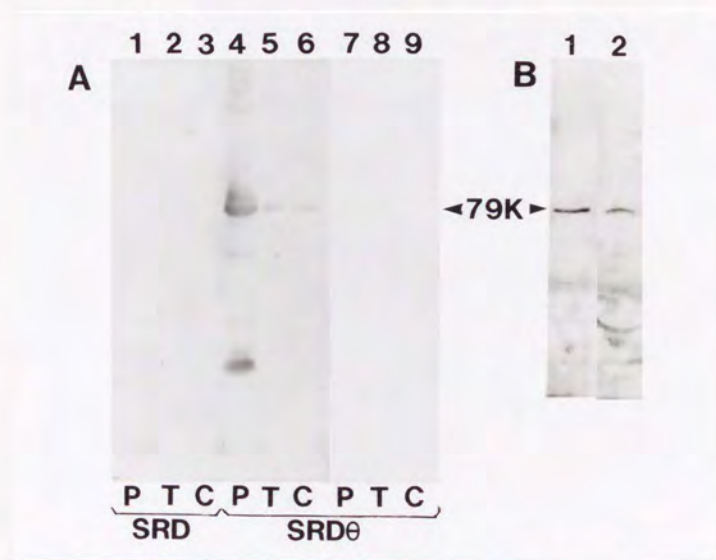


図20 ウェスタンブロット法によるnPKC θ の蛋白レベルでの同定

パネルA: P; Triton 不溶性分画、T; Triton 可溶性分画、C; 細胞質分画。SRD θ は、nPKC θ の全蛋白コード領域を含むcDNA発現ベクターをトランスフェクトしたことを示す。レーン1~6は、nPKC θ 特異的抗ペプチド抗体と、レーン7~9は、コントロール血清と反応させた。パネルB: レーン1は、nPKC θ を発現させたCOS1細胞の細胞質分画、レーン2は、マウス骨格筋の細胞質分画。レーン1,2共に抗 nPKC θ 抗体と反応させた。

【nPKC θ のキナーゼ活性】

COS1細胞に発現させたnPKC θ を、アフィニティ精製したnPKC θ のD2/D3領域の24アミノ酸残基に対する抗体を用いて免疫沈降し、その沈降物の自己リン酸化能を、種々の活性化因子存在下に検討した。

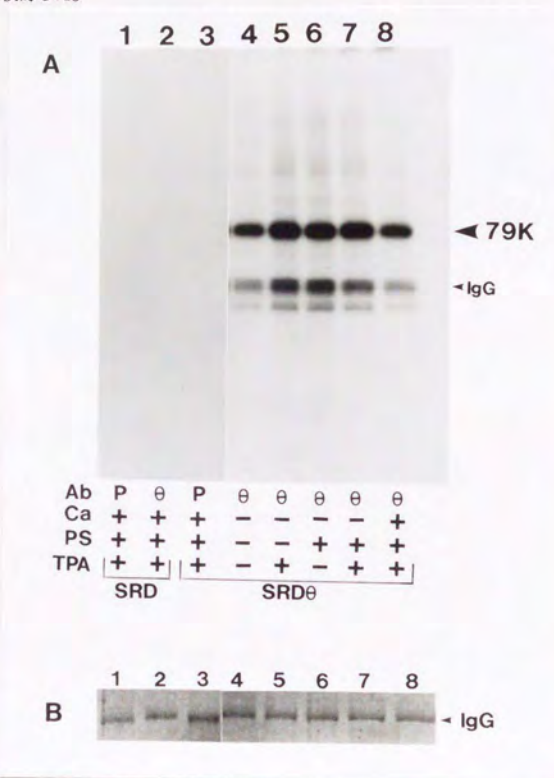


図21 nPKC θ の自己リン酸化活性

パネルA：nPKC θ のcDNAをトランスフェクトしたCOS1細胞抽出液（レーン3～8）とベクターのみをトランスフェクトしたCOS1細胞抽出液（レーン1、2）を抗nPKC θ 抗体（Ab= θ ）またはコントロール血清（Ab=P）で免疫沈降させた。免疫沈降物の自己リン酸化反応は、PKCの活性化因子Ca²⁺、PS、TPAの存在下(+),あるいは非存在下(-)で行った。リン酸化のバンドは、SDS-PAGE後、オートラジオグラフィーで検出した。パネルB：Aでオートラジオグラフィーに用いたゲルのCBB染色。

図21Aから分かるように、nPKC θ のcDNA特異的に約79-kDaのバンドがリン酸化され、nPKC θ は蛋白質キナーゼであることが分かった。また、このバンドはTPA及びPSの存在によって増強されたが（レーン5～7）、 Ca^{2+} の存在によってはむしろ減弱され（レーン8）、nPKC θ も他のnPKC分子種同様、 Ca^{2+} 非依存性であることが示唆された。しかし、この点については、更に検討を加える必要がある。

レーン4から8までは、同一の免疫沈降物を5等分してリン酸化反応を行ったものであり、バンドのリン酸化の程度の差が各レーンに重層した蛋白量の差でないことは、CBB染色したIgGの量によってモニターした（図21B）。79-kDaのバンドのすぐ下方のリン酸化されたバンドは、このIgGのバンドに一致した。最下方のバンドは、沈降したnPKC θ によってリン酸化された未知の蛋白質であると考えられる。

第二節 考察

—骨格筋におけるnPKC θ の役割について—

nPKC θ の発現が骨格筋で高いことの生理的意義はほとんど分かっていない。骨格筋は、筋原細胞 (myoblast) が分化と共に融合してできた多核細胞であり、分裂増殖も停止し、分化の極に達した状態にあると考えられる。筋原細胞の融合 (myoblast fusion) とPKCの関係については、TPA処理によって融合とCa²⁺の流入が促進されること (69)、逆に、H-ras 癌遺伝子により融合不能となった細胞株は野性株に比べ2～3倍高いPKC活性をもつことが報告されている (70)。従って、筋原細胞から筋繊維の形成に至る分化過程におけるnPKC θ の関与は興味を持たれるところである。この点に関して現在、ラットの筋原細胞由来のL8細胞を用いて検討中である。

マウスの培養筋細胞であるBC3H-1細胞では、インシュリン刺激によってDAGの産生が引き起こされると共に、グルコースの取り込みも上昇することから、インシュリンによるグルコースの取り込みにPKCが関与している可能性が示唆されている (71)。しかし、*in vivo* の骨格筋を用いた実験では、これに相反する結果が得られている (72, 73)。nPKC θ との関係を含め、この問題については、今後更に検討していく必要があると思われる。

筋分化にあずかるMyoDファミリー (MyoD, myogenin, Myf-5, MRF-4) の中でMyoDとmyogeninは、リン酸化されることが知られている (74)。しかし、これらの蛋白のリン酸化部位も、これらを基質としてリン酸化する酵素も明らかにされていない。MyoDファミリーは、共通構造の一つとして、そのC末端付近にセリン、スレオニン残基に富む領域を持っている。この中にはセリン/スレオニン残基の近傍にリジン残基、あるいはアルギニン残基を配するという、PKCのリン酸化部位のコンセンサス配列に相当する部分も存在している (75-78)。一方、ニワトリの骨格筋細胞において、TPA処理によりmyogenin やCMD1 (chicken myogenic determination factor 1) のmRNAの発現が抑制されることが報告され (79)、PKCが筋分化に必要な遺伝子の発現調節に関与している可能性が考えられている。MyoDファミリーのリン酸化とnPKC θ の関係を調べることは、筋分化の制御という面で重要な課題であると考えられる。

第3章 総括と展望

【cPKCとnPKC】

第1章、及び第2章で述べてきたように、構造、フォルボールエステル結合活性、キナーゼ活性、特異抗体による蛋白レベルでの同定から、nPKC η と nPKC θ という2種の新しいPKC分子種の存在を明らかにすることができた。特に、nPKC η 、及びnPKC θ のmRNAの分布には際立った特徴があった。即ち、これまでに単離された分子種では、脳での高い発現が特徴であったのに対し、この両種の脳での発現レベルは低く、nPKC η は皮膚及び肺で、nPKC θ は骨格筋でそれぞれ最も発現が高かった。この様に、組織特異性の高いnPKC分子種が新たに加わったことは、nPKCの情報伝達における重要性を示す一つの証左であると考えられる。

我々は、PKCファミリーをcPKCとnPKCの二つに分けて考えてきたが、ショウジョウバエ、線虫、酵母からもcPKCやnPKCに相応ずると考えられるPKC関連遺伝子が単離されている。

ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)では、染色体上の位置に基づいて、53E(br)、53E(ey)、98Fと名付けられた3種のPKC関連遺伝子(dPKC)が報告されている(80)。53E(br)と53E(ey)にコードされた蛋白は、典型的なcPKC構造を有している。これに対し、98Fにコードされた蛋白にはC2領域に相当する構造がなく、nPKC δ と高い相同性(61%)を持つことから、98FはショウジョウバエのnPKC様遺伝子であると考えられる。53E(ey)については、光受容体細胞特異的に発現し、光受容体の脱活性化や網膜変性に関与することが報告されている(81)。

線虫(*Caenorhabditis elegans*)は、TPAにより摂食行動に異常をきたし、発育が阻害される。このTPAの作用に抵抗性のミュータントの解析から、抵抗性を司る遺伝子、tpa-1が単離されたが、驚くべきことに、tpa-1はC2領域を欠くnPKC様の蛋白をコードしていることが分かった(82)。

酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)からは、遺伝子レベルでPKC-1(83)、蛋白レベルでyPKC(84)が各々独立に分離された。PKC-1とyPKCが同一であるとは限らないが、PKC-1がC2領域様の配列を持つこと、yPKCは、 Ca^{2+} 、DAG、PS存在下に活性化されることから、酵母にcPKC様蛋白が存在することは間違いない。PKC-1については、細胞周期のG2期からM期への移行に必須であることが明らかにされている。また、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)にnPKC様の蛋白をコードする遺伝子が存在することも報告されている(未発表)。

以上のことから、cPKCとnPKCが進化の極めて早期に分かれ、それぞれ違った役割を担ってきたことが予想される。また、ショウジョウバエや線虫は個体レベルでのPKCの機能の解析に、酵母はその遺伝的易操作性を利用して、PKCの分子遺伝学的な解析に、それぞれ役立つ良いモデルになると考えられる。

【PKCの構造活性相関】

nPKC η 、 θ 両分子種の構造上の最大の特徴は、 Ca^{2+} の結合部位と考えられているC2領域を欠くことである。これまでに、同様にC2領域を欠くnPKC δ (38, 85)、 ϵ (24)、 ζ (29)のキナーゼ活性、及びnPKC ϵ のフォルボールエステル結合活性 (86) が、 Ca^{2+} 非依存性であることが報告されている。nPKC η のキナーゼ活性については、前述のPKC-Lで自己リン酸化反応によりその Ca^{2+} 非依存性が示唆されている (41)。nPKC θ のキナーゼ活性は、第2章で述べたように、 Ca^{2+} 存在下ではその自己リン酸化が非存在下に比べむしろ抑制されることから、 Ca^{2+} 非依存性であることが示唆された。

C1領域のシステイン残基に富む繰り返し配列 (cysteine-rich repeat sequence) は、nPKC ζ を除くPKCの他の分子種同様、nPKC η 、nPKC θ においても完全に保存されていた。この配列は、いくつかのDNA結合蛋白に見られるZnフィンガー構造に類似しているが、PKCがDNAに結合することについてはまだ確たる証拠が得られていない。しかし、最近になり、6つのシステイン残基のほかに、2つのヒスチジン残基もPKCファミリーで保存されていることが指摘され、H-X₁₂C-X₂C-X₁₀H-C-X₂C-X₄H-X₂C-X₇Cという配列によって、1分子当たり4つのZnイオンが結合することが精製したcPKC β IのX線解析から報告された (87)。一方、このcysteine-rich repeat配列が、フォルボールエステル、延いてはDAGの結合に必須であることは既に報告されており (46, 47)、これはシステイン残基のチオール基とTPA、DAGのカルボニル基、水酸基の間に水素結合が形成されるためであると考えられている。また、後半のcysteine-rich sequenceの中の、4番目と5番目のシステイン残基の間にある、アスパラギン残基のカルボニル基のDAG、TPAとの結合における重要性も指摘されている (88)。実際、このアスパラギン残基は、nPKC η 、nPKC θ を含め、PDBu結合能のあるPKC分子種全てに保存されているが、PDBu結合能のないnPKC ζ (29)、及びフォルボールエステルにより活性化されない酵母のPKCでは保存されていない。

C1領域N端の擬基質配列は、PKCの活性化のメカニズムに関与していると考えられる (42)。即ち、この擬基質配列は、PKCが不活化状態にある時は、PKCの活性中心を占め、抑制的に働いているが、リン脂質、DAG、フォルボールエステルといった活性化因子が制御ドメインに結合すると、PKCのコンフォメーションの変化によって活性中心から外れ、PKCが活性化されると考えられている (19, 89)。アラニン残基の両側に、リジン、アルギニンといった塩基性残基を配するこの擬基質配列の構造が、酵母、ショウジョウバエ、線虫から哺乳類に至るまで、種を超えて保存されていることは、PKCの活性制御におけるこの配列の普遍的な重要性を示唆している。

【フォスファチジルコリン代謝とPKCシステム】

いくつかの細胞系において、アゴニスト刺激により昂進した細胞膜イノシトールリン脂質(PI)の代謝により生じるイノシトール1,4,5-三リン酸(IP₃)とDAGの産生が、時間的、量的に一致しないことが以前より知られていた。この矛盾を埋めるものとして、最近、DAG産生経路として、PI代謝の他にフォスファチジルコリン(PC)の代謝系の重要性が指摘されている(12)。PCの加水分解を引き起こすアゴニストは、通常フォスファチジル4,5-二リン酸(PIP₂)の分解も起こすが、中には、PI代謝を伴わずにPCの水解が起こる例もいくつか報告されている(90-92)。更に、PI代謝を伴わずにDAGが上昇したり(93)、PKCの基質のリン酸化の上昇する例(94)も報告されている。PIP₂由来のDAGは、その脂肪酸基にステアリン酸、アラキドン酸が多いことが、PC由来のDAGの脂肪酸基には、パルミチン酸、オレイン酸、リノレイン酸が多いことが知られ、DAGにも脂肪酸の構成を異にする分子種があることが明らかになってきた。

PCからのDAG産生経路としては、PC特異的フォスホリパーゼC(PC-PLC)からの経路と、PC特異的フォスホリパーゼD(PC-PLD)からフォスファチジン酸(PA)の産生を経て合成される経路が考えられている。また、PC-PLCとPC-PLDの活性を制御するものの一つとしてPKCが考えられている。このことは、PKCによって活性化されたPC-PLC、PC-PLDがPKCの活性化物質であるDAGを産生するというPKCのポジティブ・フィードバック機構が存在することを意味している。即ち、PC代謝の一つの大きな生理学的機能として、DAGの長時間にわたる産生とそれに続くPKCの持続的な活性化をもたらすことが考えられている。

【おわりに】

PKCを介する多彩な細胞応答について考える時、今回報告したnPKC η 、nPKC θ を含めた細胞特異性の異なる複数のPKC分子種の存在をつねに考慮しなければならない。しかし、これら分子種の生理学的な機能はもとより、特異的な基質、活性化因子、あるいはPC代謝との関係など、不明なことはまだまだ数多い。cPKCとnPKCの構造の違いは、各々の機能の違いを反映していることが予想される。今後は、cPKCとの比較のなかで、nPKC η 、nPKC θ を中心に、nPKCの情報伝達における具体的な役割を解明していきたいと考えている。

材 料

特に必要な場合のみ購入先を明記した。

A. COS1細胞

COS1細胞は、DMEM(+)中で培養し、増殖が定常期に入ったところで1/5～1/10に希釈して継代した。

*DMEM(+)の組成 (500ml):

- 4.75g DMEM (ニッスイ)
- 50ml 牛胎児血清 (Flow Laboratories)
- 5ml 1M HEPES (pH7.0)
- 10ml ペニシリン (500U/ml) / ストレプトマイシン (5mg/ml) (Flow Laboratories)
- 5ml 20mM レグルタミン (GIBCO)
- 10ml 7.5%重炭酸ナトリウム

B. キット類

- ① cDNA synthesis kit (Pharmacia)
- ② λ vector kit (Stratagene Cloning System)
- ③ Giga Pack Gold (Stratagene Cloning System)
- ④ Multiprime DNA labelling system (Amersham)
- ⑤ Gene Amp (PERKIN ELMER CETUS)
- ⑥ Alkaline phosphate substrate kit I (Vector Laboratories, Inc.)
- ⑦ RNA labelling kit (Boehringer Mannheim)
- ⑧ Nucleic acid detection kit (Boehringer Mannheim)

C. アイソトープ

- ① [α - 32 P] dCTP (Amersham)
- ② [γ - 32 P] ATP (New England Nuclear Research Products)
- ③ [3 H] PDBu (Du-Pont New England Nuclear)

D. 調製試薬類

DNA、RNAの実験に用いる試薬類は、全てオートクレーブして使用した。

【基本試薬】

- ① 2M トリス塩酸緩衝液 (1L)
242.2g のトリス塩基を800ml 程度の蒸留水に溶かし、塩酸で目的のpH に調整後、最終的に容量を1L にした。必要に応じて適当に希釈した。
- ② TE: 10mM トリス塩酸緩衝液
1mM EDTA
- ③ PBS (1L):
 - 8g 塩化ナトリウム
 - 1.15g リン酸水素二ナトリウム
 - 0.2g 塩化カリウム
 - 0.2g リン酸二水素カリウム

- ④ フェノール溶液：フェノールを65℃で溶かし、酸化防止のためにヒドロキシキノリンを終濃度が0.1%になるように加えた。これを0.5M、次いで0.1Mのトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) でフェノール層のpHが7.8以上になるまで平衡化した。
- ⑤ フェノール/クロロホルム溶液：フェノール溶液に等量のクロロホルム溶液 (クロロホルム：イソアミルアルコール=24：1) を加えたもの。

【RNAの抽出】

- ① 5.5M GTC溶液： 5.5M グアニジン・チオシアネート (Fluka)
25mM クエン酸ナトリウム
0.5% ラウリル・サルコシン酸ナトリウム
pHをNaOHで7.0に調整後、ろ過滅菌して4℃に保存した。使用直前に、終濃度が0.2Mになるように2-メルカプトエタノールを加えた。
- ② CsTFA溶液：CsTFA (cesium trifluoroacetate, Pharmacia) 密度 1.51 ± 0.01 g/ml
100mM EDTA (pH7.0)
- ③ CsCl / EDTA溶液： 5.7M 塩化セシウム
10mM EDTA (pH7.5)
- ④ TE / NaCl：TEと1M 塩化ナトリウムの1:1の混合液
- ⑤ 溶出緩衝液：10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
1mM EDTA
0.1% SDS

【ブラーク・ハイブリダイゼーション】

- ① アルカリ変性液：0.5M 水酸化ナトリウム
1.5M 塩化ナトリウム
- ② 中和液：0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
1.5M 塩化ナトリウム
- ③ 1x SSC：150mM 塩化ナトリウム
15mM クエン酸ナトリウム (pH7.0)
- ④ 1x Denhardt溶液：0.02% polyvinylpyrrolidone
0.02% Ficoll (type 400, Pharmacia)
0.02% BSA (fraction V, Sigma)
- ⑤ 1x NET：150mM 塩化ナトリウム
1mM EDTA (pH8.0)
15mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
- ⑥ ハイブリダイゼーション溶液：6x NET
1x Denhardt溶液
0.1% SDS

【大腸菌の形質転換】

- ① SOB： 2% トリプトン (DIFCO)
0.5% 酵母抽出物 (DIFCO)
0.05% 塩化ナトリウム
2.5mM 塩化カリウム

NaOH で pH を 7.0 に調整後、オートクレーブにかけた。使用直前に終濃度 10mM になるように塩化マグネシウムを加えた。

- ② TFB : 10mM MES-カリウム緩衝液 (pH6.3)
45mM 塩化マンガン
10mM 塩化カルシウム
100mM 塩化カリウム
3mM 塩化ヘキサアンミンコバルト

純水に溶解し、ろ過滅菌して冷蔵所に保存した。

- ③ SOC : SOBに終濃度 20mM になるように 1M グルコース溶液 (ろ過滅菌したもの)を加えた。

- ④ χ プロース培地 : 2.5% トリプトン
1% 酵母抽出物
0.1% グルコース
20mM 硫酸マグネシウム
50mM トリス塩酸ナトリウム (pH7.5)

- ⑤ アンピシリンプレート : 1.5% のアガーを含む χ プロース培地を、オートクレーブして滅菌、溶解し、50℃位に冷えたところに 1/1000 量のアンピシリン (100mg/ml) を加え、滅菌プレートに適当量流し込んで固まらせた。

【プラスミド DNA の精製】

- ① STET-LiCl 溶液 : 0.1M 塩化ナトリウム
10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)
1mM EDTA
5% Triton X-100
2.5M 塩化リチウム

- ② リゾチーム溶液 : リゾチームの粉末を 10mg/ml になるように 10mM のトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に溶かした。

- ③ 溶液 I : 50mM グルコース
25mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)
10mM EDTA (pH8.0)

- ④ 溶液 II (用時調製) : 0.2N 水酸化ナトリウム
1% SDS

- ⑤ 溶液 III (100ml) : 60.0ml 5M 酢酸カリウム
11.5ml 氷酢酸
28.5ml 蒸留水

- ⑥ 20% PEG / NaCl : 20% ポリエチレングリコール 6000
2.5M 塩化ナトリウム

【シーケンス反応】

- ① 10x シークエンス緩衝液 : 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
1mM EDTA
500mM 塩化ナトリウム
70mM 塩化マグネシウム
57.6mM 2-メルカプトエタノール

② d/ddNTP 混合液

	Gmix	Amix	Tmix	Cmix
d ⁷ GTP	12.4 μ M	82.6 μ M	82.6 μ M	62.5 μ M
dATP	82.6 μ M	12.4 μ M	82.6 μ M	62.5 μ M
dTTP	82.6 μ M	82.6 μ M	12.4 μ M	62.5 μ M
dCTP	12.4 μ M	12.4 μ M	12.4 μ M	12.5 μ M
100mM トリス塩酸緩衝液	16.5mM	16.5mM	16.5mM	12.5mM
1mM EDTA	165 μ M	165 μ M	165 μ M	125 μ M
ddGTP	66.1 μ M	0	0	0
ddATP	0	124 μ M	0	0
ddTTP	0	0	248 μ M	0
ddCTP	0	0	0	125 μ M

③ チェイス混合液: 1mM dNTP (dGTP、dATP、dTTP、dCTPが各1mM)

④ ホルムアミド色素: 10ml ホルムアミド
 200 μ l 0.5M EDTA (pH8.0)
 10mg プロモフェノールブルー (BPB)
 10mg キシレンシアノール (XC)

⑤ 1x TBE: 89mM トリス塩基
 89mM ホウ酸
 2.5mM EDTA

⑥ シークエンスゲルの組成

	6%	8%
アクリルアミド	5.7g	7.6g
メチレンビスアクリルアミド	0.3g	0.4g
尿素	47g	47g
10x TBE	10ml	10ml
10%過硫酸アンモニウム溶液	240 μ l	240 μ l
TEMED	60~65 μ l	60~65 μ l

【ノーザンブロット法】

① 1x SSPE: 180mM 塩化ナトリウム
 10mM リン酸ナトリウム (pH7.4)
 1mM EDTA

② 10x MOPS緩衝液: 400mM MOPS (pH7.0)
 100mM 酢酸ナトリウム
 10mM EDTA (pH8.0)

溶解後、NaOH でpH を7.0 に合わせた。

- ③ ローディング・バッファー: 50% グリセロール
1mM EDTA (pH8.0)
0.25% ブロモフェノール・ブルー
0.25% キシレン・シアンール

- ④ RNA泳動用変性ゲル: 1% アガロース
1x MOPS
2.2M ホルムアルデヒド

アガロースを蒸留水に溶解後、オートクレープし、冷めないうちに10x MOPS緩衝液とホルムアルデヒドを加えた。

- ⑤ ハイブリダイゼーション溶液: 5x SSPE
5x Denhardt溶液
50% (v/v) ホルムアミド
0.5% SDS

【抗ペプチド抗体の調製】

- ① cleavage mixture B: 0.75g フェノール (結晶)
0.25ml エサネディチオール (1,2-ethanedithiol)
0.5ml チオアニソール (thioanisol)
0.5ml 滅菌水
10ml トリフルオロ酢酸 (TFA)
- ② cleavage mixture C: 0.25ml エサネディチオール
0.25ml 滅菌水
9.5ml トリフルオロ酢酸
- ③ カップリング・バッファー: 0.1M MOPS (pH7.5)

【COS1細胞へのトランスフェクション】

- ① 1x TBS: 25mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4)
137mM 塩化ナトリウム
5mM 塩化カリウム
0.7mM 塩化カルシウム
0.5mM 塩化マグネシウム
0.6mM リン酸水素二ナトリウム
- ② DNA-DEAEデキストラン混合液:
プラスミドDNA 0.5-20 μ g
TE 50 μ l
1x TBS 450 μ l
1mg/ml DEAEデキストラン (pharmacia) 500 μ l
- ③ 1x K-PBS: 30.8mM 塩化ナトリウム
120.7mM 塩化カリウム
8mM リン酸水素二ナトリウム
1.5mM リン酸二水素カリウム
50mM 塩化マグネシウム

【フォルボールエステル結合アッセイ】

- ① binding medium: DMEM(-)にBSA、HEPES (pH7.0) を、それぞれ終濃度が1mg/ml、10mM になるように加えた。

【蛋白試料の調製】

- ① ホモジナイズ・バッファー: 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
250mM サッカロース
2mM EDTA
0.5mM EGTA
*50mM 2-メルカプトエタノール
*100 μ g/ml ロイペプチン
*2mM PMSF *使用直前に加える。
- ② 4x SDSサンプル・バッファー: 62.5mM トリス塩酸緩衝液 (pH6.8)
2% SDS
5% グリセロール
0.02% プロモフェノール・ブルー
2% 2-メルカプトエタノール

【ウェスタンブロット法】

- ① 分離ゲル用緩衝液: 1.5M トリス塩酸緩衝液 (pH8.8)
0.4% SDS
- ② 濃縮ゲル用緩衝液: 1.0M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8)
0.4% SDS
- ③ 8%ポリアクリルアミドゲルの組成 (1mm厚)

	分離ゲル	濃縮ゲル
30%ポリアクリルアミド溶液	6.4ml	933 μ l
分離ゲル用緩衝液	6.0ml	0
濃縮ゲル用緩衝液	0	2.0ml
50%グリセロール	4.0ml	0
水	7.5ml	5.1ml
過硫酸アンモニウム溶液(400mg/ml)	33 μ l	13.3 μ l
TEMED	20 μ l	13.3 μ l

- ④ SDS-PAGE用緩衝液: 25mM トリス塩基
192mM グリシン
0.1% SDS
- ⑤ トランスファー用緩衝液: 100mM トリス塩基
192mM グリシン
20% (v/v) メタノール
- ⑥ フィルター洗浄液: 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
500mM 塩化ナトリウム
0.05% (v/v) Tween 20

【自己リン酸化反応】

- ① 洗浄液A: 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
500mM 塩化ナトリウム
0.5% (v/v) Nonidet P-40
1mM PMSF
50 μ g/ml ロイペプチン
- ② 洗浄液B: 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
0.5mM EDTA
0.5mM EGTA
50mM 2-メルカプトエタノール
10% グリセロール
100 μ g/ml ロイペプチン
2mM PMSF
- ③ アッセイ溶液: 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
5mM 酢酸マグネシウム
50 μ g/ml PS
50ng/ml TPA
100 μ g/ml ロイペプチン
2mM オルトパナジン酸ナトリウム
20 μ M ATP
1 μ Ci [γ - 32 P] ATP

【*in situ* ハイブリダイゼーション】

- ① ハイブリダイゼーション溶液: 50% ホルムアミド
10% デキストラン硫酸
1x Denhardt溶液
4x SSC
50mM DTT
150 μ g/ml E.coli tRNA
0.5 μ g/ml RNAプローブ
- ② 1x TES: 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)
1mM EDTA
0.5mM 塩化ナトリウム
- ③ 1x TS: 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
150mM 塩化ナトリウム
- ④ ブロッキング溶液: 1x TS に1.5% (w/v) のドライミルク粉末を溶解した。
- ⑤ 1x TSM: 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH9.5)
100mM 塩化ナトリウム
50mM 塩化マグネシウム
- ⑥ 発色液: 1x TSM にNBT (nitro-blue tetrazolium)を340ng/ml、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)を175ng/mlの濃度でそれぞれ溶かした。

方 法

下線を引いた溶液類は材料の項でその組成を明記した。

【RNAの抽出】 (95)

(1) 全RNA

マウスの組織は摘出後すぐに 5.5M GTC 溶液 の中に入れ、十分にホモジナイズした後、ベックマンSW28型ローターで遠心し (5000 rpm、室温、10分)、残渣を除いた。上清を CsTFA 溶液、あるいは CsCl / EDTA溶液 のクッションの上に重層し、15℃で24時間遠心した。容量に応じてローターを選択し、ベックマンSW41型ローターは32,000 rpm、SW28型ローターは25,000 rpm で遠心した。遠心終了後、沈澱しているRNA に注意しながら、GTC溶液層やDNAのバンドを吸引して捨て、すばやくチューブを逆さまにして、ペーパータオルの上で水分を切った。ペレットのある底部をカップ状にチューブから切り離し、ペレットを4M GTC溶液で洗浄した後、400 μ l の TE に懸濁してエタノール沈澱した。

(2) ポリ(A)RNAの精製 (96)

a) オリゴ(dT)セルロース・クロマトグラフィーによる精製

ミニカラム (セバコール・ミニ、生化学工業) に、TE に懸濁したオリゴ(dT)セルロース (type3, Collaborative Research) を充填し (ベッド・ボリウム 1.5ml)、カラム容量の数倍量の0.1N NaOH、次いでTEで洗浄後、TE / NaClで平衡化した。全RNAは、1ml のTE に溶かし、加熱変性 (65℃, 5分) 後に急冷し、これに1ml の1M NaClを加えてカラムに通した。フロー・スルーを再びカラムに通した後に、カラムをベッド・ボリウムの5倍量の TE / NaCl で洗浄し、3ml のTE で溶出した。溶出する際、300 μ l ずつに分画し、各分画についてスポット・テストを行った。

b) スポット・テスト

各分画のサンプル1 μ l と TE 4 μ l、エチジウム・ブロマイド (1 μ g/ml) 5 μ l の混液をサラップ上滴下し、UVを当てて赤く発色した分画を回収してエタノール沈澱した。

c) オリゴテックス-dT30による精製

全RNA試料を溶出緩衝液に溶かして500 μ lとし、これに等量のオリゴテックス-dT30 (日本合成ゴム/日本ロシユ、2%w/v)を加え、65℃で5分間加熱処理後、直ちに急冷した。この混合液に100 μ l (1/10量)の5M NaClを加えた後、37℃で10分間インキュベートした。卓上遠心器で15,000 rpm で15分間遠心して上清 (rRNA)を除いた。ペレットを400 μ lの滅菌水に溶かし、65℃で5分間加熱処理後、再び遠心して上清中にポリ(A)RNAを回収した。

【マウス皮膚 cDNAライブラリーの作製】

5匹のメスのCD-1マウス (13週令)を頸椎脱臼後、予め脱毛処理しておいた背部皮膚を剥離し、更に、皮下組織をスライドグラスで掻き取った。残った表皮からグアニジウム/CsTFA法で全RNAを抽出し、次いでオリゴ(dT)セルロース・クロマトグラフィーを行ってポリ(A)RNAを精製した。キット①を用いて、ポリ(A)RNAからの二重鎖cDNAの作製とその

両末端へのEcoR I リンカーの連結を行い、これをキット②により λ gt 10 ファージベクターに組み込んだ。最後に、ファージDNAをキット③でパッケージし、これをマウス皮膚のcDNAライブラリーとした。

【nPKC-cDNAクローンの単離】

(1) プローブDNAの調製

プローブとして、以下の6種のウサギのPKC分子種のcDNA断片、または、オリゴヌクレオチドを用いた。

- ① cPKC α (-204~2047)
- ② cPKC β II (-221~1963)
- ③ cPKC γ (239~2304)
- ④ nPKC δ (終結コドンを含むC末端の10アミノ酸に相当するヌクレオチド;
AACCCCAAATATGAGCAATTCCTGGAATAG)
- ⑤ nPKC ϵ (203~2168)
- ⑥ nPKC ζ (プラスミド pN2インサート)

DNAの標識は、キット④を用いて、ランダム・プライミング法により行った。即ち、約10 ngのDNAを熱変性後、キットの溶液1(dNTP溶液) 5 μ l、溶液2(プライマー溶液) 2.5 μ l、 $[^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ 2.5 μ l、溶液3(酵素液) 1 μ lを順次加えて混合し(終量 $\sim 25\mu$ l)、室温で1時以上反応させた。反応後、80 μ lのTEを加え、セファデックスG50 (medium, Pharmacia) を充填した簡易スパンカラムを通して未反応のアイソトープを除いた。

(2) ブラーク・ハイブリダイゼーション

a) ブラーク・リフティング

ブラークを生じたプレートの上にナイロンフィルター(Hybond-N, Amersham)を密着させ、針でプレートとフィルターの双方に穴をあけてマークを付けた後、静かにピンセットでフィルターを剥した。フィルターは、アルカリ変性液、中和液、2x SSCに順次5分間ずつ、ブラーク面を上にして載せた。フィルターはペーパータオル上で風乾させた後、80℃で完全に乾燥させ、紫外線を5分間照射してDNAを固定した。

b) プレハイブリダイゼーション

3x SSC / 0.1% SDS溶液中にフィルターを入れ、65℃で1時間以上インキュベートした。

c) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション溶液に、終濃度がそれぞれ 200 μ g/ml、150万cpm/ml になるように、10分間熱変性処理したキャリアーDNA (サケ精巣DNA)、DNAプローブを加えた。この溶液をフィルターと一緒にビニールにシールし、65℃で一晩インキュベートした。

d) 洗浄

複数のプローブにクロス・ハイブリダイズするクローンを取る目的も兼ね、イオン強度

の比較的弱い条件下で洗浄した。即ち、フィルターは、2x SSC / 0.1% SDS 溶液中で、室温で5分間ずつ2回洗浄し、次いで65℃で20分間ずつ2回洗浄した。

e) オートラジオグラフィ

風乾したフィルターを3MMペーパー (Whatman) に貼りつけ、増感スクリーンを用いて一晩露光させた。

(3) PCR法によるインサート長のチェック

2次、または3次スクリーニングで陽性となったシングルブランクをプレートから拾い、100 μ l の滅菌水に懸濁し、室温に30分間おいた。次に90℃で10分間加熱処理し、このうちの10 μ l に2x 反応液 (キット⑤) を10 μ l 加えてDNA Thermal Cycler (PERKIN ELMER CETUS) で増幅した。増幅したDNAをアガロースゲルに流し、インサート長をチェックした。

【大腸菌の形質転換】

(1) コンピテント細胞の調製

大腸菌 (DH1株) をSOBで一晩振盪培養した。300ml の三角フラスコに入った30ml のSOBに培養液の一部を接種し、37℃で振盪培養した。OD₅₅₀ の濁度が 0.3~0.4 になったところで培養を止め、氷中で10分間冷却した。ファルコン2070チューブに移して遠心(2500 rpm、10分、4℃) して集菌後、10ml の TFB に懸濁して10分間氷中に静置した。再び遠心して菌体を集め、2.4ml の TFB に再懸濁した。これに84 μ l の DMSO を加えて氷中に5分間置き、次いで 2.25M の DTT 84 μ l を加えて氷中に静置した。10分後、更に84 μ l の DMSO を加えて5分間氷中に保ち、これをコンピテント細胞とした。

(2) 形質転換

ファルコン2059チューブにコンピテント細胞を210 μ l 取り、プラスミドDNA溶液を10 μ l 加え、氷中に30分間静置した。次に、42℃の水浴中で90秒間熱ショックを与え、再び氷中に戻した。これに0.8ml のSOCを加え、37℃で1時間振盪培養した。遠心 (1500 rpm、3分、4℃) して集菌後、アンピシリンプレート に塗り付け37℃で一晩培養した。

【プラスミドDNAの精製】

(1) 小スケール (2ml)

プレートからコロニーを拾い、100 μ g/ml のアンピシリンを含む2ml の χ ブロース 培地中に接種し、37℃で1晩振盪培養した。1.5ml をエッペンドルフチューブに移し、残りは4℃に保存した。チューブを5000 rpm で5分間遠心して集菌し、ペレットを350 μ l の STET-LiCl 溶液 に懸濁した。これに、25 μ l のリゾチーム溶液を加え、100℃で1分間加熱処理した。15000 rpm で5分間遠心し、ペレットはスティックですくいにとって捨てた。残った上清に420 μ l のイソプロパノールを加え、室温に5分以上静置した。4℃で10分間遠心してDNAを回収し、80%エタノールで洗った後に20 μ l のTEに溶解した。

(2)中スケール (20ml)

20mlのアンピシリン含有 χ ブロース培地に大腸菌を接種し、37℃で1晩振蕩培養した後、遠心 (2500 rpm、10分、4℃) して菌体を集めた。これを、1ml の溶液 I に懸濁し、室温に10分間静置した。次いで2ml の溶液 II を加えて氷中に5分、更に、1.5ml の溶液 III を加えて氷中に15分以上静置した。日立RPR20-2型ローターで遠心 (15000 rpm、10分、4℃) 後、上清をフェノール/クロロホルム抽出し、水層に2.7mlのイソプロパノールを加えて、イソプロパノール沈澱した。遠心 (同上) 回収したペレットは、400 μ l のTEに溶かしてエッペンドルフチューブに移し、10 μ g の RNaseA を加えて37℃で30分間処理した。フェノール/クロロホルム抽出を3回行ってRNaseAを、次にエーテル抽出を1回行って残ったフェノールを除いた。水層に240 μ l の20%PEG / NaCl を加えてよく混合し、氷中に45分以上静置した。最後に遠心 (15000 rpm、15分、0℃) してDNAを回収し、80% エタノールで洗浄後、100 μ l のTEに溶解した。

【シーケンス反応】 (97, 98)

nPKC η 、及びnPKC θ のcDNAの制限酵素地図を作り、それを基に相重複するcDNA断片をpUC18、またはpUC19プラスミド (宝酒造) に組み込んだ。組換えプラスミドで大腸菌を形質転換後、小スケール (2ml) でプラスミドDNAを精製してインサートをチェックし、目的のプラスミドを含むクローンを選択した。目的のクローンは中スケール (20ml) で増やし、アルカリSDS法でプラスミドDNAを精製した。

プラスミドDNA溶液 (DNA 2 μ g以上) 16 μ l に1N NaOH / 1mM EDTA を4 μ l 加え、室温で5分間変性させた。これに滅菌水20 μ l、5M 酢酸アンモニウム (pH4.5) 8 μ lを加えて中和し、更にエタノールを110 μ l 加えて-80℃に5分間静置した。DNAは、遠心回収後、12 μ lの滅菌水に溶かし、これに1 μ lのM13プライマー (M3またはRV、0.5pmol / μ l、宝酒造) を加えた。これ以後の反応は、96ウェルプレート上で、ケミカルロボット (DSP-240型、セイコー電子工業) により行った。

DNA / プライマー溶液に10x シーケンス緩衝液を1.5 μ l 加え、60℃に約20分間保った後、室温にまで徐々に温度を下げていき、DNAとプライマーをアニーリングさせた。これに、1 μ lの[α -³²P]-dCTP、1 μ lのKlenow 酵素溶液を加えた後4分割した。4分割した各々にddNTP混合液 (Gmix、Amix、Tmix、Cmix) のいずれかを2 μ l 加え、40℃で15分間シーケンス反応を行った。続いて、チェイス混合液を1 μ l 加えて反応させ (40℃、15分)、最後に5 μ lのホルムアミド色素を加えて85℃で7分間熱処理し、直ちに氷水中で冷却した。各反応液をシーケンスゲルに重層し、1600~2000Vの定電圧で電気泳動した。泳動後、オートラジオグラフィを行った。

【ノーザンブロット法】 (99)

(1)電気泳動・トランスファー

RNA溶液4.5 μ lに、10x MOPS 緩衝液2 μ l、ホルムアルデヒド3.5 μ l、ホルムアミド10 μ lを加え、総量20 μ lとし、65℃で15分間変性させた後、氷水中で急冷した。これに、2 μ lのローディング・バッファーを加えて1% RNA泳動用変性ゲルに載せ、1x MOPS 緩衝液中で電気泳動した。泳動終了後、ゲルを20x SSC中で約30分間振盪させた後、20x SSCをトランスファー・バッファーとして、毛細管現象を利用して、RNAをゲルからフィルター (Hybond-N)に移した。

(2)ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション溶液に、終濃度が200 μ g/mlになるように加熱処理したキャリアーDNAを加えた後、フィルターと一緒にビニールにシールして、42℃で3時間以上インキュベートした。

(3)ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション溶液中に、10分間煮沸変性させたDNAプローブとキャリアーDNAをそれぞれ終濃度が150万cpm/ml、200 μ g/mlになるように加え、フィルターと一緒にビニールにシールして、42℃で2晩インキュベートした。

(4)洗浄・オートラジオグラフィ

フィルターは、2x SSC / 0.1% SDS (室温、10分、2回)、2x SSC / 0.1% SDS (45℃、30分、1回)、1x SSC / 0.1% SDS (45℃、30分、1回)、0.1x SSC / 0.1% SDS (室温、10分、1回)の順で洗浄した。風乾後、フィルターを3MMペーパーに貼り付け、増感スクリーンを用いて露光させた。

【抗nPKC η 抗体及び抗nPKC θ 抗体の調製】 (100)

(1)抗原ペプチドの合成

抗原として用いたペプチドは、nPKC η 、 θ のアミノ酸配列のうち、以下の3条件を満たす部分を選んだ。

- i) 他の分子種との相同性が低い。(⇒D1、D2/D3、D4領域を選択)
- ii) 2次構造を取りにくい。(⇒Chou-Fasman 解析により検討)
- iii) 親水性が高い。

上記の3条件を満たす次の5つのペプチドをペプチド・シンセサイザー (Model 430A, Applied Biosystems)で化学合成した。

- ① Q⁵⁶TSTKQKTNKPTYNEEF⁷³ (nPKC η のD1領域、pI= 8.3)
- ② P³¹³GNISPTSKLISRSTLRRQGKE³³⁴ (nPKC η のD2/D3領域、pI= 11.3)
- ③ (C)⁶⁶⁶NQDEFNFSYVSPELQL⁶⁸³ (nPKC η のD4領域、pI= 4.0)
- ④ C³³²VPTPGKREPQGISWDSPLDGSNK³⁵⁵ (nPKC θ のD2/D3領域、pI= 6.0)
- ⑤ (C)⁶⁹⁰FSNFSFINPGMETLICS⁷⁰⁷ (nPKC θ のD4領域、pI= 3.8)

*ここで(C)は担体とのカップリングのために加えたシステインを示し、右肩の小数字はN端からの番号を表す。

合成したペプチドのうちアルギニン残基またはメチオニン残基を含む①、③、④、⑤は cleavage mixture B で、両残基を含まない②は、cleavage mixture C で脱保護し、ガラスフィルター漏斗上で吸引しながら、冷ジエチルエーテルで洗浄後、一晩凍結乾燥した。

(2) 抗原ペプチドと担体のカップリング

50mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) 1.5ml に、担体として用いるKLH (86mg/ml, Calbiochem) を 0.5ml、MBS (25mg/ml, Pierce Chemical Co.) を40 μ l 加え、室温で30分間搅拌した。この溶液をPD-10カラム (Pharmacia) にかけて、上記の緩衝液で溶出していき、2.5~4.5ml の間で溶出される分画 (KLH-MBS complex) を回収した。抗原ペプチド (~10mg) を100mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) 4.5ml に溶かし、上記の分画 500 μ l と混ぜ、室温で3時間搅拌し (KLH-MBS-peptide complex の形成)、4℃に保存した。

(3) ウサギの免疫

担体とカップリングさせた抗原ペプチドは、2週間おきに、1匹につき1回約1mgずつ、ウサギ (日本白色種、またはNew Zealand White種) の後頸部から背部にかけての皮下、または皮内に注射した。初回免疫はフロイント・コンプリート・アジュバント (和光純薬工業) に、2度目の免疫はフロイント・インコンプリート・アジュバント (和光純薬工業) にそれぞれ懸濁して、3度目の免疫はアジュバントなしで免疫した。3度目の免疫から1週間後に耳動脈より採血し、血清分離後、56℃で30分間非働化した。ウェスタン・ブロット法で抗体価をチェックし、必要に応じて追加免疫を行った。

(4) 抗体の精製

a) 硫酸アンモニウム沈澱

血清20mlにPBS20ml、飽和硫酸 (pH7.0) を10ml加え、30分以上搅拌後、12000 rpm、4℃で30分間遠心した。上清に飽和硫酸を更に16.7ml加え、1時間程度搅拌し、再び上と同じ条件下で遠心した。生じた白色沈澱を20mlのPBSに懸濁し、PBSに対して一晩透析した。

b) アフィニティカラムの作製

アフィニティ支持体として、アフィゲル10とアフィゲル15 (BIO-RAD) を用いた。使用説明書に基づき、等電点が6.5以下のペプチド③、⑤はアフィゲル15に、6.5以上の①、②、④はアフィゲル10にそれぞれカップリングさせた。

アフィゲルは、1カラム約1mlの割合で量りとり、ガラスフィルター漏斗上で吸引しながら、10倍量の10mM酢酸ナトリウム (pH4.5)、続いてすぐに2倍量のカップリングバッファで洗浄した。次に、このゲルをペプチド溶液 (~20mgの抗原ペプチドを2mlのカップリングバッファに溶解したもの) と4℃で一晩混和した。翌日、これに1/10量 (~200 μ l) の1NのエタノールアミンHCl (pH8.0) を加えて1時間反応させた後、ミニカラム (ムロマック・カラム、室町化学工業) に充填し、10倍量のカップリングバッファで洗浄し、アフィニティカラムとした。

c) 抗体のアフィニティ精製

アフィニティカラムを20倍量のPBSで洗浄した後、透析した抗体溶液をマイクロチューブポンプ (type MP-3, EYELA) を用いて、室温でカラムの中を約2時間循環させ、担体と抗体を十分に反応させた。その後、十分量のPBSで洗浄し、特異抗体を50mMクエン酸溶液 (pH3.0) で900 μ lずつ10分画に溶出した。この時、1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を予め100 μ lずつ分注しておき、溶出と同時に中和されるようにした。

溶出後、OD₂₈₀で蛋白定量し、蛋白量の多い分画を集めた。抗体の安定化のため、必要に応じてセントリプレッ30 (Amicon) で1mg/ml以上になるように濃縮し、-80℃に保存した。

【発現ベクターのCOS1細胞へのトランスフェクション】

(1) DEAEデキストラン法

トランスフェクションの前日に、 $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/100mmディッシュの濃度でCOS1細胞を播き、37℃で一晩インキュベートした。翌日、5mlの1x TBS (37℃) で2度洗浄し、十分に吸引したところに、DNA-DEAEデキストラン混合液をディッシュの中央にゆっくり滴下した。細胞が乾燥しないように、5～10分ごとにディッシュを揺らしながら室温に保った。30分後、10mlの1x TBS で細胞表面をよく洗い、0.1mMのクロロキン (chloroquine diphosphate, SIGMA) を含むDMEM(+)中でインキュベートした。5時間後、クロロキンの入った培地を吸引し、通常のDMEM(+)に置き換えて培養した。

(2) エレクトロポレーション法

COS1細胞は、トリプシン処理後、低速遠心して集め、PBSで2回洗浄した。この間に細胞数を計数し、 1.2×10^7 cells/mlになるようにK-PBSに懸濁した。次に、キュベットに500 μ lの細胞懸濁液と $\sim 16 \mu$ gのDNAを混ぜ、氷上に静置した。10分後、キュベットごとジーン・バルサー (Gene Pulser, BIO-RAD) で電気ショック (220V, 960 μ FD, 30msec以下) を与え、再び氷上に静置した。10分後、これにDMEM(-)を500 μ lを加えて10分間室温に保った後、1キュベット分の細胞を4枚の100mmディッシュに播き、37℃で培養した。

【COS1細胞からの蛋白試料の調製】

COS1細胞は、トランスフェクションから48～72時間後、7mlのPBSで2回、1mlのホモジナイズバッファーで1回洗浄した後、Cell Lifter (COSTAR) で掻き取り、低速遠心して集めた。細胞のペレットは100mmディッシュ当り200 μ lのホモジナイズバッファーで再懸濁し、超音波破砕した。低速遠心して細胞残渣を除き、上清を超速心 (ベックマンTLA100型ローター、100,000 rpm、4℃、30分) した。この時の上清を細胞質分画とした。残った沈殿は、0.5% Tritonを含むホモジナイズバッファーに懸濁し、超音波処理により可溶化し、再び上記条件下で超速心した。遠心後の上清をTriton可溶性分画、沈殿をTriton不溶性分画とした。各分画は、4x SDSサンプル・バッファーを加えて-20℃に保存した。

【フォルボールエステル結合アッセイ】

トランスフェクションの前日に、60mmディッシュに 5×10^5 の密度でCOS1細胞を播いた。トランスフェクションは、カルシウム共沈法、またはDEAE-デキストラン法により行った。DMEM(+)中で60~70時間培養後、培地を吸引し、Binding mediumで2回洗浄した。次に、 $[^3\text{H}]$ PDBuを終濃度10nM、または50nMになるようにBinding medium (1 ml)に添加し、100 μM の非ラベルPDBu (P-L Biochemicals) の存在下 (非特異的結合、non-specific binding)、または非存在下 (全結合、total binding) に37℃でインキュベートした。30分後、冷PBSで3回洗浄し、トリプシン処理して細胞を集め、液体シンチレーション・カウンターでカウントを測定した。特異的結合 (specific binding) は、全結合活性と非特異的結合活性の差で表した。

【ウェスタン・ブロット法】

蛋白試料は、8%SDS-ポリアクリルアミド・ゲル、または市販の4-20%グラジエントゲルプレート (第一化学薬品) で電気泳動後 (20mA/ゲル)、セミドライ式転写装置 (ATTO) で、ゲルからナイロンフィルター (クリアブロットP膜、ATTO)に2mA/cm²で電氣的に移した。

フィルターは、1%のスキムミルク (雪印) を含むPBS中で一晚ブロッキングした後、コントロール血清、または1/500 ~ 1/2000倍に希釈した nPKC η 、 θ に特異的な抗ペプチド抗体を室温で2時間反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼを結合させた抗ウサギIgG抗体 (TAGO, Inc.) を室温で1時間反応させ、最後にキット® で発色させて目的の蛋白を検出した。

【自己リン酸化反応】

前述の蛋白分画法に従って調製したCOS1細胞の上清100~150 μl に、2~3 μl のコントロール血清、またはnPKC η 、 θ の特異的な抗体を加え、氷上に静置した。2時間後Zyrosorb (10% w/v, Zymed Laboratories) またはProteinA セファロース (50%v/v, Pharmacia) を適量加え、4℃で1時間程度ゆっくり回転させながら抗原抗体複合体を吸着させた。遠心後、ベレットを洗浄液Aで3回、洗浄液Bで1回洗った後、アッセイ溶液50 μl を加え、氷上で20分間反応させた。A液で2回洗浄後、ベレットに15 μl の4x SDS サンプルバッファーを加えて10分間、100℃で処理し、これをSDS-PAGEにかけ、ゲルを乾燥後オートラジオグラフィーを行った。

【in situ ハイブリダイゼーション】 (101)

マウスの諸臓器におけるin situ ハイブリダイゼーションは、大阪大学病理学教室の野村慎太郎先生に御協力頂いた。

(1)プローブの作製

nPKC η のD1領域のEcoR I-Kpn I 断片 (~0.4kb) とD2/D3領域のHpa II-Hpa II 断片 (~0.1kb) をBluescript-I KS(-)プラスミドに組み込んだ。

アンチセンスcRNAプローブは、EcoR I で線状化しT3 RNA ポリメラーゼで転写させることにより、一方、センスcRNA プローブは、Asp718 で線状化しT7 RNA ポリメラーゼで転写

させて作製した。これらの一本鎖RNAプローブは、ジゴキシゲニン (digoxigenin) でラベルしたウリジン三リン酸を基質としてジゴキシゲニン化(キットの)した。

(2)薄切片の作製・前処理

RNaseの混入を防ぐために、ガラス、及びプラスチック器具類は、DEPC(diethylpyrocarbonate)処理、または乾熱滅菌し、溶液類は 0.2% の DEPC を含む水で作製後、オートクレープして用いた。

CD1、またはWBマウスの組織は4% パラホルムアルデヒド / PBS で固定し、パラフィン包埋後、ミクロトームで薄切片 (4 μ m) にした。ハイブリダイゼーションの前に、薄切片は脱パラフィンし、エタノールで水和させ、4% パラホルムアルデヒド / 0.1M リン酸緩衝液中に20分間つけて再固定した。次に、0.2N 塩酸処理により内在性のアルカリフォスファターゼを不活化し、更に非特異的結合を減らすために0.25% 無水酢酸 / 0.1M トリエタノールアミン (pH8.0)溶液で10分間処理した。最後に、薄切片は、エタノール濃度を段階的に上げながら脱水し、風乾した。

(3)ハイブリダイゼーション

薄切片に50 μ lのハイブリダイゼーション溶液を滴下し、シリコン処理したカバーガラスをのせて50℃で16時間高湿チャンバー内でインキュベートした。5x SSC (50℃、10分)、50% ホルムアルデヒド / 2x SSC (50℃、30分)、1x TES (37℃、15分) の順で洗浄後、37℃で10分間 RNase処理し、再び1x TES (37℃、15分)でリンスした。続いて2x SSC、0.2x SSCで50℃で15分間それぞれ2回ずつ処理し、1x TSでリンスした後、室温で30分間ブロッキングを行った。次に、薄切片をアルカリフォスファターゼを結合させた抗ジゴキシゲニン抗体と室温で45分間反応させた。最後に、1x TS、1x TSMで洗浄後、室温で一晩発色液と反応させ、翌日、10 M トリス塩酸緩衝液(pH8.0) / 1mM EDTAで反応を止めた。必要に応じて、サフランINによるカウンター染色を施した。

参 考 文 献

1. Nishizuka, Y. (1984). Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* **225**, 1365-1370.
2. Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698.
3. Nishizuka, Y. (1989). The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* **262**, 1826-1833.
4. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., and Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. (I). *J. Biol. Chem.* **252**, 7603-7609.
5. Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., and Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. (II). *J. Biol. Chem.* **252**, 7610-7616.
6. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979). Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **254**, 3692-3695.
7. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979). Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 1218-1224.
8. Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **255**, 2273-2276.
9. Castagna, M., Takai, Y., Kalbuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257**, 7847-7851.
10. Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R., and Nishizuka, Y. (1983). Protein kinase C as a possible receptor of tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **258**, 11442-11445.
11. Kraft, A. S., and Anderson, W. B. (1983). Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* **301**, 621-623.
12. Exton, J. H. (1990). Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* **265**, 1-4.
13. Huang, K.-P., Nakabayashi, H., and Huang, F.L. (1986). Isozymic forms of rat brain Ca^{2+} -activated and phospholipid-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 8535-8539.
14. Jaken, S., and Kiley, S. C. (1987). Purification and characterization of three types of protein kinase C from rabbit brain cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 4418-4422.

15. Kikkawa, U., Ono, Y., Ogita, K., Fujii, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Kosaka, Y., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1987). Identification of the structures of multiple subspecies of protein kinase C expressed in rat brain. *FEBS Lett.* **217**, 227-231.
16. Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1987). Three distinct forms of rat brain protein kinase C: differential response to unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 797-802.
17. Ase, K., Saito, N., Shearman, M. S., Kikkawa, U., Ono, Y., Igarashi, K., Tanaka, C., and Nishizuka, Y. (1988). Distinct cellular expression of βI and βII -subspecies of protein kinase C in rat cerebellum. *J. Neurosci.* **8**, 3850-3856.
18. Kosaka, Y., Ogita, K., Ase, K., Nomura, H., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1988). The heterogeneity of protein kinase C in various rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 973-981.
19. Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D., and Ullrich, A. (1986). The complete primary structure of protein kinase C—the major phorbol ester receptor. *Science* **233**, 853-859.
20. Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., Francke, U., and Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233**, 859-866.
21. Knopf, J. L., Lee, M.-H., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewich, R. M., and Bell, R. M. (1986). Cloning and Expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* **46**, 491-502.
22. Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokokura, H., Sakoh, T., and Hidaka, H. (1987). Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C. *Nature* **325**, 161-166.
23. Housey, G. M., O'Brian, C. A., Johnson, M. D., Kirschmeier, P., and Weinstein, I. B. (1987). Isolation of cDNA clones encoding protein kinase C: evidence for a protein kinase C-related gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1065-1069.
24. Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S., and Suzuki, K. (1988). A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. *Cell* **53**, 731-741.
25. Ohno, S., Kawasaki, H., Konno, Y., Inagaki, M., Hidaka, H., and Suzuki, K. (1988). A fourth type of rabbit protein kinase C. *Biochemistry* **27**, 2083-2087.
26. Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1988). The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* **263**, 6927-6932.
27. Housey, G. M., Johnson, M. D., Hsiao, W. L. W., O'Brian, C. A., Murphy, J. P., Kirschmeier, P., and Weinstein, I. B. (1988). Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell* **52**, 343-354.
28. Konno, Y., Ohno, S., Akita, Y., Kawasaki, H., and Suzuki, K. (1989). Enzymatic properties of a novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC. *J. Biochem. (Tokyo)* **106**, 673-678.

29. Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1989). Protein kinase C ζ subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3099-3103.
30. Schaap, D., Parker, P. J., Bristol, A., Kriz, R., and Knopf, J. (1989). Unique substrate specificity and regulatory properties of PKC- ϵ : a rationale for diversity. *FEBS Lett.* **243**, 351-357.
31. Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665.
32. 吉川潮、小野功貴(1989). プロテインキナーゼCの構造決定、およびその多様性の解析. *生化学* **61**, 551-568.
33. 大野茂男(1989). プロテインキナーゼCの分子多様性およびその構造と機能に関する分子生物学的解析. *生化学* **61**, 569-587.
34. Ohno, S., Akita, Y., Hata, A., Osada, S., Kubo, K., Konno, Y., Akimoto, K., Mizuno, K., Saido, T., Kuroki, T., and Suzuki, K. (1991). Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Advances in Enzyme Regulation*. **31**, 287-303.
35. Ono, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Fujii, T., Kurokawa, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1987). Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science* **236**, 1116-1120.
36. Kubo, K., Ohno, S., and Suzuki, K. (1987). Primary structures of human protein kinase C β I and β II differ only in their C-terminal sequences. *FEBS Lett.* **223**, 138-142.
37. Kubo, K., Ohno, S., and Suzuki, K. (1987). Nucleotide sequence of the 3' portion of a human gene for protein kinase C β I/II. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7179-7180.
38. Leibersperger, H., Gschwendt, M., and Marks, F. (1990). Purification and characterization of a calcium-unresponsive, phorbol ester/ phospholipid-activated protein kinase from porcine spleen. *J. Biol. Chem.* **265**, 16108-16115.
39. Osada, S., Mizuno, K., Saido, T. C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC η , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* **265**, 22434-22440.
40. Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**, 857-872.
41. Bacher, N., Zisman, Y., Berent, E., and Lívneh, E. (1991). Isolation and characterization of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin, and heart. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 126-133.
42. House, C., and Kemp, B. E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* **238**, 1726-1728.
43. Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A., and Suzuki, K. (1990). A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C α abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. *J. Biol. Chem.* **265**, 6296-6300.

44. Yoshida, Y., Huang, F. L., Nakabayashi, H., and Huang, K.-P. (1988). Tissue distribution and developmental expression of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **263**, 9868-9873.
45. Wada, H., Ohno, S., Kubo, K., Taya, C., Tsuji, S., Yonehara, S., and Suzuki, K. (1989). Cell type-specific expression of the genes for the protein kinase C family: down regulation of mRNAs for PKC α and nPKC ϵ upon *in vitro* differentiation of a mouse neuroblastoma cell line Neuro 2a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 533-538.
46. Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1989). Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4868-4871.
47. Kaibuchi, K., Fukumoto, Y., Oku, N., Takai, Y., Arai, K., and Muramatsu, M. (1989). Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **264**, 13489-13496.
48. Hume, W. F. (1983). Stem cells in oral epithelia, p. 233-270. *In* Potten, C. S. (ed.), *Stem cell*, Churchill Livingstone.
49. Dhouailly, D., Xu, C., Manabe, M., Schermer, A., and Sun, T.-T. (1989). Expression of hair-related keratins in a soft epithelium: subpopulations of human and mouse dorsal tongue keratinocytes express keratin markers for hair-, skin- and esophageal-types of differentiation. *Exp. Cell Res.* **181**, 141-158.
50. Nakadate, T., Yamamoto, S., Aizu, E., and Kato, R. (1986). Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and epidermal ornithine decarboxylase activity in mouse skin by palmitoylcarnitine. *Cancer Res.* **46**, 1589-1593.
51. Gschwendt, M., Kittstein, W., Horn, F., Leibersperger, H., and Marks, F. (1989). A phorbol ester and phospholipid-activated, calcium-unresponsive protein kinase in mouse epidermis: characterization and separation from protein kinase C. *J. Cell. Biochem.* **40**, 295-307.
52. Leibersperger, H., Gschwendt, M., Gernold, M., and Marks, F. (1991). Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the δ -type in different species and murine tissues. *J. Biol. Chem.* **266**, 14778-14784.
53. Rozengurt, E., Rodriguez-Pena, M., and Smith, K. A. (1983). Phorbol esters, phospholipase C, and growth factors rapidly stimulate the phosphorylation of a Mr 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7244-7248.
54. Stumpo, D. J., Graff, J. M., Albert, K. A., Greengard, P., and Blackshear, P. J. (1989). Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the "80-to 87-kDa" myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4012-4016.
55. Kasahara, K., Chida, K., Tsunenaga, M., Kohno, Y., Ikuta, T., and Kuroki, T. (1991). Identification of lamin B2 as a substrate of protein kinase C in BALB/MK-2 mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 20018-20023.
56. Chida, K., Yamada, S., Kato, N., and Kuroki, T. (1988). Phosphorylations of Mr 34,000 and 40,000 proteins by protein kinase C in mouse epidermis *in vivo*. *Cancer Res.* **48**, 4018-4023.

57. Chida, K., Tsunenaga, M., Kasahara, K., Kohno, Y., and Kuroki, T. (1990a). Regulation of creatine phosphokinase B activity by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 346-350.
58. Chida, K., Kasahara, K., Tsunenaga, M., Kohno, Y., Yamada, S., Ohmi, S., and Kuroki, T. (1990b). Purification and identification of creatine phosphokinase B as a substrate of protein kinase C in mouse skin *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 351-357.
59. Hennings, H., Devor, D., Wenk, M. L., Slaga, T. J., Former, B., Colburn, N. H., Bowden, G. T., Elgjo, K., and Yuspa, S. H. (1981). Comparison of two-stage epidermal carcinogenesis initiated by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in newborn and adult SENCAR and BALB/c mice. *Cancer Res.* **41**, 773-779.
60. Hennings, H., Shores, R., Wenk, M. L., Spangler, E. F., Tarone, R., and Yuspa, S. H. (1983). Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature* **304**, 67-69.
61. Hashimoto, Y. (1991). Ph.D. thesis. University of Tokyo.
62. Fournier, A., and Murray, A. W. (1987). Application of phorbol ester to mouse skin causes a rapid and sustained loss of protein kinase C. *Nature* **330**, 767-769.
63. Droms, K. A., and Malkinson, A. M. (1991). Mechanisms of glucocorticoid involvement in mouse lung tumorigenesis. *Exp. Lung Res.* **17**, 359-370.
64. Droms, K. A., and Malkinson, A. M. (1991). Phorbol ester-induced tumor promotion by downregulation of protein kinase C. *Mol. Carcinogenesis* **4**, 1-2.
65. Huang, F. L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., and Huang K.-P. (1987). Differential distribution of protein kinase C isozymes in the various regions of brain. *J. Biol. Chem.* **262**, 15714-15720.
66. Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K., Hagiwara, M., Watanabe, M., Ohta, H., Ito, Y., Tsurudome, M., and Yoshida, T. (1988). Cell type-specific expression of protein kinase C isozymes in the rabbit cerebellum. *J. Biol. Chem.* **263**, 4523-4526.
67. Malinow, R., Schulman, H., and Tsien, R. W. (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* **245**, 862-866.
68. Linden, D. J., and Connor, J. A. (1991). Participation of postsynaptic PKC in cerebellar long-term depression in culture. *Science* **254**, 1656-1659.
69. David, J. D., Faser, C. R., and Perrot, G. P. (1990). Role of protein kinase C in chick embryo skeletal myoblast fusion. *Dev. Biol.* **139**, 89-99.
70. Vaidya, T. B., Weyman, C. M., Teegarden, D., Ashendel, C. L., and Taparowsky, E. J. (1991). Inhibition of myogenesis by the H-ras oncogene: implication of a role for protein kinase C. *J. Cell Biol.* **114**, 809-820.
71. Standaert, M. L., Farese, R. V., Cooper, D. R., and Pollet, R. J. (1988). Insulin-induced glycerolipid mediators and the stimulation of glucose transport in BC3H-1 myocytes. *J. Biol. Chem.* **263**, 8696-8705.

72. Henriksen, E. J., Rodnick, K. J., and Holloszy, J. O. (1989). Activation of glucose transport in skeletal muscle by phospholipase C and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* **264**, 21536-21543.
73. Turinsky, J., Bayly, B. P. and O'Sullivan, D. M. (1990). 1,2-diacylglycerol and ceramide levels in rat skeletal muscle and liver *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **265**, 7933-7938.
74. Olson, E. N. (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* **4**, 1454-1461.
75. Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
76. Wright, W. E., Sassoon, D. A., and Lin, V. K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**, 607-617.
77. Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., and Arnold, H. H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* **8**, 701-709.
78. Rhodes, S. J., and Konieczny, S. F. (1989). Identification of MRF4: A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* **3**, 2050-2061.
79. Laufer, R., Klarsfeld, A., and Changeux, J.-P. (1991). Phorbol ester inhibit the activity of the chicken acetylcholine receptor α -subunit gene promoter. *Eur. J. Biochem.* **202**, 813-818.
80. Schaeffer, E., Smith, D., Mardon, G., Quinn, W., and Zuker, C. (1989). Isolation and characterization of two new *Drosophila* protein kinase C genes, including one specifically expressed in photoreceptor cells. *Cell* **57**, 403-412.
81. Smith, D. P., Ranganathan, R., Hardy, R. W., Marx, J., Tsuchida, T., and Zucker, C. S. (1991). Photoreceptor deactivation and retinal degeneration mediated by a photoreceptor-specific protein kinase C. *Science* **254**, 1478-1483.
82. Tabuse, Y., Nishiwaki, K., and Miwa, J. (1989). Mutations in a protein kinase C homolog confer phorbol ester resistance on *Caenorhabditis elegans*. *Science* **243**, 1713-1716.
83. Levin, D. E., Fields, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M., and Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**, 213-224.
84. Ogita, K., Miyamoto, S., Koide, H., Iwai, T., Oka, M., Ando, K., Kishimoto, A., Ikeda, K., Fukami, Y., and Nishizuka, Y. (1990). Protein kinase C in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with the mammalian enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5011-5015.
85. Mizuno, K., Kubo, K., Saido, T. C., Akita, Y., Osada, S., Kuroki, T., Ohno, S., and Suzuki, K. (1991). Structure and properties of a ubiquitously expressed protein kinase C, nPKC δ . *Eur. J. Biochem.* **202**, 931-940.
86. Akita, Y., Ohno, S., Konno, Y., Yano, A., and Suzuki, K. (1990). Expression and properties of two distinct classes of the phorbol ester receptor family, four conventional protein kinase C types, and a novel protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **265**, 354-362.

87. Hubbard, S. R., Bishop, W. R., Kirschmeier, P., George, S. J., Cramer, S. P., and Hendrickson, W. A. (1991). Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* **254**, 1776-1779.
88. Gschwendt, M., Kittstein, W. and Marks, F. (1991). Protein kinase C activation by phorbol esters: do cysteine-rich regions and pseudosubstrate motifs play a role? *Trends Biochem. Sci.* **16**, 167-169.
89. Bell, R. M., and Burns, D. J. (1991). Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**, 4661-4664.
90. Rosoff, P. M., Savage, N., and Dinarello, C. A. (1988). Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* **54**, 73-81.
91. Whetton, A. D., Monk, P. N., Consalvey, S. D., Huang, S. J., Dexter, T. M., and Downes, C. P. (1988). Interleukin 3 stimulates proliferation via protein kinase C activation without increasing inositol lipid turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3284-3288.
92. Wright, T. M., Rangan, L. A., Shin, H. S., and Raben, D. M. (1988). Kinetic analysis of 1,2-diacylglycerol mass levels in cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**, 9374-9380.
93. Lacal, J. C., Moscat, J., and Aaronson, S. A. (1987). Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-ras oncogene. *Nature* **330**, 269-272.
94. Wolfman, A., and Macara, I. G. (1987). Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in ras-transformed fibroblasts. *Nature* **325**, 359-361.
95. Okayama, H., Kawauchi, M., Brownstein, M., Lee, F., Yokota, Y., and Arai, K. (1987). High-efficiency cloning of full-length cDNA; construction and screening of cDNA expression libraries for mammalian cells. *Methods Enzymol.* **154**, 3-28.
96. Aviv, H., and Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408-1412.
97. Hattori, M., and Sakaki, Y. (1986). Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* **152**, 232-238.
98. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
99. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
100. Lerner, R. A., Green, N., Alexander, H., Liu, F.-T., Sutcliffe, J. G., and Shinnick, T. M. (1981). Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3403-3407.
101. Nomura, S., Wills, A. J., Edwards, D. R., Heath, J. K., and Hogan, B. L. M. (1988). Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonection) RNA as revealed by *in situ* hybridization. *J. Cell. Biol.* **106**, 441-450.

謝 辞

4年前、医学部を卒業早々張り切って実験を始めようとした私は、その第一日目の第一歩からして躓いてしまいました。試薬を量る天秤からpHメーターまで（医学部にも生化学実験があったにもかかわらず!!）その使い方がさっぱりわからなかったからです。その後も数多くの失敗を重ねてきた私ですが、こうして曲がりなりにも博士論文をまとめることができました。勿論、ここまで来ることができたのは、指導教官の黒木登志夫先生、東京都臨床医学総合研究所で御指導下さった大野茂男先生（現横浜市立大学医学部）、鈴木絃一先生（現東京大学応用微生物学研究所）の温かい御力添えによることは言うまでもありません。自主性を尊重し、自由な雰囲気の中で研究させて下さいましたこの三人の先生方に、ここに深く感謝申し上げます。

それから、実験の技術面でのアドバイスやサイエンスの話はもとより、いろいろな面で私を励まし、刺激して下さいました東京大学医科学研究所癌細胞学研究部、そして臨床研選伝情報部の皆さんに心よりお礼申し上げます。

本当に有難うございました。

