

氏名	しん どう ま ゆ み 進 藤 真 由 美
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2500 号
学位授与の日付	平 成 15 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Chemical Studies on the Function of C1 Homology Domains of Protein Kinase C (プロテインキナーゼCのC1ホモロジードメインの機能に関する有機化学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 東 肇 教 授 井 上 國 世 教 授 吉 川 正 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

発がんプロモーターとは、遺伝子レベルで傷害を受けた潜在的な腫瘍細胞を増殖させ、最終的にがん細胞へと誘導する化学物質の総称である。ホルボールエステルに代表される強力な発がんプロモーターは、プロテインキナーゼC (PKC) というセリン/スレオニン特異的なタンパク質リン酸化酵素を主な標的としている。本酵素は、ジアシルグリセロールをセカンドメッセンジャーとする細胞内情報伝達における鍵酵素としても広く知られている。

発がんプロモーターは、PKCアイソザイムのうち、conventional PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ ) 及び novel PKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) にそれぞれ2個ずつ存在するC1ドメイン (C1A, C1B) に結合する。従って、発がんプロモーションにおけるPKCの役割を明らかにする上で、個々のC1ドメインの機能解析が不可欠であるが、全長のPKCを用いた実験では個々のC1ドメインの発がんプロモーター結合能は評価できない。本論文は、全PKCアイソザイムのC1ドメイン中の発がんプロモーター結合部位 (約50残基の亜鉛フィンガー様配列) を含む合成ペプチド (PKC C1 ペプチド) の機能解析を行なうとともに、PKCのC1ホモロジードメインを有するジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) のC1ドメインについても同様に解析した結果をとりまとめたものである。その主な内容は以下の通りである。

第1章では、PKCアイソザイムの種類とC1ドメインをはじめとする各種機能ドメインの構造、及びPKC C1ホモロジードメインを有するPKC以外の酵素について概説し、本研究の目的及び意義について述べている。

第2章では、約50残基のPKC C1ペプチドのうち、水に対する溶解性が著しく低いC1ペプチド数種において、C末端及びN末端をそれぞれ10残基延長した約70残基のペプチドを高純度で化学合成した結果について述べている。これらの合成ペプチドの水に対する溶解性は著しく改善され、ホルボールエステルに対する結合試験が可能となった。

第3章では、中性緩衝液に対して溶解性の高いPKC  $\eta$  のC1Bペプチド ( $\eta$ -C1B) を一例として、PKC C1ペプチドの亜鉛イオン及び他の金属によるフォールディングを、エレクトロスプレー質量分析法により精密に解析した結果について述べている。 $\eta$ -C1Bは、特異的に2個の亜鉛イオンを配位して、ホルボールエステルとの結合に必要な立体構造をとることが明らかになった。一方、カドミウムイオンは亜鉛イオンと同様に、 $\eta$ -C1Bに対して特異的に2個配位するのに対し、銅イオンは酸化により分子内S-S結合を形成させることが判明した。亜鉛イオン及びカドミウムイオンでフォールディングした $\eta$ -C1Bに対するphorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) の解離定数 ( $K_d$ ) は、全長PKC  $\eta$  の $K_d$ 値と完全に一致した。

第4章では、PKC全アイソザイムのC1ペプチドに対するPDBuの解離定数について述べている。カルシウム非依存性の novel PKCでは、C1Aと比べてC1Bの $K_d$ 値が著しく小さく、C1Bが主なPDBu結合部位であることが判明した。一方、カルシウム依存性のconventional PKCでは、C1Aが主なPDBu結合部位であった。なお、PKC  $\beta$  及びPKC  $\gamma$  においては、2つのC1ペプチドが同等のPDBu結合能を示した。これらのPKC C1ペプチドライブラリーを用いて、抗がん剤の候補物質であるbryostatin 1の結合定数を測定し、2つのC1ペプチドに対する結合選択性の違いが発がんプロモーションと密接に関連していることを示した。

第5章では、PKC C1ホモロジドメインを持つジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) に注目し、DGKアイソザイムのC1ペプチドの合成並びに機能解析を行った結果がまとめられている。9種類のDGKアイソザイムのうち、DGK $\gamma$ 及びDGK $\beta$ が新しいホルボールエステルの受容体であること、及びホルボールエステルはこれらのアイソザイムのC1Aに直接結合することにより本酵素の細胞膜への移行を引き起こしていることを明らかにしている。

最後に、第6章で本研究によって解明された点及び結果がまとめられている。

## 論文審査の結果の要旨

プロテインキナーゼC (PKC) は、細胞内情報伝達の要に位置し、発がん、神経痛などの多くの疾患に関与しているタンパク質リン酸化酵素である。PKCは少なくとも11種類のアイソザイムからなり、それらの機能及び細胞内局在性が大きく異なっている。さらに発がんプロモーターであるホルボールエステルの結合するPKCアイソザイムには、それぞれ2個のホルボールエステル結合部位 (C1A, C1B) が存在するため、これらのC1ドメインの機能解析が強く望まれていた。本論文では、PKC C1ドメインの発がんプロモーター結合部位を含む50~70残基からなるペプチド (PKC C1ペプチド) を高純度で化学合成し、これらのフォールディング及びホルボールエステル結合能を精密に解析すると同時に、PKCのC1ホモロジドメインを有するジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) のC1ドメインについても同様に機能解析した結果をとりまとめたものである。本論文の評価すべき主要な点は、以下の通りである。

1. 50~70残基よりなるPKC C1ペプチドを高純度で化学合成し、それらの機能解析を精密に行った。特に、エレクトロスプレー質量分析計を用いた解析によって、PKC C1ペプチドが亜鉛イオン2個を特異的に配位していることを明確に示した点は高く評価できる。以前、原子吸光分析によってPKC C1ドメインの亜鉛の配位数2個が決定されていたが、精度が低かった。さらに同様の解析により、カドミウム及び銅イオンの効果も分子レベルで初めて明らかにした。

2. 全PKCアイソザイムのC1ペプチドに対するphorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) の解離定数を、測定条件を工夫することにより、初めて正確に決定することに成功した。本PKC C1ペプチドライブラリーは、PDBu以外のリガンドのPKC C1ペプチドに対する結合定数の測定をも可能にした。抗がん剤の候補物質として注目されているbryostatin 1とPDBuとの間で、novel PKCアイソザイムのC1A及びC1Bに対する結合選択性が異なることを見いだした点は興味深い。

3. PKC C1ホモロジドメインを持つ別のリン酸化酵素として、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) に注目し、本酵素のC1ドメインについてもPKCと同様に機能解析を行なった。その結果、DGK $\gamma$ 及びDGK $\beta$ が新しいホルボールエステルの受容体であることを初めて明確に証明できた。これまで、分子生物学的手法によって調製された全長DGKアイソザイムにおいては、酵素の不安定性及び翻訳後の修飾などにより、ホルボールエステル結合能は測定されていなかった。これより、酵素の機能ドメインの化学合成は、不安定な全長酵素の機能解析に特に有効な手段であることが実証された。

以上のように本論文は、PKC及びDGKアイソザイムのC1ドメインを純度高く化学合成して精密な機能解析を行い、発がんプロモーターの作用機構に新知見を加えたものであり、生物有機化学、ペプチド化学及び酵素化学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年10月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。