



Title	Downregulation of hydrogen peroxide-induced PKC δ activation in N-acetylglucosaminyltransferase III transfected HeLaS3 cells
Author(s)	渋谷, 幸直
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43863
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 17597 号

学位授与年月日 平成15年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学位論文名 Downregulation of hydrogen peroxide-induced PKC δ activation in N-acetylglucosaminyltransferase III transfected HeLaS3 cells
(N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ過剰発現細胞における PKC δ の抑制効果)

論文審査委員 (主査)

教授 谷口 直之

(副査)

教授 中村 敏一 教授 高井 義美

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

近年、糖タンパクの糖鎖構造の変化が細胞の生存・分化シグナルや癌化に関与していることが数多く報告されている。本研究では、N型糖鎖修飾遺伝子導入が細胞内シグナル伝達経路に与える影響とその機構の解明を目指した。N-アセチルグルコサミン転移酵素群はN型糖鎖合成の初期に働く遺伝子群であり、その後の糖鎖の伸張を決定する重要な酵素群である。この酵素群の中でもユニークな性質を持つ N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ (GnT-Ⅲ) について注目し、解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

ヒト GnT-III を過剰発現させた HeLaS3 細胞において過酸化水素刺激によって駆動するストレスシグナルを調べたところ、GnT-III 過剰発現細胞では過酸化水素によって誘導される細胞死が顕著に抑制されていることが明らかとなった。この細胞死抑制効果がアポトーシスの抑制によるものであるかを調べたところ、GnT-III 高発現細胞では過酸化水素によって誘導される DNA の断片化およびクロマチンの凝集が抑制されていた。またカスパーゼ 3 特異的阻害剤存在下では、コントロール細胞の生存率が GnT-III 高発現細胞と同レベルにまで回復していた。これらのことから GnT-III 高発現細胞では過酸化水素によって誘導されるアポトーシスが抑制されていることが明らかとなった。

細胞内のどのシグナル伝達経路が、GnT-III高発現細胞におけるアポトーシスの抑制効果に影響を及ぼしているのかを調べるために、まず生存シグナルであるNF- κ B経路とPI3K/Akt経路の活性化レベルについて比較検討を行った。ゲルシフトアッセイ及びレポータージーンアッセイを行ったところ、HeLaS3細胞では過酸化水素によるNF- κ Bの活性化レベルは非常に低く、コントロール細胞とGnT-III高発現細胞でその活性に変化が見られなかった。また活性化Akt特異的抗体を用いたウエスタンブロットの結果から、Aktの活性化レベルも両方で差は見られなかった。これらのことから過酸化水素によるNF- κ B経路およびPI3K/Akt経路の活性化に対するGnT-III発現の影響は見られないと考えられる。

次に MAP キナーゼファミリーの活性化レベルについての比較検討を行ったところ、生存シグナルである **Erk1/2**

の活性化レベルはコントロール細胞と GnT-III 高発現細胞で差が見られなかったのに対し、ストレス応答性の MAPK である JNK/SAPK の活性化が GnT-III 高発現細胞では顕著に抑制されていることが明らかとなった。この抑制に伴い JNK の下流の転写因子である c-Jun のリン酸化及び上流の MAPKK である MKK4/SEK1 の活性化も抑制されていた。また JNK 特異的な阻害剤 SP600125 前処理後に細胞の生存率を判定したところ、コントロール細胞の生存率が GnT-III 高発現細胞と同レベルにまで回復していた。これらのことから GnT-III 高発現細胞では JNK/SAPK の活性化を抑制することにより過酸化水素によって誘導されるアポトーシスを抑制しているものと考えられた。

GnT-III 高発現細胞では過酸化水素による JNK の活性化が抑制されていることから、その上流の調節因子の同定を試みた。PMA48 時間前処理を行って PMA 感受性の PKC ファミリーを分解させた条件下では、コントロール細胞の JNK1 の活性化レベルが GnT-III 高発現細胞と同レベルまで抑制されていた。またこの抑制に伴い、コントロール細胞の生存率が GnT-III 高発現細胞と同レベルまで回復していた。これらの結果より、過酸化水素による JNK1 の活性化とアポトーシスの駆動に PKC ファミリーが関与することが示唆された。

上記のことから普遍的に発現している PKC アイソフォームについて過酸化水素による活性化レベルを調べたところ、PKC δ の活性化が GnT-III 高発現細胞で特異的に抑制されていることが明らかとなった。そこで PKC δ 特異的阻害剤である Rottlerin 前処理を行ったところ、PKC δ の活性化抑制に伴いコントロール細胞における JNK1 の活性化レベルが GnT-III 高発現細胞とほぼ同レベルまで抑制されていた。以上のことから GnT-III 高発現細胞では PKC δ -JNK1 経路を特異的に抑制することにより、過酸化水素によって誘導されるアポトーシスが抑制されているものと考えられる。

[総 括]

GnT-III 遺伝子導入による N 型糖鎖構造の改変が上皮成長因子 (EGF) や神経成長因子 (NGF) といった生存シグナルのみならず、ストレス応答性のシグナル伝達に対しても影響を及ぼすことが本研究によって明らかとなった。今後 PKC δ の抑制にどのような上流因子が関与しているかを解明することは重要な課題である。細胞の生存・分化シグナルに対する翻訳後修飾の詳細な機構を解明することは細胞の癌化シグナルの解明に寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

N 型糖鎖の分岐構造の決定に関与する酵素の一つである N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は他の糖転移酵素が糖鎖の伸張反応を促進するのに対し、その後の糖鎖の伸張反応を抑制するというユニークな特徴を持つことが知られている。

近年になって、肝発癌課程において GnT-III の発現と活性が上昇していることや、GnT-III 過剰発現細胞において様々な生存シグナルの駆動に影響を及ぼしていることが報告されてきた。そこで様々なストレス応答性のシグナルに対する GnT-III 過剰発現の影響をしらべたところ、過酸化水素によって誘導されるアポトーシスを顕著に抑制していることを見いだした。またこの抑制効果はストレス応答性の MAPK である JNK1 の活性が抑制されていることによるものと考えられる。さらにこの JNK1 の活性化抑制には PKC ファミリーの一つである PKC δ の活性化レベルを選択的に抑制していることに起因するものであることが明らかとなった。これらのことから、GnT-III 過剰発現細胞において、過酸化水素によって駆動される PKC δ -JNK1 線路を選択的に抑制することによってアポトーシスを抑制していることが明らかとなった。