

論文内容要旨

Features and mechanisms of propofol-induced
protein kinase C (PKC) translocation and
activation in living cells

(生細胞における propofol 誘発性 PKC トランスロケ
ーションと活性化の特徴と機序)

Frontiers in Pharmacology, 2023;14:1284586.

主指導教員：酒井 規雄教授
(医系科学研究科 神経薬理学)

副指導教員：橋本 浩一教授
(医系科学研究科 神経生理学)

副指導教員：森岡 徳光教授
(医系科学研究科 薬効解析科学)

野口 颯真

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】 静脈麻酔薬 Propofol は全身麻酔の導入・維持や鎮静に広く用いられており、GABA_A 受容体を賦活化することによって麻酔作用を発揮すると考えられている。Propofol のターゲットは GABA_A 受容体以外にもいくつか知られており、我々はその中でもプロテインキナーゼ C(PKC)に注目した。我々は、Propofol は PKC の局在を変化させ(PKC トランスロケーション)、*in vitro* において PKC を活性化することを明らかにした。今回、我々は、PKC サブタイプ特異的な Propofol 誘発性 PKC トランスロケーションの様式の更なる検討を行い、C kinase activity reporter(CKAR)を用いた細胞内局所における PKC 活性化の測定を試みた。さらに、PKC の一部のサブタイプで見られる核内へのトランスロケーションのメカニズムの解明を試みた。最後に、いくつかの Propofol 誘導体を合成し、それぞれがどのような効果を引き起こすかを調べ、PKC トランスロケーションに必要なプロポフォールの構造モチーフを確かめた。

【方法】 HeLa 細胞に電気穿孔法を用いて、各種 PKC-GFP, 各種 Targeting-CKAR, 3xGFP を発現させた。Targeting-CKAR は FRET を利用して PKC 活性化を測定するインジケータであり、様々な細胞内局所に発現誘導が可能である。3xGFP は GFP 分子を 3 つタンデムにつなげたタンパク質である。Propofol によるタンパク質の局在変化は蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡下でタイムラプス撮影を行い観察した。

【結果・考察】100 μ M 以上の propofol は、PKC-GFP のトランスロケーションを誘発した。PKC α と PKC δ 、PKC η は細胞膜に顕著に、PKC δ は Golgi 体、PKC η は小胞体にもトランスロケーションした。PKC η については ER-tracker を用いてトランスロケーション後の小胞体との局在の一致が確認できた。PKC ζ は核内へトランスロケーションした。

Targeting-CKAR を用いた FRET 解析では、propofol による PKC トランスロケーション先である細胞膜と Golgi 体において PKC が急速かつ顕著に活性化していることが観察された。また、propofol による PKC 活性化は濃度依存的であり、臨床時の濃度である 30 μ M でも活性化が見られた。

一方、Propofol による核内へのトランスロケーションは、PKC 特異的でなく、蛋白質の核外移行を阻害する Leptomycin B 処置に影響されなかった。核移行シグナル (NLS)、核排出シグナル (NSE) を有しない 3xGFP も Propofol により移動した。これらの結果から、Propofol は、NLS や NSE とは無関係に、核膜細胞質間の分子透過性を変化させることにより、タンパク質を核内外の濃度が均一化するように移行させることが予想された。

Propofol の異性体は PKC α を Propofol よりも低い濃度で細胞膜へとトランスロケーションさせた。対して Propofol の 4 位誘導体は 4 位の置換基の種類により PKC α トランスロケーションの動態が異なった。このことから PKC の細胞膜へのトランスロケーションに關与する Propofol の構造モチーフと核内外へのトランスロケーションに關与する Propofol の構造モチーフは異なることが推測された。

【結論】 Propofol は分子種特異的な PKC トランスロケーションを誘発し、PKC の移行した部位で PKC を活性化した。また、Propofol は、核膜細胞質間の分子透過性を変化させることにより、受動的なメカニズムで、核内外へタンパク質を移行させることが明らかになった。これらの

結果は Propofol の作用発揮に PKC や他のタンパク質の局在の変化が関与している可能性を示した。