

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	野口 颯真
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	藤原 祐一郎	印
審査委員	教授	浅野 知一郎	
審査委員	准教授	佐伯 昇	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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 には一般的な副作用として投与時の血管痛・血圧低下、大量使用時の致死的な副作用として Propofol 注入症候群 (PRIS) が知られるが、どのような機序で副作用が発症するかは詳細には明らかでない。</p> <p>Propofol の作用点は GABA_A 受容体以外にもいくつか知られており、本論文では、その中でもプロテインキナーゼ C(PKC)に注目した。PKCは構造上3つのサブグループに分類され、10 種類のサブタイプが存在する。Propofol は in vitro において PKC を活性化し、細胞内の PKC の局在を変化させる (PKC トランスロケーション) ことが知られている。しかしながら、Propofol がそれぞれの分子種に対してどのように作用するか、また、実際に細胞内の PKC を活性化するかは明らかでない。そこで、本論文では以下の目的に基づいて研究を展開した。</p> <p>①PKC 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。②C kinase activity reporter (CKAR) を用いた細胞内局所における PKC 活性化の測定。③PKC 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。④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 Propofol の構造モチーフの特定。</p> <p>上記いずれの目的に対する実験も HeLa 細胞に各種タンパク質 (PKC-GFP、CKAR、3xGFP 等) を過剰発現させ、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。</p> <p>まず目的①の結果については、100 μM 以上の Propofol は、PKC-GFP のトランスロケーションを誘発した。また、Propofol による PKC の局在変化はサブタイプ特異的であった。PKCα と PKCδ、PKCη は細胞膜に顕著に、PKCδ は Golgi 体、PKCη は小胞体にもトランスロケーションした。PKCη 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。PKCζ は核内へトランスロケーションした。</p> <p>次に目的②の 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 が活性化していることが観察された。その活性化の程度は一般的な PKC 活性化剤であるホルボールエステルの PDBu と比較しても急速かつ顕著であった。また、Propofol による PKC 活性化は濃度依存的であり、臨床使用時の濃度である 30 μM でも活性化が見られた。</p> <p>目的③の Propofol による核内へのトランスロケーションについては、この現象は、PKC 特異的でなく、Propofol は PKC 以外の核内外に発現する蛋白質の局在も変化させることが明らかとなった。また、この現象は、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移行させることが考えられた。さらに Propofol は LaminB1-GFP により可視化した</p>			

核膜のしわを除去することが観察され、Propofol による核膜細胞質間の分子透過性の変化は核膜の張力の変化に由来するものと推察された。

最後に目的④の結果について、Propofol の位置異性体である 2,4-diisopropylphenol 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。

結論として 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 の作用發揮に PKC や他のタンパク質の局在の変化が關与している可能性を示した。

以上の結果から、本論文は、Propofol の新たな作用機序を明らかにし、Propofol の安全な臨床使用のための新たな視点を提供した。

よって審査委員会委員全員は、本論文が野口 颯真に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。