



Cooperative roles of various membrane phospholipids in the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase

貝淵, 弘三

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1984-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0473

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000473>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	かい 貝 淵 弘 三 (大阪府)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第420号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和59年3月31日
学位論文題目	Cooperative Roles of Various Membrane Phospholipids in the Activation of Calcium -activated, phospholipid-dependent Protein Kinase (カルシウム, リン脂質依存性蛋白質リン酸化酵素の活性化 における種々の細胞膜リン脂質の協同的役割)
審査委員	主査 教授 西 塚 泰 美 教授 田 中 千賀子 教授 杉 山 武 敏

論文内容の要旨

序 文

種々のホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質がその標的細胞の細胞膜受容体に作用するとホスホリパーゼCが活性化され、細胞膜のイノシトールリン脂質が分解してジグリセリドが生成する現象が知られている。ジグリセリドはホスファチジン酸、CDP-ジグリセリドを経て再びイノシトールリン脂質となる。この現象は一般にイノシトールリン脂質の代謝回転と呼ばれており、種々の生理活性物質の作用と密接に関連していると推定されている。最近、高井らによってセリンリン脂質と生理的濃度の Ca^{2+} の存在下に、ジグリセリドによって活性化される蛋白質リン酸化酵素（以下Cキナーゼと省略する）が発見され、本酵素がイノシトールリン脂質の代謝回転と共役して活性化される可能性が示唆された。また、川原らによって実際にCキナーゼがトロンビンによる血小板活性化反応に重要な役割を果たしていることが示された。本論文では、Cキナーゼの活性化に種々のリン脂質のうちセリンリン脂質のみが有効でその他のリン脂質が無効であることを示すと共に、他のリン脂質もセリンリン脂質によるCキナーゼの活性化に関与することを明らかにした。

実験方法

Cキナーゼはラット大脳からDEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィー、セファデックスG-150によるゲルろ過および等電点分画法によって部分精製した。Cキナーゼの触媒フラグメントはCキナーゼを Ca^{2+} 依存性プロテアーゼで限定分解した後にセファデックスG-150によるゲルろ過で部分精製した。イノシトールリン脂質とセリンリン脂質はラット大脳から、ホスファチジン酸は卵黄から、

その他のリン脂質はヒト赤血球からそれぞれケイ酸カラムクロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィーによって精製した。ジグリセリドは合成市販品を使用した。Cキナーゼ活性およびその触媒フラグメントの活性は Ca^{2+} と種々の脂質の存在下に ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$) ATP から仔ウシ胸腺の H1 ヒストンへの放射性リン酸の転移反応を利用して測定した。蛋白量は Lowry の方法に従って測定した。

実験結果

Cキナーゼは通常不活性型として細胞質に存在するが、 Ca^{2+} の存在下に細胞膜に結合して活性化される。この活性化に有効な膜成分はジグリセリドとセリンリン脂質である。活性化に関与する Ca^{2+} 、ジグリセリド、セリンリン脂質の3者のうちで、 Ca^{2+} とセリンリン脂質は酵素の活性化に必須であり、ジグリセリドは Ca^{2+} に対する酵素の親和性を増大させる。すなわち、Cキナーゼはジグリセリドが存在しなくとも Ca^{2+} とセリンリン脂質によって活性化されるが、活性化に必要な Ca^{2+} 濃度は比較的高く $10^{-4} \sim 10^{-3} \text{ M}$ である。しかし、セリンリン脂質以外にきわめて微量のジグリセリド ($0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下) が存在すると生理的な低濃度の Ca^{2+} ($10^{-7} \sim 10^{-6} \text{ M}$) の存在下で酵素活性があらわれる。また、生理的濃度の Ca^{2+} の存在下でCキナーゼの活性化に有効なリン脂質はセリンリン脂質のみであり、イノシトールリン脂質、エタノラミンリン脂質、ホスファチジン酸、コリンリン脂質、スフィンゴミエリンなどの他のリン脂質は事実上無効である。このように、セリンリン脂質以外のリン脂質はそれ単独では無効であるが、エタノラミンリン脂質をセリンリン脂質と同時に作用させるとCキナーゼ活性は著しく促進される。逆に、コリンリン脂質やスフィンゴミエリンをセリンリン脂質と同時に作用させるとCキナーゼ活性は著しく抑制される。イノシトールリン脂質やホスファチジン酸は無効である。これらのリン脂質は、Cキナーゼの触媒フラグメントの酵素活性を変化させることはなく、Cキナーゼの活性化に直接関与すると考えられる。酵素学的解析から、エタノラミンリン脂質は酵素の Ca^{2+} に対する親和性を著しく増大させ同時にセリンリン脂質やジグリセリドに対する親和性を若干増大させるが、酵素反応の最大速度を増大させることはない。一方、コリンリン脂質とスフィンゴミエリンは Ca^{2+} に対して拮抗的に、セリンリン脂質とジグリセリドに対しては拮抗的に作用して酵素活性を阻害する。

考察

以上の実験結果から、Cキナーゼの活性化に種々の細胞膜リン脂質が協同的役割を果たしていると考えられる。すなわち、生理活性物質が細胞膜受容体に作用するとイノシトールリン脂質が加水分解してジグリセリドが生成する。このジグリセリドが細胞内伝達物質としてCキナーゼを活性化する。この際、セリンリン脂質はCキナーゼの活性化に不可欠である。エタノラミンリン脂質は酵素活性をさらに促進し、コリンリン脂質やスフィンゴミエリンは酵素活性を抑制する。

赤血球や血小板の細胞膜でイノシトールリン脂質、セリンリン脂質、エタノラミンリン脂質が主に内側に、コリンリン脂質やスフィンゴミエリンが主に外側に存在することが知られている。このようなリン脂質の非対称な局在がCキナーゼの活性化に好都合な状況を呈しているかどうかは不明であるが、細胞膜の特定な部位にCキナーゼの活性化に適した構造が種々のリン脂質によって構成されていることが強く示唆される。

論文審査の結果の要旨

ある種のホルモンや神経伝達物質、細胞の成長因子、血小板活性化因子等、種々の生理活性物質がそれぞれの標的細胞膜の受容体を介してその生理作用を発揮するに際して、細胞膜のイノシトールリン脂質が急速な代謝回転を受けることが知られている。従来からこのリン脂質の代謝回転が生理活性物質による細胞機能のトランスメンブランコントロールに重要な役割を果たしているとは推定されてきたが、その生理的意義は明らかにされていなかった。本研究者の属した研究室では最近、このリン脂質の代謝回転が共役した新しい生体情報の受容機構が見出されたが、この機構ではある種の蛋白質リン酸化酵素が生理活性物質の受容伝達に働いている。

すなわち生理活性物質の刺激によりホスホリパーゼCが活動し、イノシトールリン脂質が特異的に加水分解されて、微量のジグリセリドが形質膜の内部に生成する。こうして生成したジグリセリドがシグナルの伝達物質として作用し、上記の蛋白質リン酸化酵素を形質膜へ強固に引きつけて活性化の引き金を引いている。この際、微量の Ca^{2+} (10^{-6} M以下) が必須不可欠であり、かつ細胞膜リン脂質が重要である。細胞膜リン脂質の中ではセリンリン脂質のみが本酵素の活性化に有効であり、他のイノシトールリン脂質やエタノラミンリン脂質、コリンリン脂質、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン等は無効である。本研究者は上述の生体情報の受容伝達機構における種々のリン脂質の役割分担を解析し、次の結果を得た。

単独では蛋白質リン酸化酵素の活性化に無効なエタノラミンリン脂質はセリンリン脂質と共同して本酵素の活性を著しく高めている。この際、酵素の Ca^{2+} に対する親和性が著明に亢進される。一方、コリンリン脂質およびスフィンゴミエリンはセリンリン脂質による本酵素の活性化を非拮抗的に阻害する。なお、イノシトールリン脂質およびホスファチジン酸は全く無効である。形質膜を構成するこれらの各種のリン脂質が生体情報の受容と伝達に果たす役割の解析から本研究者は次の結論を下している。

形質膜を構成している種々のリン脂質は互いに協同的に働いており、それぞれのリン脂質は独自の分担を果たしている。すなわち、種々の生理活性物質の刺激によってイノシトールリン脂質からジグリセリドが生成され、このジグリセリドが外界シグナルの伝達物質として作用する際にセリンリン脂質が必須の役割を果たしている。またこの際にエタノラミンリン脂質は蛋白質リン酸化酵素の活性化に促進的に作用し、逆にコリンリン脂質およびスフィンゴミエリンは抑制的に作用している。

形質膜の脂質二重層には数種のリン脂質が非対称性に分布していることが古くから知られているが、この研究では生体の情報の受容伝達の機構においてこの非対称性が果たしている意義の一つを解明し、各種のリン脂質の具体的な役割をはじめとあきらかとしたものであり、価値ある業績と認める。よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。