



Activation of cellular protein kinase C and mode of inhibitory action of phospholipid-interacting compounds

裏辻, 悠子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1985-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0553

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000553>

※ 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） うら つじ ゆう こ 裏 辻 悠 子 （和歌山県）
 学位の種類 医 学 博 士
 学位記番号 医博い第462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60年3月31日
 学位論文題目 **ACTIVATION OF CELLULAR PROTEIN KINASE C
 AND MODE OF INHIBITORY ACTION OF
 PHOSPHOLIPID-INTERACTING COMPOUNDS**
 （細胞内Cキナーゼの活性化機構及び脂質作用薬剤による
 阻害様式）

審 査 委 員 主査 教授 西 塚 泰 美
 教授 岩 井 誠 三 教授 齊 藤 洋 一

論 文 内 容 の 要 旨

○序 文

イノシトールリン脂質の加水分解によって生成されるジアシルグリセロールにより特異的な蛋白質リン酸化酵素（以後Cキナーゼと省略）が活性化をうける。本酵素は細胞機能の調節及び細胞増殖に関与していることが明らかにされている。このジアシルグリセロールによるCキナーゼの活性化には、生理的な濃度のカルシウムと細胞膜リン脂質を必要とする。一方ホルボールエステルの一つであるTPA（12-tetradecanoylphorbol-13-acetate）は細胞の成長や分化，発癌の促進などの生物学的作用を有する。

当教室の研究によりこのTPAがジアシルグリセロールの作用を代行して，Cキナーゼを活性化することが明らかにされている。またTPAが細胞膜に作用し，細胞内の結合蛋白質と結合して種々の生物学的作用をひき起こすことが知られているが，その結合蛋白質がCキナーゼであることも当教室で明らかにされている。TPAによるCキナーゼの活性化と，CキナーゼとTPAの結合にはいずれもカルシウムとリン脂質が必要であること，および種々のカラムクロマトグラフィーによってこのCキナーゼ，TPA，リン脂質，カルシウムは同時に得られることにより，この4者が複合体を形成していると推定される。本論文では血小板内のCキナーゼに対するTPAの作用，およびCキナーゼとT

PAの複合体を解析するとともに、試験管内でTPAによるCキナーゼの活性化や、CキナーゼとTPAの結合に関してリン脂質やカルシウムがどのような役割を果たしているかについて、リン脂質作用薬剤であるクロルプロマジンを用いて、その阻害様式について解析を行ない、これらの四者複合体の細胞内における移動、細胞機能発現までの作用機序について考察を行なった。

○実験方法

ウサギ血小板は Tange と Berman のゲル濾過法により採取した。Cキナーゼはラット大脳より Kikkawa らの方法で均一蛋白質まで精製した。TPA及び $[^3\text{H}]$ TPAは市販品を用いた。クロルプロマジンは塩野義製薬より提供を受けた。TPAによるCキナーゼの活性化は Castagna らの方法により $[r\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPから仔牛胸腺のH1ヒストンへの放射活性の転移により測定した。またTPAとCキナーゼの結合は、Ashendell と Boutwell の方法により測定した。

○実験結果

CキナーゼはジアシルグリセロールまたはTPAによりカルシウムと細胞膜リン脂質の存在下に活性化される。TPAを正常の細胞に作用させるとCキナーゼとTPAが結合して、細胞質画分に存在するCキナーゼが細胞膜に結合することが報告されている。今回血小板をTPAにて処理し、その後細胞質画分と細胞膜画分とに分離すると、通常Cキナーゼは細胞質画分にその活性の大部分が存在するが、TPA処理により細胞膜画分にその活性が存在することが確認された。次に血小板を $[^3\text{H}]$ TPAにて処理し、細胞膜画分に回収されたCキナーゼ活性を界面活性剤であるトリトンX-100を用いて可溶化し、DEAEセファセルカラムクロマトグラフィーにより解析を行なうと、Cキナーゼ活性と $[^3\text{H}]$ TPAの放射活性が一致して複合体として溶出された。この複合体はその他のカラムクロマトグラフィーやショ糖密度勾配法によっても分離されなかった。またこの溶出されたCキナーゼ活性は、カルシウムおよびリン脂質に依存しないことから、この複合体はカルシウムとリン脂質を含むものと考えられる。即ち血小板をTPAで処理することにより血小板のCキナーゼとTPAが結合してCキナーゼ、TPA、リン脂質、カルシウムの四者複合体を形成していると推定される。またこの複合体においてCキナーゼと $[^3\text{H}]$ TPAとの結合比は約1 : 0.6 ~ 0.7であった。次にこの複合体をハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーによって解析すると、Cキナーゼは $[^3\text{H}]$ TPAとは完全に分離され、カルシウムおよびリン脂質依存性の酵素として脂質を含まない形で分離された。一方、TPAと同時にクロルプロマジンを経血小板に作用させることにより、TPAによって引き起されるCキナーゼ活性の移動がクロルプロマジン等の脂質作用薬剤によって阻止されることが明らかとなった。そこで、これら脂質作用薬剤がTPAによるCキナーゼの活性化およびCキナーゼとTPAの結合にどのような作用機構で影響を与えるのかを解明するために、試験管内での実験を行なった。即ちウシ大脳から均一蛋白質にまで精製したCキナーゼと $[^3\text{H}]$ TPAを用いてTPAによるCキナーゼの活性化およびCキナーゼと $[^3\text{H}]$ TPAとの結合をカルシウムとリン脂質の存在下に測定を行なった。その結果クロルプロマジンの阻害作用は、リン脂質に拮抗的で、その阻害係数は約2

$\times 10^{-4}$ Mであった。この阻害様式は他の脂質作用薬剤であるジブカイン、イミプラミン、フェントラミン等でも同様であった。

○考 察

数年来当教室の解析により、イノシトールリン脂質の代謝回転に共役して活性化される蛋白質リン酸化酵素が、種々の細胞機能発現に関与していることが明らかとなり、多くの注目をあびている。なかでも細胞増殖、発癌機構に関してのCキナーゼの役割は重要である。即ちCキナーゼの発癌プロモーターであるTPAの受容蛋白質であると言われ、TPA、リン脂質、Cキナーゼの結合が細胞活動をひき起こすことが明らかとなっている。。本論文ではCキナーゼとTPAの複合体が約1:1の対応をしていること、この複合体が再び完全なかたちで分離されること、を証明しておりCキナーゼがTPAの受容蛋白質であることを強く示唆するものである。またその結合と活性化が常に同時におこっていることより、CキナーゼとTPAの結合が細胞機能発現と密接に関与している可能性も高い。細胞レベルでは細胞質内のCキナーゼはTPAと結合することによって細胞膜へと移動し、細胞膜のリン脂質と結合し、活性型に変化すると推定される。しかしCキナーゼの活性型は $[^3\text{H}]$ TPAとは結合出来ないことから、Cキナーゼには活性部位とは別にTPA結合部位があるものと考えられる。そしてこの結合に関してリン脂質が重要な役割をはたしているが、クロロプロマジン等の脂質作用薬剤は、Cキナーゼとリン脂質との関係を膜の脂質二重構造を修飾することによって影響を及ぼしている可能性が高い。これらの機構は、四者複合体の形成という複雑さのためさらに多く検討される必要があるが、細胞機能発現に対してCキナーゼの役割の作用機序をさぐる手がかりが得られたものと考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

神経伝達物質、ホルモン、細胞成長因子等の生理活性物質の情報受容と伝達機構において、蛋白質リン酸化酵素であるCキナーゼは種々の細胞機能に関与していることが明らかにされている。すなわち、Cキナーゼは細胞膜イノシトールリン脂質の代謝回転に共役して活性化を受け、細胞内の蛋白質リン酸化反応を介して細胞の多岐にわたる生理機能を調節している。また発癌プロモーターとして知られるホルボールエステルがCキナーゼを受容体蛋白質としていることが明らかにされて以来、Cキナーゼの細胞増殖に関する役割が考えられる。

本研究者は、クロロプロマジンや各種の局所麻酔剤の細胞膜に対する作用の物質的基盤の解析を目的とし、この種のレセプター機構において、中心的な役割を果たしているCキナーゼの活性発現に対するこれら薬剤の効果をin vivoの細胞レベル及び酵素レベルと対応させて検討を行った。その結果、このホルボールエステルの1つであるTPAは、細胞内においてCキナーゼと複合体を形成し、この複合体がCキナーゼ、TPA、リン脂質、カルシウムの四者から成っていることを明らかにしている。

次にCキナーゼとTPAの結合におけるリン脂質およびカルシウムの役割を検討し、純粋に単離したCキナーゼとTPAをもちいて試験管内の実験を行ない、CキナーゼのTPAによる活性化、及びCキナーゼとTPAの結合が同時に進行していることを証明した。

局所麻酔剤等の各種のリン脂質に親和性を有する薬物はこのCキナーゼ、TPA、カルシウム、リン脂質の四者複合体の形成を阻止し、細胞膜でのレセプター機序を抑制するとの結論を課している。この種の抑制はリン脂質と競合的であり、TPAとは競合的ではない。なお、この種のCキナーゼはアクション、デンドライト等の神経のコンダクタンスとの関連が急速に解明されつつあり、局所麻酔剤はシナプス機序のみでなく、膜のコンダクタンスの抑制にも関連することが示されている。

今回の研究は試験管内の知見に基いて intact な細胞におけるレセプター機序等に対しての各種の局所麻酔剤の作用機構を解析し、各種の外界シグナル、ことに神経伝達物質等の作用に対する麻酔薬の作用の一端を解明したものであり、従来ほとんど行われていなかった細胞内におけるCキナーゼと局所麻酔剤の作用について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。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。