



Synergistic action of protein kinase C and calcium for histamine release from rat peritoneal mast cells

片上, 祐子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0567

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000567>

※ 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)	かた 上 祐 子 (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第 470 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 61 年 3 月 31 日
学位論文題目	SYNERGISTIC ACTION OF PROTEIN KINASE C AND CALCIUM FOR HISTAMINE RELEASE FROM RAT PERITONEAL MAST CELLS (ラット腹腔肥満細胞のヒスタミン放出反応における C キナーゼとカルシウムイオンとの相乗的作用)
審査委員	主査 教授 西 塚 泰 美 教授 藤 田 拓 男 教授 杉 山 武 敏

論文内容の要旨

○序 文

肥満細胞は即時型アレルギー反応において重要な役割を果たしており、その活性化機構については多くの研究が行なわれている。中でも、抗 IgE 抗体やコンカナバリン A (以後 ConA と省略する) が肥満細胞の細胞膜受容体に作用するとイノシトールリン脂質 (以後 PI と省略する) の代謝回転と細胞質への Ca^{2+} の動員が促進されることが知られている。これらの反応は肥満細胞のヒスタミン放出反応と極めて密接な関連があると考えられている。最近、当研究室で PI の代謝回転由来のジアシルグリセロール (以後 DG と省略する) によって活性化される蛋白質リン酸化酵素 (以後 C キナーゼと省略する) が発見され、本酵素が血小板活性化反応に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。また合成 DG の 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol (以後 OAG と省略する) や発癌プロモーターである 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (以後 TPA と省略する) が C キナーゼを直接活性化することが見出された。本論文では PI の代謝回転と C キナーゼからなる新しい受容伝達機構が実際に肥満細胞に存在することを明らかにし、さらに肥満細胞のヒスタミン放出反応において C キナーゼの活性化と Ca^{2+} の動員の両者が互いに相乗的に作用することを示した。

○実験方法

ラット腹腔肥満細胞は Sullivan らの方法によって分離調整した。肥満細胞の蛋白質リン酸化反応は ^{32}P で標識した肥満細胞を刺激後、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、そのオートラジオ

グラムをデンストメーターにより定量した。無細胞系での細胞質蛋白質のリン酸化反応は、肥満細胞より分離した細胞質分画をラット大脳より精製したCキナーゼによって〔 γ - ^{32}P 〕ATPの存在下にリン酸化した。肥満細胞刺激後のリン脂質の変化は、肥満細胞を ^{32}P で標識し、刺激後、薄層クロマトグラフィーにより脂質を分離して定量した。ヒスタミンの放出反応は、肥満細胞を刺激後、放出されたヒスタミンをShoreらの蛍光定量法により測定した。

○実験結果

Cキナーゼは肥満細胞の細胞質に存在し、通常不活性型であるが、生理的濃度 ($10^{-7} \sim 10^{-6} \text{ M}$) の Ca^{2+} と細胞膜のセリンリン脂質の存在下に微量のDGによって活性化された。また肥満細胞の細胞質にはCキナーゼの基質となる蛋白質が存在した。すなわち、無細胞系でCキナーゼを肥満細胞の細胞質分画に加えると Ca^{2+} 、セリンリン脂質およびDG依存性にリン酸化される分子量約60,000 (60 K)、34,000 (34 K)、31,000 (31 K) 及び22,000 (22K) の4種の蛋白質が認められた。これらの蛋白質は、肥満細胞をConAによって刺激した場合にもリン酸化された。さらにCキナーゼを直接活性化するOAGやTPAで刺激した場合にも同じ4種の蛋白質がリン酸化された。OAGやTPAはPIの代謝回転を促進することなくCキナーゼを直接活性化するが、ヒスタミン放出反応はほとんど惹き起こさなかった。またOAGやTPAは Ca^{2+} の動員を促進しないことが明らかにされている。そこで Ca^{2+} イオノフォアであるA 23187をOAGと同時に肥満細胞に作用させてみた。OAGによるヒスタミン放出反応は、それ単独では放出反応をほとんど惹き起こさない低濃度のA 23187によって著しく相乗的に促進された。この際、A 23187単独ではPIの代謝回転やCキナーゼの基質蛋白質のリン酸化を起こさなかった。又、OAGのかわりにTPAを用いても同様の結果が得られた。これらの事実から、肥満細胞のヒスタミン放出反応にはCキナーゼの活性化と Ca^{2+} の動員の両者が必要であり、両者は互いに相乗的に作用していることが示唆された。

○考 察

肥満細胞の活性化機構は気管支喘息やアレルギー性鼻炎など種々のアレルギー疾患および病態に関連しており、その解明は臨床上においても極めて重要である。又、肥満細胞はヒスタミンを始め多くの生理活性物質をその細胞内顆粒に内蔵しており、脱顆粒による生理活性物質の放出反応は、分泌現象の生化学的機構を解明する上でのモデルとしても注目されている。本論文では、肥満細胞のヒスタミン放出反応において、DG-Cキナーゼ系と Ca^{2+} の動員の両者が重要な役割を果たしていることを明らかにした。OAGやTPAによってCキナーゼを活性化するのみでは肥満細胞の放出反応は不十分であり、また、A 23187による Ca^{2+} の動員のみでも放出反応は起こらない。しかし、両者の協同作用によって肥満細胞の活性化反応が促進されることから、これら二つの情報伝達系は互いに相乗的に働いていると結論される。肥満細胞以外の多くの細胞においても、種々のホルモンや神経伝達物質、細胞増殖因子などの生理活性物質が標的細胞膜受容体に作用するとPIの代謝回転と Ca^{2+} の動員が促進されることが知られている。この種の外界シグナルの受容機構においては、DG-Cキナ

ーゼ系と Ca^{2+} 動員が重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、これら二つの情報伝達系は、分泌現象のみならず、細胞の増殖や癌化など広範囲な細胞機能の制御機構に関与している可能性が高い。

論文審査の結果の要旨

肥満細胞の機能、ことに抗原刺激等によるヒスタミン放出反応の機構は、種々のアレルギー疾患および病態に関連しており、古くから数多くの研究がおこなわれてきた。なかでも、抗IgE抗体やコンカナバリンA (Con A) によって肥満細胞の細胞膜上に存在するIgE レセプターが架橋されると細胞膜のイノシトールリン脂質 (PI) が急速な代謝回転を受けることと、細胞質への Ca^{2+} の動員が促進されることが注目されている。これらの反応は肥満細胞からのヒスタミン放出反応に先立って起こり、外界シグナルの受容伝達機構に重要な役割を果たしていると推定されてきたが、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PI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 (Cキナーゼ) が見出され、血小板の放出反応をモデルにした解析から、新しい生体の受容伝達機構の存在を実験的に証明した。すなわちPIの代謝回転により生成されたジアシルグリセロール (DG) が細胞内伝達物質としてCキナーゼを特異的に活性化し、蛋白質リン酸化反応を介して血小板の機能を調節するという機構である。

本研究者は以上の観点から、ConAによる肥満細胞のヒスタミン放出反応の生化学的基盤の解明を目指し、受容体を介さずに直接Cキナーゼを活性化するOAGやTPA、及び Ca^{2+} の動員を選択的に惹き起こす Ca^{2+} イオノフォア A 23187 を用いた実験から次の結果を得た。

肥満細胞の細胞質には無細胞系でCキナーゼによって Ca^{2+} 、セリンリン脂質およびDG依存性にリン酸化される60K、34K、31K及び22Kの4種の基質蛋白質が存在し、これらの蛋白質は肥満細胞をCon A やOAG, TPAで刺激した場合にもリン酸化される。

OAGやTPAはPIの代謝回転を促進することなくCキナーゼを直接活性化するが、ヒスタミン放出はほとんど惹き起こさない。ところが、それ単独では放出反応をほとんど惹き起こさない低濃度のA 23187 をOAGやTPAと同時に肥満細胞に作用させると放出反応は著しく相乗的に促進される。以上の実験結果から本研究者は次の結論を下している。

肥満細胞のヒスタミン放出反応にはCキナーゼの活性化と Ca^{2+} の動員の両者が必要であり、両者は互いに相乗的に作用している。すなわち、PI由来のDGと Ca^{2+} の両者が細胞内伝達物質として作用している。

このように、本研究は、肥満細胞の活性化反応の生化学的基盤を解析し、PIの代謝回転と Ca^{2+} の動員が細胞機能の調節に連結していることを実験的に証明したものであり、生理学上の意義は非常に大きく、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。