



Activation of protein kinase C by non-phobol tumor promoter, mezerein

三宅, 良平

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0610

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000610>

※ 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)	三宅良平 (島根県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第502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	ACTIVATION OF PROTEIN KINASE C BY NON-PHORBOL TUMOR PROMOTER, MEZEREIN (非ホルポール性発ガンプロモーター, メゼレイン によるプロテインキナーゼCの活性化)

審査委員	主査 教授 西塚 泰美
	教授 杉山 武敏 教授 福崎 恒

論文内容の要旨

○序 文

発ガンプロモーターであるホルポールエステルはプロテインキナーゼCによるタンパク質リン酸化反応を介して、その多彩な生物学的作用を発現していることが明らかとなっている。すなわち、プロテインキナーゼCは生体内においてカルシウムとリン脂質の存在下に、受容体刺激によって生成されるジアシルグリセロールによって活性化されるが、ホルポールエステルはジアシルグリセロールの作用を代行し、プロテインキナーゼCに直接結合し活性化する。リン脂質とこのプロテインキナーゼCとの複合体がホルポールエステルの受容体として作用していることが明確となっている。一方、second-stageの発ガンプロモーターであるメゼレインはホルポール骨格やジアシルグリセロール構造を含まないにもかかわらず、ホルポールエステル的一种である $[^3\text{H}]$ phorbol-12,13-dibutyrate (以下 $[^3\text{H}]$ PDBu)とその受容体との特異的結合を阻害することが報告されている。本論文では、メゼレインが均一標品として分離精製したプロテインキナーゼCに結合し活性化するとともに、細胞内の本酵素を特異的に活性化することを明らかにした。これらの結果から、ホルポールエステルやメゼレインなどの発ガンプロモーターはプロテインキナーゼCを共通の受容体としてその作用を発現していることが示唆される。

○実験方法

プロテインキナーゼCはラット大脳の可溶性画分から精製した。プロテインキナーゼCの活性はカルシウムとウシ大脳リン脂質およびメゼレインの存在下に $[r-^{32}P]$ 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。プロテインキナーゼCと $[^3H]$ PDBuとの結合は、カルシウムとリン脂質を含む反応液中において反応の後、ポリエチレニミン処理をしたグラスファイバーフィルターに吸着される放射活性を測定した。非特異的結合は100倍の濃度のPDBu存在下に測定した。

細胞内におけるプロテインキナーゼCの活性化は、ヒト血小板における本酵素の特異的基質タンパク質である分子量約40,000のタンパク質（以下40Kタンパク質）のリン酸化反応を、 ^{32}P 標識ヒト血小板を用いSDS ポリアクリルアミド電気泳動の後、オートラジオグラフィーにて測定した。

○実験結果ならびに考察

メゼレインはカルシウムとリン脂質の存在下にプロテインキナーゼCを濃度依存性に活性化した。このメゼレインによるプロテインキナーゼCの活性化作用はホルボールエステル的一种である12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate（以下TPA）による活性化作用の場合と同様に、カルシウムとリン脂質が不可欠であり、メゼレイン単独では活性化作用を示さなかった。また充分量のメゼレインの存在下にさらにTPAを加えてもプロテインキナーゼCの最大活性は変化しないことから、メゼレインはTPAと同一の作用機構でプロテインキナーゼCを活性化していると考えられる。この際、メゼレインとTPAのプロテインキナーゼCの活性化定数 K_a 値は、それぞれ38nMと5nMであり、プロテインキナーゼCの活性化にはTPAに比して高濃度のメゼレインを必要とした。

メゼレインとTPAが種々の生物学的反応を惹起する能力は個々の反応によって異なることが報告されている。たとえば、マウス皮膚における発ガンプロモーターとしての作用においてTPAはメゼレインに比して78倍強力であるが、過形性や炎症を惹起する能力はメゼレインとTPAは同等の作用を有することが示されている。したがって両者の K_a 値が種々の反応を惹起する上での能力を必ずしも反映しないため、 $[^3H]$ PDBuとプロテインキナーゼCの結合反応に対するメゼレインの効果を解析した。

$[^3H]$ PDBuはカルシウムとリン脂質の存在下に精製したプロテインキナーゼCに飽和的な結合を示し、解離定数 K_d 値は8nMを示した。メゼレインとTPAは $[^3H]$ PDBuの結合を競合的に阻害し、阻害定数 K_i 値はそれぞれ3nMと2nMと算出された。メゼレインの K_i 値はミンク肺細胞（1.7nM）やマウス大脳の顆粒性画分（1.4nM）の K_i 値とはほぼ一致するが、マウス皮膚の顆粒性画分（98nM）やニワトリ胎児性線維芽細胞（180nM）およびヒト白血球（200から1000nM）において報告されている K_i 値とは一致しなかった。このメゼレインの K_i 値の多様性は結合実験の条件や細胞膜リン脂質の組成の差異に起因する可能性が高いと考えられる。

一方、血小板の活性化においてTPAはプロテインキナーゼCを直接活性化しその特異的基質タンパク質である40Kタンパク質のリン酸化を介してその作用を発現していることが当教室の研究によって明らかにされている。メゼレインもTPAと同様に血小板の40Kタンパク質のリン酸化を惹起したが、

TPA に比べて数倍の高濃度を必要とした。血小板からのセロトニン放出などの細胞反応はTPA によるプロテインキナーゼCの活性化とイオノフォアによるカルシウム動員が相乗的に作用して惹起されるが、メゼレインも血小板の活性化においてカルシウムと相乗的に作用した。

メゼレインは2段階発ガンプロモーションモデルの second-stage 発ガンプロモーターとして分類される。すなわち、メゼレイン自身も弱い発ガンプロモーターとしての作用を有しているが、メゼレインの前処置により極めて低濃度のホルボールエステルが発ガン過程を促進すると考えられている。このメゼレインはホルボールエステルと異なり、ジアシルグリセロール構造を含まないにもかかわらずプロテインキナーゼCを試験管内および生体内で活性化することが本研究から明らかとなった。ジアシルグリセロール構造は本構造は本酵素の活性化に絶対的なものではなく、ジアシルグリセロールやホルボールエステルおよびメゼレインによって惹起される細胞膜の共通の微細構造の変化がプロテインキナーゼCの活性化に必要であると推察される。

論文審査の結果の要旨

発ガンプロモーターであるホルボールエステルは試験管内および細胞を用いた解析結果からプロテインキナーゼCの活性化を介してその生物学的作用を発現していることが既に明らかにされている。生理的条件下においては、プロテインキナーゼCはイノシトールリン脂質の加水分解により生じるジアシルグリセロールによって活性化をうける。ホルボールエステルはその分子構造中にジアシルグリセロール様の構造を有することから、プロテインキナーゼCの活性化にこの構造が重要であると考えられてきた。

論文の著者はジアシルグリセロール構造を有しない非ホルボール性発ガンプロモーター、メゼレインの作用機序を明らかにする目的でラット大脳から精製したプロテインキナーゼCおよびヒト血小板を用いて解析を行い、次に述べる実験結果を得た。

1. メゼレインは精製プロテインキナーゼCをカルシウムとリン脂質の存在下に濃度依存性に活性化した。メゼレイン単独あるいは、カルシウム、リン脂質のいずれをかいてもプロテインキナーゼCの活性化は惹起されなかった。
2. メンブランフィルター法を用いた結合実験において、メゼレインは放射活性を有するホルボールエステルとプロテインキナーゼCの結合を拮抗的に阻害し、阻害定数は3nMと算出された。
3. ヒト血小板において分子量約40,000のタンパク質がプロテインキナーゼCによるリン酸化反応の基質となり得ることが既に明らかになっている。メゼレインはこのタンパク質を濃度依存性にリン酸化した。さらに血小板からのセロトニン放出反応において、メゼレインはカルシウムと相乗的に作用した。

以上の結果から、非ホルボール性発ガンプロモーターであるメゼレインはジアシルグリセロールとの構造類似性を有しないにもかかわらず、ホルボールエステルと同様の作用機序でプロテインキナーゼCを活性化することが明らかになった。この結果は発ガンプロモーターとリン脂質の相互作用によ

って惹起される細胞膜の微細構造の変化が、プロテインキナーゼCの活性化に重要であることを示唆するものである。

本研究は、非ホルボール性発ガンプロモーターであるメゼレインによるプロテインキナーゼCの活性化機構を研究したものであるが、メゼレインの生物学的な作用機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。