



Rapid assay of binding of tumor-promoting phorbol esters to protein kinase C1

田中, 康

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0615

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000615>

※ 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）	たなか やすし 田 中 康 （高知県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第507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	Rapid Assay of Binding of Tumor- Promoting Phorbol Esters Protein Kinase C (プロテインキナーゼCに対するホルボールエステル の結合の迅速測定法)
審査委員	主査 教授 西 塚 泰 美 教授 廣 畑 和 志 教授 岩 井 誠 三

論文内容の要旨

○序 文

Phorbol ester は発癌プロモーターとして発癌過程を促進するのみならず、細胞の分裂や分化、酵素の誘導、核酸や脂質の代謝亢進、放出反応など多彩な生物学的活性を有していることが知られている。この Phorbol ester の作用発現機構には、細胞表面のリセプターが関与していることが報告されていた。我々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され蛋白質リン酸化酵素（Protein Kinase C）を見出し、その作用機構の解明を続けて来たが、最近の研究によって、この Phorbol ester が Protein Kinase C と結合し、直接この酵素を活性化することが明らかとなった。すなわち生理的条件下では細胞外シグナルが細胞に到達すると、細胞膜の phosphatidylinositol より diacylglycerol が産生される。この産生された diacylglycerol によって、生理的な低濃度の Ca^{2+} 及び細胞膜リン脂質（主に phosphatidylserine）の存在下に Protein Kinase C が活性化される。一方 12- O -tetradecanoyl phorbol-13 acetate 及び phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu) などの Phorbol ester は細胞膜に取り込まれ、前述の diacylglycerol の作用を代行し直接 Protein Kinase C を活性化する。この活性化には Phorbol ester, Protein Kinase C, Ca^{2+} , 及び phosphatidylserine の四者複合体の形成が必須となる。本論文では、この Protein Kinase C に対する Phorbol ester の結合能の測定を迅速かつ簡便化した。この測定方法は発癌プロモーターのスクリーニングや発癌作用を有する物質の研究に有用であると考えられる。

○実験方法

PDBu 及び [^3H] PDBu は Chemical for Cancer Research 社及び New England Nuclear 社より購入した。Protein Kinase C は Kikkawa らの方法により精製した。PDBu の Protein Kinase C に対する結合反応 0.2 ml の反応液中に 20mM Tris Malate (pH 6.8), 100mM KCl, 0.15mM CaCl_2 , 0.05mM EGTA, 100 $\mu\text{g/ml}$ phosphatidylserine, 30 nM [^3H] PDBu (13.4 Ci/ μmol), 0.5% dimethyl sulfoxide, 及び 0.05~0.1 μg の Protein Kinase C を加え, 30°C にて行った。20分後, 氷冷の 0.5% dimethyl sulfoxide を加え, 反応を停止し, 反応液を polyethylenimine 処理ガラスフィルターで濾過し, そのガラスフィルターを 0.5% dimethyl sulfoxide にて洗滌の後, 吸着した PDBu の放射活性を測定した。非特異的結合は上述の反応液に 30 μM の非放射性 PDBu を加えて測定した。放射活性の測定にはトルエンベース液体シンチレーターを用い, 液体シンチレーションカウンターにて測定した。また蛋白質の定量には, Bensadoun 及び Weinstein の方法によった。

○実験結果

この polyethylenimine 処理ガラスフィルターを用いた結合実験においても, Protein Kinase C と [^3H] PDBu と結合には, Ca^{2+} 及び phosphatidylserine を含む四者複合体の形成が必要であり, この結果は以前に報告した高速液体クロマトグラフィーを用いたゲル濾過法による分析結果とよく一致した。この際, グラスフィルターを polyethylenimine 処理を行わなければ, この複合体の回収率は 20% に低下した。また, この反応系での非特異的結合は 10% 以下であった。この Protein Kinase C に対する [^3H] PDBu 結合の時間的経過は約 10 分間で最高となり, その後はやや低下した。また Protein Kinase C に対する PDBu の結合は Protein Kinase C の用量に依存して増加した。一方 Protein Kinase C に対する PDBu の結合は PDBu の濃度に依存して増加し, 飽和的に結合した。この結果を Scatchard plot 解析を行うと Protein Kinase C 1 mol に対して PDBu が 0.8 mol 結合し, この Kd 値は約 8 nM と算定され, この結果も前述の高速液体クロマトグラフィーを用いた結合反応の結果とよく一致した。また四者複合体を形成するのに必要とされる phosphatidylserine 比較的高濃度を必要とするが, これも濃度に依存して結合が見られた。リン脂質のうち, phosphatidylserine が最も有効であり, phosphatidylethanolamine や phosphatidylinositol では効果が低かった。一方, 生理的条件下では Protein Kinase C は diacylglycerol により活性化をうけるが, この diacylglycerol の Protein Kinase C と PDBu との結合に対する効果を検討した。diacylglycerol である diolein その濃度に依存して Protein Kinase C と PDBu の結合を抑制した。この時の 50% 結合抑制における diolein の濃度は約 7 $\mu\text{g/ml}$ であった。この抑制効果は monolein や triolein 等の中性脂質には認められず, diolein に特異的であった。

○考 察

我々は今まで Protein Kinase C と Phorbol ester との結合反応には高速液体クロマトグラフィーを用いたゲル濾過法を用いていたが, この方法では多くの時間を要した。今回, 開発した実験方法

では、従来報告されているゲル濾過法、polyethylene glycol 沈澱法に比して迅速であり、かつ非特異的結合も低いことが明らかとなった。またアセトン沈澱法のように有機溶媒も使用しないため、Protein Kinase CとPDBuの結合に対する種々の物質の効果の検討も可能である。この方法を用いることにより、Phorbol ester 以外の発癌プロモーターのProtein Kinase CとPDBuの結合に対する効果もすでに検討されており、この結合測定法は発癌プロモーター作用を有する物質のスクリーニングやプロモーター阻害物質の効果の検討に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

発癌プロモーターであるホルボールエステルは細胞の発癌化の過程に関与するのみならず、酵素の誘導や白血球の遊走、神経伝達物質の放出反応等に関与するなど、多彩な生物学的活性を有することが知られており、その作用機構の解明が注目されている。一方、細胞膜イノシトールリン脂質から加水分解して産生されるジアシルグリセロールによって活性化される蛋白質リン酸化酵素（プロテインキナーゼC）が発見され、多くの細胞の機能の調節に重要な働きをしていることが明らかとなってきた。このプロテインキナーゼCがホルボールエステルによって活性化されることが実証され、ホルボールエステルとプロテインキナーゼCとの関係が確立されて、発癌におけるこの酵素の役割が重要な研究対象となっている。本学位申請者はホルボールエステルによるプロテインキナーゼCの活性化機構の解明を目的とし、その活性測定の迅速、かつ簡便な方法を開発した。プロテインキナーゼCの活性化反応には、ホルボールエステルのほかにフォスファチジルセリン、カルシウムを必要としている。本研究者の考 開発した発癌プロモーターの迅速な測定方法ではメンブランフィルターを用いて放射性ホルボールエステルとプロテインキナーゼ、カルシウム、磷脂質四者の複合体をトラップし、その放射能を測定するというきわめて簡単なものである。この方法と従来用いられていた数多くの複雑な方法とを比較検討した結果、その精製、特異性などにおいてきわめてすぐれていることが判明し、また、これまでの方法に比較してきわめて短時間の中に多数の資料の発癌プロモーターの活性をスクリーニングすることが可能である。したがって、発癌プロモーターの作用に対する種々の物質の影響を容易に検討することも可能となり、広い分野の研究に利用されることがあきらかとなった。実際、この方法を用いてホルボールエステル以外の種々の発癌プロモーターの作用を有する物質の解析にも有効な測定方法となっており、すでに各方面で検討されている。以上のようにこの測定法は発癌プロモーター作用を有する物質のスクリーニングや、また発癌プロモーター阻害物質の影響の判定に有用であり、発癌過程の解明に役立つ可能性が大きい。したがって本研究は価値のある業績と認め、医学博士の学位を得る資格があると認める。