



Activation of protein kinase C potentiates norepinephrine release from sinus node

春藤, 久人

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1988-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0707

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000707>

※ 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) 春藤久人(大阪府)
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 医博い第566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63年3月31日
 学位論文題目 Activation of protein kinase C potentiates norepinephrine release from sinus node
 (プロテインキナーゼC活性化による洞結節からのノルエピノフリン遊離の増強)
 審査委員 主査 教授 田中千賀子
 教授 福崎恒 教授 西塚泰美

論文内容の要旨

緒言

Ca^{2+} /リン脂質依存性蛋白リン酸化酵素(Cキナーゼ)は広く生体内の組織に分布し、細胞膜イノシトールリン脂質代謝と共にホルモンや神経伝達物質などのシグナルの細胞内情報伝達、細胞の増殖、分化等に関与することが報告されている。また、Cキナーゼは神経細胞、特にシナプソーム分画に高密度に存在することから、神経伝達物質遊離過程における本酵素の生理的役割が想定されている。本研究はモルモット心臓洞結節に分布する交感神経終末からの神経伝達物質遊離過程におけるCキナーゼの役割を解明することを目的とした。

方法

雌雄のモルモット(体重300-400g)の摘出心を実験に用いた。摘出心を両心耳、心房、洞結節、両心室、心室中隔に分け各部位をトリス塩酸バッファー中でホモジナイズ後、遠心し、膜標品を調製した。ホルボールエステル結合実験はリガンドとして、 ^3H -phorbol-12,13-dibutyrate(^3H -PDBu)を用いて行い、非特異結合は $10\mu\text{M}$ PDBu存在下での ^3H -PDBu結合と規定し、総結合との差を特異結合とした。次に、ノルエピネフリン(NE)遊離実験のために摘出洞結節を ^3H -NEを含む栄養液に1時間浸漬した。20分間新しい栄養液で洗浄し、白金双極電極(直径0.2mm、極間0.5mm、長さ1.5mm)を装着し毎分0.2mlの速度で栄養液を表面灌流した。5分毎に採取した灌流液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。灌流液中に遊離した ^3H -NEを活性アルミナに吸着させ、高速液体クロマトグラフィーにより、その中に含まれる放射活性の68%(刺激前)、87%(刺激中)および67%(刺激後)がNEであることを確かめた。

結果および考察

PDBu結合実験

心房膜標品への³H-PDBu結合は飽和性および高親和性の单一成分を示し, Kd 6.13nM, Bmax 4.88pmol/mg proteinであった。心臓各部位における³H-PDBu結合は高い方から、右心耳>洞結節>心房>左心耳>心室中隔>左心室>右心室の順であった。特に心室では著しく低く、心房各部位の1/3以下であった。この³H-PDBu結合部位の分布は心臓におけるアドレナリン作動性神経の分布と良く一致しており、³H-PDBu結合部位がアドレナリン作動性神経の神経終末に局在していることが示唆された。Cキナーゼはホルボールエステル受容体そのものであることが証明されている。従ってここで示されたPDBu結合部位の局在はCキナーゼの局在を反映していると考えられる。

NE遊離実験

³H-NEを取り込ませた洞結節に単矩形波電気刺激(1.5mA, 5Hz, 1.5ms)を適用すると、³H-NE遊離は自発遊離に対し約2倍に増加した。³H-NE遊離は刺激電流(0.25-3.0mA)及び刺激頻度(1-15Hz)依存性を示した。この³H-NE遊離はCa²⁺除去栄養液の灌流や神経伝導を遮断するtetrodotoxinを適用すると抑制されたことから、NEが洞結節に分布する神経終末に取り込まれ、刺激によって神経から遊離されると考えられる。また洞結節をCa²⁺除去栄養液で灌流しておき、Ca²⁺イオノフォアであるA23187とCaCl₂(2.5mM)を同時に適用すると、同様にCa²⁺依存性NE遊離が認められた。

NE遊離に対するホルボールエステルの作用

Cキナーゼ活性化作用を持つホルボールエステルである12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)は³H-NE自発遊離には影響しなかったが、電気刺激およびA23187による³H-NE遊離を濃度依存性に増大した。一方、Cキナーゼ活性化作用を持たないホルボールエステルである4 α -phorbol-12,13-didecanoateはNE遊離に影響を与えたかった。この実験成績より、脱分極刺激あるいはCa²⁺イオノフォアにより惹起される細胞内Ca²⁺の上昇及びそれ以降の神経伝達物質遊離過程において、Cキナーゼの活性化が促進的に作用していると考えられる。更にCキナーゼの阻害物質であるpolymyxin Bおよび1-(5-isoquinoline sulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7)の前処置によりTPAによるNE遊離増大作用は抑制された。この結果はNE遊離過程に対するCキナーゼ活性化による促進作用を更に支持するものである。電気刺激によるNE遊離は外液Ca²⁺濃度依存性(0.25-2.5mM)を示した。TPAの遊離増大作用は外液Ca²⁺濃度が0.25mMの時に最大となった。またTPAは最大反応の50%を惹起するのに必要であるCa²⁺濃度を減少させた。これらの結果からCキナーゼの活性化は神経伝達物質遊離過程のCa²⁺に対する感受性を増加させることにより伝達物質遊離を促進すると考えられる。

以上、本研究により、モルモット心臓において高親和性のホルボールエステル結合部位の存在が証明された。そして、洞結節に分布するアドレナリン作動性神経の神経終末からのNE遊離過程に対してCキナーゼの活性化が神経伝達物質遊離過程のCa²⁺に対する感受性を増大させること

により、促進的に作用することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

プロテインキナーゼCは広く生体に分布し、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と考えられる。

申請者はモルモット心臓洞結節標本を用いてそこに分布する交感神経終末におけるプロテインキナーゼCの存在及びノルエピネフリン(NE)遊離に対するプロテインキナーゼC活性化の効果とその作用機構を解明するべく本研究を企て次の結果を得た。

まずモルモット心臓におけるプロテインキナーゼCの分布をみるためにプロテインキナーゼCを特異的に活性化するホルボールエステル結合実験を行い、ホルボールエステル結合部位の不均一な分布が交感神経終末の心臓内での分布とよく一致する結果を得た。このことはホルボールエステル受容体蛋白質すなわちプロテインキナーゼCが交感神経終末に局在することを示唆するものである。

次に神経終末からのNE遊離を定量化するために、洞結節標本に前もって³H-NEを負荷し、電気刺激に対応して³H-NEの遊離がみられ、この³H-NE遊離はCa²⁺依存性であること、神経伝導を遮断すると消失することを示して、NE遊離が神経終末由来であることを巧みに立証し実験系を確立している。

また神経伝達物質遊離過程におけるCa²⁺メッセンジャー系の機能を解明する上で、よりsensitiveな方法として、Ca²⁺除去栄養液灌流下にCa²⁺イオノフォアとCa²⁺を同時に投与することによりNE遊離を誘発する方法を考案した。発癌プロモータであるホルボールエステルにより³H-NE遊離が増強されることに加えて、プロテインキナーゼ阻害薬がホルボールエステルの作用を抑制することを示し、プロテインキナーゼCの活性化がNE遊離に促進的に作用することを立証した。更にプロテインキナーゼC活性化の神経伝達物質遊離促進の作用機序として、神経伝達物質遊離過程のCa²⁺に対する感受性を増加させるという興味ある所見を示している。

NEの90%以上がシナプス小胞内に存在しexocytosisにより遊離されるという報告と考えあわせると、本研究の成果は神経伝達物質遊離にとどまらず、exocytosis mechanismにおけるプロテインキナーゼCの関与を示唆するものと考えられる。

以上のように本研究はプロテインキナーゼCの活性化が心臓交感神経伝達物質遊離過程に促進的に働くことを示し、心臓機能の神経性調節に関与していることを明確にした。このことは末梢交感神経系におけるプロテインキナーゼCの生理的役割を解明し、更にexocytosis mechanismにおける機能をも示唆するものとして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。