



Action of mercurials on activity of partially purified soluble protein kinase C from mice brain

井上, 裕彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-04-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0924

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000924>

※ 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)	井 上 裕 彦 (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第696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	平成2年3月31日
学位論文題目	Action of Mercurials on Activity of Partially Purified Soluble Protein Kinase C from Mice Brain (マウス脳より部分精製したプロテインキナーゼCに対する 水銀化合物の影響)
審査委員	主査 教授 住 野 公 昭 教授 春日 雅 人 教授 村 上 宏

論文内容の要旨

【緒 言】

発癌プロモーターであるホルボールエステルのターゲットとして知られている Ca^{2+} /リン脂質依存性プロテインキナーゼ(Cキナーゼ)は多くの動物種,組織に広く分布し,放出反応やエキソサイトーシスをはじめとして,代謝調節,細胞の増殖や分化など,多彩な生体機能の調節において,様々な細胞内情報伝達に重要な役割を果たすものとして注目されている。近年の構造解析の研究から,Cキナーゼは single chain peptide で,他のキナーゼに比しN,C両末端側にシステインを豊富に含むことが明らかになった。N端側は,これらシステインにより,Zn finger と呼ばれる核酸結合蛋白によく見られる構造をとると共に,セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール(DG)の結合部位,即ちホルボールエステル結合部位を含むと推定されている。また,C端側には酵素活性中心を含むと考えられているがC端側システインの生理的役割は必ずしも明らかではない。

一方,水俣病の起因物質であるメチル水銀をはじめとする各種水銀化合物はいずれもSH基に高い親和性を示し,蛋白質のSH基とメルカプチド結合することにより種々の酵素活性阻害を引き起こすことが,主たる毒性発現機序とされている。Cキナーゼもシステインを多く含み,中枢神経系に高濃度に存在するため,水銀化合物により修飾を受け,惹いては水銀化合物の中枢神経毒性発現に関与する可能性が推測される。そこで,マウス大脳より得たCキナーゼ酵素標品を用い,水銀化合物のCキナーゼ活性に及ぼす影響を他のSH基阻害薬の効果と比較検討した。

【方 法】

1. Cキナーゼの精製

ICR系マウス（雌，6週齢）を断頭後，すみやかに大脳を摘出し，氷冷下でトリス塩酸緩衝液（pH 7.5），1mM EGTA，1mM フェニルメチルスルフォニルフロライド（プロテアーゼ阻害剤）と共にポリトロンにて破碎した。超遠心操作（100,000 xg 60min）により得た可溶性分画をDEAEセルロースに添加し，90mM NaClにより溶出される画分を部分精製酵素標品として用いた。

2. 水銀化合物及びSH基阻害薬

無機水銀；塩化第二水銀（ HgCl_2 ）

有機水銀；メチル水銀（ CH_3HgCl ），酢酸フェニル水銀（ $\text{C}_6\text{H}_5\text{—Hg—OCO—CH}_3$ ），

PCMB（p-chloromercuribenzoic acid， $\text{HOOC—C}_6\text{H}_4\text{—HgCl}$ ）

ジスルファイド；DTNB（5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid，

$\text{COOH—O}_2\text{N—C}_6\text{H}_4\text{—S—S—C}_6\text{H}_4\text{—NO}_2\text{—COOH}$ ）

アルキル化剤；NEM（N-ethylmaleimid， $\text{—CO—CH=CH—CO—N—C}_2\text{H}_5$ ）

これら試薬を下記の，3. 酵素活性反応液，4. ホルボールエステル結合量測定液中に添加し効果を検討した。

3. Cキナーゼ酵素活性の測定

Cキナーゼ酵素活性は $[\gamma\text{—}^{32}\text{P}]$ ATPからH1ヒストンへのリン酸化により測定した。Cキナーゼ（ $25\mu\text{g/ml}$ ）をH1ヒストン（ $8\mu\text{g/ml}$ ）を含む反応液〔20mM トリス塩酸緩衝液， $10\mu\text{M}$ $[\gamma\text{—}^{32}\text{P}]$ ATP（sp.act. 8Ci/mmole ），5mM酢酸マグネシウム，0.5mM塩化カルシウム， $8\mu\text{g/ml}$ フォスファチジルセリン， $0.8\mu\text{g/ml}$ ジオレイン〕と 30°C 5分間インキュベートし，25%トリクロロ酢酸により反応を停止させた。沈澱するヒストンをメンブレンフィルターにて濾過し，補集された ^{32}P 放射活性を全活性とし，反応液からジオレインを除いて得られたブランク値との差を特異的酵素活性とした。各種濃度の水銀化合物及びSH基作用薬を反応液中に添加し効果を検討した。

4. ホルボールエステル結合量の測定

Cキナーゼへのホルボールエステル結合量の測定には ^3H phorbol 12, 13-dibutyrate（ ^3H PDBU）を用いた。即ちCキナーゼ（ $25\mu\text{g/ml}$ ）を ^3H PDBU（10nM，sp.act. 15.8Ci/mmole ）を含む反応液〔20mM トリス塩酸緩衝液，1mM EGTA，1mM EDTA，0.2mM 塩化カルシウム， $30\mu\text{g/ml}$ フォスファチジルセリン，4mg/ml 牛血清アルブミン〕と 30°C 30分間インキュベートした。ポリエチレンイミン処理したWhatmann GF/B グラスフィルターで 0°C トリス塩酸緩衝液を用い洗浄濾過し，フィルターに補集された ^3H 放射活性をPDBU結合全活性とし， $30\mu\text{M}$ PDBU存在下の ^3H 放射活性をブランク値としてその差を特異的結合量とした。各種濃度の水銀化合物及びSH基作用薬を反応液中に添加し効果を検討した。

【結果及び考察】

Cキナーゼ酵素活性は，水銀化合物及びSH基作用薬何れによっても，濃度依存性に抑制された。塩化第二水銀は最も低濃度から抑制効果を示し， IC_{50} 値は $0.08\mu\text{M}$ であり，メチル水銀，フェニル

水銀やPCMBの有機水銀は何れも約 $1\mu\text{M}$ と同程度の IC_{50} 値を示した。DTNBとNEMはそれぞれ IC_{50} 値 $9.1\mu\text{M}$, $842\mu\text{M}$ と高濃度を要した。ヒル係数は水溶性の塩化第二水銀, DTNBやNEMはほぼ1であったが, 脂溶性の有機水銀約1.4であり, 作用の違いが示唆された。この抑制作用がN端とC端, いずれのシステインを介するのかを明らかにするために以下の検討を行なった。

酵素活性の阻害様式をヒストンに対し解析すると, 何れの化合物も IC_{50} 値付近では非拮抗阻害を示したので, C端側システインは基質結合部には含まれないものの, 阻害されると基質結合を抑制するような重要な位置にあると考えられた。Cキナーゼの活性化にはN端側へのDG或いはホルボールエステルの結合が必要であるとされており, N端側のシステインの阻害を介し活性化が抑制されている可能性がある。そこで, 次にホルボールエステル結合に対するこれら試薬の影響を調べたところ, 何れの試薬もホルボールエステル結合量を減少させたが, IC_{50} 値は酵素活性抑制の20~30倍高かった。ホルボールエステル安定化の為に, 反応系へのアルブミン添加が不可欠であるとされているが, アルブミンにより水銀化合物やSH基阻害薬の効果が減弱する為, 正確な IC_{50} 値は求められなかった。ホルボールエステル結合に対する阻害も何れの試薬も非拮抗阻害を示した。従ってN端側のシステインはDGやホルボールエステル結合部位に含まれないものの, 修飾されればDGやホルボールエステルの結合を抑制し, ひいてはCキナーゼの活性化を抑制すると考えられた。

中枢神経障害を起こすと報告されているヒト脳内水銀濃度は, $0.1\sim 2.0\mu\text{M}$ とされている。水銀化合物は $0.08\sim 1.0\mu\text{M}$ の濃度でCキナーゼ活性を強く抑制するので, 脳内においても, メチル水銀蓄積時にCキナーゼ活性が抑制され, 情報伝達系が傷害されることが, 中枢神経障害を引き起こす一因となっている可能性が示唆された。

【結 論】

1. メチル水銀を含む水銀化合物はシステインを介しCキナーゼ活性を抑制する。
2. 無機水銀の IC_{50} 値は $0.08\mu\text{M}$, 有機水銀で約 $1\mu\text{M}$ であり脳内においても充分阻害しうる濃度である。
3. Cキナーゼのシステインは酵素活性中心及びDG或いはホルボールエステル結合部位の何れにも含まれないが, 水銀化合物はこのシステインを抑制することで酵素活性そのもの及びDG或いはホルボールエステル結合によれ活性化の何れも抑制する。

以上のようにCキナーゼの抑制がメチル水銀の中枢神経症状発現に関与する可能性を見いだした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

水銀は, 単体の形であれ化合物の形であれ, またそれが無機化合物であれ有機化合物であれ, 環境汚染物質の元凶とされ日本の水俣病を始めとして世界各国で少なからず健康被害をもたらした。WHOの決議に基づいた国際化学物質安全計画でも, 水銀が最初の評価対象物質として取り上げられ, 化学物質災害対策の国際協力が実施されている。

水俣病の原因物質であるメチル水銀をはじめとする各種の水銀化合物は、SH基と高い親和性を有し、蛋白質、アミノ酸のSH基とメルカプチド結合することにより酵素活性阻害や蛋白合成阻害を引き起こすことが知られている。しかし、メチル水銀による特異的な神経障害機序については未だ不明な点が多い。

一方、中枢神経系に高濃度に存在する Ca^{2+} ・磷脂質依存性プロテインキナーゼ（Cキナーゼ）は、多彩な生体機能の調節の中で細胞内情報伝達に重要な役割を果たしている。近年の構造解析の研究から、CキナーゼはN、C両末端にシステインを豊富に含み、N端側はジアシルグリセロール結合部位を、C端側に酵素活性中心を構成すると考えられている。

そこで申請者は水銀化合物がシステインを多く含むCキナーゼを修飾し、ひいては水銀化合物の神経毒性発症に関与する可能性を確かめるため、マウス大脳から得たCキナーゼ酵素標品を用い、水銀化合物のCキナーゼ活性に対する効果を、他のSH基阻害薬と比較しながら検討した。

材料として、マウス大脳を摘出し氷冷下で緩衝液と共に破碎し、超遠心操作で可溶性分画を得、所定のカラム分画を行なった部分精製酵素を用いた。

作用試薬として塩化第二水銀、塩化メチル水銀、酢酸フェニル水銀、p-クロロ安息香酸第二水銀、DTNB、NEMを用い、酵素活性測定液、ホルボールエステル結合量測定液中に、各種濃度の作用薬を添加して効果を検討した。

活性の測定はATPからH1ヒストンの磷酸化を所定の方法で行ない、結合量の測定はPDBUを用いて所定の方法で行なった。得られた結果を kinetic 解析し、作用機序の検討を加えた。

水銀化合物およびSH基作用薬はいずれも濃度依存性にCキナーゼ活性を抑制した。IC50値は無機水銀の塩化第二水銀では $0.08 \mu\text{M}$ 、有機水銀の三種は何れも約 $1 \mu\text{M}$ 、DTNB、NEMはそれぞれ9.1、 $840 \mu\text{M}$ であった。ヒル係数は塩化第二水銀、DTNB、NEMはほぼ1であったが、三種の有機水銀は約1.4であった。またPDBU結合阻害実験でも濃度依存性に結合を阻害し、そのIC50値は活性阻害の20～100倍の濃度で、ヒル係数はNEM以外の作用薬ではほぼ2であった。このことから *in vitro* における水銀化合物によるCキナーゼへの影響は、無機水銀がより低濃度で活性を抑制し、有機水銀はより高濃度を要するもののわずかの濃度変化で強く抑制することが判った。

阻害様式を解析すると非拮抗阻害を示した。このことはC端側システインは基質結合部位と離れて存在するが、しかし阻害されれば基質結合を抑制する重要な位置にあると考えられた。PDBU結合も非拮抗阻害され、N端側のシステインもPDBUの結合部位に含まれないものの、修飾を受けるとPDBU結合を低下させ、ひいてはCキナーゼ活性を抑制すると考えられた。また基質結合部位の阻害が、活性化部位の阻害より優先することが示唆されるが有機水銀と無機水銀で大きな差は認められなかった。

メチル水銀で中枢神経障害を起こしたヒト脳内水銀濃度は $0.1 \sim 2 \mu\text{M}$ と報告されており、本研究でのCキナーゼ活性抑制濃度とほぼ一致し、脳内に移行しやすいメチル水銀が蓄積すると情報伝達系が傷害され、中枢神経障害を発症させる一因となりうることが示唆された。

以上、本研究は、水銀化合物の脳中Cキナーゼに対する効果について、作用濃度と作用機序を研究

したもので、Cキナーゼの活性抑制が水銀による中枢神経症状発現に関与する可能性を明らかにし、重要な知見を得た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。