Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Protein kinase C of a human megakaryoblastic leukemic cell line(MEG-01) -Analysis of subspecies and activation by diacylglycerol and free fatty acids-

北川, 泰生

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1993-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1151
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001151

※ 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）　北川泰生（きたがわ やすお）　（滋賀県）

博士の専攻分野の名称　博　士（医学）

学位記番号　博い第826号

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付　平成5年3月31日

学位論文題目　Protein kinase C of a human megakaryoblastic leukemic cell line (MEG-O1)
Analysis of subspecies and activation by diacylglycerol and free fatty acids
ヒト巨核芽球性白血病由来細胞株 MEG-01 の Protein kinase C 分子種の解析及び diacylglycerol と遊離脂肪酸による活性化

審査委員　主査　教授　西塚泰美
教授　横山光宏　教授　田中千賀子

論文内容の要旨

緒　言

Protein kinase C（以下 PKC）は、イノシトールリン脂質の代謝回転に伴い生成される diacylglycerol（以下 DAG）により活性化を受けるカルシウム／リン脂質依存性セリン／トレオニンタンパク質リン酸化酵素として発見された。それはまた、発癌プロモーターとして知られる phorbol ester と結合し活性化を受けることが知られている。PKC は多くの分子種から構成される分子ファミリーであり、種々の細胞内情報伝達に関与していると考えられている。ことに細胞の分化増殖過程では、PKC の持続的活性化が必要であると推定されており、PKC の活性維持には DAG のみならず phosphatidylcholine の加水分解に由来する不飽和脂肪酸が関与すると考えられている。

一方、ヒト巨核芽球性白血病由来細胞株 MEG-O1 は、phorbol ester により成熟巨核球へと分化誘導されることから PKC の細胞分化における役割の解析に適した細胞株であるといえる。本研究は、MEG-O1 細胞に発現されている PKC 分子種を明らかにするとともに、不飽和脂肪酸が DAG と相乗的にこれらの PKC 分子種を活性化することを示した。これらの結果から巨核芽球細胞の分化において、DAG のみならず、不飽和脂肪酸による PKC の活性調節が重要な役割を果たしていることが示唆される。

実験方法

MEG-O1 細胞は 10％牛血清を含む RPMI1640 培地中で培養した。MEG-O1 細胞中の PKC 分子種は、MEG-O1 細胞（約 1-2x10^8個）を 0.25M ショ糖を含むトリス緩衝液中で超音波破砕し、10 万 g、

60分間の遠心上清からDEAE－セルロースカラムクロマトグラフィーによる部分精製の後、ハイドロキシアパタイトカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより各PKC分子種を分離した。各々のPKC分画をLaemmli法に従って、SDSポリアクリルアミド電気泳動を行ないニトロセルロース膜に転写の後、PKC分子種特異抗体を用いてイムノブロット解析を行なった。PKCの活性はCa^{2+}、phosphatidylserine（以下PS）、DAG、及び脂肪酸の存在下に[γ-^{32}P]ATPからH1-histoneへの放射活性の転移により測定した。

結　果

1．MEG-O1細胞の発現されているPKC分子種の解析

MEG-O1細胞のPKCは、ハイドロキシアパタイトカラムにより2つのピークに分けられた。一番目のピークはラット脳PKCのtypeⅡ（β）に相当する位置に溶出され、二番目のピークはtypeⅢ（α）に相当する位置に溶出され、またイムノブロット法により、それぞれβ分子種及びα分子種に対する特異抗体によりともに分子量約8万のタンパク質が検出された。これらの結果からMEG-O1細胞にはPKC分子種のうちtypeⅡ（β）及びtypeⅢ（α）の2種類が発現されていることが示された。

2．MEG-O1細胞PKC分子種の酵素化学的性質

MEG-O1細胞から分離されたPKC分子種typeⅡ（β）、typeⅢ（α）ともにPS存在下では10^{-4}Mの高濃度のCa^{2+}で活性を示し、PS及びDAG存在下では、10^{-6}Mの低濃度のCa^{2+}で高い活性を示した。PS及びDAGに不飽和脂肪酸であるarachidonic acidを加えることにより両酵素とも、Ca^{2+} 10^{-6}Mの濃度で約2倍に活性が増強された。Arachidonic acidの用量依存性を検討した結果、PSとDAG存在下で最大の活性を示すarachidonic acidの濃度は両酵素とも20μMであり、高濃度の脂肪酸はかえって酵素活性を阻害した。Linoleic acid、linolenic acid及びoleic acid等の不飽和遊離脂肪酸では、arachidonic acidと同様にPSとDAG存在下で両酵素とも約2倍の活性の増加が認められたが、palmitic acid、stearic acid等の飽和遊離脂肪酸では活性の増加は認められなかった。

考　察

MEG-O1細胞にはH1-histoneを基質タンパク質とした解析から、PS、DAG及びCa^{2+}に依存性のtypeⅡ（β）PKCとtypeⅢ（α）PKCが存在することが示され、特異抗体を用いたイムノブロット法によりこれらの分子種の存在が確認された。一方、分化したヒト末梢血血小板にはtypeⅢ（α）PKCと、Ca^{2+}非依存性でPS、DAGに部分的に依存性を示す未同定のPKC分子種が存在することが報告されている。従って、巨核球から血小板への分化過程においてPKC分子種の発現が変化し、巨核球のtypeⅡ（β）PKCと血小板の未同定のPKC分子種とは異なる機能を有すると推定される。MEG-O1細胞のPKC分子種typeⅡ（β）及びtypeⅢ（α）は、ともにDAGとarachidonic acidにより細胞内レベルの低濃度のCa^{2+}で相乗的に活性の増強が認められることから、イノシトールリン脂質代謝により一過性に上昇した細胞内Ca^{2+}が正常に戻った後も、DAGと不飽和脂肪酸によりこ

れらのPKC分子種の活性が持続する可能性が示唆される。細胞の分化増殖の過程では持続性のPKCの活性化が必要とされることから、分化増殖におけるホスホリパーゼA_2及びホスホリパーゼDを介するPKCの関与が示唆され、持続的PKC活性化の具体的役割の解明が今後の課題である。

論文審査の結果の要旨

ヒトの巨核芽球性白血病に由来する細胞株MEG-O1株は、Phorbol ester によって成熟巨核球へと分化するので、細胞分化のモデルとして使用されている。各種の細胞生長因子などのシグナルによる細胞の増殖や分化に際して、細胞膜の多数のリン脂質が連動して分解し、その代謝生成物のいづれもが、細胞内への情報伝達にprotein kinase C（PKC）を介して働くことが示唆されている。

本研究者は、上記の細胞株の分化過程を解析する目的から、細胞内に存在するPKC分子種の酵素化学的同定と、これらの分子種が、ホスホリパーゼA_2により生成される不飽和脂肪酸によりどの様な活性の調節をうけるかに焦点をあてた解析を実施した。

まずPKC分子種については、生化学的解析と、特異抗体を用いた免疫化学の方法により、α種及びβ種が存在することを同定した。続いて、これら分子種について、その活性化様式の解析を行い、不飽和脂肪酸が関与することを示した。すなわち、α種、β種PKCは従来はイノシトールリン脂質のホスホリパーゼCによる分解に由来するジグリセリドとカルシウムイオンの上昇によってその機能が発揮されていると考えられていたが、これに加えてコリンリン脂質のホスホリパーゼA_2による分解生成物である不飽和脂肪酸がジグリセリドと共存すると、カルシウムイオンの上昇なしに著しい機能が発揮される。不飽和脂肪酸としてはオレイン酸、リノール酸、リノレイン酸、アラキドン酸等、細胞膜コリンリン脂質の2位に結合しているものはすべて有効であり飽和脂肪酸は無効である。

これらの酵素科学的解析の結果は、細胞にシグナルが加えられた場合、ホスホリパーゼCのみでなくホスホリパーゼA_2もまた活性を発現し、細胞膜を構成する種々のリン脂質が同時に分解され、それらの生成物質が協調して、情報伝達に直接かかわっていることを示唆している。実際に、細胞分化反応に際して、Phorbol esterやジグリセリドと同時に、不飽和脂肪酸を細胞培養液に共存させると、速かな細胞分化応答が惹きおこされる。

以上の結果は、ホルモン、細胞生長因子などのシグナルの伝達に際しては、受容体を介するイノシトールリン脂質の分解反応のみが主役を果たしているとの従来の通念を打破し、コリンリン脂質のホスホリパーゼA_2による分解反応もまた直接情報伝達に共役している可能性を示したものである。また、アラキドン酸以外の不飽和脂肪酸の生物学的直接活用の存在を示した点で価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。