



Protein phosphatase inhibitors induce the release of serotonin from rat basophilic leukemia cells(RBL-2H3)

阪本, 哲一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1249

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001249>

※ 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）	さか もと のり かず 阪 本 哲 一	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博い第878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6年3月31日	
学位論文題目	Protein phosphatase inhibitors induce the release of serotonin from rat basophilic cells leukemia (RBL-2H3) (蛋白質脱磷酸化酵素阻害薬はラット好塩基球性白血病細胞よりセ トロニン遊離を引き起こす)	
審査委員	主査 教授 田 中 千賀子 教授 春日 雅 人 教授 西 塚 泰 美	

論文内容の要旨

目 的

肥満細胞や好塩基球からの炎症性化学物質の遊離は急性炎症やアレルギーの初期反応として重要である。ラット好塩基球性白血病細胞（RBL-2H3）は、粘膜肥満細胞及び好塩基球における炎症性化学物質の遊離の実験モデルとして広く用いられている。RBL-2H3細胞からのセロトニン遊離は免疫抑制薬であるFK506やサイクロスポリンAによって阻害される。その作用機序は免疫抑制薬が各々の結合蛋白質と複合体を形成し、セリン-スレオニン-蛋白質脱磷酸化酵素であるカルシニューリンの活性を阻害する事によると考えられている。蛋白質脱磷酸化酵素の役割を更に調べるために、1型及び2A型蛋白質脱磷酸化酵素に選択的な阻害薬であるオカダ酸（OA）及びカリクリンA（CL-A）のRBL-2H3細胞からのセロトニン遊離に対する作用を検討した。

方 法

(1) セロトニン遊離実験

DMEM培養液にて 4×10^5 細胞/mlのRBL-2H3細胞浮遊液を作成し、24穴プレートに各々0.5 ml分注し、18時間、 ^3H -セロトニンを取り込ませた後、培養液を0.2 ml HEPES buffer (25mM HEPES (pH 7.75), 100 mM NaCl₂, 5 mM KCl, 0.4mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5.6mM D-glucose, 0.1%牛血清アルブミン) に換えた。種々の濃度のOA又はCL-Aを適用した後、buffer中及び細胞内に残存する放射活性を測定し、セロトニン遊離量を算出した。細胞外液カルシウム非存在下でのセロトニン遊離実験はカルシウム除去HEPES bufferにおいて行なった。

(2) 細胞内カルシウム濃度測定実験

HEPES bufferにて 10^5 細胞/mlの細胞浮遊液を作成し、カルシウム蛍光指示薬であるfura-2 ($5 \times 10^{-6}\text{M}$)を取り込ませ、細胞内カルシウム濃度測定装置(CAF-100)を用いて細胞

内カルシウム濃度の変化を測定した。

(3) 細胞内蛋白質磷酸化実験

H E P E S buffer を用いて 4×10^5 細胞/ml の細胞浮遊液を作成し、 ^{32}P - orthophosphate (0.1mCi/ml) を30分間取り込ませた。その後、対照 (溶媒のみ) 及び種々の薬物を処置した細胞より調製した抽出液を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びオートラジオグラフィーにより解析した。

結 果

(1) セロトニン遊離実験

O A ($3 \times 10^{-6}\text{M}$) 及び C L - A ($3 \times 10^{-8}\text{M}$) を処置した細胞では、時間依存的に増加する遅発性で持続性のセロトニン遊離を認めた。各々処置後90分、60分で最大のセロトニン遊離を認めた。また、O A 及び C L - A を各々75分間、45分間処置した細胞では、濃度依存性に増加するセロトニン遊離を認め、各々 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ にて最大のセロトニン遊離を認めた。また、E G T A にて細胞外液カルシウムをキレートしたカルシウム除去 H E P E S buffer においても同様のセロトニン遊離を認めた。蛋白質磷酸化酵素阻害薬であるスタウロスポリン (10^{-6}M) 及び K - 252 a (10^{-6}M) を15分間前処置した細胞では C L - A ($3 \times 10^{-8}\text{M}$) を45分間処置してもセロトニン遊離を認めなかった。

(2) 細胞内カルシウム濃度測定実験

イオノマイシン (10^{-7}M) 処置直後では細胞内カルシウム濃度の急激な上昇を認めるのに対して、C L - A ($3 \times 10^{-8}\text{M}$) 45分間処置前後における細胞内カルシウム濃度は、溶媒のみ処置した対照における細胞内カルシウム濃度と同様で、著明な変化はなかった。

(3) 細胞蛋白質磷酸化実験

$3 \times 10^{-8}\text{M}$ C L - A を処置した細胞では、25、20、18、15、13及び12 KDa の蛋白質の磷酸化の亢進が認められた。しかし、 10M スタウロスポリン前処置後に C L - A を処置した細胞においては、このような蛋白質の磷酸化の亢進は認められなかった。

考 察

O A 及び C L - A を処置することで R B L - 2 H 3 細胞からの時間依存性に増加する遅発性で持続性のセロトニン遊離を認めた。また同条件下の C L - A 処置にて細胞内蛋白質の磷酸化の亢進が認められた。O A 及び C L - A は蛋白質磷酸化酵素を直接活性化しないので、R B L - 2 H 3 細胞においては、1型及び2A型蛋白質脱磷酸化酵素を阻害することにより、細胞内蛋白質の磷酸化の亢進が起こりセロトニン遊離が引き起こされると考えられる。これは蛋白質磷酸化酵素阻害薬であるスタウロスポリンの前処置でセロトニン遊離及び細胞内蛋白質の磷酸化の亢進が認められなくなる実験結果にも合致する。C L - A は O A よりも100倍も強く1型蛋白質脱磷酸化酵素の活性を阻害する事が報告されている。C L - A は O A より100分の1の濃度でセロトニン遊離を引き起こすことから、1型蛋白質脱磷酸化酵素が R B L - 2 H 3 細胞においてセロトニン遊離を持続的に阻害しており、O A および C L - A が1型蛋白質脱磷酸化酵素を阻害する事で細胞内蛋白質の磷酸化の亢進が起こりセロトニ

ン遊離が引き起こされると考えられる。抗原刺激やカルシウムイオノフォアによるセロトニン遊離は細胞内カルシウム濃度の急激な上昇を伴って起き、細胞外液カルシウム非存在下では起こらない。一方、OA及びCL-Aによるセロトニン遊離は細胞内カルシウム濃度の変化を伴わず、また、細胞外液カルシウム非存在下でもOA及びCL-Aはセロトニン遊離を引き起こす。

以上の事よりRBL-2H3細胞からのセロトニン遊離はカルシウムに依存する部位の下流において蛋白質脱リン酸化酵素によって抑制的に調節をうけており、その部位にOA及びCL-Aが作用しているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

粘膜肥満細胞及び好塩基球における炎症性化学物質の遊離の実験モデルであるRBL-2H3細胞からの抗原刺激によるセロトニン遊離は免疫抑制薬であるFK506やサイクロスポリンAによって抑制される。これらの免疫抑制薬は2B型Protein phosphatase（カルシニューリン）の活性を阻害する事からProtein phosphataseの分泌機構への関与が注目されている。申請者は1型及び2A型Protein phosphataseに選択的な阻害薬であるオカダ酸及びカリクリンAを用いてRBL-2H3細胞からのセロトニン遊離における情報伝達系でのProtein phosphataseの働きを検討した。

その結果、オカダ酸及びカリクリンAを処置した細胞では、時間依存的に、また濃度依存的に増加する遅発性で持続的なセロトニン遊離を認めた。また、Protein kinase阻害薬であるスタウロスポリン及びK-252aを前処置した細胞ではカリクリンAによるセロトニン遊離は認められなかった。オカダ酸及びカリクリンAによるセロトニン遊離は抗原刺激や Ca^{2+} イオノファによるものとは異なり細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を伴わず、また、細胞外液 Ca^{2+} 非存在下でも認められた。カリクリンAを処置した細胞では、細胞内蛋白質のリン酸化の亢進が認められた。スタウロスポリンを前処置した細胞ではカリクリンAによる細胞内蛋白質のリン酸化の亢進は認められなかった。

本研究よりRBL-2H3細胞からのセロトニン遊離は Ca^{2+} に依存する部位の下流において1型Protein phosphataseによって抑制的に調節をうけており、その部位にオカダ酸及びカリクリンAが作用して1型Protein phosphataseを阻害する事で細胞内蛋白質のリン酸化の亢進が起こりセロトニン遊離が引き起こされると考えられた。以上の知見は肥満細胞や好塩基球からの炎症性化学物質の遊離の情報伝達系において1型Protein phosphataseが抑制的に調節をおこなっている可能性を示唆している。本研究はセロトニン遊離へのProtein phosphataseの関与について研究したものであるが、肥満細胞や好塩基球からの炎症性化学物質の遊離の分子機構について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって本申請者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。