

Title	クロマフィン細胞からのカテコラミン分泌におけるカルモデュリンおよびCキナーゼの役割と破傷風毒素による分泌阻害効果 — ジギトニン処理細胞を用いた研究
Author(s)	岡部, 登志男
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37976">https://hdl.handle.net/11094/37976</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 【 1 】

氏名	岡 部 登 志 男
博士の専攻分野 の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 9 8 6 9 号
学位授与年月日	平 成 3 年 8 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科 内科系専攻
学位論文名	クロマフィン細胞からのカテコラミン分泌におけるカルモデュリン およびCキナーゼの役割と破傷風毒素による分泌阻害効果 — ジギ トニン処理細胞を用いた研究
論文審査委員	(主査) 教 授 西村 健 (副査) 教 授 松田 守弘 教 授 祖父江憲治

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 〔目 的〕

開口分泌は  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入が引き金となって誘発されることが知られている。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇によって  $Ca^{2+}$  受容タンパク質が活性化され一連の過程を経て分泌がおこると推定されている。しかし種々の  $Ca^{2+}$  受容タンパク質の中でどの物質が開口分泌に本質的な役割を演じているのは明らかではない。

本研究ではジギトニンによって透過性を亢進させたクロマフィン細胞を用いて、 $Ca^{2+}$  受容タンパク質のうちでも特に重要であると考えられるカルモデュリン (CaM) およびCキナーゼの分泌に及ぼす影響を調べた。またこれらのタンパク質と、分泌を阻害する破傷風の毒素の作用との関係を検討した。

## 〔方 法〕

- 1) クロマフィン細胞はウシ副腎髄質より、Kilpatrickの方法に従い分離し、3～7日間培養したものをを用いた。CaMはウシ脳より、アクチン、カルデスモンはニワトリ砂嚢平滑筋より既報の方法で精製した。破傷風毒素は *Clostridium tetani* Harvard A47 Biken 亜株の培養上清を出発材料として松田らの方法により精製した。
- 2) クロマフィン細胞を  $[^3H]$ -Norepinephrine ( $[^3H]$ -NE) でラベルした後、 $20 \mu M$  ジギトニンを含むK-G溶液で  $37^\circ C$ 、10分間処理した。その後種々の濃度の  $Ca^{2+}$  を含む K-G溶液で  $37^\circ C$ 、10分間刺激して細胞外液中に放出された  $[^3H]$ -NEの量を測定した。
- 3) 上記2)の方法によってジギトニン処理したクロマフィン細胞を  $10 \mu M$   $[^{32}P]$ -ATP を含むK-

G溶液で37°C, 10分間リン酸化し, オートラジオグラフィーによってタンパク質のリン酸化を調べた。Cキナーゼ活性はhistone III-Sを基質として測定した。

#### [成績]

- 1) ジギトニン処理細胞において [<sup>3</sup>H]-NE放出量はMgATP存在下でCa<sup>2+</sup>濃度依存性に上昇し, 2.5×10<sup>-6</sup>M Ca<sup>2+</sup>で最大に達した。このCa<sup>2+</sup>依存性分泌におけるCキナーゼの関与を調べるため, Cキナーゼを活性化するphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を添加したところ, Ca<sup>2+</sup>依存性分泌はPMA濃度依存性に上昇し, 300 ng/mlで最大に達した。一方, Cキナーゼ阻害剤であるH-7やPKC(19-36)は, Ca<sup>2+</sup>およびPMA添加時において放出された[<sup>3</sup>H]-NE量のうちPMAによる上昇分のみを抑制し, PMA非添加時の分泌に対しては影響を及ぼさなかった。
- 2) CaMの分泌におよぼす効果を明らかにするため, まずCaM阻害剤であるW-7を用いて検討した。Ca<sup>2+</sup>依存性分泌はW-7濃度依存性に減少し, 100 μM W-7で50%程度の減少を認めた。しかしW-7は細胞膜にも結合することが知られており, 膜の機能を変化させることによってW-7が分泌を阻害する可能性も除外できない。そこで, この細胞にCaMを添加して直接効果を調べた。CaMは濃度依存性に分泌を上昇させ, 40 μM CaMでCa<sup>2+</sup>依存性分泌は130-150%に上昇した。一方, CaMの代わりにウシ血清アルブミン, カルデスモン, アクチンを添加しても[<sup>3</sup>H]-NE分泌に影響を与えなかった。またW-7による分泌の低下はCaMを添加することによって回復した。CaMの作用はCa<sup>2+</sup>が10<sup>-6</sup>M以上で認められ, 10<sup>-7</sup>M以下のCa<sup>2+</sup>濃度ではCaMの影響は認められなかった。次にCaMによって活性化される酵素の代表的なものであるミオシン軽鎖キナーゼの分泌に対する効果をこのキナーゼ阻害剤であるML-9を使用して検討した。100 μM ML-9添加によってCa<sup>2+</sup>依存性分泌は40%程度低下した。CaMはこの低下を50%回復させた。
- 3) 破傷風毒素はCa<sup>2+</sup>依存性分泌を90%以上阻害した。またこの毒素はPMA添加時でも81%, PMA及びH-7添加時でも92%の分泌抑制を示した。そこで破傷風毒素とCキナーゼとの相互作用を調べるため, Cキナーゼ活性の細胞内分布に対する毒素の影響を検討した。ジギトニン処理細胞では可溶分画に95%, 顆粒分画に5%のCキナーゼ活性があり, PMA添加によってそれぞれ29%, 71%へと変化した。この変化はH-7によって部分的に抑制された。破傷風毒素はPMAやH-7によるCキナーゼ活性の細胞内分布の変化に影響を及ぼさなかった。次にCキナーゼによってリン酸化されるタンパク質と破傷風毒素の関係をオートラジオグラフィーを用いて検討したが, PMAやH-7によって変化するタンパク質のリン酸化はこの毒素によって変化しなかった。
- 4) 破傷風毒素はCaM添加時のCa<sup>2+</sup>依存性分泌を86%抑制した。そこでこの毒素とCaMとの直接作用を検討した。Ultrogel AcA34ゲルクロマトグラフィーあるいはzero-length crosslinkerを用いた結合実験を行ったが破傷風毒素はCaMと結合しなかった。

#### [総括]

ジギトニンによって膜透過性を亢進させたクロマフィン細胞内に種々の物質を導入して解析を行っ

た。その結果、

- 1) PMAとH-7, PKC(19-36)を用いた実験から、Cキナーゼの活性化によりCa<sup>2+</sup>依存性分泌は増加するが、PMA非添加時の細胞の分泌にはCキナーゼ系は働いていないことを明らかにした。
- 2) CaMはCa<sup>2+</sup>依存性分泌に重要な役割を演じていることを明らかにした。この系で得た結果が示すML-9による分泌の減少はミオシン軽鎖キナーゼ抑制に基づくものと考えられるので、クロマフィン細胞からの開口分泌にはアクチン・ミオシンの収縮系が関与している可能性が考えられる。
- 3) 破傷風毒素による分泌阻害にはCキナーゼが関与し、この毒素がCキナーゼの細胞内分布を変化させるという報告があるが、これに反して本研究では破傷風毒素はCaM及びCキナーゼとは直接に作用することなく分泌を抑制することがわかった。破傷風毒素の作用部位は、CキナーゼやCaMの関与する部位よりも開口分泌の最終過程により近い部位にあると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は開口分泌機構におけるカルモデュリン、Cキナーゼという二種類のCa<sup>2+</sup>受容タンパク質の役割と、これらのタンパク質に対する破傷風毒素の作用についてジギトニン処理したクロマフィン細胞を用いて解析を行ったものである。

その結果、Cキナーゼは分泌に必須なものではなくむしろmodulatorとして働くこと、カルモデュリンが分泌に重要な役割をもつこと、破傷風毒素はこれらのCa<sup>2+</sup>受容タンパク質が関与する部位よりも遠位の部位に作用することを明らかにした。

以上の成果は分泌機構の研究や破傷風毒素の作用機序研究に寄与するところが大きく、学位に値する業績であると考ええる。