



Title	プロテインキナーゼCによるヒスタミンH1受容体の調節機構
Author(s)	劉, 業奇
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38118">https://hdl.handle.net/11094/38118</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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	劉業奇
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 10630 号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	プロテインキナーゼCによるヒスタミンH <sub>1</sub> 受容体の調節機構
論文審査委員	(主査) 教授 三木 直正 (副査) 教授 谷口 直之 教授 祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### (目的)

ヒスタミンH<sub>1</sub>受容体は末梢臓器及び脳に存在する。末梢においては平滑筋の収縮や毛細血管の透過性の亢進を引き起こし、尋麻疹などのアレルギー疾患に深く関与している。また、中枢においてはヒスタミン神経の伝達に関与していると考えられている。H<sub>1</sub>受容体の情報伝達機構についてはヒスタミンが受容体に結合すると、GTP結合蛋白質を介してホスホリパーゼC (PLC) に伝えられ、細胞膜の成分であるホスファチジルイノシトール三リン酸が分解され、セカンドメッセンジャーであるイノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) とジアシルグリセロール (DG) が産生される。IP<sub>3</sub>は細胞内のCa<sup>2+</sup>貯蔵部位のCa<sup>2+</sup>を動員し、一方、DGはプロテインキナーゼC (PKC) を活性化する。活性化されたPKCは蛋白質のリン酸化反応を介して細胞機能を調節すると考えられるが、H<sub>1</sub>受容体への影響は今までほとんど研究がなかった。そこでPKCを活性化する発癌プロモーターであるホルボールエステルとPKCの阻害剤を用いて、H<sub>1</sub>受容体量とその機能の調節機構に関して検討を行った。

#### (方法ならびに成績)

1) プロテインキナーゼC (PKC) を活性化する発癌プロモーターであるホルボールエステルの一つであるPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (1 μM) を培養HeLa細胞に添加すると、H<sub>1</sub>拮抗薬である [<sup>3</sup>H] メピラミンの結合部位は20時間後にコントロールの最大結合量106fmol/mg蛋白質から191fmol/mg蛋白質へ増加した。増加した [<sup>3</sup>H] メピラミンの結合部位はd-及びl-クロルフェニラミンとの結合において立体特異性を示した。また、1 μM PMAで6時間処理したHeLa細胞のH<sub>1</sub>受容体のmRNA (ノーザンプロットの結果) もコントロール細胞に比べ明確に増加した。これらの結果より真のH<sub>1</sub>受容体が増加したと結論した。一方、PMAで処理した細胞のH<sub>1</sub>受容体については、 [<sup>3</sup>H] メピラミン結合におけるK<sub>d</sub>値が2.7nMから1.7nMへ有意に低下した (P<0.001)。コントロール及びPMAを処理したHeLa細胞の [<sup>3</sup>H] メピラミン結合に対するヒスタミン及び各種H<sub>1</sub>受容体の拮抗薬のK<sub>i</sub>値を検討した。PMAを処理したHeLa細胞膜の [<sup>3</sup>H] メピラミン結合に対するメピラミンとd-及びl-クロルフェニラミンのK<sub>i</sub>値はコントロールの細胞より有意に減少し、PMAで処理した細胞のH<sub>1</sub>受容体は阻害薬に対する親和性が増加しているものと考えられた (P<0.01)。一方、ジアシルグリセロールのアナログであるOAG (1-oleoyl-2-scetyl-sn-glycerol) 及び細胞内Ca<sup>2+</sup>を増加するCa<sup>2+</sup>イオノフォアであるイオノマイシンも [<sup>3</sup>H] メピラミン結合部位を有意に増加した (それぞれP<0.01とP<0.001) が、活性のないホルボールエステル、4 α-PDD (4 -alpha-phorb

ol-12, 13-didecanoate) にはその作用が認められなかった。また PKC の阻害剤である staurosporine, K252a, H7, sphingosine と phloretin はいずれも PMA による  $H_1$  受容体量の増加を抑制した ( $K_i$  値はそれぞれ 1.7nM, 37nM, 6.2  $\mu$ M, 6.8  $\mu$ M 及び 8.2  $\mu$ M であった)。

2) ヒスタミン  $H_1$  受容体の機能をそのセカンドメッセンジャーである細胞内イノシトールリン酸 (IPs) の蓄積量を測定することによって調べた。HeLa 細胞を15分間 PMA で処理するとヒスタミンを加えても細胞内 IPs 量が増加しなかった。しかし、PKC 阻害剤の staurosporine 又は K252a を PMA と同時に加えておくと IPs 量がヒスタミンによって増加した。また、HeLa 細胞を 20 時間 PMA で処理するとヒスタミンによる IPs の増加は見られなかったが、この場合、PKC 阻害剤の staurosporine 又は H7 を PMA と同時に投与しておくと IPs のヒスタミンによる増加が見られた。これは PMA を短時間作用させた場合と長時間作用させた場合で作用する PKC のサブフォームが異なる可能性が示唆された。

3) グルココルチコイドの一つであるデキサメサゾン単独では効果がなかったが、1  $\mu$ M PMA と同時に投与すると、PMA 単独処理群に比べて、1  $\mu$ M デキサメサゾンとの同時投与群では 35%、10  $\mu$ M デキサメサゾンとの同時投与群では 40% の [ $^3$ H] メピラミン結合部位が減少した (共に  $P < 0.001$ )。

#### (総括)

PKC の活性化は HeLa 細胞の  $H_1$  受容体量を増加させた。また、 $H_1$  受容体量を増加させた HeLa 細胞においても増加させていない HeLa 細胞においても PKC の活性化は  $H_1$  受容体の情報伝達を抑制した。しかし、これらの PKC による  $H_1$  受容体の調節機構が少なくとも三種類の異なる PKC サブフォームによって別々に調節されていると考えられた。また、グルココルチコイドは PKC による  $H_1$  受容体量の増加を阻害した。PKC による  $H_1$  受容体の調節はヒスタミンの炎症作用に関与していると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

ヒスタミン  $H_1$  受容体を調節する機構を HeLa 細胞を使って検討した。ホルボールエステルの phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (1  $\mu$ M) 存在下では  $H_1$  受容体を標識する [ $^3$ H] メピラミン結合は 20 時間後に約 2.5 倍に増加した。PMA で 6 時間処理した HeLa 細胞の  $H_1$  受容体の mRNA も増加した。ジアシルグリセロールのアナログである OAG 及  $Ca^{2+}$  ionophore である ionomycin も [ $^3$ H] メピラミン結合を有意に増加した。プロテインキナーゼ C (PKC) の阻害剤である staurosporine, K252a, H7, sphingosine と phloretin はいずれも PMA による  $H_1$  受容体量の増加を抑制し、PKC の関与が示唆された。Dexamethasone はこの PMA による  $H_1$  受容体増加を抑制した。PMA で 20 時間処理した HeLa 細胞はヒスタミンを加えてもイノシトールリン酸 (IPs) の蓄積が起こらなかったが PKC 阻害剤のうち staurosporine と H7 を加えることによってヒスタミンによる IPs の蓄積がみられた。ヒスタミンによる IPs の蓄積は PMA の短時間処理によっても抑制されたが、PKC 阻害剤のうち staurosporine と K252a によってヒスタミンによる IPs の蓄積が回復した。すなわち、ヒスタミンによる IPs の蓄積は PMA によって抑制的に調節されているが、PMA の作用時間によって PKC 阻害剤に対する感受性が異なった。この研究はヒスタミン  $H_1$  受容体量及び機能に各々異なる PKC サブフォームと考えられるリン酸化酵素が関与することを明かした。

以上のことから本論文は学位に値するものと思われる。