原 著

ヒトメラノーマ由来の培養細胞 (Bowes 株) の tissue-type plasminogen activator 分泌におよぼす培養液中の ATP および Ca^{2+} イオンの効果

酒井 鉄博* 岡田 清孝* 板東 博志* 菊池 啓*
深尾 偉晴* 上嶋 繁* 松尾 理*

Effects of extracellular ATP and Ca^{2+} ion on the secretion of tissue-type plasminogen activator from cultured human melanoma cells (Bowes)

Testuhiro SAKAI*, Kiyotaka OKADA*, Hiroshi BANDO*,
Hiraku KIKUCHI*, Hideharu FUKAO*, Shigeru UESHIMA*
and Osamu MATSUO*

Key words: tissue-type plasminogen activator (t-PA) melanoma cells (Bowes), secretion, ATP, calcium ion

A human melanoma cell line (Bowes) secretes tissue-type plasminogen activator (t-PA) into a culture medium. We previously reported that the secretion of t-PA was affected by changing the concentrations of Na^+ or K^+ in the culture medium and by the addition of monensin, an ionophore for monovalent cations. In this study we investigated the effects of exogenous ATP and Ca^{2+} on the t-PA secretion in order to elucidate its basic mechanism. The cells, after 10 min preincubation with 1 mM EGTA in MEM, were incubated in MEM containing various concentrations of ATP (0–5.0 mM) and Ca^{2+} (1.8–9.0 mM) for 6 or 24 hours. The increase in the extracellular ATP or Ca^{2+} concentration resulted in depression of t-PA secretion in a dose-dependent manner. Intracellular t-PA was increased in the combination of ATP and Ca^{2+} concentrations: 0.5–2.5 mM ATP with 9.0 mM Ca^{2+} at 6 h, or 0.5–2.5 mM ATP with 4.3 or 5.3 mM Ca^{2+} at 24 h. The protein synthesis was suppressed by the addition of ATP (0.5–5.0 mM)

* 近畿大学医学部生理〔〒589 大府府南河内郡狭山町西山380〕, Department of Physiology, Kinki University School of Medicine, Sayama, Osaka, Japan.

to the medium, while it was only slightly affected by extracellular Ca^{2+} with 0–0.1 mM ATP. At 5.3 mM Ca^{2+} the suppressive effect of ATP on the protein synthesis became obvious. The DNA synthesis was stimulated by Ca^{2+} without ATP, but a remarkable increase in the DNA synthesis was observed at 0.1–2.5 mM ATP, where Ca^{2+} had no additional effect on the DNA synthesis. However at 5.0 mM ATP, the DNA synthesis was inhibited. The RNA synthesis was enhanced by 0.1 or 0.5 mM ATP but suppressed above 1.0 mM, while Ca^{2+} had little effect. Intracellular cAMP level was not changed by Ca^{2+} and ATP after 5 min incubation in the experimental medium. Extracellularly applied dibutyryl cyclic AMP did not influence the t-PA secretion or the intracellular t-PA level. These results suggest that ATP and Ca^{2+} co-operatively suppress the t-PA secretion system without participation of cAMP.

緒 言

ヒトメラノーマ由来の培養細胞 Bowes 株（以下、本細胞系と略）は、tissue-type plasminogen activator (t-PA) を培養液中に分泌することが知られている¹⁾。本細胞系の t-PA 分泌能に対し、培養液中の Na^+ , K^+ イオン濃度の変化^{2,3)}、および Na^+ イオン特異性の高い ionophore の monensin⁴⁾の添加などが抑制的に作用する⁵⁾ことをすでに報告した。これらの結果は細胞内、外の Na^+ , K^+ などの 1 価陽イオン濃度により、t-PA 分泌能が影響されることを示している。本研究では細胞外から作用させると細胞膜透過性に影響を与えることが報告されている adenosine triphosphate (ATP)^{6~8)}を用いた。ATP 処理により 1 価陽イオンだけでなく Ca^{2+} イオンの細胞内への取込が増加することが報告されている^{9,10)}。したがって ATP 存在下で Ca^{2+} イオン濃度の変化を細胞外でおこすと、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度にも影響を与え得ると考えられる。そこで本研究では細胞外液中の ATP と Ca^{2+} イオン両者の濃度を変化させて、t-PA 分泌能、蛋白および核酸合成能、細胞内 cyclic AMP (cAMP) に対する効果を検討した。

I. 材料と方法

Eagle MEM（日水製薬、東京）に 10% fetus calf serum (FCS) (Gibco, Grand Island) を添加し、growth medium としてヒトメラノーマ

由来の培養細胞、Bowes 株を培養した。本細胞系はプラスチック培養フラスコ（75 cm², Corning）に 20 ml の growth medium を加え、37°C, 5% CO₂ の下で継代培養された。実験に用いる細胞は、0.2% Trypsin（1:250, Difco）5 分間処理により継代培養フラスコから採取し、φ 35 mm プラスチックディッシュに 1×10⁵ cells/dish, 2 ml の growth medium と共に播種した。細胞が monolayer に増殖した後、実験に供した。

1. 実験液の調製

ATP-2 Na 10 mM 溶液を Ca^{2+} を除いた組成の Eagle MEM で作製し NaOH で pH 7.2 に調整後、終濃度、0, 0.1, 0.5, 2.5, 5.0 mM で用いた。 Ca^{2+} イオン濃度は 0.1 M CaCl_2 を Ca^{2+} を除いた Eagle MEM に加え、終濃度 1.8 mM から 9.0 mM の範囲で用いた。ATP と Ca^{2+} イオン両者の濃度変化はおおの 2 倍濃度溶液を等量混合し目的の終濃度溶液を得た。

2. Sampling 方法

monolayer に増殖した本細胞系を 1 mM EGTA を含む Eagle MEM で 37°C, 10 分間 incubate の後、実験液に交換し incubation を続けた。実験液量は 2 ml/dish とした。

3. t-PA 分泌能の検討

実験液に交換後、6 時間と 24 時間に実験液中に放出された t-PA を fibrin plate 法¹¹⁾により測定した。また細胞は PBS で洗浄ののち、0.01% Triton X-100 を 2 ml/dish 加えたのち氷冷下で超音波処理（W-220F Heat-Systems-

Fig. 1 Released plasminogen activator from melanoma cells to the medium. An aliquot of the medium was sampled 6 h (A) and 24 h (B) after the change to the experimental medium.

Ordinate: Plasminogen activator activity expressed as percent of control which was obtained at 1.8 mM Ca^{2+} without ATP.

Abscissa: Extracellular concentration of ATP in the experimental medium.

Symbols: ●; 1.8 mM, ■; 3.3 mM, ◆; 4.3 mM, ▲; 5.3 mM and ▼; 9.0 mM or Ca^{2+} concentration in the experimental medium.

Ultrasonic) 10秒間をおこない、可溶化され、cell lysate に調製された。cell lysate 中の t-PA を fibrin plate 法により測定した。

4. 蛋白および核酸合成能の検討

実験液交換時に蛋白、DNA、RNA の放射性前駆体¹²⁾として L-[U-¹⁴C]-leucine (CFB 67, Amersham), [6-³H]-thymidine (TRK 61, Amersham), [5, 6-³H]-uridine (NET 367, New England Nuclear) をおのおの 0.42, 5.5, 0.6 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の濃度で添加し、24 時間後、実験液を除去した後、PBS で洗浄し、dish に 10% TCA を加え、さらに 10% TCA で 2 回洗浄して得られた TCA 不溶分画中に取込まれた放射性から、蛋白、DNA、RNA の合成能⁹⁾¹²⁾の指標を得た。

5. 細胞内 cAMP level の検討

実験液交換 5 分後の細胞内 cAMP level を測定した。実験液を除去した後、氷冷下で 6% TCA を加え、cAMP を抽出した。水飽和ジエチルエーテルで抽出液から TCA を除去した後、cAMP 測定 Kit (Yamasa, 千葉) を用いて cAMP 定量を行った¹³⁾¹⁴⁾。別に実験液中に ⁶N,

2'-dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (db-cAMP) を $10^{-10} \sim 10^{-5}$ M 加え、細胞に取込ませ、細胞内 cAMP level を上昇させた。6 時間後に t-PA 分泌能、細胞内 t-PA level を測定した。

II. 結 果

1. t-PA 分泌能に対する細胞外 Ca^{2+} イオン、ATP の効果

細胞外液の Ca^{2+} イオン濃度を変化させ、同時に ATP を添加した場合の t-PA 分泌能を図 1-A (6 時間後)、B (24 時間後) に示した。6 時間後の結果では ATP の存在しない場合、 Ca^{2+} イオン濃度が 4.3 mM 以上に増加すると t-PA 分泌の抑制がみられた。また ATP は 0.5 mM 以上の濃度で濃度依存性の t-PA 分泌抑制が顕著であった。 Ca^{2+} イオン濃度の増加は、ATP の t-PA 分泌抑制に対し、加算的に作用する傾向がみられた。24 時間後の結果では、 Ca^{2+} イオン濃度 4.3 mM でわずかに t-PA 分泌が抑制されたが、5.3 mM に増加するとかえって分泌抑制効果が減少した。すなわち、24 時

Fig. 2 Intracellular plasminogen activator level. Sampling times (A) and (B), ordinate, abscissa and symbols are the same as indicated in Fig. 1.

間後では6時間後に比べて Ca^{2+} イオン濃度依存性の t-PA 分泌抑制の傾向は小さかった。一方, 1.0~5.0 mM の ATP 存在下で ATP 濃度依存性の t-PA 分泌抑制が顕著であった。

細胞内 t-PA level におよぼす Ca^{2+} イオンおよび ATP の効果を図 2 に示した。6時間後の結果では 5.3 mM 以下の Ca^{2+} イオン濃度で, ATP 濃度にかかわらずほぼ一定の細胞内 t-PA level が維持されていた。しかし 9.0 mM の Ca^{2+} イオンと 1.0~2.5 mM の ATP の共存下では細胞内 t-PA が約 1.8 倍に増加した(図 2-A)。24時間後の結果では 3.3 mM Ca^{2+} イオンと 5.0 mM ATP, 5.3 mM Ca^{2+} イオンと 0.5 または 1.0 mM ATP が共存した場合, 細胞内 t-PA が約 2 倍に増加した。さらに 4.3 mM Ca^{2+} イオンと 0.5 または 1.0 mM ATP とが共存した場合には細胞内 t-PA level は約 4 倍に達した(図 2-B)。

2. 蛋白合成に対する細胞外 Ca^{2+} イオン, ATP の効果

^{14}C -leucine を実験液中に $0.42 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ 添加し, 24時間後, 細胞の TCA 不溶分画中に取込まれた放射性を蛋白合成能の指標とし, 図 3 に示した。ATP 濃度 0.5 mM 以上で部分的な蛋白合成抑制がみられ, 特に 5.3 mM Ca^{2+} イオンが共存した場合には 1.0~5.0 mM ATP により蛋白合成能はコントロール (0 mM AT

Fig. 3 Protein synthesis estimated by the incorporation of radioactivity into the TC A-insoluble fraction of the cells after incubation for 6 h (A) and 24 h (B) in the experimental medium containing $0.42 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ of ^{14}C -leucine. The symbols are defined in Fig. 1.

P, 1.8 mM Ca^{2+} イオン) の60%程度に抑制された。

3. 核酸合成に対する細胞外 Ca^{2+} イオン, ATP の効果

DNA, RNA 合成能を ^3H -thymidine, ^3H -uridine を実験液中におおの $5.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$, $0.6 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ 添加し, 24時間後に細胞の TCA 不溶分画への取込を指標として比較した(図 4)。

Fig. 4 DNA synthesis (A) and RNA synthesis (B) were estimated by radioactivity incorporated into the TCA-insoluble fraction after 24 h incubation in the experimental medium containing $5.5 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -thymidine (A) or $0.6 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -uridine (B).

DNA 合成能は ATP の無い場合, Ca^{2+} イオン濃度 $3.3 \sim 5.3 \text{ mM}$ で約 2 倍に増加した. 0.1 , 0.5 , 1.0 mM の ATP の存在により DNA 合成の亢進が顕著であった (図 4-A).

RNA 合成能に関し, 0.1 , 0.5 mM ATP の存在下で軽い合成促進傾向があったが, 1.0 mM ATP 存在下では変化が少なく, ATP 濃度を 2.5 , 5.0 mM と上昇させると, RNA 合成が抑制された. RNA 合成に対し Ca^{2+} イオン濃度の増加は顕著な効果をもたなかった (図 4-B).

4. 細胞内 cAMP level に対する細胞外 Ca^{2+} イオン, ATP の効果

細胞外の Ca^{2+} イオン, ATP の変化が細胞内情報伝達物質の 1 つである cAMP に対し影響して, t-PA 分泌能に変化をもたらす可能性を検討した. 図 5 に実験液交換 5 分後の細胞内 cAMP level を示した. 細胞外の Ca^{2+} イオン, ATP の濃度変化による細胞内 cAMP level の変化は顕著でなかった. また実験液中に db-cAMP を加え, 細胞にとりこませ細胞内 cAMP level を上昇させ, 6 時間後に t-PA 分泌能, および細胞内 t-PA level に対する効果を検討したところ, db-cAMP による効果はほとんど

Fig. 5 Intracellular cAMP level. Cells in the culture dish were fixed with 6 % TCA 5 min after the medium was changed to the experimental medium. The symbols are defined in Fig. 1.

認められなかった (図 6).

III. 考 按

すでに知られている分泌糖蛋白の合成分泌過程の概略を示すと, まず粗面小胞体 (rER) 膜に結合したポリゾームでペプチド鎖が合成さ

Fig. 6 Effect of dibutyryl cAMP on the secretion of plasminogen activator (A) and on the intracellular plasminogen activator level (B). Sampling for assay was made 6 h after the medium was changed to the experimental medium (1.8 mM Ca^{2+} without ATP) containing dibutyryl cAMP. Ordinate: Relative value of plasminogen activator activity to the control (without dibutyryl cAMP). The bars represent S.D. ($n=6$).

れ、そのペプチド鎖が小胞体内腔に移行する際に高マンノース型糖鎖がアスパラギン残基に付加される。次いで小胞体からゴルジ装置の cis, medial, trans 領域を輸送される間に糖分解酵素、糖転移酵素などにより、マンノースを失い、代りにシアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンなどの付加を受け、糖鎖のプロセッシングの完了した分泌糖蛋白は細胞表面に近い分泌顆粒を経て、やがて細胞外に放出されるとされている¹⁷⁾。Monensin を作用させると、主としてゴルジ装置における細胞内輸送を阻害し、分泌蛋白の細胞内蓄積を伴う、分泌阻害が報告されている^{5), 15), 16)}。

分泌蛋白の細胞外への放出に関し、すでに各種の分泌細胞において、細胞表面の受容体刺激により細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の上昇に至る情報伝達が進められているが、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度と分泌とを直接関連づける証拠^{18), 19)}は少ない。本研究では細胞内 Ca^{2+} イオン濃度を、外部からコントロールする試みとして、ATP 共存下で実験液中の Ca^{2+} イオン濃度を变化させた。また細胞内情報伝達経路に関与する可能性の強い cAMP²⁰⁾ についても検討を加えた。

本細胞系の t-PA 分泌能に対し、細胞外の

Ca^{2+} イオンの増加および ATP の存在は、0.1 ~ 1.0 mM ATP 濃度の範囲で両者が相乗的な抑制効果を示した (図 1)。図 2 に示したように、細胞内 t-PA level の上昇を惹起するために適当な Ca^{2+} イオン、および ATP の濃度条件があると考えられる。しかし図 3 に示したように細胞蛋白合成能に対しては、特定の Ca^{2+} イオン、ATP 濃度の組合せの下で顕著な促進がみられなかったことから、分泌蛋白または t-PA の合成能を特異的に促進させる Ca^{2+} イオン、ATP 濃度条件があると考えられる。

本細胞系に monensin を作用させた場合には、細胞内に t-PA の蓄積と、分泌の抑制がみられ両者は逆相関のような関連性を示した⁵⁾が、本研究においては両者に明確な関連性が乏しく、 Ca^{2+} イオン、ATP は monensin と異なった部分において t-PA 分泌に相乗的抑制効果をもたらしたと考えられる。蛋白合成、核酸合成に対しても monensin は濃度依存性の抑制効果を示した⁵⁾が、本研究において Ca^{2+} イオン、ATP は蛋白合成に関し弱い抑制効果を示した一方、核酸合成に関しては ATP 濃度により抑制、促進の両方の効果がみられた。以上のことから Ca^{2+} イオン、ATP の細胞内諸機能に対す

る効果はかなり複雑で, monensin の主たる作用部位である細胞内輸送系¹⁵⁾¹⁶⁾とは異なる部位に作用していると考えられる。

細胞内 cAMP level は細胞外 Ca^{2+} イオン, ATP による影響が小さいこと (図 5), db-cAMP 処理によって細胞内 cAMP を上昇させた後も t-PA 分泌能, 細胞内 t-PA level に差異はみられなかった (図 6) ことから, Ca^{2+} イオン, ATP 濃度変化による t-PA 分泌能への影響は cAMP を介する細胞内情報伝達系とは関係が薄弱であると考えられる。

文 献

- 1) Matsuo, O., Fijiken, D.C. and Collen, D.: On the thrombolytic properties of human tissue plasminogen activator and urokinase (Mannucci, P.M. and D'Angelo eds.: Urokinase: Basic and Clinical Aspects), London: Academic Press, London, 1982, 55~61.
- 2) 酒井鉄博, 岡田清孝, 松尾 理: Tissue plasminogen activator に及ぼす Na^+ , K^+ イオンおよび monensin の影響. 日血会誌, **47**; 302, 1984.
- 3) Matsuo, O., Kikuchi, H., Ueshima, S., Okada, K., Matsuo, C., Bando, H. and Sakai, T.: Effect of Na^+ , K^+ ion concentration on the production of plasminogen activator from a melanoma cell line. Thromb. Res., **38**; 577~584, 1985.
- 4) Agtarap, A., Chamberlin, J.W., Pinkerton, M. and Steinrauf, L.: The structure of monensin acid a new biologically active compound. J. Am. Chem. Soc., **89**; 5737~5742, 1967.
- 5) 酒井鉄博, 岡田清孝, 菊池 啓, 上嶋 繁, 板東博志, 松尾 理: 組織性 plasminogen activator 分泌機構におよぼす monensin の効果. 血液と脈管, **16**; 595~602, 1985.
- 6) Hempleing, H.G., Stewart, C.C. and Gasic, G.: The effect of exogenous ATP on the electrolyte content of TA_3 ascite tumor cells. J. Cell. Physiol., **73**; 133~140, 1969.
- 7) Romuldez, A., Volpi, M., Sha'afi, R.I.: Effect of exogenous ATP on sodium transport in mammalian red cells. J. Cell. Physiol., **87**; 297~306, 1976.
- 8) 北川隆之: ATP による動物細胞表面膜の透過性調節. 蛋白質核酸酵素, **29**; 511~522, 1984.
- 9) Perdue, J.F.: The isolation and characterization of plasma membranes from culture cells. III. The adenosine triphosphate-dependent accumulation of Ca^{2+} by chick embryo. J. Biol. Chem., **246**; 6750~6759, 1971.
- 10) Lnadry, Y., Lehninger, A.L.: Transport of calcium ions by Ehrlich ascites-tumor cells. Biochem. J., **158**; 427~438, 1976.
- 11) Matsuo, O., Mihara, H. and Rokushima, Y.: Assessment of the thrombolytic effect of low urokinase concentrations. Acta Haematol. Jpn., **39**; 298~305, 1976.
- 12) 丸尾文治, 高橋 甫: 放射性同位元素による酵素化学研究法 (赤堀四郎・編: 酵素研究法), 朝倉書店, 東京, 1961, 第4巻, p. 199~229.
- 13) Steiner, A.L., Parker, C.W. and Kipnis, D. M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. J. Biol. Chem., **247**; 1106~1113, 1972.
- 14) Steiner, A.L., Paglira, A.S., Chase, L.R. and Kipnis, D.M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. J. Biol. Chem., **247**; 1114~1120, 1972.
- 15) Uchida, J., Smilowitz, H. and Tanzer, M.L.: Monovalent ionophores inhibit secretion of procollagen and fibronectin from cultured human fibroblast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76**; 1868~1872, 1979.
- 16) Tartakoff, A.M.: Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin, Cell, **32**; 1026~1028, 1983.
- 17) 池原征夫: 分泌蛋白質の細胞内輸送機構. 細胞工学, **3**; 221~229, 1984.
- 18) Tartakoff, A.M. and Vassalli, P.: Plasma cell immunoglobulin secretion, J. Exp. Med., **146**; 1332~1345, 1977.
- 19) 秋山伸一, 白石憲男, 吉村昭彦: 分泌機構の体細胞遺伝学. 細胞工学, **5**; 34~42, 1986.
- 20) Anderson, R.G.W. and Pathak, R.K.: Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments.

Cell, **40**; 635~643, 1985.of hormone action. Science, **177**; 401~408,

21) Sutherland, E.W.: Studies on the mechanism

1972.

●わが国唯一のビタミンB₁₂研究の完全な集大成!

ビタミンB₁₂ —基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人 専門医24氏分担執筆

A 5判 367頁 図157 表73 定価7,800円(〒300円)

ビタミンB₁₂は最も新しく発見されたものであるが、その構造の特異性や作用の独自性から、その研究の進歩は著しいものがある。最近では、その同族体の臨床応用が広がってきたものの、生化学、酵素学などの基盤にたった合理的な使用法はまだほど遠い所にある。本書はわが国でのB₁₂研究を現時点で集大成し、関係各方面の研究者に便ならしめた。

●内容：第1章 ビタミンB₁₂研究の進歩と問題点、第2章 ビタミンB₁₂の吸収、第3章 ビタミンB₁₂の腸管吸収機構、第4章 Whole body counterのビタミンB₁₂吸収試験ならびにB₁₂代謝への応用、第5章 悪性貧血と胃の自己免疫、第6章 悪性貧血の成因に関する自己免疫的考察、第7章 ビタミンB₁₂の生体内転換利用、第8章 ビタミンB₁₂結合蛋白、第9章 Acid-resistant binding capacity と“granulocyte related” binding proteinについて、第10章 トランスコバリンII欠乏症、第11章 ビタミンB₁₂のradioassay、第12章 ビタミンB₁₂と葉酸代謝、第13章 ビタミンB₁₂と中毒、第14章 巨赤芽球性貧血、第15章 尿中メチルマロン酸排泄とビタミンB₁₂代謝、第16章 高ビタミンB₁₂血症、第17章 ビタミンB₁₂代謝と神経系、第18章 ビタミンB₁₂と神経疾患。