ラット好中球からのアラキドン酸遊離に 及ぼす再アシル化阻害の影響

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION
rapid communication

奈良場博昭・松本英希・
上野晃憲・大石幸子*

Effect of inhibitory drugs of reacylation on release of arachidonic acid

We have previously reported that blockers of acylation of lyso-PAF, such as triacsin C or merthiolate, enhanced PAF production in the stimulated rat neutrophils. The present study demonstrated that pretreatment with triacsin C or merthiolate enhanced the arachidonic acid release by 2 to 3-fold in rat neutrophils when stimulated with opsonized zymosan, Ca-ionophore A23187 or phorbol myristate acetate.

From these results we conclude that the release of arachidonic acid from rat neutrophils may also be controlled by acylation pathway in addition to the activation of phospholipase A₂.

Rec. 10/4/1995, Acc. 10/24/1995, pp 57~59

Hiroaki Naraba・Hideki Matsumoto・
Akinori Ueno・Sachiko Oh-ishi*

key words : arachidonic acid,
reacylation, phospholipase A₂

炎症反応において重要な役割を演じているアラキドン酸代謝物の産生は、まず、ホスホリパーゼ A₂ によって膜脂質よりアラキドン酸が遊離されて開始される¹⁾。アラキドン酸は、再アシル化により速やかに細胞膜リン脂質に取り込まれるので、遊離アラキドン酸量を決定する因子としてホスホリパーゼ A₂ の活性化だけではなく、再アシル化反応も考慮に入れる必要がある。

筆者らは、すでにアシル-CoA 合成酵素の阻害

図1 Effect of triacsin C and merthiolate on the incorporation of [¹⁴C] arachidonic acid in rat neutrophils

Rat neutrophils (1×10^7 cells/ml) were incubated with triacsin C (0, 0.05, 0.5, 5 nM) for 60 min or merthiolate (0, 3, 10, 30 μM) for 10 min, and then incubated in the presence of [¹⁴C] arachidonic acid (1 μM, 30,000 dpm) for 20 min. [¹⁴C] arachidonic acid incorporated into the cells was extracted and radio activity was counted. Values are means of 4 experiments with standard deviations.

***indicate the value is significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from the control value without triacsin C or merthiolate.

薬の triacsin C²⁾ とアシルトランスフェラーゼの阻害薬の merthiolate を前処置したラット好中球で、オプソニン化ザイモサン (OPZ) 刺激で産生される血小板活性化因子 (PAF) の産生増加を報告した³⁾。さらに、この現象の解析から、PAF 産生の制御因子としての再アシル化経路の重要性を明らかにしてきた⁴⁾。そこで、本研究では、ラット好中球のアラキドン酸遊離に対し、これら再アシル化抑制薬の効果を検討し、アラキドン酸遊離量の調節における再アシル化経路の役割の解明を試みた。

材料と方法

ラット好中球としては、既報³⁾に従い、Sprague-Dawley 系雄性ラット (日本 SLC) の腹腔にガゼイン溶液で誘導した浸潤細胞を用いた。細胞の刺激は、ラット好中球 (1×10^7 cells/1 ml) に刺激薬として 500 μg/ml オプソニン化ザイモサン (OPZ)、あるいは 1 μM カルシウムイオノフォア A23187 (A23187)、あるいは 30 nM ホルボールエステル (PMA) を添加し、37°C で 10 分間イン

* Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University 北里大学薬学部薬理学教室

Offprint requests to : Hiroaki Naraba, Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

図2 Effect of pretreatment with triacsin C or merthiolate on the arachidonic acid release from rat neutrophils by several stimulants
Rat neutrophils were pretreated with triacsin C or merthiolate and then stimulated with 500 μ g/ml OPZ (A), 1 μ M Ca-ionophore A23187 (B) or 30 nM PMA (C) for 10 min. Arachidonic acid in the incubation medium was assayed by the ADAM HPLC method. Values are means of 4 experiments with standard deviations.
**indicates the value is statistically significantly different ($P < 0.01$) from that stimulated with each agonist alone.

キュベートすることにより行った。再アシル化阻害薬の前処置は、triacsin C (0.5 μ M) の場合は刺激薬添加前に 60 分間、merthiolate (30 μ M) の場合は 10 分間行った。アラキドン酸の細胞膜リン脂質への取り込みの検討では、上記のように再アシル化阻害薬を前処置したラット好中球 (1×10^7 cells/1 ml) に [14 C] アラキドン酸 (30,000 dpm) を添加し 37°C で 20 分間インキュベートし、細胞内に取り込まれた [14 C] アラキドン酸を抽出し放射活性を測定した⁵⁾。アラキドン酸の定量は既報⁶⁾に従い、ADAM-HPLC 法を用いて行った。

結 果

(1) アラキドン酸の取り込みに対する再アシル化阻害薬の効果

ラット好中球への [14 C] アラキドン酸の取り込みは、添加後徐々に増加し約 20 分後までにほぼ終了し、この 20 分間のインキュベーションにより添加した 1 μ M のアラキドン酸の約 30% が細胞のリン脂質画分に取り込まれた⁵⁾。今回、阻害薬無処置群での 20 分間のアラキドン酸取り込みを 100% とし、再アシル化阻害薬の効果を評価した。

図1に示すように、アラキドン酸の取り込みは triacsin C あるいは merthiolate の前処置により、用量に依存して阻害された。

(2) 各種刺激薬によるアラキドン酸遊離に対する再アシル化阻害薬の影響

ラット好中球を OPZ (500 μ g/ml), A23187 (1 μ M) あるいは PMA (30 nM) で刺激することにより、アラキドン酸遊離の増加が認められ、OPZ 刺激において特に強い遊離作用が認められた。この遊離は、各刺激ともインキュベーション時間 10 分まで増加しつづけ、その後一定となった。図2には、10 分間の各刺激によるアラキドン酸遊離に対する triacsin C、および merthiolate の前処置の影響を示す。再アシル化阻害薬 triacsin C、または merthiolate の前処置のみではほとんどアラキドン酸遊離は認められなかったが、それぞれの刺激薬により増加したアラキドン酸遊離は、再アシル化阻害薬の前処置によりさらに有意に増強された。

考 察

遊離アラキドン酸の細胞膜リン脂質への取り込

みは、まず、アシル-CoA 合成酵素によるアラキドノイル-CoA の形成と、それに引き続くアシルトランスフェラーゼによるアラキドノイル-CoA のリン脂質への取り込みという、二段階の反応を経ることが知られている⁷⁾。以前に報告したように酵素活性の検討から、triacsin C はアシル-CoA 合成酵素を²⁾、merthiolate はアシルトランスフェラーゼをそれぞれ特異的に抑制する⁴⁾。再アシル化阻害薬の前処置による [¹⁴C] アラキドン酸の細胞への取り込み阻害作用は、これらの酵素阻害作用に起因するものと考えられる。

筆者らは、ラット好中球を OPZ 刺激した場合にホスホリパーゼ A₂ の活性が上昇すること、そしてその活性が細胞質ホスホリパーゼ A₂ の特異抗体によって抑制されることを報告した⁴⁾。したがって、観察されたアラキドン酸の遊離は、ホスホリパーゼ A₂ の活性化によってリン脂質からアラキドン酸が切り出された結果と考えられる。

再アシル化阻害薬の前処置により、三種の刺激薬によって増加したアラキドン酸遊離はさらに数倍に増加した。これら再アシル化を抑制する薬物は、ホスホリパーゼ A₂ 活性には影響を及ぼさないことを確認している⁴⁾。再アシル化阻害薬による遊離アラキドン酸量の増加は、アラキドン酸の取り込み阻害によるものと考えられる。このことは、さまざまな刺激により遊離したアラキドン酸が、同様な再アシル化反応により、速やかに細胞膜リン脂質に取り込まれることを示唆するものである。したがって、遊離アラキドン酸量を検討する際には、ホスホリパーゼ A₂ の活性化だけでなく、常に再アシル化によるアラキドン酸の再取り込みのプールの存在を考慮する必要がある。

筆者らは、これまでに triacsin C や merthiolate を用いて、PAF 産生の増強作用を報告してきたが⁴⁾、本研究において、これら再アシル化阻害薬によりアラキドン酸遊離の増強作用も認められた。このことは、炎症反応において重要な役割を果たす PAF とアラキドン酸が、ともに再アシル化反応により産生調節を受けている可能性を示唆するものであり、これら生理活性物質の生合成における密接な関係が推定される。

文 献

- 1) 工藤一郎：アラキドン酸カスケード作動酵素としてのホスホリパーゼ A₂。炎症 14：455-465, 1994.
- 2) Tomoda, H., Igarashi, K., Cyong, J.-C., Ōmura, S. : Evidence for an essential role of long chain acyl-CoA synthetase in animal cell proliferation. J. Biol. Chem. 266 : 4214-4219, 1991.
- 3) Naraba, H., Imai, Y., Hayashi, M., Oh-ishi, S. : Enhanced production of platelet-activating factor in stimulated rat leukocytes caused by the blockade of lysophospholipid acylation. Jpn. J. Pharmacol. 61 : 109-113, 1993.
- 4) Naraba, H., Imai, Y., Kudo, I., Nakagawa, Y., Oh-ishi, S. : Activation of phospholipase A₂ and acylation of lysophospholipids : The major regulators for platelet activating factor production in rat neutrophils. J. Biochem. 118 : 442-447, 1995.
- 5) Oh-ishi, S., Yamaki, K., Abe, M., Tomoda, H., Ōmura, S. : The acyl-CoA synthetase inhibitor triacsin C enhanced eicosanoid release in leukocytes. Jpn. J. Pharmacol. 59 : 417-418, 1992.
- 6) Yamaki, K., Oh-ishi, S. : Comparison of eicosanoids production between rat polymorphonuclear leukocytes and macrophages : Detection by high-performance liquid chromatography with precolumn fluorescence labeling. Jpn. J. Pharmacol. 58 : 299-307, 1992.
- 7) Lands, W. E. M. : Metabolism of glycerolipids. II. The enzymatic acylation of lysolecithin. J. Biol. Chem. 258 : 2233-2237, 1960.