ラット mast cell リン酸化反応に関する研究 (第1報)

——顆粒膜 diphosphoinositide——

黒 沢 元 博*

Studies of phosphorylation in rat mast cells (first report)——demonstration of diphosphoinositide (DPI) in rat mast cell granule membranes Granules were isolated from sonicated rat mast cells on a Percoll gradient and incubated with [γ - 32 P] ATP in the presence of Mg^{2+} . After stopping the reaction, lipid extraction of the intact membrane granules was performed with acidic medium and phospholipids were separated by thin layer chromatography on 1% (w/v) oxalic acid and potassium oxalate impregnated silica gel plates. Considerable amounts of radioactivity were found to be incorporated into DPI. The radioactivity in DPI was associated with the granule themselves and not detected in the granule supernates. Extensive washing of the granules did not significantly affect DPI formation and areas of the Percoll gradient containing cytosol fraction had no demonstrable DPI forming activity and did not increase the response when added back to the granules. When suspensions of intact and broken membrane granules which contained approximately equivalent amounts of granule membrane proteins were compared with respect to DPI formation, broken membrane granule preparations were found not to exceed in DPI production than intact membrane granules, suggesting that DPI formation is occurring on the cytoplasmic side of granule membranes.

Motohiro Kurosawa*

* First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Gunma University

IgE 抗体の関与するアレルギー反応により、いわゆる exocytosis を介して遊離する mediator は、主に mast cell に由来すると考えられる。mast cell 顆粒膜間の、あるいは mast cell 細胞膜と顆粒膜との融合の結果顆粒が脱出し、その内容物である mediator が放出されるわけであるが、その詳細な機序はまだ不明である。

最近、数多くの生理的反応が蛋白リン酸化機構により制御されることが報告されている¹⁾。筆者らも分離 mast cell 顆粒を用いて蛋白リン酸化反応に関する研究を進めているが、本研究の過程において [γ - 32 P] ATP と incubate した mast cell 顆粒内にリン酸化蛋白あるいは主要リン脂質とは異なるリン酸化物質が存在することを発見し、それが phosphatidylinositol (PI) および triphosphoinositide (TPI) とともに phosphoinositide²⁾ に属する diphosphoinositide (DPI) であることを証明したので報告する。

材料と方法

(1) 材 料

[γ - 32 P] ATP (4, 500 μ Ci/mmol) (ICN製); oxalic acid,

potassium oxalate, Scintiverse (Fisher 製); silica gel plate (20×20 cm, 0.25 mm) (Brinkmann 製); sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel (SDS/PAG) electrophoresis 用試薬および分子量測定用標準蛋白 (Bio Rad 製); その他すべての試薬は Sigma 製を用いた。

(2) ラット mast cell 分離法

Sprague-Dawley 系雌性ラット (250~300 g) の胸腔および腹腔洗浄液中に、白血球およびその他の細胞と混在した mast cell を採取した。洗浄液は 10 units/ml の heparin を含む balanced salt solution (BSS) で、4 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.9 mM $CaCl_2$ pH 7.2 からなり、0.046% (w/v) bovine serum albumin (BSA) を含有する (BSSA)。採取した mast cell は Percoll 比重法³⁾により分離精製した (toluidine blue による染色法で純度 90% 以上)。

(3) ラット mast cell 顆粒分離法 (図1)

分離精製した mast cell を Branson Sonifier cell disrupter 185 により破碎 (60 W, 3 分30秒間処置) した後、Kruger ら⁴⁾の方法に従い mast cell 顆粒を分離した。顆粒は図1に示すごとく明らかな2層を形成し、上部顆粒層のA層、下部顆粒層のB層およびこれら中間の

* 群馬大学医学部第一内科学教室

図1 procedure for the separation of intact and broken membrane mast cell granules on Percoll gradient

C層をそれぞれ実験に供した。

電子顕微鏡を用いた検索および ruthenium red 染色⁴⁾によると、A層は主に(90%以上)正常膜を欠き膨満した形態を示す broken membrane granule (B顆粒)よりなり、B層は主に(95%以上)形態学的に膜の保たれた intact membrane granule (I顆粒)より形成されていた。こうして分離した顆粒を2回 BSS で洗浄した後、以下の実験に供した。

(4) 反応系

mast cell 顆粒 BSS 浮遊液 $50\mu\text{l}$ (2.8×10^6 mast cell よりの顆粒)を 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 20 mM MgCl_2 , $10\mu\text{M}$ [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP (5×10^6 cpm/ μmol) と 30°C で15分間 incubate した(反応総量 $100\mu\text{l}$)。以下に示す有機溶剤を添加することにより反応を停止し、脂質抽出操作を行った。また氷冷した 1 ml BSS を加えて反応を停止し、直ちに 4°C で $2,000 \times g$, 10分間遠心した後、aspirate した上清と顆粒 pellet 中の脂質をそれぞれ以下のごとく検索した。

(5) mast cell 顆粒 phosphoinositide の抽出と分離

mast cell 顆粒内の脂質を Bligh & Dyer³⁾の方法に従って抽出した。すなわち 0.5 ml methanol, 0.25 ml chloroform および 0.1 ml 0.2 N HCl を直接 $100\mu\text{l}$ の反応系に添加した後、反応チューブをキャップで密封し激しく

振盪した。室温で30分間放置した後 $1,000 \times g$, 10分間遠心して不溶物を除去した。0.25 ml chloroform, 0.25 ml 0.1 N HCl に対照として $10\mu\text{g}$ のそれぞれ PI, DPI および TPI を加えた後、上清と混和した。激しく振盪した後 $1,000 \times g$, 10分間遠心して水性層と有機層の2つの層を分離した。水性層を注意深く aspirate し、一定量の有機層を室温下で窒素ガスにより乾燥させた。乾燥後試料は $60\mu\text{l}$ chloroform に再溶解し、一晚 -80°C で貯蔵した。

上清および顆粒 pellet 中の脂質抽出は以下のごとく行った。すなわち、上清は 4 ml methanol, 2 ml chloroform および 0.5 ml 0.317 N HCl と混和し、室温で放置、遠心した後さらに 2 ml chloroform, 2 ml 0.1 N HCl と混和した。顆粒 pellet 中の脂質抽出には 0.6 ml methanol, 0.3 ml chloroform, 0.24 ml 0.1 N HCl および 0.3 ml chloroform, 0.3 ml 0.1 N HCl を用いた。

脂質は silica gel plate を用い、thin layer chromatography (TLC) により分離した。plate は使用前に 1% (w/v) oxalic acid または 1% (w/v) potassium oxalate に浸し、室温で乾燥させた後 110°C で15分間加熱した。oxalic acid 処理 plate は chloroform/methanol/4N NH_4OH (9:7:2, v/v/v)⁶⁾, potassium oxalate 処理 plate は chloroform/acetone/methanol/acetic acid/water (40:15:13:12:8, v/v/v/v/v)⁷⁾ で展開した。脂質部分はヨードを用いて染色同定し、plate より剥離した後シンチレーション液 (Scintiverse) の存在下に液体シンチレーションカウンターを用いて ^{32}P 量を測定した。対照としてヨードにより染色されない部分も測定に供した。

^{32}P 活性が脂質部分と一致するか否かを検索するため、染色後 autoradiography を行った。すなわち、乾燥 plate を intensifying screen を用いて Kodak XR-5 医学用フィルムに3日間曝露した後、Kodak RPX-Omat を用いてフィルムを現像乾燥した。

(6) 顆粒蛋白測定法

顆粒蛋白量は Bradford⁸⁾の方法に従い、結晶 BSA を対照として測定した。

(7) SDS/PAG electrophoresis による顆粒蛋白解析

Laemmli⁹⁾の方法に従い、SDS/PAG electrophoresis を行い、顆粒蛋白を分離解析した。polyacrylamide の濃度は separating gel が 6% より 18% (w/v) の linear gradient で、stacking gel は 3% (w/v) を用いた。顆粒 pellet を 6% (w/v) SDS/30% (w/v) glycerol/15% (w/v) 2-mercaptoethanol/0.003% (w/v) bromphenol blue/0.75 M Tris/HCl pH 6.8 の溶液 $70\mu\text{l}$ に浮遊させ、直ちに 100°C で5分間加熱した後実験に供した。

electrophoresis は室温下 100 V で行い、反応後は 12% (w/v) trichloroacetic acid/50% (w/v) methanol/0.03%

図2 thin-layer chromatography (TLC) and autoradiography of lipid extracts of rat mast cell granules labeled with ^{32}P

A: a 1% oxalic acid impregnated silica gel plate, B: a 1% potassium oxalate impregnated silica gel plate. In both A and B, the first lane is an iodine stain and the second lane is the corresponding autoradiography of chromatography.

(w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 溶液を用いて gel を固定染色した。その後 7% (w/v) acetic acid/10% (v/v) methanol 溶液を用いて脱染色を行い、その結果染色された蛋白を Zeineh soft laser scanning densitometer を用いて定量化した。

結果

(1) mast cell 顆粒 DPI の証明

I 顆粒を Mg^{2+} の存在下で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ と incubate し、反応停止後顆粒浮遊液中の脂質を抽出分離すると図2に示すごとく、oxalic acid および potassium oxalate 処理のいずれの silica gel plate を用いた場合においても、autoradiography で DPI 部分に明らかな ^{32}P 活性を認めた。oxalic acid および potassium oxalate 処理 silica gel plate における DPI 部分の ^{32}P 量誤差は 5% 以内で、DPI 部分の ^{32}P 活性は強い相関を示した。また、反応停止後遠心し顆粒 pellet および上清を分離してそれ

ぞれの脂質を検索したが、上清には ^{32}P 活性は認められなかった。一方、顆粒 pellet では図2と同様のパターンが得られた。

さらに oxalic acid 処理 plate における DPI 部分を plate より剥離し、0.5 ml methanol, 0.25 ml chloroform, 0.2 ml 0.1 N HCl および 0.25 ml chloroform, 0.25 ml 0.1 N HCl を用いて脂質抽出を行った後、以下の検索を行った。すなわち、試料の半量は ^{32}P 量測定に供し、残り半量は potassium oxalate 処理 plate による脂質分離に用いた。plate を乾燥後 autoradiography を行ったが、 ^{32}P 活性はヨードで染色される DPI 部分と一致した。さらにこの部分を plate より剥離し ^{32}P 量を測定すると、 ^{32}P 量測定に供した試料中 ^{32}P 量の $93.2 \pm 4.8\%$ (mean $\pm$ SE) であった。

0.1 N HCl の代わりに 0.04% (w/v) CaCl_2 を用いて脂質抽出を行い、potassium oxalate 処理 plate により脂質を分離し autoradiography を行ったところ、DPI 部分には痕跡ほどの ^{32}P 活性をみるのみであった。

(2) I 顆粒および B 顆粒の比較検討

B 顆粒を用い、I 顆粒と比較検討した。I 顆粒は膜破損の際顆粒内可溶性蛋白を喪失することが考えられるため、SDS/PAGE electrophoresis を用い分子量 30,000~40,000 の I 顆粒および B 顆粒に共通の主要顆粒膜蛋白¹⁰⁾量を基準に顆粒数の調整を行った。試料の半量は顆粒数を除き I 顆粒と同一の条件下で反応を行い、その後脂質を抽出分離した。残り半量は溶媒に溶解後 SDS/PAGE electrophoresis を行い、染色後 scanning により蛋白量を測定し、I 顆粒数に比較換算した。

図3に示すごとく、I 顆粒とほぼ同量の顆粒膜蛋白を含む B 顆粒を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ と incubate し DPI 部分の ^{32}P 量を比較検討したが、B 顆粒中の ^{32}P 量は I 顆粒に比し多くはなかった。

(3) 細胞質分画の混在に関する検討

I 顆粒を分離した後、2, 4, 6 回 BSS で洗浄し、それぞれ反応を行い DPI 部分の ^{32}P 量を比較検討したが、有意差はみられなかった。図3に示すごとく、顆粒を含まず細胞質分画を含むと考えられる Percoll の C 層を用いて一般条件下で反応を行い脂質抽出、分離を行ったが、DPI 部分に ^{32}P 活性は認められなかった。また、I 顆粒を本分画の共存下に反応させ、細胞質分画を共存させないで反応させた同数の I 顆粒よりの DPI 部分の ^{32}P 量と比較検討したが、有意差は認められなかった。

考察

DPI は中性 pH において 2 価の陰イオンを有し、2 価の陽イオンと結合能を有する特異的なリン脂質で、TPI とともに polyphosphoinositide²⁾の範疇に属するものである。本リン脂質の特徴の一つとして、一般的脂質

図3 autoradiography of labeled lipids from intact and broken membrane granules after incubation with [γ - ^{32}P] ATP, extraction and TLC (1% oxalic acid impregnated silica gel plate)

A: intact membrane granules washed twice with BSS after isolation from the Percoll gradient (2.8×10^6 mast cell equivalents), B: intact membrane granules washed two additional times with BSS (2.8×10^6 mast cell equivalents), C: broken membrane granules washed twice with BSS after isolation from the Percoll gradient (6.6×10^6 mast cell equivalents), approximately 50% of the membrane protein content of A as determined by scanning of stained proteins of electrophoresed samples, D: broken membrane granules washed twice with BSS (13.2×10^6 mast cell equivalents), E, F and G contain samples from other regions of the Percoll gradient (cytosol fraction), E: 20 μl Percoll layer, F: 40 μl Percoll layer, G: intact membrane granules washed twice with BSS (2.8×10^6 mast cell equivalents) and mixed with 20 μl Percoll layer, H: 50 μl buffer layer.

PI, DPI, TPI are respective phosphoinositide standards.

抽出法では不安定で、さらに一般的 TLC では他の脂質との分離が困難であることが挙げられ、それは同時に本リン脂質の研究を進めるうえで大きな障害となってきた。しかし Hawthorne ら^{11,12)} の精力的な研究成果より、DPI の膜透過性への関与が示唆されるに至り注目されつつあるが、mast cell を用いた検討はまだ報告されていない。抗原-抗体反応による mast cell からの mediator 遊離機構、特に顆粒放出前の膜融合との関係において、本リン脂質の関与の有無は興味あるところである。

筆者らは [γ - ^{32}P] ATP を用いた mast cell 顆粒内における一連の蛋白リン酸化反応の研究を進める過程で、偶然リン酸化蛋白あるいは主要リン脂質とは異なるリン酸化物を発見した。oxalic acid および potassium oxalate 処理 silica gel plate を用いた TLC により顆粒 pellet

および上清中の脂質検索を行ったが、DPI 部分の ^{32}P 活性は顆粒に存在することは明らかである。しかし、図4に示すごとく oxalic acid 処理 plate により PI, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidic acid (PA), phosphatidylserine (PS), cardiolipin (CL), sphingomyelin (SM), phosphatidylglycerol (PG) などの一般的リン脂質は DPI と明らかに分離区別されるが、これら脂質が ^{32}P で標識され DPI 部分に混在する可能性は存在する。

そこで、oxalic acid および potassium oxalate 処理 silica gel plate 双方を用いて一連の実験を行った。通常一般のリン脂質は HCl あるいは CaCl_2 いずれの存在下でも抽出されるが、DPI は酸性下で抽出される¹³⁾ことを考えあわせると、DPI が ^{32}P によって標識されたことは明らかである。一方、本論文で報告した mast cell

図4 position of various lipids as determined by staining with iodine vapour after chromatography on a 1% (w/v) oxalic acid impregnated silica gel plate

顆粒の分離法ではB顆粒層の蛋白量はI顆粒層の $22.8 \pm 4.8\%$ (mean $\pm$ SE) にすぎず、この点を検討するため ^{32}P 標識 DPI 量に関しI顆粒とB顆粒を用いて比較検討を行った。

SDS/PAGE electrophoresis を用い、主要顆粒膜蛋白量をもとに等量の蛋白を含有するI顆粒とB顆粒を比較したが、 ^{32}P 標識 DPI 量に有意差は認められなかった。また細胞質分画を用いた検討および洗浄回数の ^{32}P 活性へ及ぼす影響の検討結果より、DPI部分の ^{32}P 活性は細胞質分画の混在によるものではないことは明らかである。以上より、 Mg^{2+} の存在下で mast cell 顆粒を ATP と incubate すると mast cell 細胞質側の顆粒膜、すなわち顆粒膜外側に DPI が形成されることが明らかになった。

現時点で mast cell 顆粒膜における DPI 形成機構およびその明白な意義付けをすることは困難であるが、以下のごとく興味ある仮説を想定することはできる。すなわち、顆粒外側の DPI は通常細胞質中に存在する酵素によりさらに TPI ヘリン酸化されるか、あるいは PI, PO_4 さらに diacylglycerol (DAG), inositol 1,4 diphosphate へ還元されることが考えられる。ここで特に興味あるのは DPI を DAG と inositol 1,4 diphosphate へ還元する phosphodiesterase⁽⁴⁾で、本酵素は低濃度の Ca^{2+} により活性化される。また DAG は膜融合を惹起する⁽⁵⁾ことが知られている。mast cell よりの mediator 遊離に関し Ca^{2+} の関与は周知のことで、顆粒膜内における DAG の調節機構は顆粒膜融合および exocytosis を惹起するうえで重要なものかもしれない。さらに、DPI は PI よりも陰イオンに荷電しており、それ自体陰イオンに荷電している細胞膜と顆粒膜との融合に際し電気力学的 barrier を形成し、細胞膜と顆粒膜の融合を調節することも考えられる。

もしこの仮説が正しければ、顆粒膜内の DPI 量の減

少によりこの barrier が崩れ、分泌過程がさらに促進することになるとも考えられるが、今後の検討が必要である。

結 語

mast cell 顆粒を Mg^{2+} 存在下に ATP と incubate すると、mast cell 細胞質側の顆粒膜、すなわち顆粒膜外側に DPI が形成された。

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜った群馬大学医学部第一内科学教室 小林節雄教授に深謝致します。

文 献

- 1) Cohen, P.: The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296: 613-620, 1982.
- 2) Michell, R.H.: Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta* 415: 81-147, 1975.
- 3) Enerback, L., Svenson, I.: Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density of Percoll. *J. Immunol. Methods* 39: 135-145, 1980.
- 4) Kruger, P.G., Lagunoff, D., Wan, H.: Isolation of rat mast cell granules with intact membranes. *Exp. Cell Res.* 129: 83-93, 1980.
- 5) Bligh, E., Dyer, W.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959.
- 6) Gonzalez-Sastre, R., Folch-Pi, J.: Thin-layer chromatography of phosphoinositides. *J. Lipid Res.* 9: 532-533, 1968.
- 7) Jolles, J., Zwiers, H., Dekker, Ad., Wirtz, K.W.A., Gispén, W.H.: Corticotropin-(1-24)-tetracosapeptide affects protein phosphorylation and polyphosphoinositide metabolism in rat brain. *Biochem. J.* 194: 283-291, 1981.
- 8) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- 9) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* 227: 680-685, 1970.
- 10) Lagunoff, D., Pritzel, P.: Characterization of rat mast cell proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 173: 554-563, 1976.
- 11) Hawthorne, J.N., Kemp, P.: The brain phosphoinositides. *Advan. Lipid Res.* 2: 127-166, 1964.
- 12) Michell, R.H., Hawthorne, J.N.: The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21: 333-338, 1965.
- 13) Radin, N.S.: Preparation of lipid extracts. *Methods in Enzymology*. vol. XIV. ed. by

Lowenstein, J.M. Academic Press, 1965, p 245-254.

- 14) Allan, D., Michell, R.H.: A calcium-activated polyphosphoinositide phosphodiesterase in the plasma membrane of human and rabbit erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 508: 277-

286, 1978.

- 15) Allan, D., Billah, M.M., Finean, J.B., Michell, R.H.: Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular $[Ca^{2+}]$. *Nature (London)* 261: 58-60, 1976.