ラット mast cell リン酸化反応に関する研究 (第8報)

—活性化 mast cell よりの polyphosphoinositide 遊離とその局在—

黒 沢 元 博*

Studies of phosphorylation in rat mast cells (eighth report)—polyphosphoinositide (PPI) release from stimulated mast cells and localization of PPI response— Serosal mast cells were purified by bovine serum albumin density gradient centrifugation and prelabeled with $^{32}\text{PO}_4$. Incorporation of $^{32}\text{PO}_4$ into PPI, diphosphoinositide (DPI) and triphosphoinositide (TPI), was determined by thin-layer chromatography on oxalic acid impregnated silica gel plates. $^{32}\text{PO}_4$ incorporation into DPI in mast cell supernates as well as pellets was increased by concanavalin A. As a control for possible artifactual formation of DPI in the supernates, supernates from labeled stimulated or unstimulated cells were incubated with intact or broken membrane granules from unlabeled cells isolated from sonicated mast cells on a Percoll gradient. No obvious $^{32}\text{PO}_4$ incorporation into PPI in the granules was seen. The question of how much of the labeled PPI is present in the granule fraction was considered. Studies in unstimulated mast cells labeled with $^{32}\text{PO}_4$, including controls for artifactual incorporation of label during granule isolation, suggest that at least 40% of the total cellular radiolabel in PPI is in the granules. The results of these studies indicate that changes in PPI metabolism may be a intrinsic part of the biochemical mechanisms that control mediator release from mast cells.

Motohiro Kurosawa*

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

IgE 抗体の関与する mediator 遊離過程は、一連の chain reaction で標的細胞である mast cell の細胞表面での変化、細胞内生化学的機構および exocytosis を介して発現すると考えられる。細胞内生化学的機構には、 Ca^{2+} ¹⁾、エネルギー代謝²⁾、cyclic nucleotides³⁾、リン脂質⁴⁾、cytoskeletal protein⁵⁾ などの関与があげられ、mast cell 顆粒膜間の、あるいは mast cell 細胞膜と顆粒膜との融合を介して顆粒が脱出し、その内容物である mediator が放出されるわけであるが、その詳細は不明である。

リン脂質の一つ polyphosphoinositide (PPI)、すなわち diphosphoinositide (DPI)、および triphosphoinositide (TPI) は、その生理作用の一つとして細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節⁶⁾ あるいは膜透過性調節作用⁷⁾ を有することが報告されており、mast cell よりの mediator 遊離機序を考えるうえで PPI 関与の有無はたいへん興味あるところである。先に筆者ら⁸⁾は、 $^{32}\text{PO}_4$ で標識した mast cell を concanavalin A (ConA) あるいは compound 48/80 で刺激すると、DPI および TPI の $^{32}\text{PO}_4$ 標識量が増加することを認め、mast cell が活性化されると PPI 代

謝が亢進することを報告した。本論文では、mast cell 内における PPI 代謝の局在性について若干の検討を加えた。

材料と方法

(1) 材料

^{32}P -orthophosphoric acid ($^{32}\text{PO}_4$) (New England Nuclear 製), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (4500 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) (ICN 製), oxalic acid, Scintiverse (Fisher 製), Silica gel plate (20×20 cm, 0.25 mm) (Brinkmann 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

以下に示す二つの方法によった。すなわち $^{32}\text{PO}_4$ 標識実験には、mast cell medium (MCM)⁹⁾ をラット (Sprague-Dawley 系, 雄性, 250~300 g) 胸腔および腹腔の洗浄液として用い、bovine serum albumin (BSA) 比重法⁹⁾により mast cell を分離精製した。また、mast cell 顆粒分離実験には balanced salt solution with BSA (BSSA)¹⁰⁾を洗浄液として用い、Percoll 比重法¹¹⁾により分離精製した。Mast cell は buffer により2回洗浄した後、実験に供した。

(3) ラット mast cell 顆粒分離法

* 群馬大学医学部第一内科学教室

分離精製した mast cell を Branson Sonifier cell disrupter 185細胞破碎装置により破碎 (60 W, 3分30秒間) した後, Percoll 比重法¹⁰⁾により形態学的に膜の保たれた正常顆粒, および正常膜を欠き膨満した形態を示す破損顆粒を分離した. 顆粒は2回 balanced salt solution (BSS)¹⁰⁾で洗浄した後, 実験に供した.

(4) 反応系

以下の各種条件下に反応を行った.

① mast cell 内 PO_4 を枯渇させるため 37°C で60分間 incubate した. 室温で $60\times\text{g}$, 8分間遠心した後, 細胞を MCM に再浮遊させ, ただちに $^{32}\text{PO}_4$ 標識実験に供した. 3.5×10^6 個 mast cell を $40\ \mu\text{Ci } ^{32}\text{PO}_4$ と 37°C 5分間 incubate した後, 前報⁹⁾に従い $10\ \mu\text{g/ml}$ ConA および $30\ \mu\text{g/ml}$ phosphatidylserine (PS), あるいは PS のみと 37°C 30分間反応させた. PS は窒素ガスにより室温で乾燥した後 MCM を加え, Brounsonic 1510 sonicator により $75\ \text{W}$ で5分間処理し, 乳化した後, ただちに実験に供した. 反応は $1\ \text{ml}$ 氷冷 MCM を添加することにより停止させ, ただちに 4°C で $60\times\text{g}$, 8分間遠心した. 上清および cell pellet 中の PPI を以下に示す方法により抽出, 分離した.

② 37°C 60分間 incubate し, PO_4 を枯渇させた 2×10^6 個 mast cell を $40\ \mu\text{Ci } ^{32}\text{PO}_4$ と 37°C 60分間反応させた. $1\ \text{ml}$ 氷冷 MCM を添加して反応を停止させた後, ただちに遠心し, 上清を除去した. 細胞の半量はただちに PPI の抽出, 分離に供し, 残り半量は細胞破碎装置により破碎 ($60\ \text{W}$, 3分30秒間) した後, 顆粒分離に供した. 分離した顆粒を洗浄後, 4°C で $2,000\times\text{g}$, 10分間遠心し, 上清を除去した後顆粒 pellet 中の PPI を検討した.

③ 1.7×10^6 個 mast cell より分離した正常顆粒を $20\ \text{mM}$ MgCl_2 , $20\ \text{mM}$ Tris/HCl pH 7.4 の存在下に 5×10^6 cpm [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP ($4500\ \mu\text{Ci/mmol}$) と 15分間反応させた (反応総量 $100\ \mu\text{l}$). $1\ \text{ml}$ 氷冷 BSSA を添加して反応を停止させ, ただちに遠心して上清を除去した. BSSA で洗浄した後, 試料の $1/3$ はただちに PPI の抽出, 分離に供した. 残り試料の半量は 1.7×10^6 個 mast cell と混和し, 細胞破碎装置により破碎 ($60\ \text{W}$, 3分30秒間) した後, 再度顆粒の分離を行い, 顆粒中の PPI を検討した. 残りの試料は, 同一条件下に細胞破碎装置により破碎した 1.7×10^6 個 mast cell と混和し, その後同様に顆粒を再度分離し, 顆粒中の PPI を抽出, 分離した.

④ 5×10^6 cpm [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP ($4500\ \mu\text{Ci/mmol}$) を 2.7×10^6 mast cell に添加し, ただちに細胞を同一条件下に破碎した後顆粒を分離し, 顆粒中の PPI について検討した.

⑤ PO_4 を枯渇させた 3.3×10^6 個 mast cell を 40

$\mu\text{Ci } ^{32}\text{PO}_4$ と 37°C で5分間 incubate した後, $10\ \mu\text{g/ml}$ ConA および $30\ \mu\text{g/ml}$ PS あるいは PS のみと 37°C で30分間反応させた. $1\ \text{ml}$ 氷冷 MCM を添加して反応を停止させた後, ただちに遠心し, 上清を得た. この上清と 2.4×10^6 個 mast cell より得られた正常および破損顆粒と 37°C で15分間 incubate した後, 4°C で $2000\times\text{g}$, 10分間遠心した. 上清を除去した後, 顆粒中の PPI を抽出, 分離した.

(5) PPI の抽出と分離法

Bligh & Dyer の方法¹²⁾に従い PPI を抽出した. すなわち $0.6\ \text{ml}$ methanol, $0.3\ \text{ml}$ chloroform, $0.24\ \text{ml}$ $0.1\ \text{N HCl}$ に mast cell あるいは mast cell 顆粒を添加し, 一方上清中の PPI 抽出には $4\ \text{ml}$ methanol, $2\ \text{ml}$ chloroform, $0.35\ \text{ml}$ $0.457\ \text{N HCl}$ を用いた. 反応チューブをキャップで密封し, 激しく振とうした. 室温で30分間放置した後, $1,000\times\text{g}$, 10分間遠心して不溶物を除去した. 得られた上清中の PPI を以下のごとくさらに抽出した. mast cell あるいは mast cell 顆粒よりの試料は $0.3\ \text{ml}$ chloroform, $0.3\ \text{ml}$ $0.1\ \text{N HCl}$ と, 上清よりの試料は $2\ \text{ml}$ chloroform, $2\ \text{ml}$ $0.1\ \text{N HCl}$ と混和した (それぞれ対照として $10\ \mu\text{g}$ PPI を含む). 激しく振とうした後, $1,000\times\text{g}$, 10分間遠心して水性層と有機層の二つの層を分離した. 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, 1 晩 -80°C で貯蔵した.

PPI は, 1% (w/v) oxalic acid で処理した Silica gel plate を用い, thin layer chromatography (TLC) により分離した¹³⁾. chloroform/methanol/ $4\ \text{N}$ NH_4OH ($9:7:2$, v/v/v) で展開した後, ヨードにより PPI を染色同定した. PPI 部分を plate より剝離した後, 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.

結果

(1) mast cell pellet および上清中の ^{32}P 標識 PPI
mast cell を ConA により刺激すると, 先に報告⁹⁾したごとく, 細胞中の ^{32}P 標識 PPI 量が増加した. 上清を用いて検討すると, ConA により活性化された mast cell の上清において ^{32}P 標識 DPI 量の増加がみられた (表1).

(2) 顆粒中 ^{32}P 標識 PPI

活性化された mast cell より顆粒を分離することを試みたが, 成功しなかった. そこで, PO_4 を枯渇させた mast cell を $^{32}\text{PO}_4$ と incubate した後, 顆粒を分離し, 顆粒中 ^{32}P 標識 PPI 量を mast cell 中のそれと比較検討した. その結果表2に示すごとく, 正常および破損顆粒内に明らかな ^{32}P 標識 DPI および TPI を認めた.

表1 $^{32}\text{PO}_4$ incorporation into DPI and TPI in mast cell pellets and supernates with and without ConA stimulation

	mast cell pellet		supernate	
	ConA+PS	PS	ConA+PS	PS
DPI	11054 cpm	8624 cpm	215 cpm	61 cpm
	10540	7059	167	75
TPI	3988	2765	43	17
	4017	2723	36	26

Phosphate depleted mast cells (3.5×10^5) were prelabeled with $^{32}\text{PO}_4$ ($40 \mu\text{Ci}/\text{tube}$) for 5 min at 37°C and then incubated with either $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ConA and $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ PS or PS alone. Thirty minutes later incorporation was halted by the addition of ice-cold MCM and PPI labeling was determined as described in METHODS. The data represent duplicate values from one experiment.

表2 $^{32}\text{PO}_4$ incorporation into DPI and TPI in mast cell pellets and granules

	DPI	TPI
	cpm	cpm
cell pellets	6173.3 ± 411.4	1005.0 ± 38.5
intact membrane granules	522.7 ± 90.2	103.3 ± 16.8
broken membrane granules	1608.3 ± 192.6	712.0 ± 97.6

Phosphate depleted mast cells (2×10^6) were incubated with $^{32}\text{PO}_4$ ($40 \mu\text{Ci}/\text{tube}$) for 60 min at 37°C . Further labeling was halted by adding ice-cold MCM. After sedimenting the cells, half of the cell pellets were extracted immediately under the standard conditions. The remainder of the cells were resuspended in BSSA and their granules were isolated as described in Methods. The lipid was extracted from the isolated granules under the standard conditions. The data represent the mean $\pm$ SEM of triplicate values.

mast cell 中の PPI 量と比較検討すると、正常顆粒では 8.7%、破損顆粒では 32.3% で、正常顆粒に比し破損顆粒中により多くの ^{32}P 標識 PPI を認めた。

対照実験として $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP と incubate した正常顆粒を mast cell と混和し、再度細胞破碎装置により破碎した後、顆粒を分離した。顆粒中 ^{32}P 標識 PPI 量を mast cell との処理を行わない試料中のそれと比較検討した。正常および破損顆粒中の ^{32}P 標識 DPI 量は対照の 22.4% および 18.7% であった。また、 $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP と incubate した正常顆粒をすでに細胞破碎装置により破碎した mast cell と混和し、再度顆粒分離を行い、mast cell との処理を行わない試料と比較検討した。正常およ

び破損顆粒中 ^{32}P 標識 DPI 量は対照の 37.4% および 24.1% であった。

一方、mast cell を細胞破碎装置により破碎する直前に $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP を添加し、顆粒を分離した後、正常および破損顆粒中 ^{32}P 標識 PPI について検討したが、明らかな ^{32}P 標識 PPI は認められなかった。また、 PO_4 を枯渇させた後、 $^{32}\text{PO}_4$ と incubate した mast cell を ConA および PS、あるいは PS のみと反応させ、得られた上清と正常および破損顆粒を incubate し、顆粒中 ^{32}P 標識 PPI を検討したが、同様に明らかな ^{32}P 標識 PPI は認められなかった。

考 察

活性化 mast cell における PPI 代謝の亢進が顆粒内のものであるならば、 ^{32}P 標識 mast cell を刺激した際に、顆粒脱出に伴い、少なくとも一部の ^{32}P 標識 PPI が反応液上清中に認められると考えられる。そこで、ConA により mast cell を刺激した後、上清中の PPI を検討したところ、非刺激 mast cell 反応液の上清に比し、明らかな ^{32}P 標識 DPI 量の増加を認めた。活性化 mast cell より遊離する反応液中の mediator は、遊離した顆粒に由来するが、一部は依然細胞内に存在し、反応液との交通を有する顆粒によると考えられる。活性化に伴う mast cell 内および遊離顆粒量を的確にとらえることは、現在手技上不可能で、本実験結果より、活性化 mast cell より DPI が遊離することは明らかであるが、顆粒数との量的な関係などを示すことはできない。

つぎに、mast cell 中 ^{32}P 標識 PPI のどれほどが顆粒に存在するかについて検討した。まず、前述の一般的顆粒分離法により、活性化 mast cell より顆粒を分離することを試みたが成功しなかった。おそらく、mediator 遊離反応に伴う顆粒内の変化によるものと思われる。そこで、非活性化 mast cell を ^{32}P で標識し、顆粒を分離した後、顆粒中 PPI について検討した。その結果、正常および破損顆粒のいずれにおいても ^{32}P 標識 PPI が認められたが、mast cell 全体の量と比較検討するとそれぞれ 8.7% および 32.3% にすぎなかった。

対照実験として、 ^{32}P 標識顆粒を mast cell、あるいは細胞破碎装置で破碎した mast cell と混和し、顆粒分離操作過程における喪失 ^{32}P 量について検討したところ、前者では 58.9%、後者では 38.5% もの ^{32}P 標識 DPI が顆粒分離に際し喪失することがわかった。これは DPI の分解、あるいは手技的に顆粒そのものの喪失によるためとも考えられるが、一方、この ^{32}P 喪失量は驚くほど大きいものであり、リン酸化した顆粒は、より分離することが困難であることが示唆される。破損顆粒の ^{32}P 標識 PPI 量は正常顆粒に比し明らかに高値を示したが、この点に関し、破損顆粒がよりリン酸化されやすい可能

性, 顆粒分離過程において ^{32}P 標識正常顆粒が破損する可能性などをあげることができるが, その詳細は不明である。

顆粒中 ^{32}P 標識 PPI が顆粒分離過程において, 細胞内 ^{32}P 標識 ATP あるいは $^{32}\text{PO}_4$ により標識されたいわゆる artifact のものであるか否かを検討するため, 以下の実験を行った。すなわち, 細胞破砕直前に [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP を添加し, mast cell を破砕した後顆粒中 PPI について検討したが, ^{32}P 標識 PPI は認められなかった。また, ^{32}P 標識 mast cell を活性化し, それから得られた上清と正常および破損顆粒を incubate した後, 顆粒中 ^{32}P 標識 PPI を検討したが, ^{32}P 標識 PPI は認められず, 顆粒中 ^{32}P 標識 PPI は顆粒分離過程における artifact ではないことが明らかである。

以上, mast cell が活性化されると DPI が遊離することを報告した。活性化 mast cell より顆粒を分離し, PPI との関係を直接検討することは出来なかったが, 非活性化 mast cell を用い, mast cell 中 PPI の少なくとも40%は顆粒中に存在することを証明した。先に筆者¹⁴⁾は, mast cell 顆粒には活性の強い phosphatidylinositol kinase が存在することを報告しており, この結果は納得できるところである。

現時点で活性化 mast cell よりの PPI 遊離について, mediator 遊離機構における明白な意義付けを行うことは不可能である。PPI は phosphodiesterase により diacylglycerol に分解されるが, diacylglycerol は膜融合を惹起することが報告¹⁵⁾されており, 興味あるところである。

結 語

mast cell が活性化されると DPI が遊離することを報告した。併せて, mast cell 内 PPI の少なくとも40%は顆粒中に存在することを証明した。

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いたします。

文 献

- 1) Ishizaka, T.: Analysis of triggering events in mast cells for immunoglobulin E-mediated histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67: 90-96, 1981.
- 2) Gillespie, E., Lichtenstein, L.M.: Histamine release from human leukocytes: studies with deuterium oxide colchicine and cytochalasin B. *J. Clin. Invest.* 51: 2941-2947, 1972.
- 3) Sullivan, T.J., Parker, K.L., Kulczycki, A. Jr., Parker, C.W.: Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. II. Studies of the effects of concanavalin A and anti-IgE on cyclic AMP concentrations during mediator release. *J. Immunol.* 117: 713-716, 1976.
- 4) Kennerly, D.A., Sullivan, T.J., Parker, C.W.: Activation of phospholipid metabolism during mediator release from stimulated mast cells. *J. Immunol.* 122: 152-159, 1979.
- 5) Orr, T.S.C., Hall, D.E., Allison, A.C.: Role of contractile microfilaments in the release of histamine from mast cells. *Nature* 236: 350-351, 1972.
- 6) Buckley, J.T., Hawthorne, J.N.: Erythrocyte membrane polyphosphoinositide metabolism and regulation of calcium binding. *J. Biol. Chem.* 247: 7218-7223, 1972.
- 7) Hendrickson, H.S., Reinertsen, J.L.: Phosphoinositide interconversion: a model for control of Na^+ and K^+ permeability in the nerve axon membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 1258-1264, 1971.
- 8) 黒沢元博, 根本俊和, 笛木隆三, 小林節雄: ラット mast cell リン酸化反応に関する研究(第7報)—histamine 遊離と polyphosphoinositide 代謝. *アレルギー* 34: 198-203, 1985.
- 9) Sullivan, T.J., Parker, K.L., Stenson, W., Parker, C.W.: Modulation of cyclic AMP in purified mast cells. I. Response to pharmacologic, metabolic and physical stimuli. *J. Immunol.* 114: 1473-1479, 1975.
- 10) Kruger, P.G., Lagunoff, D., Wan, H.: Isolation of rat mast cell granules with intact membranes. *Exp. Cell Res.* 129: 83-93, 1980.
- 11) Enerback, L., Svenson, I.: Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density of Percoll. *J. Immunol. Methods* 39: 135-145, 1980.
- 12) Bligh, E., Dyer, W.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959.
- 13) R. Gonzalez-Sastre, J. Folch-Pi.: Thin-layer chromatography of phosphoinositides. *J. Lipid Res.* 9: 532-533, 1968.
- 14) 黒沢元博: ラット mast cell リン酸化反応に関する研究(第2報)—顆粒膜 phosphatidylinositol kinase—, 日薬理誌, (印刷中).
- 15) Allan, D., Billah, M.M., Finean, J.B., Michell, R.H.: Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$. *Nature (London)*, 261: 58-60, 1976.