ラット mast cell リン酸化反応に関する研究 (補遺/その1)

—mast cell 顆粒 triphosphoinositide—

田中哲治・青木 栄・黒沢元博*

Studies of phosphorylation in rat mast cell (supplement-1)—demonstration of triphosphoinositide (TPI) in rat mast cell granule— Granules were isolated from sonicated rat mast cells on Percoll gradient and incubated with [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP in the presence of Mg^{2+} and exogenous diphosphoinositide. 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 TPI on both plates. Extensive washing of the granules did not significantly affect the ^{32}P incorporation into TPI. The radioactivity in TPI was associated with the granule themselves and it is apparent that TPI is produced in rat mast cell granule.

Tetsuji Tanaka・Sakae Aoki・Motohiro Kurosawa*

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

key words: mast cell, phosphorylation, diphosphoinositide, triphosphoinositide

mast cell よりの メディエーター遊離反応は、即時型アレルギー反応モデルの一つとして広く用いられている。mast cell より exocytosis を介して遊離するメディエーターは、細胞膜と顆粒膜、あるいは顆粒膜間の膜融合の結果顆粒が脱出し、放出されるものと考えられているが、その詳細な機序はまだ不明である。

polyphosphoinositide に属する diphosphoinositide (DPI), および triphosphoinositide (TPI) は、電気的に負に荷電している特異的リン脂質で、そのため2価の陽イオンとの結合能を有することが示唆されている¹⁾。特に、TPI は EDTA よりも Ca^{2+} に対し、高い結合力があるといわれ²⁾、DPI, TPI の膜における量的変化が、 Ca^{2+} などの2価陽イオンの結合状態に変化を及ぼし³⁾、細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節し⁴⁾、その結果、膜の透過性を制御する⁵⁾ことが考えられている。

筆者らは、現在までの一連の研究において、ラット mast cell 顆粒膜には DPI 産生機構が存在することを明らかにし⁶⁾、DPI はリン酸化酵素 phosphatidylinositol (PI) kinase の働きにより、ATP, Mg^{2+} 存在下に PI がリン酸化されたものであることを報告した⁷⁾。

本論文では、ラット mast cell 顆粒における TPI 産生機構存在の有無について検討した。

材料と方法

(1) 材料

[$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (4500 $\mu\text{Ci}/\text{m mol}$) (ICN 製), Percoll

(Pharmacia 製), toluidine blue, DPI, bovine serum albumin (BSA) (Sigma 製), Liquifluor (New England Nuclear 製), silica gel plate (20×20 cm, 0.25 mm) (Machery-Nagel 製), oxalic acid, potassium oxalate, およびその他すべての試薬は和光純薬製特級を用いた。

(2) ラット mast cell および mast cell 顆粒分離法

前報⁶⁾に準じた。すなわち、250~300 g の Sprague Dawley 系雄性ラット(静岡県実験動物農協より購入)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単位/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) BSA を含有する。Percoll 比重法⁸⁾により分離・精製した mast cell (toluidine blue 染色法で純度90%以上)を Branson Sonifier 細胞破碎装置 185 型により破碎(60W, 3分30秒間処置)した後、Krüger らの方法⁹⁾に従い、mast cell 顆粒を分離した。顆粒は Percoll 内に2層を形成し、上層は膜を欠き、膨満した形態を示す破損顆粒よりなり、下層は形態学的に膜の保たれた正常顆粒より形成されていた。2回 BSS で洗浄した正常顆粒を以下の実験に用いた。

(3) 反応系

mast cell 顆粒 BSS 浮遊液 60 μl ($4.0\sim6.0\times10^6$ 個の mast cell より分離したもの)を 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 20 mM MgCl_2 , 0.1 mg/ml DPI, および 10 μM [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (5×10^9 cpm/ μmol) と 30°C で15分間 incubate した(反応液量100 μl)。反応は、以下に示す有機溶

* 群馬大学医学部第一内科教室

図1 thin layer chromatography (TLC) and autoradiography of lipids extracts of rat mast cell granules labeled with ^{32}P

A: in the absence of exogenous diphosphoinositide (DPI).

B: in the presence of DPI. The first lane is an iodine stain, the second and the third lanes are the corresponding autoradiography of chromatography.

剤を添加することにより停止し、ついで脂質抽出を行った。

(4) mast cell 顆粒 TPI の抽出と分離

前報⁶⁾に準じ、mast cell 顆粒内の脂質を抽出した。すなわち、0.5 ml methanol, 0.25 ml chloroform, 0.1 ml 0.2 N HCl, および 0.25 ml chloroform, 0.25 ml 0.1 N HCl を用いて 2 段階に抽出した。抽出した脂質は 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 にて処理したものを用いた。oxalic acid 処理 plate は、chloroform/methanol/4N NH_4OH (9:7:2, v/v/v), potassium oxalate 処理 plate は、chloroform/acetone/methanol/acetic acid/water (40:15:13:12:8, v/v/v/v/v) で展開した。TPI 部分をヨード染色により同定し、silica gel plate より剥離した後、シンチレーション液 (Liquifluor) の存在下に液体シンチレーションカウンタ

図2 autoradiography of labeled lipids from rat mast cell granules after incubation with $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP in the presence of exogenous DPI, extraction and TLC

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.

ーを用いて ^{32}P 量を測定した。対照としてヨードに染色されない部分も測定に供した。

^{32}P 活性部分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 Kodak XR-5 医学用フィルムに 3 日間曝露した後、Kodak RPX-O mat を用いてフィルムを現像乾燥した。

結果

顆粒を外因性 DPI の非存在下に、 Mg^{2+} および $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP と incubate し、反応停止後顆粒浮遊液中の脂質を抽出した。ついで、oxalic acid 処理 silica gel plate を用いて TLC により脂質を分離し、autoradiography を行くと、図1に示すごとく、TPI 部分の ^{32}P 活性は痕跡程度しか認められなかった。一方、外因性 DPI の存在下に、その他同一条件下に顆粒を Mg^{2+} および $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP と反応させると、TPI 部分に明らかな ^{32}P 活性が認められた。すなわち、TPI 部分の ^{32}P 量は外因性 DPI の存在下で明らかに増加し、他に 2 回同一条件下に実験を行っても同様の結果が得られた。

ついで、顆粒を外因性 DPI の存在下に、 Mg^{2+} 、 $[\gamma^{32}P]$ ATP と incubate した後、試料を 2 等分し、脂質を抽出した。ついで、oxalic acid および potassium oxalate 処理 silica gel plate を用いて脂質を分離すると、図 2 に示すごとく、いずれの plate においても、autoradiography で TPI 部分に明らかな ^{32}P 活性を認めた。二つの plate における TPI 部分の ^{32}P 量を測定すると、その誤差は 9.5% 以内で、TPI 部分の ^{32}P 活性は明らかな相関を示した。

反応停止後 0.1 N HCl のかわりに、0.04% (w/v) $CaCl_2$ を用いて脂質抽出を行い、oxalic acid および potassium oxalate 処理 plate により脂質を分離し、autoradiography を行うと、TPI 部分に ^{32}P 活性は認められなかった。

また、oxalic acid 処理 silica gel plate における TPI 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い、potassium oxalate 処理 silica gel plate を用いて脂質を分離し、autoradiography を行うと、 ^{32}P 活性は TPI 部分にみられた。

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、TPI 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。

考 察

Hokin ら¹⁰⁾により、アセチルコリンでハト豚が刺激されると、phosphoinositide の代謝が亢進することが報告されて以来、さまざまな細胞において、その活性化に際し、phosphoinositide 代謝亢進がみられることが報告されている。筆者らも、先に mast cell において、mast cell 活性化の際に DPI, TPI 量が増加することを報告した¹¹⁾。顆粒に PI kinase が存在する⁷⁾ことを考えると、DPI 量の増加は比較的容易に理解することができる。

今回、筆者らは、ラット mast cell 顆粒に TPI 産生機構が存在するか否かを検討した。顆粒を外因性 DPI 存在下に、 Mg^{2+} 、 $[\gamma^{32}P]$ ATP と反応させると、silica gel plate において TPI 部分に一致して ^{32}P 活性が認められた。外因性 DPI の非存在下に、その他同一条件下に顆粒を反応させても、TPI 部分の ^{32}P 活性は、痕跡程度しか認められなかった。

HCl のかわりに、 $CaCl_2$ を用いて脂質抽出を行い、その後 TLC により脂質を分離しても、TPI 部分に ^{32}P 活性は認められなかった。一般のリン脂質は、HCl および $CaCl_2$ いずれの存在下でも抽出されるが、TPI は酸性下で比較的安定して抽出される¹²⁾ことを考えると、TPI 部分の ^{32}P 活性は、 ^{32}P 標識 TPI であると考えら

れた。

この可能性を、さらに明確にするため、oxalic acid および potassium oxalate 処理 silica gel plate を用いて一連の実験を行った。すなわち、脂質抽出後試料の半量ずつを、それぞれ oxalic acid および potassium oxalate 処理 silica gel plate を用い脂質を分離すると、いずれの plate においても TPI 部分に一致して ^{32}P 活性が認められ、その活性は強い相関を示した。また、oxalic acid 処理 silica gel plate の TPI 部分を剥離した後、酸性条件下に脂質抽出を行い、その後、potassium oxalate 処理 silica gel plate を用いて脂質を分離すると、 ^{32}P 活性は TPI に一致した。さらに、顆粒の洗浄回数を増加しても、TPI 部分の ^{32}P 活性量に明らかな変化を認めなかったことより、細胞質分画などが混在したことは考えられなかった。

以上より、mast cell 顆粒を外因性 DPI 存在下に Mg^{2+} 、 $[\gamma^{32}P]$ ATP と反応させると、 ^{32}P 標識 TPI が形成されることが明らかとなった。

現時点で、mast cell 顆粒における TPI 産生機構、およびその明白な意義づけをすることは困難であるが、顆粒における TPI の量的変化が細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節し、mast cell よりのメディエーター遊離過程における膜透過性の変化に関与することが考えられる。

また、mast cell よりのメディエーター遊離過程には、解糖系を介するエネルギー代謝機構が関与することが明らかにされている¹³⁾が、DPI が TPI にリン酸化されることにより、細胞内 ATP 濃度が調節され、メディエーター遊離過程が制御されることも考えられる。

近年、TPI の生理的意義として、細胞膜受容体伝達機構としての TPI の分解がにわかに注目されはじめている。すなわち、細胞活性化反応の最初の段階として、phospholipase C の活性化に伴う TPI の加水分解が、細胞活性化機構のトリガーとなることが考えられている¹⁴⁾。TPI の加水分解に伴い、diacylglycerol (DAG) と inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP_3) が生成されるが、 IP_3 は細胞内 Ca^{2+} を遊離し^{15,16)}、DAG は protein kinase C 活性を増加するとされている¹⁷⁾。筆者らも、ラット mast cell¹⁸⁾およびラット白血球細胞 RBL-1 cell¹⁹⁾中に protein kinase C が存在することを明らかにしているが、ラット mast cell 顆粒 TPI とこれらの点との関係に関しては、今後検討すべき問題である。

結 語

mast cell 顆粒を外因性 DPI 存在下に Mg^{2+} および ATP と incubate すると、TPI が形成された。

稿を終えるに当り、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) Michell, R.H.: Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 81-147, 1975.
- 2) Dawson, R.M.C.: Phosphatido-peptide-like complexes formed by the interaction of calcium Ptd Ins 4, 5 P with protein. *Biochem. J.* 97: 134-138, 1965.
- 3) Jolles, J., Zwiers, H., Dongen, C.J., Schotman, P., Wirtz, K.W.A., Gispen, W.H.: Modulation of brain polyphosphoinositide metabolism by ACTH-sensitive protein phosphorylation. *Nature* 286: 623-625, 1980.
- 4) Buckley, J.T., Hawthorne, J.N.: Erythrocyte membrane polyphosphoinositide metabolism and the regulation of calcium binding. *J. Biol. Chem.* 247: 7218-7223, 1972.
- 5) 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.
- 6) 黒沢元博：ラット mast cell リン酸化反応に関する研究(第1報)—顆粒膜 diphosphoinositide—, 炎症 5: 31-36, 1985.
- 7) 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 86: 9-15, 1985.
- 8) Enerbäck, L., Svensson, I.: Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density of Percoll. *J. Immunol. Methods* 39: 135-145, 1980.
- 9) Krüger, P.G., Lagunoff, D., Wan, H.: Isolation of rat mast cell granules with intact membranes. *Exp. Cell Res.* 129: 83-93, 1980.
- 10) Hokin, M.R. and Hokin, L.E.: Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* 203: 967-977, 1953.
- 11) 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.
- 12) Radin, N.S.: Preparation of lipid extracts. *Methods in Enzymology*. vol. XIV. (ed. by Lowenstein, J.M.), Academic Press, 1965, p. 245-254.
- 13) Bertil, D., Börje, U.: Evidence for energy-requiring processes in histamine release and mast cell degranulation in rat tissues induced by compound 48/80. *Acta Physiol. Scand.* 53: 315-329, 1961.
- 14) Abdel-Latif, A.A., Aktar, R.A., Hawthorne, J.N.: Acetylcholine increases the breakdown of Ptd Ins 4, 5 P_2 in rabbit iris muscle prelabelled with [^{32}P]-phosphate. *Biochem. J.* 162: 61-73, 1977.
- 15) Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., Shulz, I.: Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intra-cellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. *Nature* 306: 67-69, 1983.
- 16) Joseph, S.K., Thomas, A.P., William, R.J., Irvine, R.F., Williamson, J.R.: Myo-Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate; a second messenger for the hormonal mobilization of intracellular Ca^{2+} in liver. *J. Biol. Chem.* 259: 3077-3081, 1984.
- 17) Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., Nishizuka, Y.: Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 91: 1218-1224, 1979.
- 18) 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4報)— Ca^{2+} , phosphatidylserine, Diacylglycerol 依存性 Protein Kinase の分離—, アレルギー 33: 1053-1058, 1984.
- 19) 黒沢元博：ラット肥満細胞リン酸化反応に関する研究(第3報)—ラット白血病細胞 RBL-1 cell 由来, Ca^{2+} , リン脂質, Diacylglycerol 依存性 Protein Kinase—, 日薬理誌 86: 1-7, 1985.