

プラゾシンによる肝性リパーゼ分泌促進機構の解析に関する研究

福山大学薬学部 生化学研究室

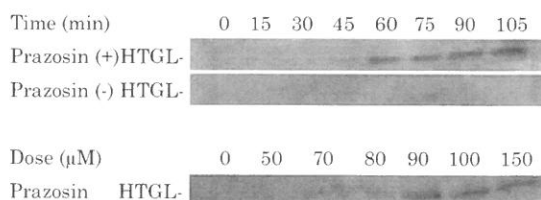
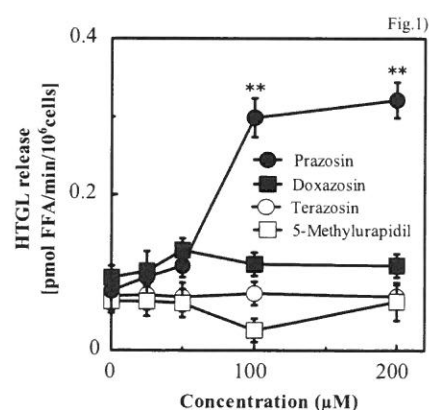
中村 徹也

肝性リパーゼ(HTGL)は、リポタンパク質代謝酵素の1つであり、カイロミクロンがリポタンパク質リパーゼ(LPL)によって加水分解を受けたカイロミクロンレムナントや中間比重リポタンパク質(IDL)中のトリアシルグリセロール(TG)を加水分解し、より高比重のリポタンパク質と遊離脂肪酸(FFA)を生じる。また HTGL は、高比重リポタンパク質(HDL)の代謝を介し、末梢からのコレステロール除去にも一役を担っている。すなわち HTGL は、生体における TG や FFA およびリポタンパク質の供給を調節し、脂質代謝上極めて重要な役割を担っている。事実、HTGL の欠損は、脂質異常症や動脈硬化症の発症要因になっている。この HTGL は分泌型糖タンパク質として肝実質細胞において粗面小胞体上で合成され、シグナルペプチド解離後、ゴルジ体での糖鎖修飾を受け分泌される。分泌された HTGL は肝細胞上や血管内皮細胞表面でヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合して係留されるが、分泌過程を含めその活性調節機構の詳細は不明である。

一方、プラゾシン(1-[4-amino-6,7-dimethoxy-quinazolin-2-yl]-4-[2-furoyl]piperazine)は、1965年に quinazoline を基本骨格に合成され、 α_1 アドレナリン受容体を選択的に遮断することで降圧作用を有する。このプラゾシンは近年、 α_1 アドレナリン受容体拮抗作用とは無関係と示唆される生理作用の報告が多くあり、特に脂質代謝に関しては、ショ糖食ラットで褐色脂肪組織における LPL 活性の増強や肝臓における TG の減少や 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA 還元酵素の活性抑制によるコレステロール低下などが報告されている。しかし、それらの作用の詳細なメカニズムは不詳であり、肝臓における HTGL の挙動については、全く検討がされていない。

そこで本研究では、肝臓における HTGL の生理的意義、特に分泌や活性調節におけるシグナル伝達機構を明らかにすることは脂質代謝において極めて重要と考え、その解析ツールの1つとしてプラゾシンを用い、初代培養肝細胞を用い検討を行った。

初代培養肝細胞は、24 時間絶食した Wistar 系雄性ラットを用い、コラゲナーゼ法及び遠心法により、遊離肝実質細胞を得、これを CO₂ 下、37℃、24 時間培養した。さらに培養液を交換後、各種薬剤存在下、温置した。この際、培養液中の HTGL 活性を分泌された本酵素活性の標品として、活性を測定した。この初代培養肝細胞にプラゾシン共存下温置させると、温置時間の経過およびプラゾシン濃度の増加に伴い HTGL の分泌を促進することが認められたが、他の quinazoline 系 α_1 アドレナリン受容体遮断薬では HTGL の分泌は認められなかった(Fig.1)。



このプラゾシンによる HTGL 分泌促進作用は、細胞内に存在する非受容体型チロシンキナーゼである Src チロシンキナーゼの関与が示唆された。また、Src チロシンキナーゼはホスホリパーゼ C(PLC)を活性化させることから検討したところ、プラゾシンによる本酵素の分泌に PLC 活性化の関与が示唆された。PLC は細胞膜構成成分であるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸(PIP₂)に作用し、イノシトール 1,4,5 三リン酸(IP₃)を生成するが、プラゾシンによる HTGL の分泌においても、IP₃ 量の増加による小胞体からの Ca²⁺放出が関与することを示唆された。また Ca²⁺とカルモジュリンの結合に続くカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK-II) の活性化について検討を行ったところ、プラゾシンによる本酵素の分泌に Ca²⁺/カルモジュリンの関与とそれに続く CaMK-II 活性化の関与が示唆された。また、カルモジュリンは、多機能タンパク質としてアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性化に関与することが知られており、本酵素の分泌においても AC の関与が認められた。AC の活性化は細胞内環状アデノシン一リン酸(cAMP)量の増加を引き起こす。またプラゾシンはホスホジエステラーゼ(PDE)の阻害作用も報告されていることから細胞内 cAMP 量を測定したところ、著しい増加が認められた。さらに cAMP はプロテインキナーゼ A(PKA)の活性化を示唆するところから、本酵素の分泌に PKA の関与を検討したところ、プラゾシンにより肝細胞内 PKA 活性は大きく上昇した。

以上の結果より、プラゾシンは細胞内に取り込まれ、非受容体型チロシンキナーゼを刺激し、PLC の活性上昇を引き起こし、IP₃ を増加させる。この IP₃ は小胞体に作用し、細胞内に Ca²⁺ 放出を促し、カルモジュリンと結合することで CaMK-II を活性化させる。さらにはアデニル酸シクラーゼの活性化により肝細胞内 cAMP の増加、それに伴う細胞内 PKA の活性化が引き起こすことを見出した。

すなわち、HTGL はこれらの経路により肝細胞内からの分泌が調節されており、プラゾシンはこれを活性化することで分泌を促進していることを明らかにした。

【論文発表】

- Nakamura T., Kerakawati R., Morita T.,
J. Health Sci., **56**, 462-466 (2010).
- Morita T., Tomioka K., Takada M., Nakamura T., Kerakawati-Fujita R.,
Med. Biol., **154**, 144-151 (2010).
- Nakamura T., Morita T.,
Med. Biol., **156**, 332-337 (2012).
- Nakamura T., Morita T.,
Biol. Pharm. Bull., **37**, 922-925 (2014).
- Nakamura T., Kamishikiryo J., Morita T.,
Pharmacol. Rep., **68**, 649-653 (2016).

学 位 審 査 報 告 書

学位申請者氏名 中 村 徹 也

学位論文題目 プラゾシンによる肝性リパーゼ分泌促進機構の解析に関する研究

論文審査委員

主 査 赤 崎 健 司

副主査 金 尾 義 治

副主査 井 上 敦 子

論文審査及び試験の結果の要旨

本論文は、リポタンパク質代謝酵素の1つであり、脂質代謝上極めて重要な役割を担っている肝性リパーゼ(HTGL; Hepatic Triacylglyceride Lipase, EC 3.1.1.3)の分泌過程を含む活性調節機構の解析を試みた内容である。本酵素は、血漿中にて可溶性を持つリポタンパク質として存在している肝臓で生成された超低比重リポタンパク質(VLDL)などに含まれるトリアシルグリセロール(TG)がリポタンパク質リパーゼ(LPL)によって加水分解を受けて生じたレムナント中の TG をさらに加水分解することでより高比重のリポタンパク質や遊離脂肪酸(FFA)を生成する。また HTGL は、高比重リポタンパク質(HDL)₂にも作用し、さらに高比重でコレステロールを引き抜く作用を持つ HDL₃ へ変換する。すなわち、本酵素は各組織への脂質の供給に対する律速段階を担っている。

そこで、申請者は α_1 アドレナリン受容体選択的遮断薬であるプラゾシンが HTGL 分泌促進作用を有することを見出し、これを用いて本酵素の分泌過程などの解析を行った。プラゾシンの HTGL 分泌促進作用は、プラゾシン構造類似体や非構造類似体の α_1 アドレナリン受容体選択的遮断薬では認められなかったことより、プラゾシンに特異的な作用であることが示唆された。プラゾシンによる HTGL 分泌促進作用が、肝細胞の非受容体型のおそらく Src チロシンキナーゼとこれを介するホスホリパーゼ C(PLC)活性化によることが示唆されたことから、プラゾシンと温置した肝細胞における PLC の活性を測定したところ、著しい活性上昇を認めた。このプラゾシンによる PLC 活性の上昇は、非受容体型 Src チロシンキナーゼおよび PLC の各阻害剤共存下で抑制された。さらにプラゾシンによる HTGL 分泌は、細胞内イノシトール 1,4,5 三リン酸(IP₃)量の増加や IP₃による小胞体からの細胞質

への Ca^{2+} 放出、さらに Ca^{2+} とカルモジュリンの結合、これによる Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK-II) の活性化が示唆された。そこでプラゾシン処理した肝細胞における CaMK-II 活性を測定したところ、その著しい活性上昇が認められた。

このカルモジュリンや CaMK-II の活性化は細胞内 cyclic AMP 準位の上昇を惹起する可能性が考え、検討を行ったところプラゾシンによって肝細胞におけるアデニル酸シクラーゼ (AC) の活性化と、これによる細胞内 cAMP 量の上昇、さらにそれに依存したプロテインキナーゼ A (PKA) の活性化が見い出された。またこの PKA 活性上昇は、非受容体型 Src チロシンキナーゼおよび PLC 並びにカルモジュリンと CaMK-II の各々の阻害剤にて抑制された。

これらの結果より、HTGL の分泌は、おそらく非受容体型 Src チロシンキナーゼを活性化と、これを介する PLC の活性上昇がホスファチジルイノシトール 4,5 二リン酸 (PIP_2) からの IP_3 産生を増加させ、これが小胞体から細胞質への Ca^{2+} の放出を促し、上昇した細胞内 Ca^{2+} がカルモジュリンと結合し、それに依存する CaMK-II の活性上昇を引き起こす段階を踏み、これらのシグナルが AC の活性化とそれに伴う細胞内 cyclic AMP 量の上昇を生じ、次いでこれを介する PKA の活性上昇によって、その分泌が促進されることを明らかにした。すなわちプラゾシンはおそらく細胞に取り込まれ、これらのシグナル伝達系を刺激することでその作用を発現していると考えられる。

以上のように、学位申請者は肝性リパーゼの分泌に関して、様々なシグナル伝達が密接に関与していることを解明している。本研究の成果は、肝性リパーゼの活性調節機構の解明や脂質異常症、さらには動脈硬化症の回避に大きく寄与するものと思われる。

本論文は、博士の学位論文としての価値を十分持つものと考えられる。また、学位論文公聴会における試問についても適切に解答したと判定した。

以上のことから、論文審査及び試験の結果を合格と認める。