

プラズミ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

目次

諸論	1
略語表	3
第1章 プラゾシンによる初代培養ラット肝細胞からの Hepatic Triacylglyceride Lipase の分泌に対する 受容体の関与	7
1-1 序論	7
1-2 試薬および動物	8
(1) 試薬	8
(2) 動物	8
1-3 実験方法	9
(1) 初代培養肝細胞の調製	9
(2) HTGL 活性の測定	10
(3) Western blotting による HTGL タンパク質の検出	10
(4) データ処理	11
1-4 実験結果	11
1-5 考察	14
第2章 プラゾシンによる HTGL 分泌に対する ホスホリパーゼ C の関与	23
2-1 序論	23
2-2 試薬および動物	23
(1) 試薬	23
(2) 動物	24
2-3 実験方法	24

(1) 初代培養肝細胞の調製	2 4
(2) HTGL 活性の測定.....	2 4
(3) Western blotting による HTGL タンパク質の検出	2 4
(4) ホスホリパーゼ C 活性の測定.....	2 4
(5) データ処理.....	2 5
2-4 実験結果	2 5
2-5 考察	2 6

第3章 プラゾシンによる HTGL 分泌に対する

Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の関与.....	3 1
3-1 序論	3 1
3-2 試薬および動物	3 2
(1) 試薬	3 2
(2) 動物	3 2
3-3 実験方法	3 2
(1) 初代培養肝細胞の調製.....	3 2
(2) HTGL 活性の測定.....	3 2
(3) Western blotting による HTGL タンパク質の検出	3 3
(4) Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 活性の測定	3 3
(5) データ処理.....	3 4
3-4 実験結果	3 4
3-5 考察	3 6

第4章 プラゾシンによる HTGL 分泌に対する

cyclic AMP およびプロテインキナーゼ A の関与	4 4
4-1 序論	4 4
4-2 試薬および動物	4 5
(1) 試薬	4 5
(2) 動物	4 5

4-3 実験方法	4 5
(1) 初代培養肝細胞の調製	4 5
(2) HTGL 活性の測定	4 5
(3) Western blotting による HTGL タンパク質の検出	4 6
(4) 細胞内 cAMP 量の測定	4 6
(5) プロテインキナーゼ A 活性の測定	4 6
(6) データ処理	4 7
4-4 実験結果	4 7
4-5 考察	4 9
総括	5 9
謝辞	6 3
論文目録	6 4
引用文献	6 5

緒論

食餌により吸収された脂質や肝臓および脂肪組織で合成された脂質は、血漿中を通り種々の組織や器官へ輸送される際、個々の形では存在せず、アポリポタンパク質と結合することにより可溶性を持つリポタンパク質として存在している¹⁾。この食餌による脂質は、小腸で吸収されカイロミクロンとなり血中に移行する。また肝臓に取り込まれ再合成を受けたリポタンパク質は、超低比重リポタンパク質(VLDL)としてトリアシルグリセロール(TG)を輸送しており、これらのリポタンパク質中に多く含まれる TG は血管内皮に係留されているリポタンパク質リパーゼ(LPL; Lipoprotein Lipase, EC 3.1.1.34)によって加水分解を受ける²⁾。この LPL と反応することによって生じたより高比重のリポタンパク質は、次いで肝性リパーゼ(HTGL; Hepatic Triacylglyceride Lipase, EC 3.1.1.3)によりリポタンパク質中の TG は加水分解を受けさらに一層高比重のリポタンパク質と遊離脂肪酸(FFA)およびグリセロールを生じ、生成された FFA は各組織や癌細胞などのエネルギーとして利用される^{2,3)}。またこの HTGL は、高比重リポタンパク質(HDL)の末梢からのコレステロール除去作用に関与するとされており、主に HDL₃が末梢などのコレステロールを引き抜き、より大きな HDL₂となったりリポタンパク質の TG を加水分解することで HDL₃へと戻る^{4,5)}。すなわち HTGL は、生体における TG や FFA などのレベルを調節することで脂質代謝上、極めて重要な一役を担っていると言える。そのため、HTGL の欠損は、TG と VLDL の蓄積を生じ、脂質異常症を発症する⁶⁾。

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合成され、N 末端リーダーペプチドが失われ、ラットでは 52~55kDa の高マンノース型となり、ゴルジによる輸送過程で、シアル酸を含むオリゴ糖の修飾を受け、成熟した 57~59kDa の HTGL として分泌される⁷⁾。この分泌された HTGL は類洞に面した肝細胞と内皮細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合して係留されているが、分泌過程や触媒活性調節機構の詳細は未だ不明瞭である⁷⁾。

一方、プラゾシン(1-[4-amino-6,7-dimethoxy-quinazolin-2-yl]-4-[2-furoyl]piperazine)は 1965 年に開発され、構造上の特徴として quinazoline 核を母核に持ち、当初はサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ(PDE)阻害剤として合成を目的とされていたが、交感神経の α_1 アドレナリン受容体を選択的に遮断する作用がある

ことが見出されたため血圧を低下させる初めての α_1 アドレナリン受容体選択的遮断薬として用いられてきている⁸⁾。現在においては、本態性高血圧症、腎性高血圧症や褐色細胞種、前立腺肥大症に伴う排尿障害に用いられる。その後の作用機序の解析が進み血管平滑筋の α_{1B} アドレナリン受容体を遮断することで降圧作用を示し、前立腺において尿道括約筋の $\alpha_{1A/1D}$ アドレナリン受容体を遮断することで括約筋を弛緩させ排尿障害の改善がなされている^{9,10)}。薬物動態としては血中に移行したプラゾシンは血漿タンパク質とその大部分が結合し、さらには投与量の大部分が肝臓に取り込まれグルクロン酸抱合等の多岐にわたる代謝を受け胆汁中に排泄される^{11,12)}。このプラゾシンを含むquinazoline系 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬は、 α_1 アドレナリン受容体拮抗作用による影響とは別に α_1 アドレナリン受容体を介していないとされる作用の報告が多く行われている。例えば、血管平滑筋細胞の増殖及び伸展の阻害作用が報告されており、反対に骨格筋でのせん断応力上昇における血管新生作用は α_1 アドレナリン受容体非依存的であり、これらは分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)が関与していると報告されている^{13,14)}。また前立腺がん細胞ではセルサイクルにおいてG2期の停止に続くアポトーシスの惹起、アルツハイマー病におけるアポリポタンパク質Eや抗炎症性サイトカインの増加、心的外傷後ストレス(PTSD)の改善などの報告もされている¹⁵⁻¹⁷⁾。さらにこれらプラゾシンを含むquinazoline系 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬は、高血圧患者におけるプラゾシンの長期投与でのHDL上昇およびコレステロール比(HDLコレステロール/VLDLコレステロール+LDLコレステロール)の上昇や3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル(HMG)-CoA還元酵素の活性抑制によるコレステロールの低下などが知られており、さらにプラゾシンはショ糖食摂取ラットの褐色脂肪組織においてLPL活性の増強やショ糖食摂取ラットでの肝TG分泌速度の減少など脂質代謝に影響を生じることが臨床知見から認められている¹⁸⁻²⁰⁾。このようにプラゾシンは脂質代謝に対し種々の作用を示す事が報告されているが、肝臓への作用は不明瞭な点が多く、HTGL分泌については不明である。

すなわち脂質代謝においてHTGLの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、極めて重要であると考えられる。そこで本研究においてはプラゾシンによる脂質代謝の挙動を調べることにより、本酵素の分泌過程を含む活性調節機構やプラゾシンのそれらへの関与を解析するため検討を行った。

略語表

本論文において用いた略語は、次の通りである。

HTGL	Hepatic Triacylglyceride Lipase
AC	Adenylate Cyclase
Adrenaline	(R)-4-(1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl)benzene-1,2-diol
Amiloride	3,5-Diamino-N-(aminoiminomethyl)-6-chloropyrizinamide
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
Calphostin C	[(2R)-1-[3,10-dihydroxy-12-[(2R)-2-(4-oxo)carbonyloxypropyl]-2,6,7,11-tetramethoxy-1-yl]propan-2-yl] benzoate
CaMK-II	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase II
Chelerythrine	1,2-Dimethoxy-12methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridin-12-ium
cAMP	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
CYP	Cytochrome P450
DAG	Diacylglycerol
DGK	Diacylglycerol kinase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Doxazosin	(RS)-2-[4-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxine-2-carbonyl)piperazin-1-yl]-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amine
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethlene Glycol Tetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethlene Glycol-bis(β -aminoethyl Ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
Epac	Exchange protein directly activated by cAMP
FBS	Fetal Bovine Serum
FFA	Free Fatty Acid

H-89	N-[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinoline-sulfonamide
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution 10× Concentrated
HDL	High Density Lipoprotein
Herbimycin A	[(2R,3S,5S,6R,7S,8E,10R,11S,12E,14E)-2,5,6,11-tetramethoxy-3,7,9,15-tetramethyl-16,20,22-trioxo-17-azabicyclo[16.3.1]docosa-8,12,14,18,21-pentaen-10-yl]carbamate
Hepes	N-2-Hydroxyethyl Piperazine-N-2-ethanesulfonic Acid
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HRP	Horseradish peroxidase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
Isoproterenol	(R)-3,4-dihydroxy-α-(isopropylaminomethyl)benzyl alcohol
KN-62	4-[(2S)-2-[(5-Isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl] phenylisoquinolinesulfonic acid ester
KN-92	2-[N-(4-Methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine, Phosphate
KN-93	2-[N-(2-hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]-amino-N-(4chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine
KT5720	(9R,10S,12S)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindol-o[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid, hexyl ester
LDL	Low Density Lipoprotein
L-nor-adrenaline	1-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-aminoethanol
LPL	Lipoprotein Lipase
LY294002	2-Morpholin-4-yl-8-phenylchromen-4-one
MDL-12,330A	Cis-N-(2-Phenylcyclopentyl)azacyclotridec-1-en-2-amine
5-Methylurapidil	5-Methyl-6[[3-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-propyl]-amino]-1,3-dimethyluracil
MOPS	3-(N-Morpholino) Propane Sulfonic acid
OCT	Organic Cation Transporter

PBS	Phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
Phenylephrine	(R)-3-(1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl)phenol
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Cyclic AMP dependent Protein kinase
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PP3	4-Amino-1-phenyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
Prazosin	1-[4-Amino-6,7-dimethoxy-quinazolin-2-yl]-4-[2-furoyl]-piperazine
PVDF	Polyvinylidene difluoride
Quin2/AM	8-Amino-2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-methoxyquinoline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymethylester
R59949	3-[2-[4-[Bis(4-fluorophenyl)methylidene]piperidin-1-yl]ethyl]-2-sulfanylidene-1H-quinazolin-4-one
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SH	Src homology
SKF-525A	α -Phenyl- α -propylbenzeneacetic acid 2-(diethylamino) ethyl Ester
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
ST-638	α -Cyan-3-ethoxy-4-hydroxy-5-phenyl-tiomethylcinnamide
TBA	Tetrabutylammonium
TCA	Trichloroacetic acid
Terazosin	(RS)-6,7-dimethoxy-2-[4-(tetrahydrofuran-2-ylcarbonyl)piperazin-1-yl]quinazolin-4-amine
TG	Triacylglyceride
TPA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

Triton X-100	Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether
Tween 20	Polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate
U-73122	1-[6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]- 1H-pyrrole-2,5-dione
U-73343	1-[6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]- 2,5-pyrrolidinedione
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
W-5	N-(6-Aminoethyl)-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride
W-7	N-(6-Aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide Hydrochloride
Xestospongin C	[1R-(1R,4aR,11R,12aS,13S,16aS,23R,24aS)]-eicosahydro-5H, 17H-1,23:11,13-diethano-2H,14H-[1,11]dioxacycloeicosaino[2, 3-b:12,13-b1]dipyridine

第1章 プラゾシンによる初代培養ラット肝細胞からの Hepatic Triacylglyceride Lipase の分泌に対する 受容体の関与

1-1 序論

脂質代謝に影響を与える薬剤は数多く存在しており、中でも quinazoline 系骨格を持つ α_1 アドレナリン受容体拮抗薬は、HDL やコレステロール比(HDL/LDL+VLDL)の上昇、HMG-CoA 還元酵素の抑制、LPL 活性の増加など脂質代謝に影響を与える事が以前から示唆されている¹⁸⁻²⁰⁾。反対に非選択性 β アドレナリン受容体拮抗薬やループ系、チアジド系利尿薬では LPL 活性の減少、コレステロール生合成の増加や HDL の低下、VLDL および LDL の増加の増加など脂質代謝に影響を与える事が報告されている^{21,22)}。

プラゾシンなど α_1 アドレナリン受容体拮抗薬の脂質代謝に対する作用は、血管における α_1 アドレナリン受容体の遮断により、他の臓器へのアドレナリンの作用の増強であると推測されていた。この α_1 アドレナリン受容体には α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D} サブタイプが存在しておりラット肝臓において α_{1B} のみ発現していると報告されている^{23,24)}。これらサブタイプの発現は異なっており、 α_{1B} は細胞膜上に、 α_{1A} は細胞膜と細胞質に、 α_{1D} は細胞質に多く局在する²⁴⁾。また α_1 アドレナリン受容体には α_{1L} サブタイプも報告されており、プラゾシン低感受性(low affinity)である事より α_{1L} と呼ばれ、ヒト前立腺やウサギ耳動脈組織に発現している²⁵⁾。プラゾシンの受容体感受性は α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D} に対し高い親和性を持つ受容体拮抗薬であるが、この受容体のアゴニスト非存在下で受容体が自発的に持っている活性(構成的活性)を抑制する逆作用薬(inverse agonist)として構成的な反応を抑えるとされている²⁶⁾。しかしこれらに分類される薬剤の特異的な作用は多く、近年の報告では α_1 アドレナリン受容体に非依存的な作用としての報告も少なくない^{13,14)}。更には肝臓にも発現している有機カチオントランスポーター(OCT)1 の強力な阻害剤としても知られており、

多様なプラゾシンの作用が認められている²⁷⁾。緒論で述べたようにプラゾシンは、シヨ糖食摂取ラットの褐色脂肪組織において LPL の活性増強¹⁸⁾などが報告されているが、その活性増強のメカニズムは不明瞭であり、詳細は検討されていない。またラット副睾丸脂肪組織においてバナジン酸ナトリウムによる LPL の遊離や初代培養ラット肝細胞においてヘパリンによる HTGL の遊離に膜受容体型チロシンキナーゼの関与^{28,29)}が報告されており、プラゾシンでも関与が推測される。

そこで本章では、プラゾシンの標的として α_1 アドレナリン受容体を含む、細胞膜受容体の関与を考慮し、脂質代謝関連酵素である HTGL の分泌に対し検討を行った。

1-2 試薬および動物

(1)試薬

Prazosin、Adrenaline、Amiloride、L-nor-Adrenaline、Doxazosin、Isoproterenol、Phenylephrine、TBA、インスリン、デキサメタゾン、アプロチニン、コラゲナーゼは和光純薬から、Herbimycin A はコスモバイオ社から、5-Methylurapidil、PP2、PP3、Terazosin、Williams' medium E はシグマ社から、ハンクス①は日水製薬から、SKF-525A はメルクミリポア社から、トリプシンインヒビター(大豆製)及び Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)、ST638 はライフテクノロジー社から、Triolein,[carboxyl-¹⁴C]- (2.59GBq/mmol)はパーキンエルマー社から、リッキシンチは National Diagnostius 社から購入したものを使用した。その他の試薬は、生化学用特級を使用した。

(2)動物

体重 200~300g の Wistar 系雄性ラット(清水実験材料)を購入後、1~2 週間、固形飼料 CE-2(日本クレア)で飼育し、実験前 24 時間絶食して用いた。

なお動物実験は、福山大学学術研究倫理審査委員会にて承認を得られている(承認番号：H-27-動-16)。

1-3 実験方法

(1)初代培養肝細胞の調製

肝実質細胞はコラゲナーゼを用いた **Berry&Friend** の方法³⁰⁾を一部改変³¹⁾して、分離精製した。24時間絶食した **Wistar** 系雄性ラットを開腹後、門脈内に留置針(サーフロー留置針 C 型 16G×2 1/2")を挿入し、前灌流緩衝液を灌流させると同時に下大動脈を切断し、脱血及び緩衝液の放出を行った。その後、コラゲナーゼ溶液に交換し、再び灌流を行い、灌流後、直ちに肝臓を摘出し氷冷したハンクス溶液中に移した。摘出した肝臓をはさみで細分し、これをガーゼで濾過し、肝細胞を分散させた。その後、遠心(90×g, 1min, 4°C; クボタ製 5922 型)し、細胞を沈降させた。上清を除いた後、氷冷ハンクス溶液を同量加えて細胞を懸濁・分散させ、遠心(50×g, 1min, 4°C; クボタ製 5922 型)を2回繰り返す、得られた沈殿分画を遊離肝実質細胞とした。

採取した遊離肝実質細胞は **Williams' medium E** 培養液(0.22% NaHCO₃, 10% FBS, 10⁻⁸M インスリン, 10⁻⁸M デキサメタゾン, 5kIU アプロチニン 含有, pH 6.9)を用い、プラスチックディッシュ(**FALCON PRIMARIA**)上で細胞の濃度が 1×10⁵cells/cm² となるように懸濁し、37°C、5%CO₂ 下 CO₂ インキュベータで 24 時間培養を行った。

24 時間培養後、培養液を **Williams' medium E** 培養液(0.22% NaHCO₃, 2% BSA 含有, pH 6.9)に交換した。更に、各種薬剤存在下、t 時間培養を継続した後、その培養液を採取し、遠心(1500×g, 10min, 4°C; クボタ製 KR-1500)し、得られた上清を肝細胞より遊離された **HTGL** の粗酵素標品とした。また培養肝細胞 1g に対し、**Krebs-Ringer** 緩衝液(119mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 4.8mM KCl, 0.5mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, pH 7.4, 4°C) 10ml を加え、細胞採取後、遠心(1500×g, 10min, 4°C; クボタ製 KR-1500)、上清を捨て凍結させる。この細胞量に対して 10 倍希釈量の細胞破碎液(10mM HEPES, トリプシンインヒビター 0.005%, PMSF 2mM, pH 7.4)を加え、氷冷下、超音波破碎(10sec×2, 4°C; **S&M** 社製 **Vibra-cell ultrasonic processor**)を行い、超遠心(105,000×g, 60min, 4°C; **ベックマン**製 **L-100 XP Ultracentrifuge**)を行った。その遠心上清を肝細胞内 **HTGL** 粗酵素標品とした。各種薬剤は、水溶媒とし、水に不溶な試薬は細胞に影響のない濃度の **DMSO** に溶かし使用した。

(2)HTGL 活性の測定

HTGL の活性は、Schotz らの方法³²⁾を用い、すなわち、0.2M Tris-HCl 緩衝液、Triolein,[carboxyl-¹⁴C]- (1.21 μ M; 3.1kBq/ml)、0.3% BSA、0.075% Triton X-100、pH 8.6(28°C)0.4ml を氷中で超音波処理(5min; S&M 社製 Sonifire)して乳化処理し、これに 0.37M Tris-HCl/3.2M NaCl 緩衝液(2% BSA, pH 8.8, 28°C)0.39ml を加えた反応液 0.79ml に粗酵素標品 0.2ml を添加し、28°C で 30 分間温置した。反応は、停止液(イソプロパノール:3N H₂SO₄=40:1)2ml を添加して停止させた後、ヘキサン 2ml 及び精製水 1ml を加えて 1 分間振盪して、遊離脂肪酸を抽出した。ついで遠心(1500 \times g, 7min, 4°C; 日立製 05PR-22 型)し、上層のヘキサン層を採取し、これに 0.1N KOH 500 μ l を加えて、10 分間振盪する。遊離脂肪酸を含むアルカリ層(下層)300 μ l を採取し、リッキシンチ 5ml を加え、液体シンチレーションカウンター(アロカ製 LSC-6100 型)で遊離脂肪酸の放射活性を測定した。HTGL の活性は、pmol FFA/min/10⁶cells で表し、3 ないし 4 検体の平均及び標準誤差で示した。

(3)Western blotting による HTGL タンパク質の検出

BSA を標準タンパク質とし Bradford 法³³⁾に従って吸光度を測定し標準曲線を作成した。その後、未知サンプルの吸光度を測定しタンパク量を揃えた後、可溶化溶液(2% SDS, 4% 2-mercaptoethanol 含有)を加え、100°C で 5 分間煮沸し、Laemmli 法³⁴⁾に従い SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)(200V, 40mA, 60min, ゲルに 0.1%SDS/10%Acrylamide 含有)を行った。膜への転写は、Towbin らの方法³⁵⁾に準じて行った。すなわち、SDS-PAGE 後、ゲルとポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜(GE ヘルスケア社)にブロッティング緩衝液(0.2M Glycine, 100mM Tris, 5% メタノール)を飽和させ、セミドライ式ブロッティング装置(40V, 200mA, 60min, ATTO 社製 AE-6687)を用いて転写を行った。PVDF 膜に転写後、1%脱脂粉乳を含む PBS でブロッキング(1% スキムミルク, 1% Tween 20, 室温, 60min)を行い、PBS で洗浄(5min \times 5)し、0.1%脱脂粉乳を含む PBS で適量に希釈したウサギ抗体(1 次抗体)と反応させた(室温, 60min)。反応後、PBS で洗浄(5min \times 5)し、0.1%脱脂粉乳を含む PBS で適量に希釈したヤギ抗ウサギ IgG-HRP 複合体(2 次抗体)と反応させた(室温,

60min)。 反応後、PBS で洗浄(5min×5)し、ウェスタンブロット用化学発光試薬 (ImmunoStar® Zeta, 和光社)に浸し、イメージングシステム(BIO-RAD 社製 ChemiDoc XRS)で化学発光の検出を行った。

(4)データ処理

結果は平均±標準誤差で示した。 有意差検定は、Student's t-test、Welch t-test、及び Dunnett's-test、Tukey's-test を用いて行った。

1-4 実験結果

(1) プラゾシンの経時変化及び濃度変化による HTGL の分泌

Fig.1 は、プラゾシン共存下、肝細胞との温置による時間の経過及びプラゾシンの濃度の増加による HTGL の分泌について示している。 プラゾシンにより時間依存的(Fig. 1A-1a)及び濃度依存的(Fig. 1A-1b)に HTGL 分泌は促進した。 また HTGL タンパク質は、活性の増加に比例して時間依存的(Fig. 1B-1a)及び濃度依存的(Fig. 1B-1b)に増加した。

(2) 各種 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬の濃度変化による HTGL 分泌の比較 及び薬剤構造による作用

quinazoline 系 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬としてプラゾシン、ドキサゾシン³³⁾、テラゾシン³⁴⁾を用い、また異なる骨格の α_1 受容体拮抗薬である 5-メチルウラピジル³⁵⁾を用いてこれらの濃度変化による HTGL の分泌について、プラゾシンにおける特異性の検討を行った。 HTGL の分泌はプラゾシン特異的に促進が認められた(Fig. 2A-2a)。 また母核である quinazoline 自体を肝細胞と共に温置しても HTGL 分泌作用は認められなかった(Fig. 2A-2b)。 また HTGL タンパク質は、プラゾシンのみ

濃度依存的に増加したが、ドキサゾシン、テラゾシン、5-メチルウラピジルおよびキナゾリンの濃度を増加させても HTGL タンパク質の分泌は認められなかった(Fig. 2B)。

(3) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する細胞内外の HTGL 活性

プラゾシンによる HTGL 分泌による細胞内 HTGL 活性の変化の検討を行った。プラゾシンと肝細胞との温置により細胞外の HTGL 活性は増加(Fig. 3A-3a)したのに対し、細胞内 HTGL 活性は低下した(Fig. 3A-3b)。さらに HTGL タンパク質では、プラゾシン非添加群における細胞内 HTGL タンパク質は保持されたが、プラゾシン添加群では細胞内 HTGL タンパク質は、時間依存的に減少が認められた(Fig. 3B)。

(4) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する α, β アドレナリン受容体刺激薬の効果

アドレナリン受容体拮抗薬のプラゾシンによる HTGL 分泌は α, β アドレナリン受容体刺激薬で抑制されるかどうか、アドレナリン受容体の関与について検討を行った。 α, β アドレナリン受容体刺激薬である(±)-Adrenaline、 α, β_1 アドレナリン受容体刺激薬である L-nor-Adrenaline、 α_1 アドレナリン刺激薬である Phenylephrine、 β アドレナリン受容体刺激薬である Isoproterenol の共存下、プラゾシンによる HTGL の分泌は各種薬剤の濃度を増加しても影響が認められなかった(Fig. 4A)。また HTGL タンパク質においても、各種薬剤の濃度を増加しても影響が認められなかった(Fig. 4B)。

(5) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の効果

プラゾシンによる HTGL 分泌に対する受容体型チロシンキナーゼの関与について検討を行った。ピラジン誘導体のチロシンキナーゼ阻害剤である Amiloride³⁶⁾共存下、プラゾシンによる HTGL の分泌は、ほとんど変化が認められなかった。また

上皮成長因子(EGF)受容体などのチロシンキナーゼを抑制することで知られているケイヒ酸誘導体のチロシンキナーゼ阻害剤である ST-638³⁷⁾共存下に置いてもほとんど変化が認められなかった(Fig. 5A)。また HTGL タンパク質においても、各種薬剤の濃度を増加しても影響が認められなかった(Fig. 5B)。

(6) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する

非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の効果

プラゾシンによる HTGL 分泌に対する非受容体型チロシンキナーゼの関与について検討を行った。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選択的阻害剤である PP2³⁸⁾により、プラゾシンによる HTGL の分泌は大きく抑制された。一方、Src チロシンキナーゼに阻害作用はなく、EGF 受容体チロシンキナーゼに阻害作用を持ち PP2 のネガティブコントロールである PP3³⁹⁾ではほとんど効果が認められなかった。また Src のシステイン残基の SH 基と反応し Src チロシンキナーゼを阻害する Herbimycin A⁴⁰⁾の濃度増加に伴い著しく抑制された(Fig. 6A)。同様に HTGL タンパク質においても、PP2 では抑制が認められたが、PP3 では抑制が認められなかった(Fig. 6B-6a)。さらに、Herbimycin A の濃度依存的に抑制が認められた(Fig. 6B-6b)。

(7) プラゾシンと標的を同じとするトランスポーター阻害剤の効果

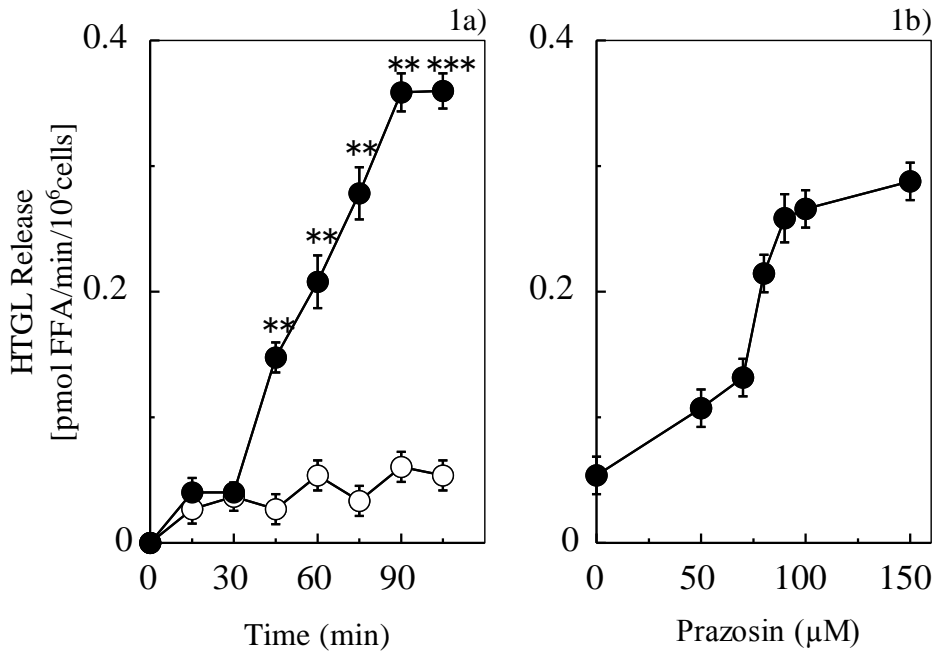
及びプラゾシンによる HTGL 分泌に対する代謝阻害剤の効果

プラゾシンは OCT を阻害する報告があり²⁷⁾、肝臓には OCT1 が発現していることから OCT1 阻害剤について検討を行った。OCT1 阻害剤である Tetrabutylammonium(TBA)によるトランスポーター阻害では HTGL 分泌に変化は認められなかった(Fig. 7A-7a)。一方、非特異的にチトクローム P450(CYP)を阻害する代謝阻害剤である SKF-525A⁴¹⁾により著しい HTGL 分泌抑制が認められた(Fig. 7A-7b)。さらに、SKF-525A の濃度依存的に HTGL タンパク質においても著しい抑制が認められた(Fig. 7B-7b)。

1-5 考察

初代培養ラット肝細胞を用いた本実験系において、HTGL の分泌はプラゾシン添加により、時間の経過及びプラゾシンの濃度増加に伴い促進される事を報告している⁴²⁾。プラゾシンは通常、血管などのアドレナリン α_1 受容体を選択的に遮断することによりその薬効を示す。しかし、図 2.に示すようにアドレナリン α_1 受容体遮断薬の中でプラゾシンによる HTGL 分泌作用は特異的であり、また図 4.に示すように受容体を刺激しても変化がないことから、プラゾシンによる HTGL 分泌は、細胞膜上のアドレナリン受容体の関与は低いことが示唆された。更には HTGL の分泌促進は、細胞表面における受容体型チロシンキナーゼの関与が示唆されている事から^{28,29)}、プラゾシンによる肝細胞からの HTGL 分泌も受容体型チロシンキナーゼの関与の検討を行ったが、図 5.のように細胞膜に特異的なチロシンキナーゼ阻害剤では抑制が認められなかった。しかし、図 6.に示すように非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤におけるプラゾシンによる HTGL 分泌は抑制が認められた。また、図 7.ではプラゾシンで阻害作用が報告されている OCT についても検討を行ったが、OCT 阻害剤での変化は認められなかった。一方、薬物代謝酵素である CYP 阻害剤による HTGL 分泌は著しく抑制が認められ、プラゾシンは細胞内に入ること何らかの影響により HTGL の分泌を促進していることが示唆された。Erve らは、*in vitro* においてプラゾシンはその構造中のフラン骨格の代謝物が細胞に影響を与えると報告している¹²⁾。近年、プラゾシンや他のアドレナリン受容体関連薬において、受容体に対する元々の作用とは違ったそれぞれ特異的な作用が数多く報告されており、プラゾシンによる HTGL 分泌にもその可能性が示唆される。すなわち、プラゾシンによる HTGL 分泌は、肝細胞内に移行したプラゾシンが CYP 代謝を受ける事により、何らかの生物活性を得ることで、おそらく非受容体型チロシンキナーゼ、なかでも Src チロシンキナーゼを介して HTGL の分泌を促進している事が示唆された。

1A)



1B)

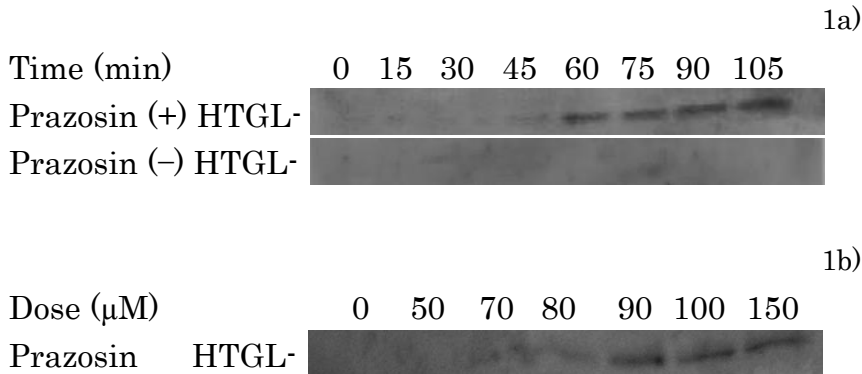


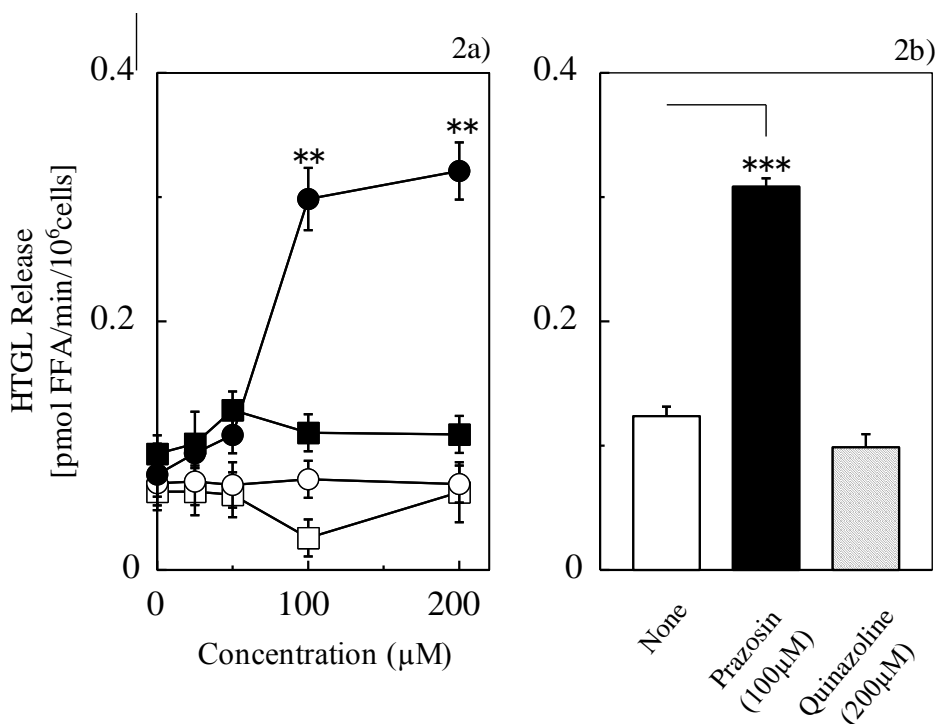
Fig.1. The Time Course of HTGL Release from Hepatocyte by Stimulated Prazosin and the Prazosin Concentration Dependence on release of HTGL

1A) 1a) The hepatocytes were incubated for 0-105 min either with (●) or without (○) 100 μM prazosin. 1b) The hepatocytes were incubated for 60 min with various concentrations (0-150 μM) of prazosin.

Significant differences compared with the control: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

1B) Western blot analysis with an HTGL antibody. HTGL protein is released by prazosin time- and dose-dependent manner. The incubation time is 0-105 min with (±) 100 μM prazosin, and dose response is incubated 60 min with 0-150 μM concentrations prazosin.

2A)



2B)

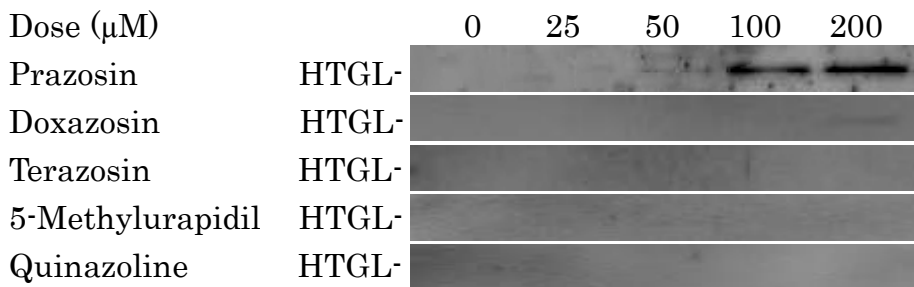
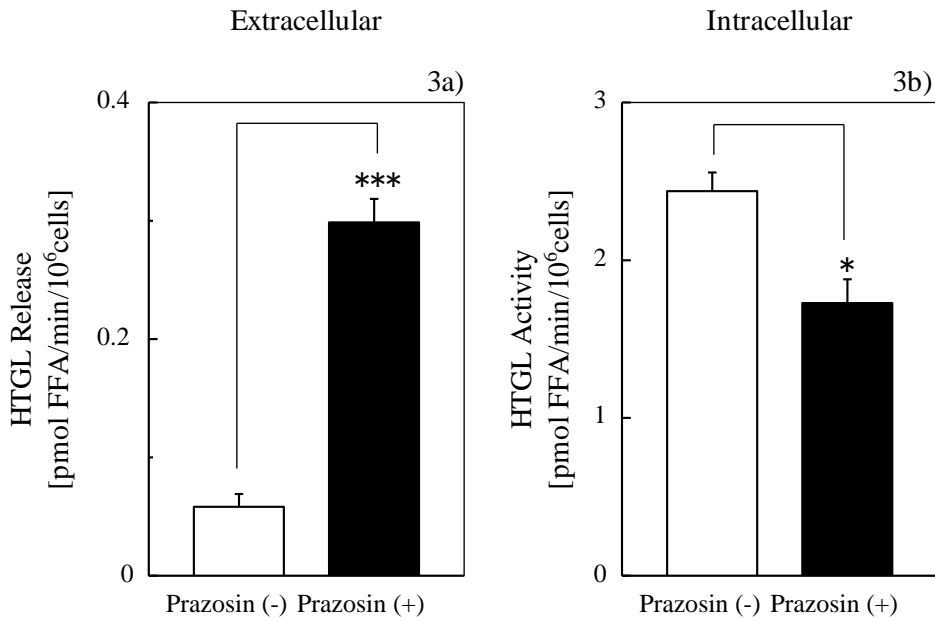


Fig. 2. Comparison of HTGL Release by Alpha 1 Adrenoceptor Antagonists and Effect of Quinazoline Structure on Release of HTGL from Hepatocyte

2A) 2a) The hepatocytes were incubated for 60 min with various alpha 1 adrenoceptor antagonists; prazosin (●), doxazosin (○), terazosin (■), 5-methylurapidil (□). 2b) The hepatocytes were incubated for 60 min with prazosin (black bar) or quinazoline (slash bar). Significant differences compared with each alpha 1 adrenoceptor antagonists: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

2B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with 0-200 μM of various alpha 1 adrenoceptor antagonists and quinazoline, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

3A)



3B)

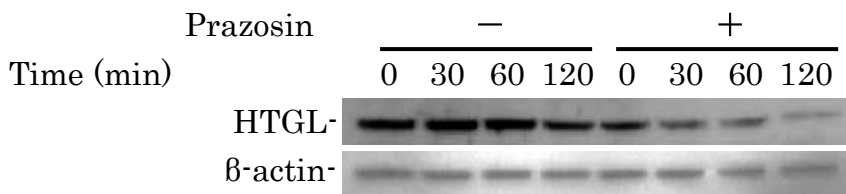


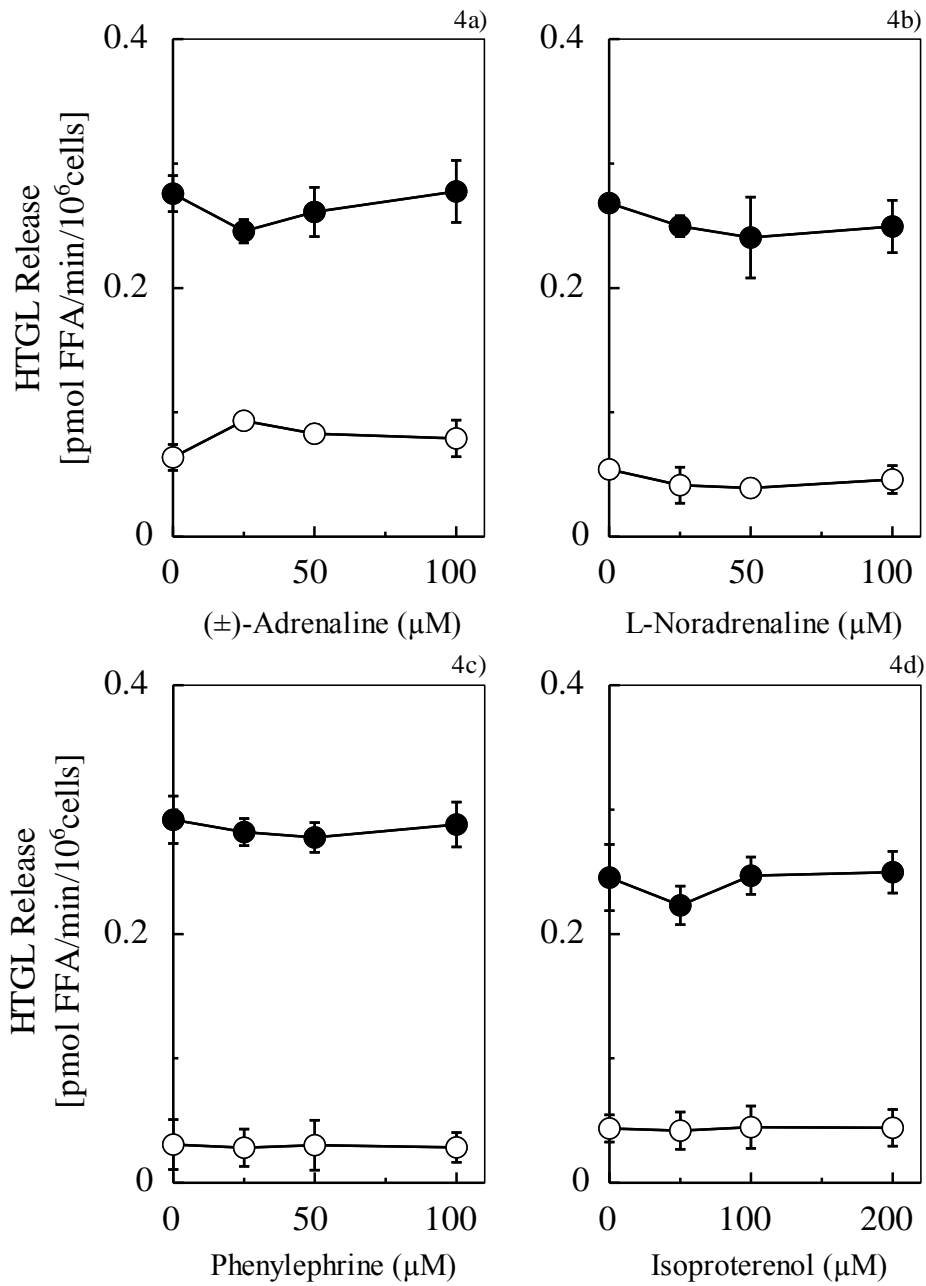
Fig. 3. Extracellular HTGL Release from the Hepatocyte and Intracellular HTGL Activity of the Hepatocyte

3A) 3a) The HTGL release from hepatocytes were increased to incubate for 60 min with prazosin (black bar). 3b) The intracellular HTGL activity in the hepatocytes were decreased to incubate for 60 min with prazosin (black bar).

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

3B) The hepatocytes were incubated for 0-120 min with (\pm) prazosin, the hepatocytes were lysated and centrifuged for western blot analysis with an HTGL antibody. The β -actin antibody is used for the loading control.

4A)



4B)

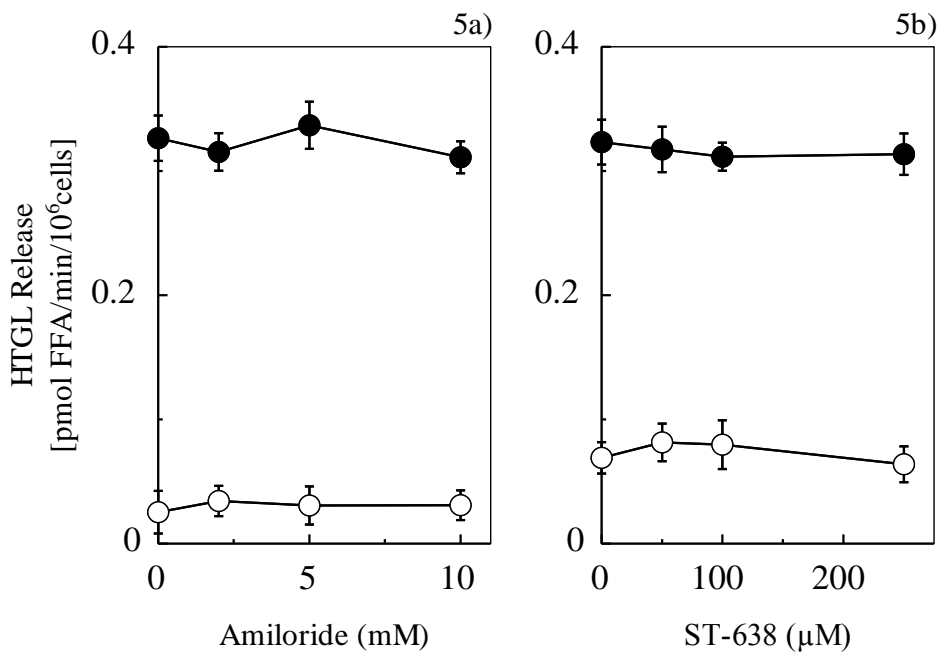
	Prazosin -				Prazosin +				
(±)-Adrenaline (μM)	0	25	50	100	0	25	50	100	4a)
HTGL-									
L-Noradrenaline (μM)	0	25	50	100	0	25	50	100	4b)
HTGL-									
Phenylephrine (μM)	0	25	50	100	0	25	50	100	4c)
HTGL-									
Isoproterenol (μM)	0	50	100	200	0	50	100	200	4d)
HTGL-									

Fig. 4. Effects of Adrenoceptor agonists on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

4A) 4a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μ M, ●) or without (○) in the presence of (\pm)-adrenaline. 4b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μ M, ●) or without (○) in the presence of L-noradrenaline. 4c) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μ M, ●) or without (○) in the presence of phenylephrine. 4d) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μ M, ●) or without (○) in the presence of isoproterenol. No significant differences.

4B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (\pm) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of 0-200 μ M of various adrenoceptor agonists, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

5A)



5B)

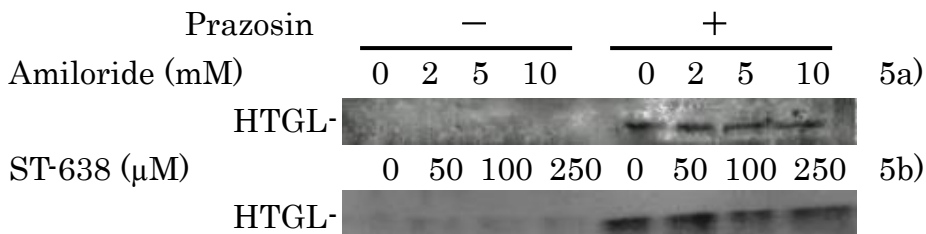


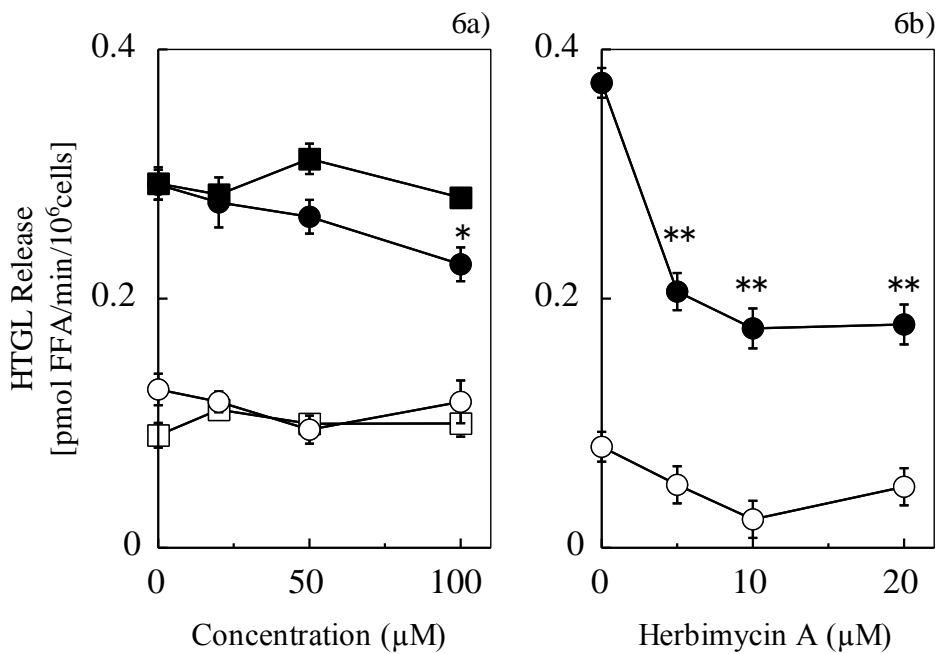
Fig. 5. Effects of Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

5A) 5a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of amiloride. 5b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of ST-638.

No significant differences.

5B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of receptor tyrosine kinase inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

6A)



6B)

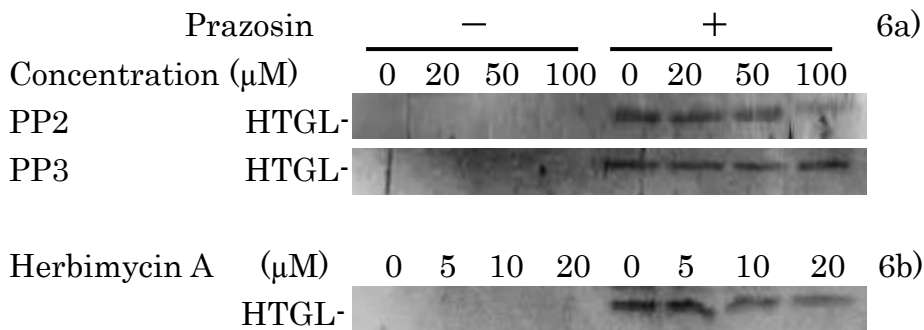


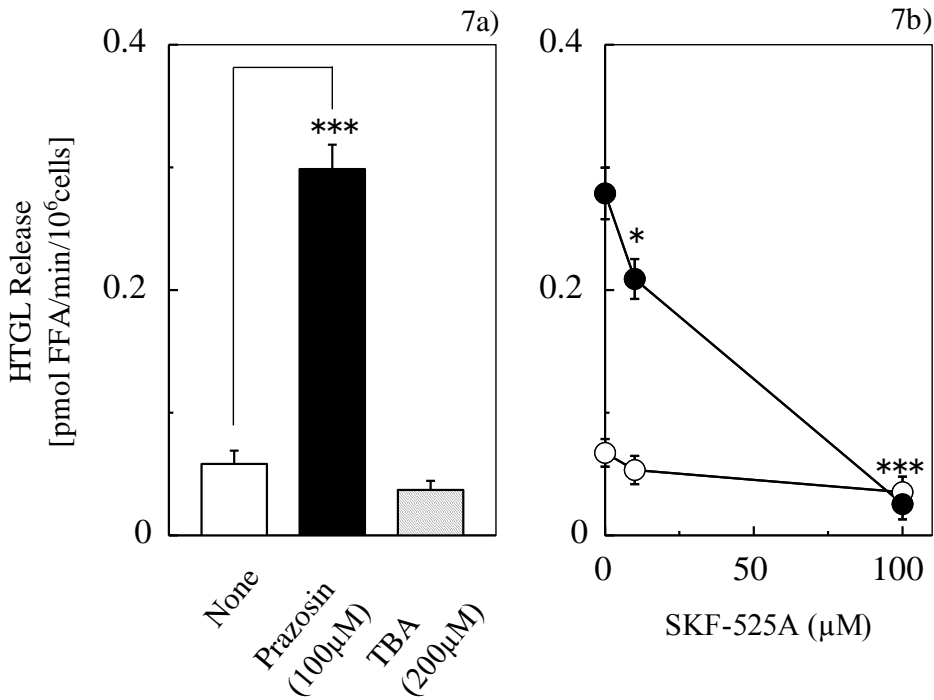
Fig. 6. Effects of Non-receptor Tyrosine Kinase Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

6A) 6a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●,■) or without (○,□) in the presence of PP2 (○,●) and PP3 (□,■). 6b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of herbimycin A.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

6B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of non-receptor tyrosine kinase inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

7A)



7B)

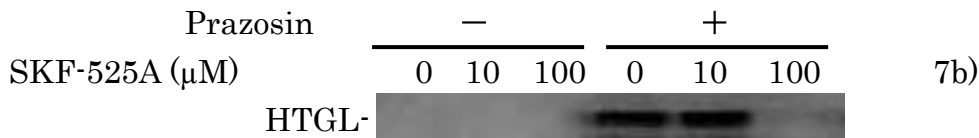


Fig. 7. Effects of Organic Cation Transporter Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

7A) 7a) The hepatocytes were incubated for 60 min with prazosin (black bar) or TBA (slash bar). 7b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of SKF-525A.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

7B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of 0-100 μM SKF-525A, the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

第2章 プラズシンによる HTGL の分泌に対する ホスホリパーゼ C の関与

2-1 序論

第1章において、プラズシンによる HTGL の分泌は非受容体型 Src チロシンキナーゼを介することが示唆された。近年、Src チロシンキナーゼはホスホリパーゼ C(PLC)のリン酸化と活性化が起こることが報告されている⁴³⁾。PLCの活性化によってホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PIP₂)を分解しイノシトール 1,4,5-三リン酸(IP₃)とジアシルグリセロール(DAG)の2つのセカンドメッセンジャーを産生することで生体内へのシグナル伝達を通して様々な細胞機能の調節に関与している⁴⁴⁾。Kerakawati らの報告によるとエンドセリン-1によるマウスエールリッヒ腹水癌細胞からの LPL 分泌は細胞内の PLC を介することが報告されている⁴⁵⁾。

本章では、プラズシンによる HTGL の分泌に対するチロシンキナーゼの影響を受ける因子として PLC の関与について検討を行った。

2-2 試薬及び動物

(1)試薬

U-73122、U-73343、コール酸ナトリウム(cholate-Na)及び dithiothreitol(DTT)は和光純薬から、Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [myo-inositol-2-³H(N)] PIP₂は室町薬品から購入したものを使用した。その他の試薬は、本論文第1章 1-2(1)に示した。

(2)動物

本論文第1章1-2(2)に記載した Wistar 系雄性ラットを飼育し、実験前 24 時間絶食して用いた。なお動物実験は、福山大学学術研究倫理審査委員会にて承認を得られている（承認番号：H-27-動-16）。

2-3 実験方法

(1)初代培養肝細胞の調製

遊離肝実質細胞の調製及び初代培養法は、本論文第1章1-3(1)に示した。

(2)HTGL 活性の測定

HTGL 活性の測定法は、本論文第1章1-3(2)に示した。

(3)Western blotting による HTGL タンパク質の検出

Western blotting による HTGL タンパク質の検出法は、本論文第1章1-3(3)に示した。

(4)ホスホリパーゼ C 活性の測定

肝実質細胞を本論文第1章1-3(1)で示した方法で各種薬剤などと温置した後、培養肝細胞 1g に対し氷冷した 20mM HEPES-K 緩衝液(1mM DTT, 0.25M Sucrose, 1mM EDTA, 0.7% cholate-Na 含有, pH7.0, 4°C)500 μ l を加え、氷冷下破碎(15sec \times 2, 4°C; 日音製ハンディマイクロホモジナイザー)をした。これを、遠心(4°C, 10,000 \times g,

30min)し、この遠心上清を PLC の粗酵素標品とした。

PLC 活性は、Higashi らの方法⁴⁶⁾に準じて測定した。0.37kBq Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [myo-inositol-2-³H(N)] PIP₂を基質とし、これを 100mM Hepes-K 緩衝液(1mM DTT, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA, 1% cholate-Na, 0.8 mg/ml phosphatidylcholine 含有, pH7.0, 4°C)に加え、これに粗酵素標品 5 μ l を加え 37°C で 10 分間温置した。予め、反応開始前の対照には、10%TCA を 100 μ l 加えた。その後、10%TCA を 100 μ l 加え反応を停止し、遠心(16,000 \times g, 5 min)し、生成した[2-³H]IP₃を含む上清 100 μ l を採取し、これにリッキシンチ 2ml を加え、液体シンチレーションカウンター(アロカ製 LSC-6100 型)によって放射活性を測定した。PLC 活性は、fmol/min/10⁶ cells で表し、3 ないし 4 検体の平均及び標準誤差で示した。

(5)データ処理

本論文第 1 章 1-3(4)に示した。

2-4 実験結果

(1) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する PLC 阻害剤の効果

プラゾシンによる HTGL 分泌に対する PLC の関与について検討を行った。PLC に特異的な阻害剤である U-73122⁴⁷⁾の濃度増加に伴いプラゾシンによる HTGL の分泌は著しく抑制された。一方、U-73122 の構造類似体で PLC 阻害作用が極めて低い U-73343⁴⁸⁾では濃度を増加してもほとんど変化は認められなかった(Fig.8A)。同様に HTGL タンパク質においても、U-73122 の濃度増加に伴い抑制されたが、U-73343 では濃度を増加してもほとんど変化は認められなかった(Fig.8B)。

(2) PLC 活性に対するプラゾシンの効果

肝細胞とプラゾシン共存下、細胞内 PLC 活性の変化について検討を行った。Fig.9a は肝細胞とプラゾシンの温置時間の経過における細胞内 PLC 活性の変化について示している。0~30 分間のプラゾシンとの温置により、PLC 活性はコントロールと比較し、10 分で約 1.5 倍の上昇を示した。また、Fig.9b は肝細胞とプラゾシンの濃度増加における PLC 活性の変化を示している。プラゾシンの濃度増加に伴い肝細胞内 PLC 活性は上昇した。

(3) プラゾシンによる PLC の活性上昇に対するチロシンキナーゼ阻害剤

及び PLC 阻害剤の効果

Fig.10 はプラゾシンによる細胞内 PLC 活性の上昇に対する非受容体型チロシンキナーゼ及び PLC の関与について示している。プラゾシンによる PLC 活性の上昇は、非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤である PP2、Herbimycin A 存在下、阻害が認められた。また PLC 阻害剤である U-73122 存在下、阻害は認められたが、U-73122 の構造類似体で PLC 阻害作用の低い U-73343 存在下では阻害作用は低かった。

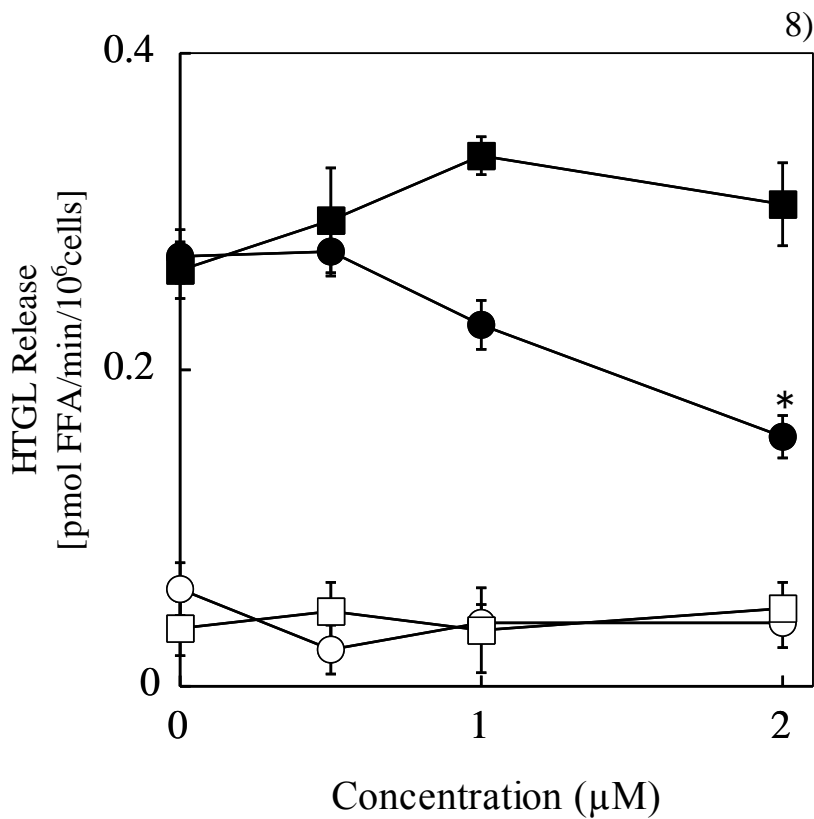
2-5 考察

PLC にはアイソザイムが存在しており哺乳動物では現在 13 種類同定されているが、各構造の違いに従って 6 種の型に大別されている。PLC β は 7 回膜貫通型受容体および 3 量体 G タンパク質とカップリングして活性化されるが、PLC γ は PLC のアイソザイムであり SH ドメインを持つ。また Src チロシンキナーゼには Src 相同(SH)ドメインが存在しており、Src のチロシンリン酸化によって SH2 ドメインを介して結合し、PLC γ 自身もチロシンリン酸化され、活性化される。またチロシンキナーゼの活性化に伴いリン酸化された PLC γ は PIP₂ を分解し IP₃ と DAG の 2 つのセカンドメッセンジャーを産生することが知られている。

これらの結果から、プラゾシンによる肝細胞からの HTGL 分泌は、PLC 阻害剤に

より抑制されたことにより、肝細胞における PLC 活性の挙動を調べた。すると、肝細胞内の PLC 活性は、プラゾシンと肝細胞の温置時間の経過及びプラゾシンの濃度の増加に伴い上昇した。更にはその PLC 活性上昇は、非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤や PLC 阻害剤により抑制が認められた。Xu らの報告によると細胞外マトリックスによる c-Src を介した PLC の活性化が報告されている⁴⁹⁾。すなわち第 1 章の結果で、プラゾシンによる HTGL の分泌は G タンパク質との関与は低いことが示唆されるため、プラゾシンによる HTGL の分泌は、おそらくプラゾシンが細胞内に移行することで非受容体型チロシンキナーゼを刺激し、自己リン酸化を引き起こし、PLC を活性化させる事で IP₃ および DAG の産生が関与している事が示唆された。

8A)



8B)

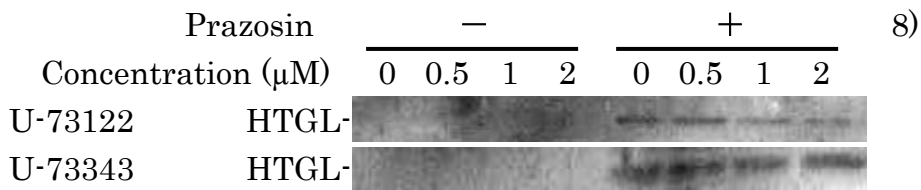


Fig. 8. Effects of Phospholipase C Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

8A) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●,■) or without (○,□) in the presence of U-73122 (○,●) and U-73343 (□,■).

Significant differences compared with the control: **p*<0.05.

8B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of PLC inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

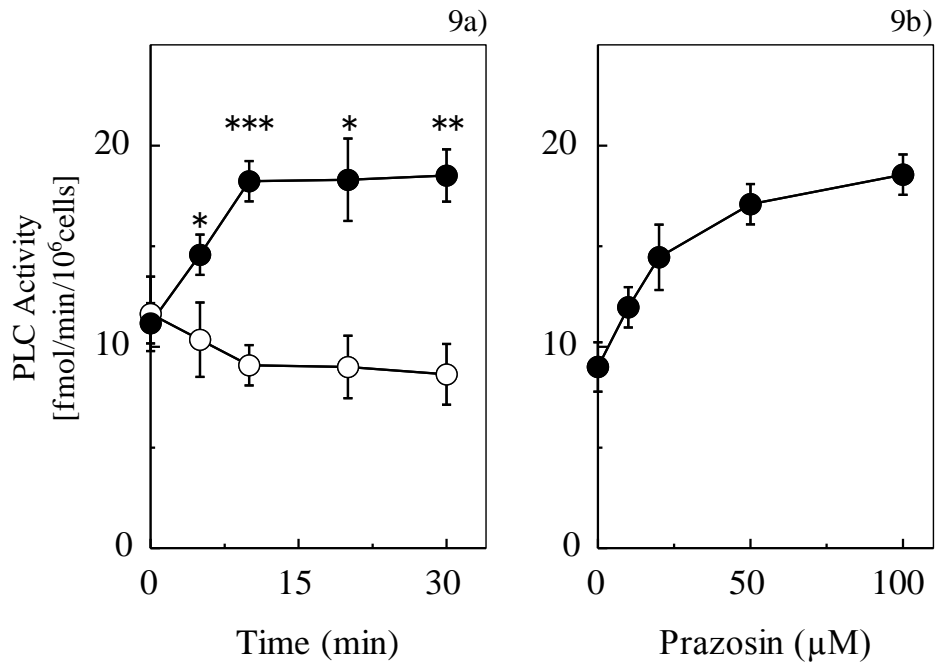


Fig. 9. Increasing Effect of Prazosin Phospholipase C Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) over a 30-min period. (b) The hepatocytes were incubated for 30 min with prazosin various concentrations (0-100 μM) of prazosin.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

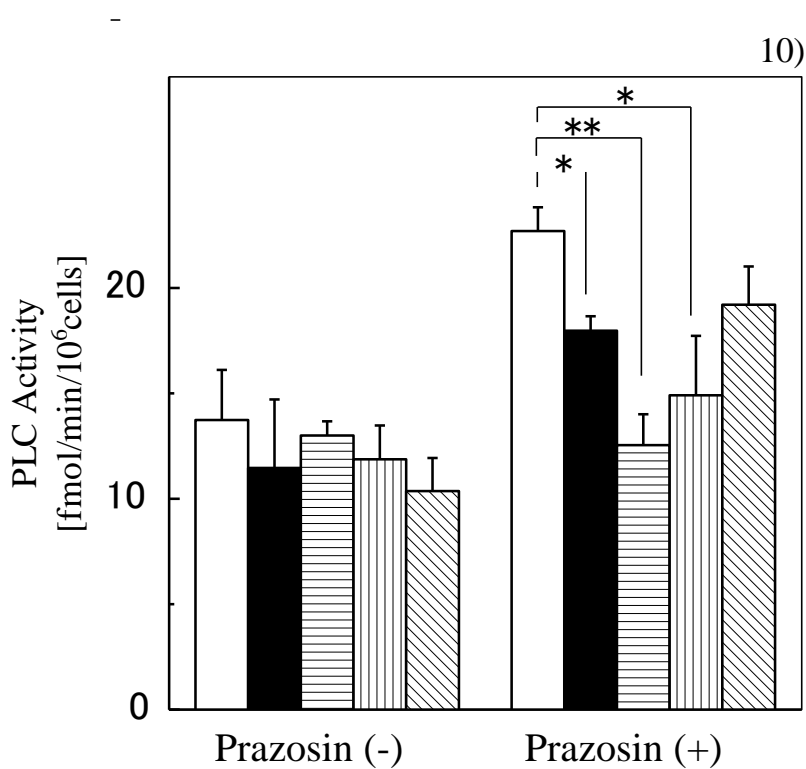


Fig. 10. Effect of Non-receptor Tyrosine Kinase Inhibitors and Phospholipase C Inhibitors on Increase in Phospholipase C Activity by Prazosin

The hepatocytes were incubated with 100 μ M prazosin or without (white bar) in the presence of PP2 (black bar), herbimycin A (cross bar), U-73122 (vertical bar), U-73343 (slash bar).

Significant differences compared with the prazosin-treated group and without inhibitors: * p <0.05 and ** p <0.01.

第3章 プラズシンによる HTGL の分泌に対する

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の関与

3-1 序論

第2章において、プラズシンによる HTGL の分泌は、PLC の活性化を伴うことが示唆された。 PLC の活性化により、PIP₂ は IP₃ と DAG を生成する。 この IP₃ は小胞体に作用する事で細胞内に Ca²⁺を動員し、DAG は Ca²⁺と共にプロテインキナーゼ C(PKC)の活性化と DAG キナーゼ(DGK)活性化によるホスファチジン酸の生成を行うことが知られている。 生体内においてこの Ca²⁺と DAG などの分布平衡は重要な意味を持っており、細胞内 Ca²⁺濃度においては非常に低濃度である。 Motoyashiki らの報告によると硫酸バナジル-BSA によりラット脂肪組織からの LPL 分泌に IP₃ の関与が明らかとされている⁵⁰⁾。 また、IP₃ により上昇した細胞内 Ca²⁺ は Ca²⁺結合部位を持つ分子に結合し、細胞内のタンパク質機能発現を調節する事が知られており、その代表的な Ca²⁺シグナル伝達経路として PKC 経路、カルモジュリンを介した Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMK)経路などが挙げられる。 特にこのカルモジュリンは多彩な酵素やタンパク質と結合し、細胞のシグナル伝達やイオン輸送、細胞死などに関係する重要な酵素を活性化させるなど多機能に渡り作用するとされており⁵¹⁾、カルモジュリン発見の端緒となった PDE やアデニル酸シクラーゼ、NO 合成酵素などへのシグナル伝達も担っている⁵²⁾。 Tagashira らの報告によると CaMKファミリーである Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 型(CaMK-II)はヘパリン刺激によるラット肝細胞からの HTGL 分泌において関与することが明らかになっている⁵³⁾。 またラット肝細胞での細胞骨格組織や自食作用(オートファジー)制御において関与することが報告されている⁵⁴⁾。 肝細胞での CaMK-II の役割においては、やはり多岐にわたる機能が報告されている。

本章では、プラズシンによる HTGL の分泌に対する細胞内 Ca²⁺上昇によって調節

を受ける因子として特にカルモジュリンおよび CaMK-II 活性の関与について検討を行った。

3-2 試薬及び動物

(1)試薬

Calphostin C、Quin2/AM、Trifluoperazine、W-7、W-5、Xestospongine C は和光純薬から、KN-93、KN-92、KN-62、R59949 はシグマ社から、Chelerythrine Chloride はライフテクノロジーズ社から、Sigma TECT® CaMKII Assay System はプロメガ社から、Adenosine 5'-triphosphate, [γ - 32 P]-ATP(111TBq/mmol) はパーキンエルマー社から購入したものを使用した。その他の試薬は、本論文第 1 章 1-2(1)に示した。

(2)動物

本論文第 1 章 1-2(2)に記載した Wistar 系雄性ラットを飼育し、実験前 24 時間絶食して用いた。なお動物実験は、福山大学学術研究倫理審査委員会にて承認を得られている（承認番号：H-27-動-16）。

3-3 実験方法

(1)初代培養肝細胞の調製

遊離肝実質細胞の調製及び初代培養法は、本論文第 1 章 1-3(1)に示した。

(2)HTGL 活性の測定

HTGL 活性の測定法は、本論文第 1 章 1-3(2)に示した。

(3)Western blotting による HTGL タンパク質の検出

Western blotting による HTGL タンパク質の検出法は、本論文第 1 章 1-3(3)に示した。

(4)Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 活性の測定

肝実質細胞を本論文第 1 章 1-3(1)で示した方法で各種薬剤などと温置した後、上清を除き凍結させる。培養肝細胞 1g に対し氷冷した 20mM Tris-HCl 緩衝液(2mM EDTA, 2mM EGTA, 20 μ g/ml トリプシンインヒビター, 10 μ g/ml アプロチニン, 5 μ g/ml ロイペプチン, 2mM DTT, 25mM benzamidin, 1mM PMSF 含有, pH8.0, 4 $^{\circ}$ C)3ml を加え、氷冷下破碎(15sec \times 2, 4 $^{\circ}$ C; 日音製ハンディマイクロホモジナイザー)をした。これを、遠心(4 $^{\circ}$ C, 350 \times g, 5min)し、この遠心上清を CaMK-II の粗酵素標品とした。

CaMK-II 活性の測定は、プロメガ社の Signa TECT[®] CaMKII Assay System を用いて定量した⁵⁵⁾。基質溶液は、ビオチン化したペプチド基質(Biotinylated peptide substrate)2.5 μ l と CaMK-II 活性化液(1mM CaCl₂, 1 μ M カルモジュリン, 0.1mg/ml BSA)5 μ l を含む CaMK-II 反応液(50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 0.5mM DTT, pH7.2, 4 $^{\circ}$ C)5 μ l に ATP(0.5mM ATP 5 μ l, [γ -³²P]-ATP 0.05 μ l)5 μ l 加え、超純水 2.5 μ l で希釈した。コントロール群は、この活性化液の代わりにコントロール液(1mM EGTA, pH7.2)を加える。基質溶液 20 μ l と CaMK-II 粗酵素標品 5 μ l を添加し、30 $^{\circ}$ C で 5 分間温置した。反応停止後、反応液 10 μ l を SAM^{2®} Biotin Capture Membrane にのせ、これを 2M NaCl で 30 秒間 1 回、2 分間 3 回、2M NaCl と 1%リン酸で 2 分間 4 回洗浄後、超純水で 30 秒間 2 回洗浄し風乾させた。この Membrane をバイアルに入れリッキシンチ 5ml を加え、液体シンチレーションカウンター(アロカ製 LSC-6100 型)によって放射活性を測定した。CaMK-II 活性は、nmol phosphate/min/10⁶ cells で表し、3 ないし 4 検体の平均及び標準誤差で示した。

(5)データ処理

本論文第 1 章 1-3(4)に示した。

3-4 実験結果

(1) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する IP_3 受容体阻害剤、PKC 阻害剤の効果

プラゾシンによる HTGL 分泌に対する PLC 以降のシグナル伝達において、小胞体 IP_3 受容体刺激における作用と PKC の関与について検討を行った。 IP_3 受容体阻害剤である Xestospongin C⁵⁶⁾によりプラゾシンによる HTGL の分泌は阻害剤の濃度増加に伴い抑制された(Fig.11A-11a)。 しかし、PKC 阻害剤である Calphostin C⁵⁷⁾や Chelerythrine Chloride⁵⁸⁾ の濃度を増加しても影響は認められなかった(Fig.11A-11bc)。 同様に HTGL タンパク質においても、Xestospongin C により抑制が認められたが、Calphostin C および Chelerythrine Chloride では抑制が認められなかった(Fig.11B-11abc)。

(2) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する DAG 合成アナログ及び

DGK 阻害剤の効果

続いて PLC 以降のシグナル伝達において、DAG の直接刺激における作用と DGK の関与について検討を行った。 DAG による刺激を模倣し、PKC を持続的に活性化する Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (TPA)⁵⁹⁾による HTGL の分泌は認められなかった。またプラゾシン共存下でも競合的阻害も認められなかった。さらに、DGK 阻害剤である R59949⁶⁰⁾共存下でのプラゾシンによる HTGL 分泌に対する影響は認められなかった(Fig.12A-12ab)。 また HTGL タンパク質においても各薬剤による影響は認められなかった(Fig.12B-12ab)。

(3) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する Ca^{2+} キレーターの効果

プラゾシンによる HTGL 分泌に対する細胞内 Ca^{2+} 変動の関与について検討を行った。プラゾシンによる HTGL 分泌は、細胞膜を透過できる脂溶性のアセトキシメチルエステル体にした Ca^{2+} キレート剤である Quin2/AM⁶¹⁾の濃度増加に伴い抑制された(Fig.13A)。さらに、HTGL タンパク質においても Quin2/AM の濃度依存的に抑制が認められた(Fig.13B)。

(4) プラゾシンによる HTGL 分泌に対するカルモジュリン阻害剤の効果

次に Ca^{2+} のシグナル伝達として代表的な結合タンパクであるカルモジュリンの関与について検討を行った。プラゾシンによる HTGL の分泌は、フェノチアジン誘導体で Ca^{2+} 依存的にカルモジュリンに結合する阻害剤 Trifluoperazine⁶²⁾、ナフタレンスルホンアミド誘導体で Ca^{2+} 存在下カルモジュリンを阻害する W-7⁶³⁾の濃度増加に伴い著しく抑制された。また W-7 の脱 Cl 体でカルモジュリン阻害作用の極めて弱い構造類似体である W-5⁶⁴⁾では濃度を増加しても抑制はほとんど認められなかった(Fig.14A-14ab)。さらに HTGL タンパク質においても Trifluoperazine、W-7 の濃度依存的に抑制が認められたが、W-5 では抑制が認められなかった(Fig.14B-14ab)。

(5) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する CaMK-II 阻害剤の効果

カルモジュリンはカルモジュリン依存性酵素の活性化を促す。特にプラゾシンによる HTGL 分泌に対する CaMK-II の関与について検討を行った。CaMK-II に特に強い阻害作用を示すが、CaMK-I や IV など広いスペクトルの阻害や自己リン酸化した CaMK-II に阻害作用を示さないと報告のある KN-62⁶³⁾の濃度増加に伴い HTGL 分泌は抑制された(Fig.15A-15a)。また CaMK-II の特異的な阻害剤である KN-93⁶⁵⁾の濃度増加に伴いプラゾシンの作用は抑制された。更には KN-93 の構造類似体であり CaMK-II 阻害作用の極めて弱い KN-92⁶⁶⁾によっては濃度を増加しても抑制は認められなかった(Fig.15A-15b)。さらに HTGL タンパク質においても KN-62、KN-93

の濃度依存的に抑制が認められたが、KN-92 では抑制が認められなかった (Fig.15B-15ab)。

(6) CaMK-II 活性に対するプラゾシンの効果

肝細胞とプラゾシン共存下、細胞内 CaMK-II 活性の変化について検討を行った。Fig.16a は肝細胞とプラゾシンの温置時間の経過における細胞内 CaMK-II 活性の変化について示している。0~20 分間のプラゾシンとの温置により、CaMK-II 活性はコントロールと比較し、10 分で約 2.0 倍の上昇を示した。また、Fig.16b は肝細胞とプラゾシンの濃度増加における CaMK-II 活性の変化を示している。プラゾシンの濃度増加に伴い肝細胞内 CaMK-II 活性は上昇した (Fig.16)。

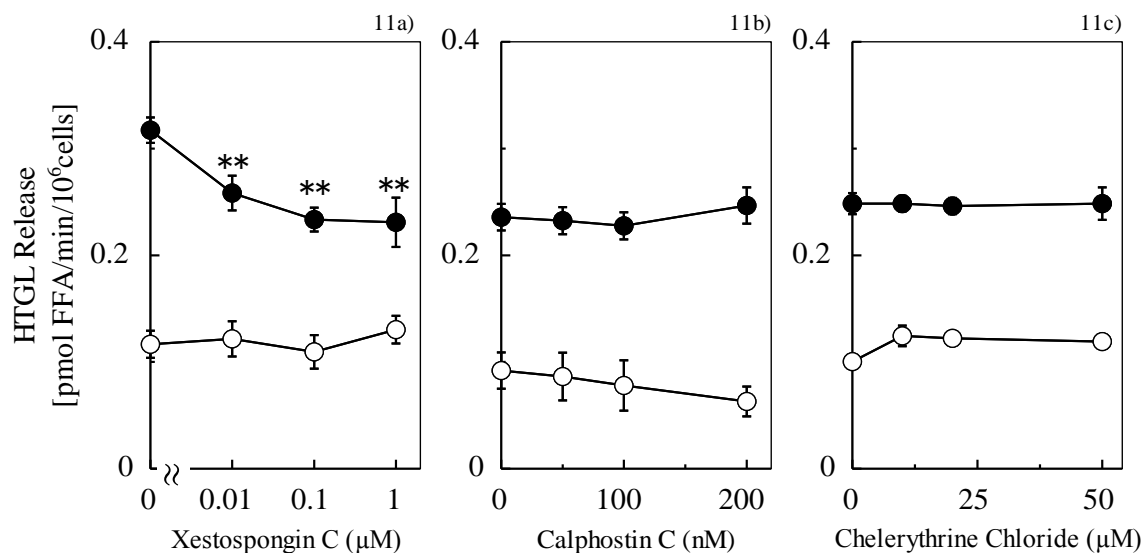
3-5 考察

前章による結果から、プラゾシンによる HTGL の分泌は、プラゾシンの細胞内移行による非受容体型チロシンキナーゼを介して、PLC 及び PI3K の活性化が関与している事を示してきた。本章では PLC の活性化以降、セカンドメッセンジャーである IP₃ と DAG によるシグナル伝達について検討を行った。IP₃ による小胞体からの Ca²⁺放出は、細胞内 Ca²⁺上昇を引き起こす。Fig.12a の結果よりプラゾシンによる HTGL の分泌に小胞体からの Ca²⁺放出の関与が示唆された。一方、DAG と Ca²⁺ は PKC の活性化を引き起こすが、Fig.12b、13a、13b の結果によると HTGL 分泌における PKC 及び DGK によるホスファチジン酸の生成の関与は極めて低い事が示唆された。この上昇した細胞内 Ca²⁺は多くの場合、カルモジュリンなど Ca²⁺結合タンパク質と結合し細胞の機能を調節している⁵¹⁾。本章における検討において、カルモジュリンを阻害するとプラゾシンによる HTGL の分泌は、大きく抑制された (Fig.14)。複合体となった Ca²⁺/カルモジュリンはさらに CaMK に結合し、活性化させることで様々な機能発現に関与している。CaMK ファミリーのうち CaMK-II について、Niki らの報告ではラット膵β細胞より CaMK-II を介してインスリン分泌を調節することを示唆している⁶⁷⁾。プラゾシンによる HTGL の分泌においても

CaMK-II 阻害剤による抑制が認められた(Fig.15)。これらの結果から、肝細胞とプラゾシンとを温置し、肝細胞における CaMK-II 活性の挙動を調べた。すると、肝細胞内の CaMK-II 活性は、プラゾシンと肝細胞の温置時間の経過およびプラゾシンの濃度の増加に伴い上昇した。

ここまでの結果より、プラゾシンによる HTGL の分泌は、おそらくプラゾシンが細胞内へ移行することで非受容体型チロシンキナーゼを刺激・活性化し、PLC 及び PI3K を活性化させ、IP₃ 産生により小胞体から Ca²⁺が放出、この Ca²⁺放出で賦活化されたカルモジュリンと、これら Ca²⁺/カルモジュリン複合体による CaMK-II の活性化が密接に関与していることが示唆された。

11A)



11B)

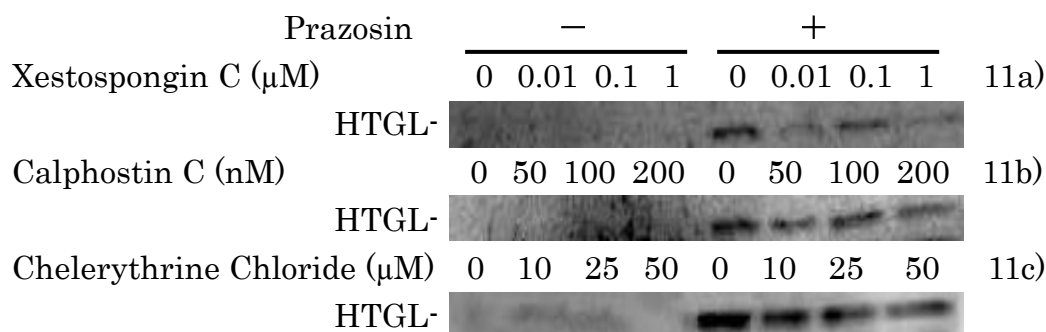


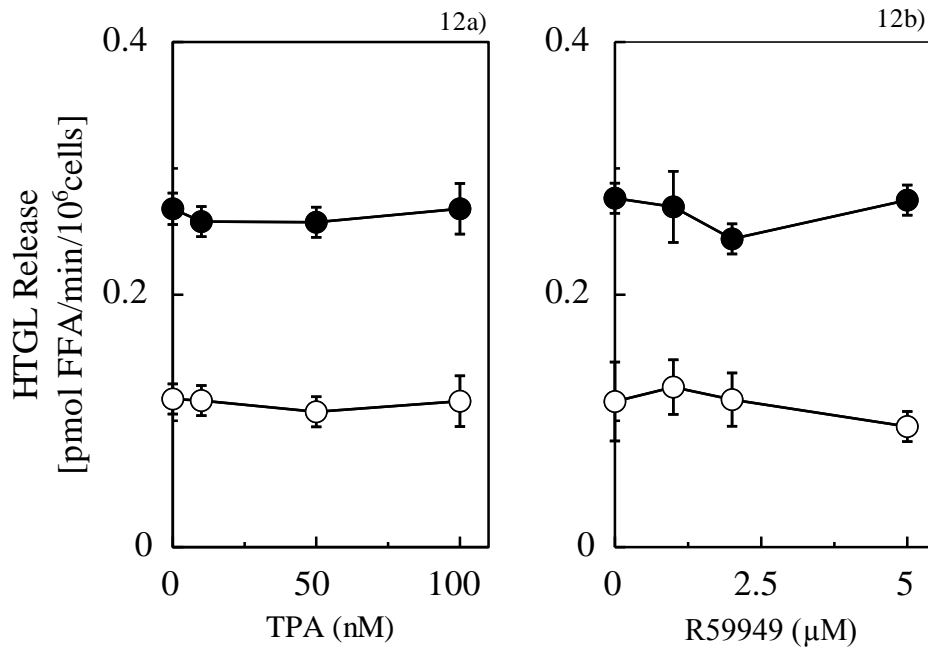
Fig. 11. Effects of Inositol-1,4,5-triphosphate Inhibitor and Protein Kinase C Inhibitors and Diacylglycerol Kinase Inhibitor on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

11A) 11a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of Xestospongins C. 11b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of Calphostin C. 11c) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of Chelerythrine Chloride.

Significant differences compared with control: ***p*<0.01.

11B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of IP₃ receptor inhibitor and PKC inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

12A)



12B)

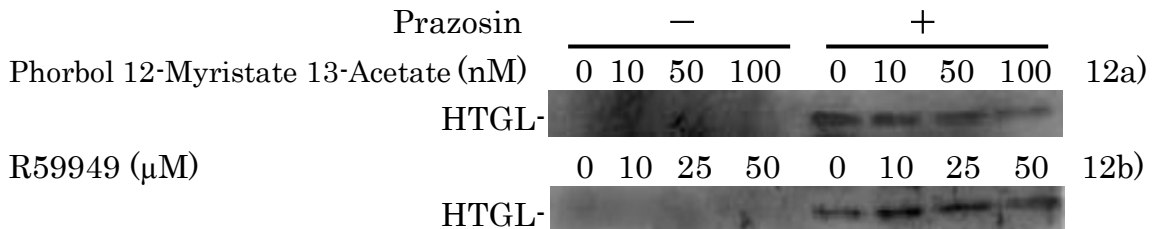
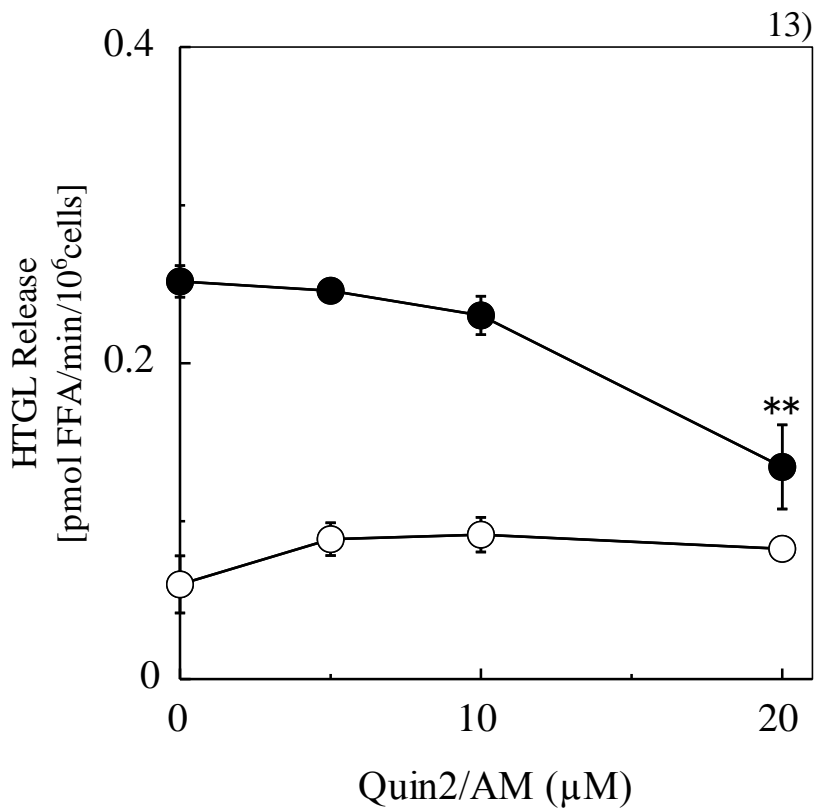


Fig. 12. Effects of Diacylglycerol analog as Protein Kinase C activator and Diacylglycerol Kinase Inhibitor on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

12A) 12a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of TPA. 12b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of R59949.

12B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of PKC activator and DGK inhibitor, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

13A)



13B)

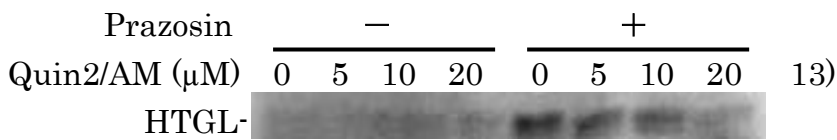


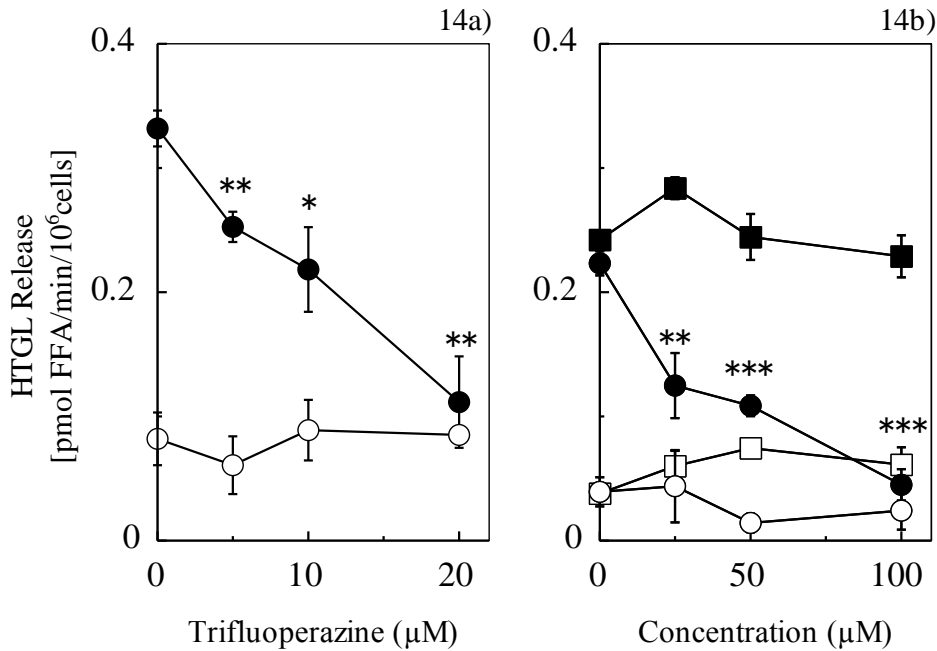
Fig. 13. Effects of Ca²⁺-chelator on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

13A) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of Quin2/AM.

Significant differences compared with the control: ***p*<0.01.

13B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of Ca²⁺-chelator, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

14A)



14B)

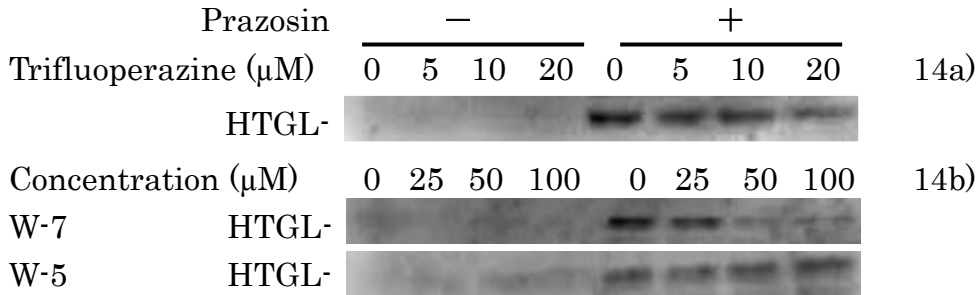


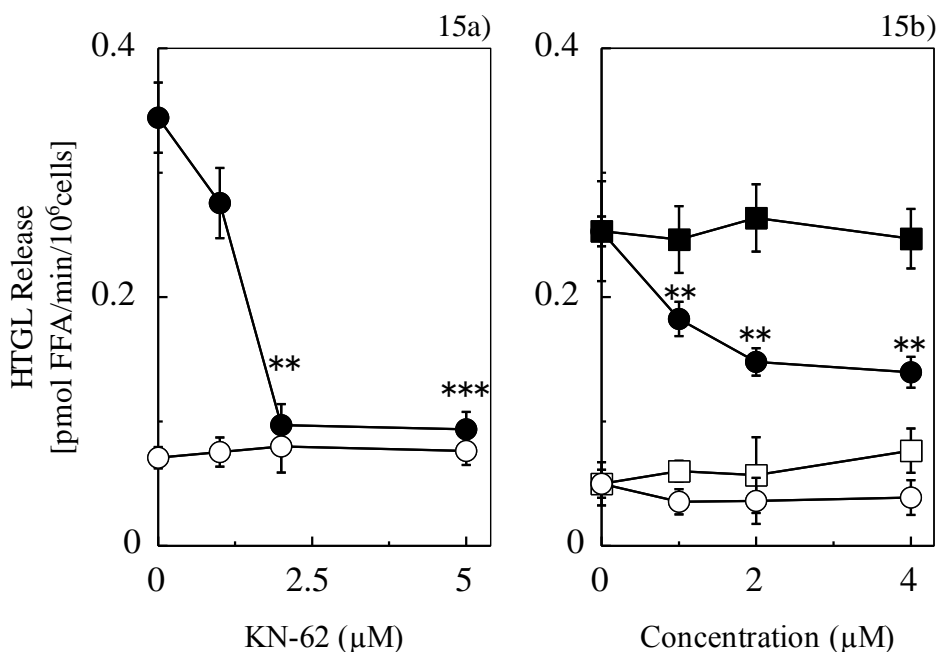
Fig. 14. Effects of Calmodulin Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

14A) 14a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of Trifluoperazine. 14b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●, ■) or without (○, □) in the presence of W-7 (○, ●) and W-5 (□, ■).

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

14B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of calmodulin inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

15A)



15B)

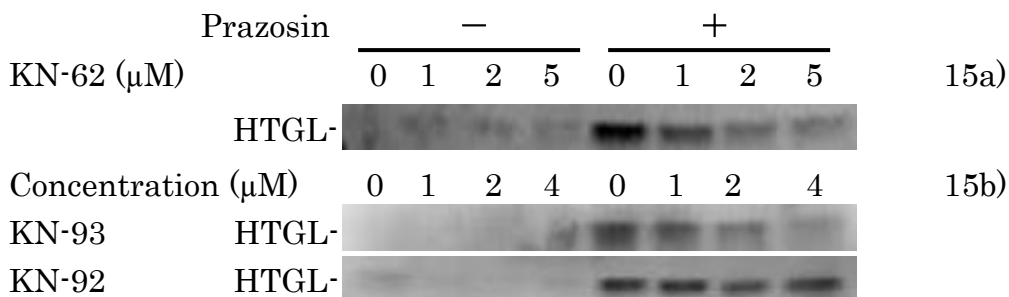


Fig. 15. Effects of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

15A) 15a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of KN-62. 15b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●, ■) or without (○, □) in the presence of KN-93 (○, ●) and KN-92 (□, ■).

Significant differences compared with control: ***p*<0.01 and ****p*<0.001.

15B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of CaMK-II inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

16)

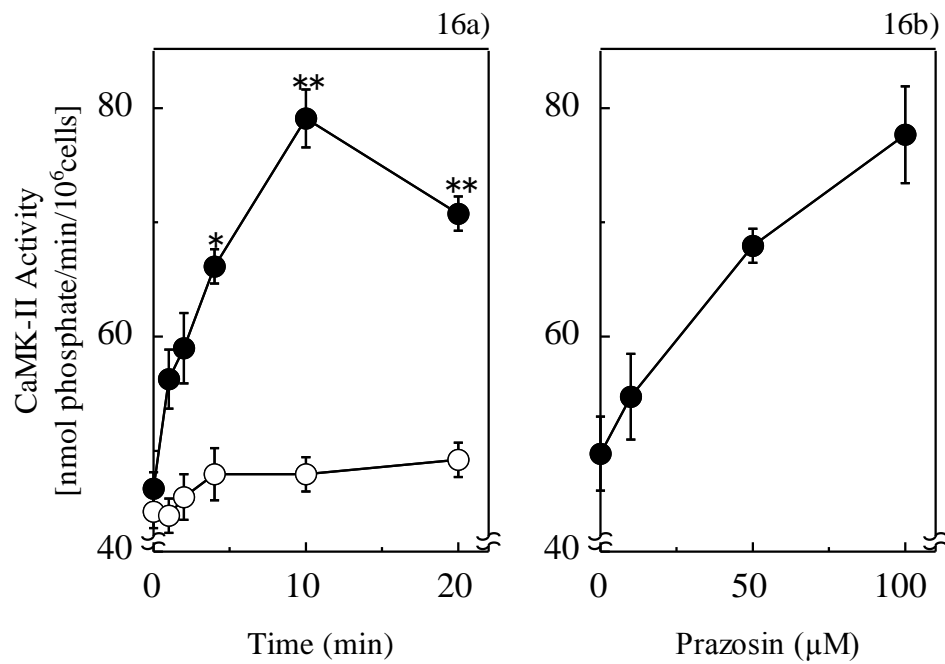


Fig. 16. Increasing Effect of Prazosin on Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) over a 20-min period. (b) The hepatocytes were incubated for 10-min with various concentrations (0-100μM, ●) of Prazosin.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

第4章 プラゾシンによる HTGL の分泌に対する

cyclic AMP およびプロテインキナーゼ A の関与

4-1 序論

前述の章でプラゾシンによる HTGL の分泌は、細胞内 Ca^{2+} の上昇により、 Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルモジュリンと複合体を作り、さらに Ca^{2+} /カルモジュリン賦活化酵素である CaMK-II の活性化が関与している事を示してきた。このカルモジュリンは、多機能性タンパク質として知られているが、これはカルモジュリンが多くのシグナル伝達に関与し、生体内で多くの機能発現に影響を与えるためである。実際に、カルモジュリン結合タンパク質には前章の CaMK の他にアデニル酸シクラーゼ(AC)やホスホジエステラーゼ(PDE)などが報告されている⁵²⁾。AC は、ATP をセカンドメッセンジャーである cAMP に変換する酵素であり、cAMP は PDE により 5'-AMP に分解される。この cAMP は、cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PKA)を活性化することで多くの細胞機能に関与することが知られているが⁶⁸⁾、最近では cAMP が PKA の他に cAMP 依存性交換タンパク質(Epac)に結合することでインスリンや胆汁酸の分泌に関与するという報告もある^{69,70)}。さらにはデキストラン硫酸による癌細胞からの LPL 分泌に細胞内 cAMP 量の上昇が関与していることが報告されている⁷¹⁾。Park らは、マウスの骨格筋や白色脂肪組織において resveratrol の経口投与は PDE を抑制し、細胞内 cAMP 量の上昇を引き起こすことを報告している⁷²⁾。またプラゾシンは、細胞内 PDE 阻害作用を持つことが知られており⁸⁾、そこで本実験系においてもプラゾシンにより細胞内 cAMP 量の変化が起こり、HTGL の分泌に影響を与えるのではないかと推測される。

そこで本章では、プラゾシンによる HTGL の分泌に対する細胞内 cAMP 量の挙動の関与とそれに伴う PKA の活性化の関与について検討を行った。

4-2 試薬及び動物

(1)試薬

2',5'-Dideoxyadenosine、H-89、KT5720 は和光純薬から、MDL-12,330A はシグマ社から、cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay(EIA) System は GE ヘルスケア社から、PKA Assay kit はミリポア社から、Adenosine 5'-triphosphate, [γ - 32 P]-ATP(111TBq/mmol) はパーキンエルマー社から購入したものを使用した。その他の試薬は、本論文第 1 章 1-2(1)に示した。

(2)動物

本論文第 1 章 1-2(2)に記載した Wistar 系雄性ラットを飼育し、実験前 24 時間絶食して用いた。なお動物実験は、福山大学学術研究倫理審査委員会にて承認を得られている（承認番号：H-27-動-16）。

4-3 実験方法

(1)初代培養肝細胞の調製

遊離肝実質細胞の調製及び初代培養法は、本論文第 1 章 1-3(1)に示した。

(2)HTGL 活性の測定

HTGL 活性の測定法は、本論文第 1 章 1-3(2)に示した。

(3) Western blotting による HTGL タンパク質の検出

Western blotting による HTGL タンパク質の検出法は、本論文第 1 章 1-3(3)に示した。

(4)細胞内 cAMP 量の測定

肝実質細胞を本論文第 1 章 1-3(1)で示した方法で各種薬剤などと温置した後、培養肝細胞 1g に対し氷冷した 5%TCA 1ml を加え、全タンパク質を瞬時に変性・沈殿させ cAMP の分解を固定する。これにハンクス溶液(pH7.2,4°C)200 μ l 加え、採取し、超音波破碎(5sec \times 2, 4°C; S&M 社製 Vibra-cell ultrasonic processor)後、遠心(10,000 \times g, 20min, 4°C; SORVALL 社製 fresco)する。その上清 600 μ l を採取し、水飽和エーテルを 5 倍量加え TCA を含む上層(エーテル層)を除去し、下層(水層)の pH が中性になったら下層を採取、その cAMP 量を測定した。cAMP 量の測定は、GE ヘルスケア社の cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay(EIA) System を用いて定量した⁷³⁾。cAMP 量は、pmol/10⁶cells で表し、3 検体の平均及び標準誤差で示した。

(5)プロテインキナーゼ A 活性の測定

肝実質細胞を本論文第 1 章 1-3(1)で示した方法で各種薬剤などと温置した後、上清を除きリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 3 回細胞が剥離しないよう穏やかに洗浄し、培養肝細胞 1g に対し氷冷した 20mM MOPS 緩衝液(25mM β -glycerophosphate, 5mM EGTA, 1mM orthovanadate-Na, 1mM DTT; pH7.2, 4°C)1ml を加え、氷冷下超音波破碎(10sec \times 2, 4°C; S&M 社製 Vibra-cell ultrasonic processor)をした。これを遠心(4°C, 10,000 \times g, 20min)し、この遠心上清を PKA の粗酵素標品とした。

PKA 活性の測定は、ミリポア社の PKA Assay kit を用いて定量した⁷⁴⁾。基質溶液は、Kemptide(LRRASLG)5 μ l と PKC/CaMK Inhibitor 溶液 10 μ l に Mg/ATP 溶液(Mg/ATP:[γ -³²P]-ATP=9:1)10 μ l を加えた。基質溶液 20 μ l と PKA 粗酵素標品 20 μ l を添加し、30°C で 10 分間温置した。氷上で反応停止後、素早く反応液 25 μ l を P81

Phosphocellulose Squares paper にのせ、これを 0.75%リン酸で 5 分間 3 回洗浄後、アセトンで 5 分間 1 回洗浄し風乾させた。この paper をバイアルに入れリッキシンチ 5ml を加え、液体シンチレーションカウンター(アロカ製 LSC-6100 型)によって放射活性を測定した。PKA 活性は、nmol phosphate/min/10⁶ cells で表し、3 ないし 4 検体の平均及び標準誤差で示した。

(6) データ処理

本論文第 1 章 1-3(4)に示した。

4-4 実験結果

(1) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する AC 阻害剤の効果

プラゾシンによる HTGL 分泌に対する AC の関与について検討を行った。AC の競合的阻害剤である 2',5'-Dideoxyadenosine⁷⁵⁾の濃度増加に伴い HTGL 分泌は抑制された。またアデニル酸シクラーゼの非競合的阻害剤である MDL-12,330A⁷⁶⁾の濃度増加に伴い著しく抑制が認められた(Fig.17A-17ab)。さらに各種薬剤の濃度依存的に HTGL タンパク質の抑制が認められた(Fig.17B-17ab)。

(2) プラゾシンによる HTGL 分泌に対する PKA 阻害剤の効果

プラゾシンによる HTGL 分泌に対する PKA 阻害剤の効果について検討を行った。HTGL 分泌は、それぞれ異なるタイプの PKA 阻害剤である H-89⁷⁷⁾及び KT-5720⁷⁸⁾の共存下、阻害剤の濃度上昇に伴い抑制された(Fig.18A)。

(3) 細胞内 cAMP 量に対するプラゾシンの効果

肝細胞とプラゾシン共存下、細胞内 cAMP 量の変動について検討を行った。Fig.19a は肝細胞とプラゾシンの温置時間の経過における細胞内 cAMP 量の変動について示している。0~45 分間のプラゾシンとの温置により、細胞内 cAMP 量はコントロールと比較し、30 分経過時点で約 1.5 倍の増加を示した。更に Fig.19b は肝細胞とプラゾシンの濃度増加における細胞内 cAMP 量の変動を示している。プラゾシンの濃度増加に伴い細胞内 cAMP 量は大きく増加した。

(4) プラゾシンによる細胞内 cAMP 量の上昇に対する AC 阻害剤の効果

プラゾシンによる細胞内 cAMP 量の上昇に対する AC の関与について検討を行った。AC 阻害剤である 2',5'-Dideoxyadenosine および MDL-12,330A 共存によって、プラゾシンによる cAMP 量の上昇が各阻害剤の濃度増加に伴い抑制された(Fig.20ab)。

(5) PKA 活性に対するプラゾシンの効果

肝細胞内におけるプラゾシン添加による PKA 活性の変化について検討を行った。PKA 活性は、肝細胞とプラゾシンとの温置により、その温置時間の経過に伴い上昇した(Fig.21a)。

(6) プラゾシンによる PKA 活性化に対する PLC 阻害剤の効果

プラゾシンによる細胞内 PKA 活性の上昇に対する PLC の関与について検討を行った。PLC に特異的な阻害剤である U-73122 の共存によって、プラゾシンによる細胞内 PKA 活性の上昇は抑制された。一方、U-73122 の構造類似体で PLC 阻害作用が極めて低い U-73343 の共存ではプラゾシンによる細胞内 PKA 活性の上昇は、ほとんど変化が認められなかった(Fig.22)。

(7) プラゾシンによる PKA 活性化に対するカルモジュリン阻害剤の効果

次にプラゾシンによる細胞内 PKA 活性の上昇に対する PLC の関与について検討を行った。カルモジュリン阻害剤である Trifluoperazine の共存によって、プラゾシンによる細胞内 PKA 活性の上昇は阻害剤の濃度増加に伴い抑制された(Fig.23)。

(8) プラゾシンによる PKA 活性化に対する CaMK-II 阻害剤の効果

更にプラゾシンによる細胞内 PKA 活性の上昇に対する CaMK-II の関与について検討を行った。CaMK-II 阻害剤である KN-93 の共存によって、プラゾシンによる細胞内 PKA 活性の上昇は阻害剤の濃度増加に伴い抑制された(Fig.24)。

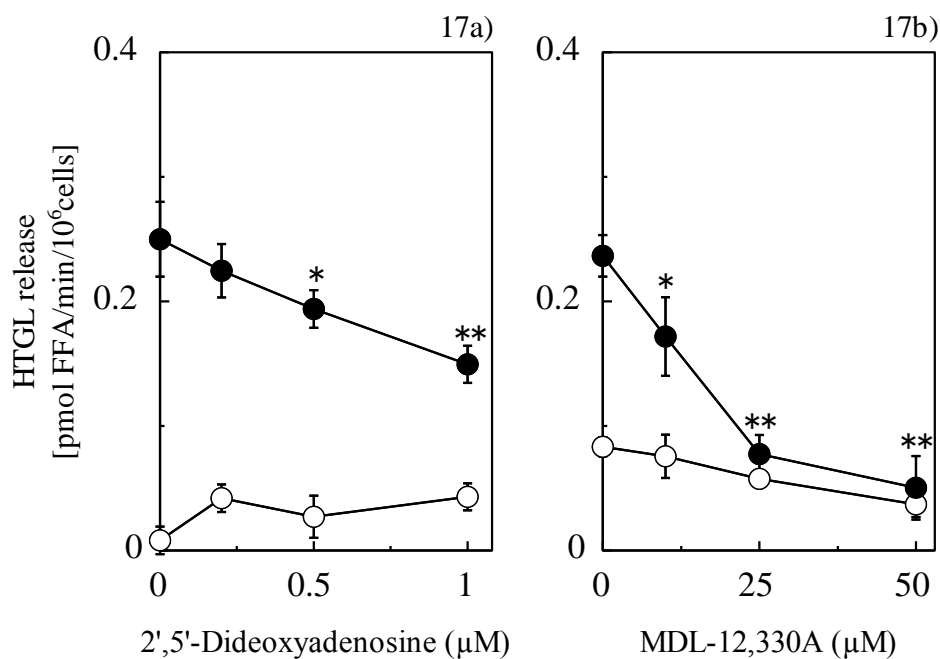
4-5 考察

本章では、細胞内 cAMP 量の変動とそれに伴う PKA の活性化について検討を行った。Fig.17の結果よりプラゾシンによる HTGL の分泌は、AC を介した細胞内 cAMP 量の上昇の関与が示唆された。細胞内 cAMP 量の上昇は、PKA の制御サブユニットに結合し、PKA から触媒サブユニットを離し活性型となる。Fig.18の結果より PKA 阻害剤によっても抑制されたことで、プラゾシンによる HTGL の分泌は PKA の活性化の関与が示唆された。そこでプラゾシンによる細胞内 cAMP 量の変動を測定したところ、プラゾシンと肝細胞の温置時間の経過およびプラゾシンの濃度の増加に伴い上昇した(Fig.19)。更にこの上昇した細胞内 cAMP 量は、AC 阻害剤により著しく抑制された(Fig.20)。Morita らの報告において、ルテニウムレッドにより肝細胞からの HTGL 分泌促進が認められる際、細胞内 cAMP 量は温置時間 30 秒において一過的な上昇を示す⁷⁹⁾。しかし、本実験結果によると細胞内 cAMP 量は一過性な上昇ではなく、時間依存的に上昇している。これはプラゾシンによる肝細胞内の PDE 阻害作用の影響があると考えられる⁸⁾。実際に、肝細胞にプラゾシンと PDE 阻害剤である IBMX とを温置しても HTGL 分泌は保持されたままであった。また cAMP アナログ(ジブチリル cAMP)は、HTGL の分泌を抑制すると報告⁸⁰⁾もあるが、

1mM ジブチリル cAMP による HTGL の分泌は、まったく変化が認められなかった。これらのことより、肝細胞からの HTGL 分泌にはある程度の cAMP 量が必要であり、また単一な cAMP 量の上昇では HTGL 分泌は行われなことが示唆される。一方、Fig.21 の結果より肝細胞内の PKA 活性は、プラゾシンと肝細胞の温置時間の経過およびプラゾシンの濃度の増加に伴い上昇した。これは、cAMP 量の上昇と関連している。

以上の結果より、プラゾシンによる HTGL 分泌促進作用は、AC の活性化および PDE 抑制を介する肝細胞内の cAMP 量の上昇が密接に関与していることが示唆された。それに伴いおそらく cAMP 上昇による PKA の活性化が関与していることが示唆された。また、本論文第 3 章の結果も含め、プラゾシンによる HTGL 分泌促進作用は、おそらく一部 Ca²⁺放出に次ぐカルモジュリンとの結合による CaMK-II の活性化を引き起こし、AC の活性化に次ぐ cAMP 量の上昇、それに次ぐ PKA の活性化が関与していることが示唆された。

17A)



17B)

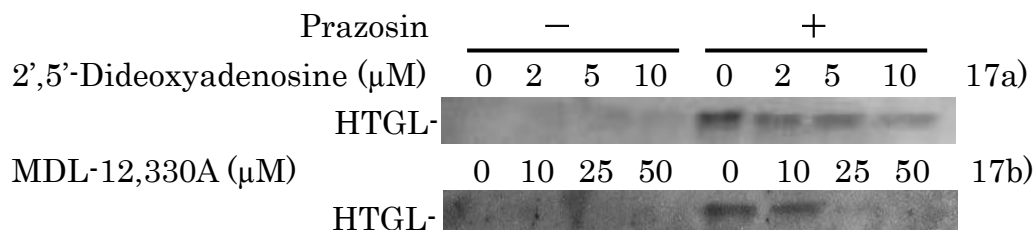


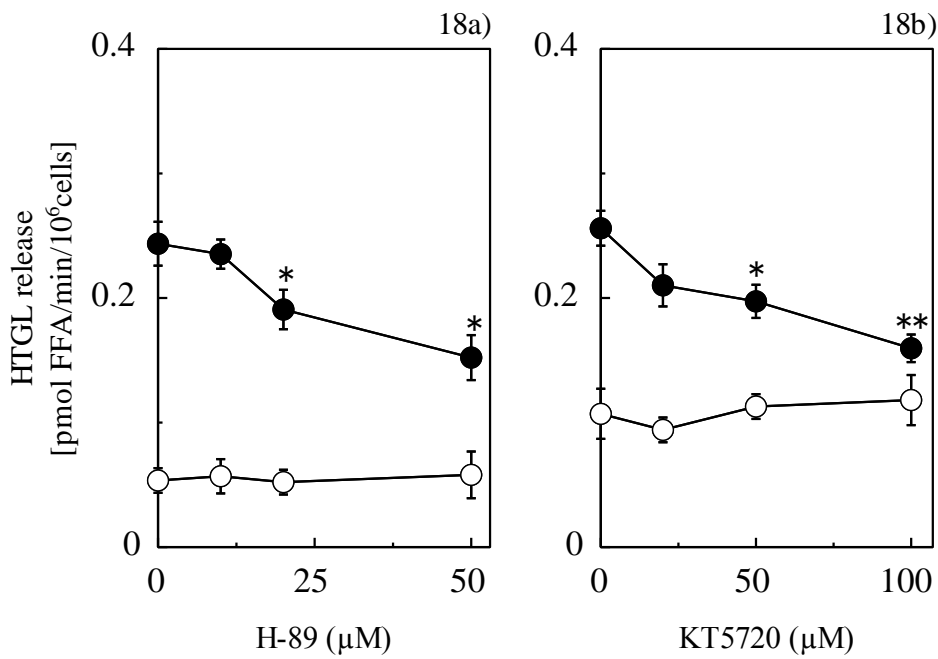
Fig. 17. Effects of Adenylate Cyclase Inhibitors
on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

17A) 17a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of 2',5'-dideoxyadenosine. 17b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of MDL-12,330A.

Significant differences compared with the control: **p* < 0.05 and ***p* < 0.01.

17B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of AC inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

18A)



18B)

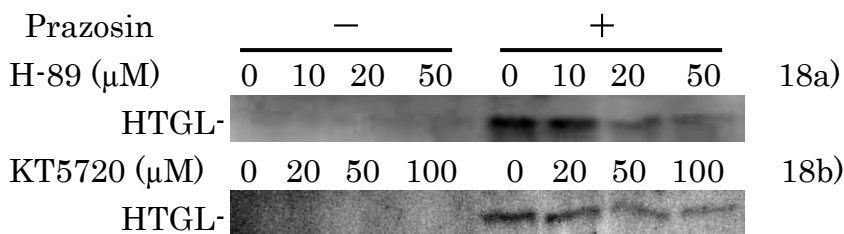


Fig. 18. Effects of Protein Kinase A Inhibitors
on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

18A) 18a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of H-89. 18b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of KT5720.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

18B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of PKA inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

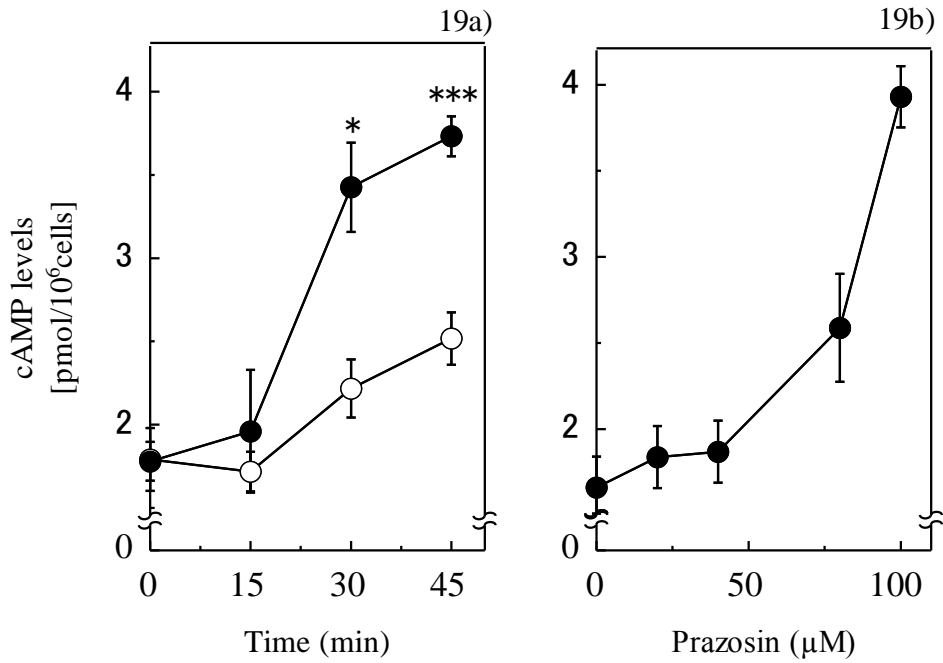


Fig. 19. Increase in cyclic AMP Content in Hepatocytes by Prazosin

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) over a 45-min period. (b) The hepatocytes were incubated for 45-min with various concentrations (0-100μM, ●) of Prazosin.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

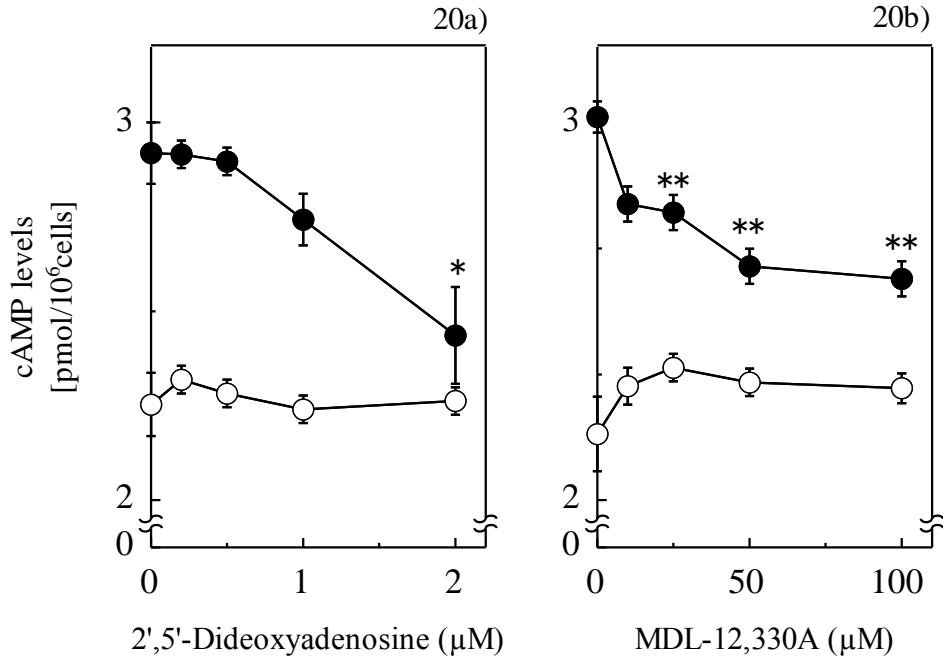


Fig. 20. Increase in cyclic AMP Content in Hepatocytes by Prazosin

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of 2',5'-dideoxyadenosine. (b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of MDL-12,330A.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

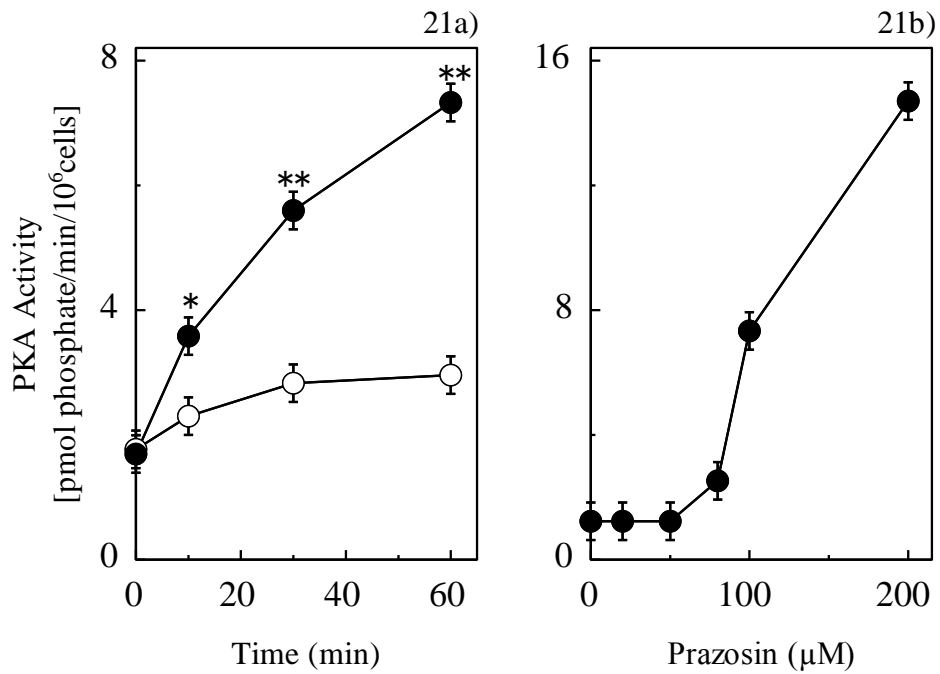


Fig. 21. Increasing Effect of Prazosin on Protein Kinase A Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) over a 60-min period. (b) The hepatocytes were incubated for 60-min with various concentrations (0-100 μM, ●) of Prazosin.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

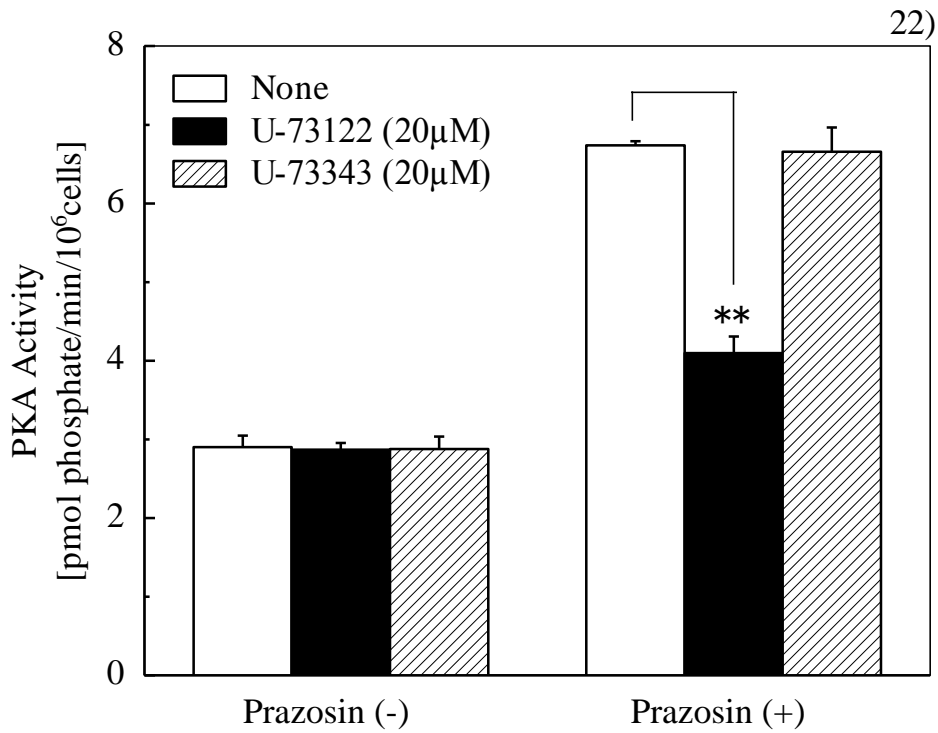


Fig. 22. Effect of Phospholipase C Inhibitors
on Increase in Protein Kinase A Activity by Prazosin

The hepatocytes were incubated with 100µM prazosin or without (white bar) in the presence of U-73122 (black bar), U-73343 (cross bar).

Significant differences compared with the prazosin-treated group and without inhibitors:

** $p < 0.01$.

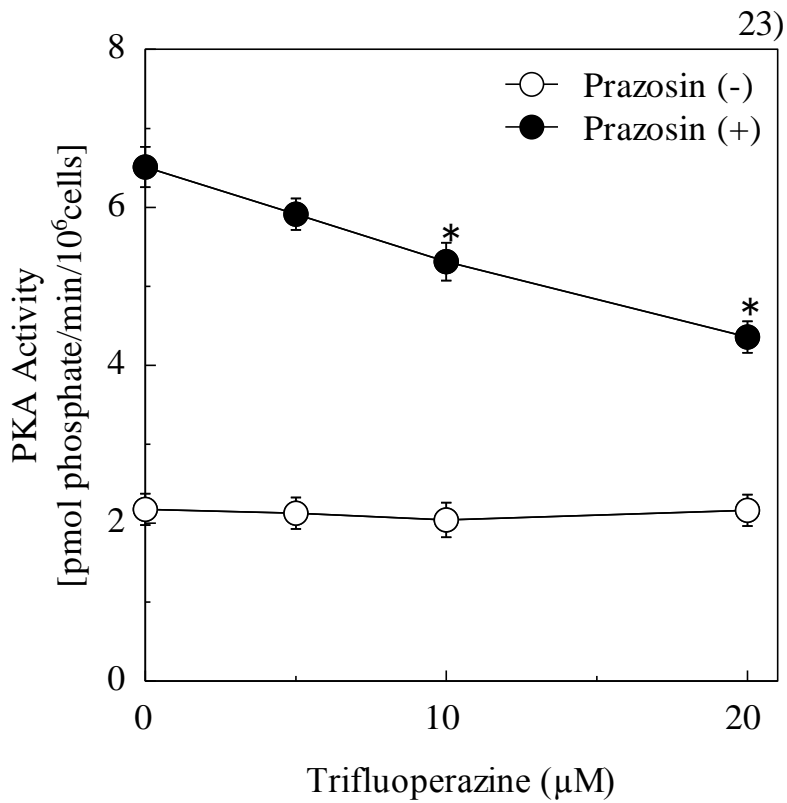


Fig. 23. Effect of Calmodulin Inhibitors
on Increase in Protein Kinase A Activity by Prazosin

The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of Trifluoperazine.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$.

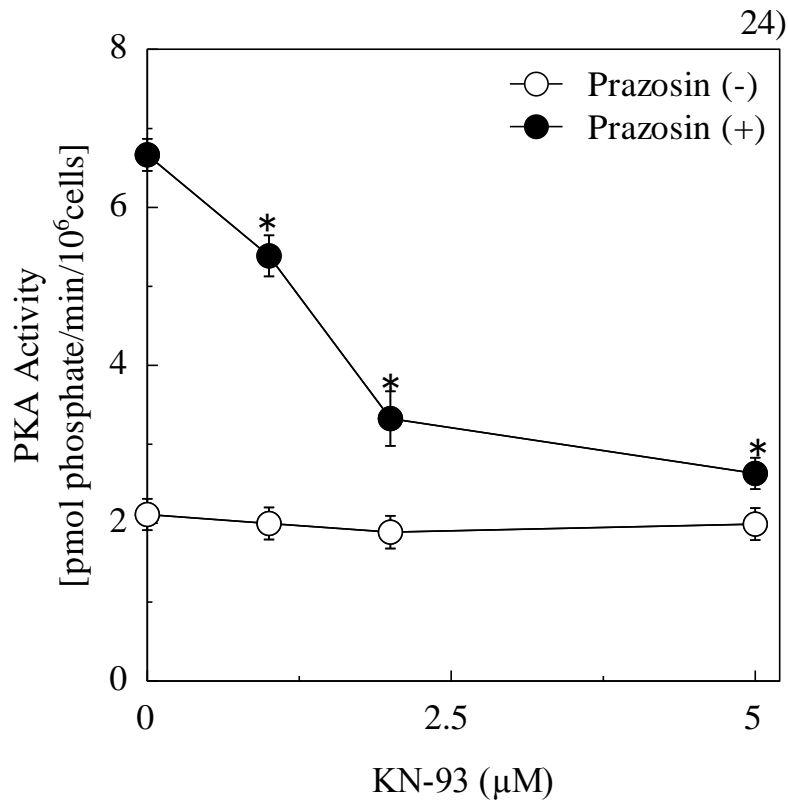


Fig. 24. Effect of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Inhibitors on Increase in Protein Kinase A Activity by Prazosin

The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of KN-93.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$.

総括

本研究では、初代培養ラット肝細胞を用い脂質代謝において重要な調節を担う肝性リパーゼ(HITGL)の肝細胞による活性調節機構について検討を行った。その解析に際し、アドレナリン α_1 受容体遮断薬のプラゾシンが、HITGLの分泌を促進することを新たに見出した。プラゾシンによるHITGL分泌促進作用は、他のアドレナリン α_1 受容体遮断薬の中でも特異的な作用で、プラゾシンと同じ基本骨格を有する他のアドレナリン α_1 受容体遮断薬や基本骨格であるキナゾリン自体においてもHITGLの分泌促進作用は認められなかった。またアドレナリン受容体遮断薬のみならず、アドレナリンなどのアドレナリン受容体刺激薬においてもHITGL分泌促進作用は認められず、かつプラゾシンのHITGL分泌促進作用に対し、ほとんど影響を与えなかった。このプラゾシンの作用に対する他の膜受容体の関与として膜受容体型のチロシンキナーゼを検討したが、HITGL分泌促進作用の変化は認められなかった。しかし、非受容体型すなわち細胞内チロシンキナーゼの関与が示唆されたため、解析を行ったところ、おそらく非受容体型チロシンキナーゼ、なかでもSrcチロシンキナーゼを介してHITGL分泌を促進していることが示唆された。

非受容体型チロシンキナーゼの活性化は、PLC γ を活性化することから、プラゾシンによるHITGL分泌促進に対するPLC阻害剤の効果について検討を行ったところ、著しく抑制が認められた。また肝細胞におけるPLC活性を調べたところ、プラゾシンと温置された肝細胞におけるPLCの活性は上昇し、更にこの上昇したPLC活性は、非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤により抑制が認められた。すなわち、プラゾシンによるHITGL分泌は、非受容体型チロシンキナーゼを介するPLCの活性化が関与していることが示唆された。

PLCの活性化により、PIP₂を基質としたセカンドメッセンジャーはIP₃とDAGを産生するが、IP₃は小胞体からのCa²⁺放出を促進し、DAGはPKCの活性化機構に大

きく寄与している。本研究においてプラゾシンによる HTGL 分泌促進作用は、小胞体の IP₃ 受容体阻害剤との共存下、抑制が認められた。一方、DAG アナログによる PKC 刺激、PKC や DAG の代謝経路である DGK の阻害剤では、HTGL 分泌に変化は認められなかった。さらに IP₃ による小胞体からの Ca²⁺放出によって細胞内 Ca²⁺の上昇を起こすが、プラゾシンによる HTGL 分泌は、細胞内 Ca²⁺キレート剤共存下抑制された。すなわち、プラゾシンによる HTGL 分泌は、Src チロシンキナーゼを介した PLC の活性化に伴う IP₃ の産生増加、IP₃ による小胞体からの Ca²⁺放出が関与していることが示唆された。

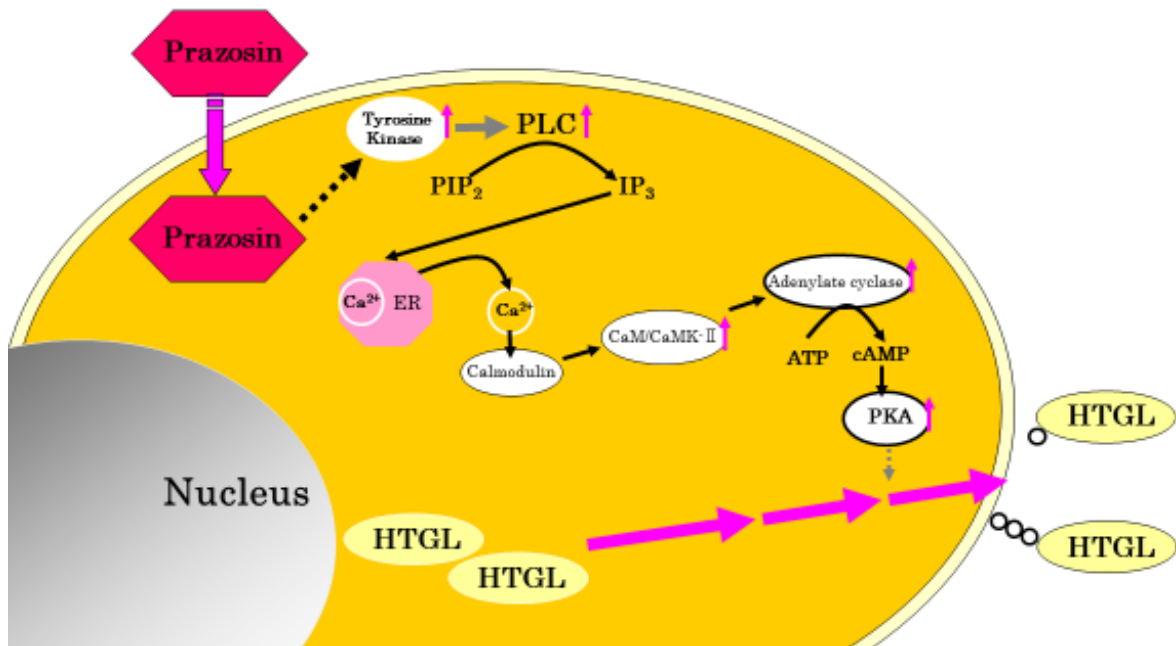
次に、小胞体から放出された Ca²⁺は、PKC などカルシウム依存性酵素の活性化を惹起し、細胞の機能調節を行う。また Ca²⁺結合タンパク質と結合することで細胞内情報伝達を行う。プラゾシンによる HTGL 分泌促進作用に PKC の関与が低いことが示唆されたので、Ca²⁺結合タンパク質であるカルモジュリンおよび CaMK-II の関与について検討を行ったところ、これらの各阻害剤で著しい HTGL の分泌抑制が認められた。すなわち、プラゾシンによる HTGL の分泌は、非受容体型チロシンキナーゼを介する PLC の活性化による IP₃ の産生とそれに伴う小胞体からの Ca²⁺放出、更にはカルモジュリンと結合し、CaMK-II を活性化させることが重要であると示唆された。

多機能性タンパク質と呼ばれるカルモジュリンは、AC や PDE の活性調節に関与することが報告されており、またプラゾシンは、PDE 阻害作用を有することが知られている。プラゾシンによる HTGL の分泌は、AC 阻害剤によって著しく抑制され、PKA 阻害剤によっても抑制が認められた。そこでプラゾシンによる HTGL 分泌促進作用に対する細胞内 cAMP の関与を検討したところ、プラゾシンによる細胞内 cAMP 量の上昇が認められた。さらにプラゾシンにより PKA 活性の上昇も認められた。すなわち、プラゾシンによる HTGL の分泌は、AC の活性化および PDE の抑制による細胞内 cAMP 量の上昇と、これに伴う PKA の活性化が関与していると示唆された。

すなわち、これらの結果から、プラゾシンはおそらく肝細胞の細胞膜受容体に作用することなく、細胞内において非受容体型チロシンキナーゼを活性化し、それによるシグナルが生じ、PLCの活性上昇、次いでIP₃の産生増加を惹起し、このIP₃により小胞体のIP₃受容体を刺激することでCa²⁺放出を促し、細胞内Ca²⁺の増加を生じる。さらには増加した細胞内Ca²⁺とカルモジュリンの結合、それに伴うCaMK-IIの活性化を引き起こす。そしてさらに、CaMK-IIの活性化によりACが活性化され、細胞内cAMP量の上昇とそれに伴うPKAの活性化を促進する。HTGLの分泌は細胞内Ca²⁺の変動によるCaM/CaMK-II系とCaM/AC/PKA系によって調節されており、プラゾシンはこれらの系を活性化することによりHTGLの分泌を促進していることが示された。

プラゾシンによる初代培養ラット肝細胞からのHTGL分泌促進は、これらの細胞内シグナル伝達過程により引き起こされることが明らかとなった。

Release of HTGL from Hepatocyte



Scheme 1. HTGL signal transduction pathway by Prazosin

謝辞

本研究において、福山大学薬学部生化学研究室 森田哲生教授には終始御懇切なる直接の御指導と御鞭撻を賜りましたことを心から厚く感謝の意を表します。

また、研究遂行に有益なご協力とご援助戴きました本学薬学部生化学研究室 上敷領淳准教授、本学薬学部放射薬品化学研究室 本屋敷敏雄准教授に深く感謝の意を表します。

さらに、本研究に有益なご協力とご助言戴きました本学薬学部生化学研究室 螻川内理恵助手、木下千恵美助手に心からお礼申し上げます。

なお、本研究にあたり基礎からご指導戴きました本学部同研究室 田頭尚士博士に厚くお礼申し上げます。

さらに、本研究において多くのご助言を戴きました本学部同研究室 森永幸恵修士、奥田恵理子修士、堀川祐介修士、川添彩修士、高田真希修士、三上徹也修士、富岡 香理修士にお礼申しあげます。

また、本研究にご協力戴きました同研究室 田崎 正幸学士、大久保嘉則学士、佐藤真耶学士、上田 藍学士、串田 康弘学士、宮崎 陽子学士、大窪 舞学士、久野 陽子学士、永渕 由香里学士、丸谷 有香学士、安田 大輝学士、池田 歩未学士、川上 莉奈学士、黒瀬 有香君、遠竹 惇乃君、加森 里実君、ならびに同研究室の各位に感謝いたします。

また、ファイザー株式会社には快く文献の提供を頂きましたことをお礼申し上げます。

論文目録

本研究の主要部分は以下の論文に公表した。

- 1) Tetsuya Nakamura, Rie Kerakawati, and Tetsuo Morita: Prazosin Stimulates the Release of Hepatic Triacylglycerole Lipase Caused from Primary-culture Rat Hepatocytes,
J. Health Sci., **56**, 462-466 (2010).

- 2) Tetsuo Morita, Kaori Tomioka, Maki Takada, Rie Kerakawati-Fujita: Stimulatory Growth of Mouse Mammary Tumor FM3A Cells Produced by L-Arginine
Med. Biol., **154**, 144-151 (2010).

- 3) Tetsuya Nakamura, Tetsuo Morita: Involvement of the Leukotriene Metabolic Pathway in the Stimulatory Release of Hepatic Lipase Produced by Prazosin from Primary Cultured Rat Hepatocytes,
Med. Biol., **156**, 332-337 (2012).

- 4) Tetsuya Nakamura, Tetsuo Morita: 3',5'-Cyclic Monophosphate Involvement in Hepatic Triacylglyceride Lipase Release from Prazosin-Stimulated Primary Cultured Rat Hepatocytes,
Biol. Pharm. Bull., **37**, 922-925 (2014).

- 5) Tetsuya Nakamura, Jun Kamishikiryo, Tetsuo Morita: Prazosin-stimulated release of hepatic triacylglyceride lipase from primary cultured rat hepatocytes is involved in the regulation of cAMP-dependent protein kinase through activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II,
Pharmacol. Rep., **68**, 649-653 (2016).

引用文献

- 1) Smith L.C., Pownall H.J., Gotto A.M. Jr., *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 751-757 (1978).
- 2) Nilsson-Ehle P., Garfinkel A.S., Schotz M.C., *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 667-693 (1980).
- 3) Landin B., Nilsson A., Twu J.S., Schotz M.C., *J. Lipid Res.*, **25**, 559-563 (1984).
- 4) Connelly P.W., *Clin. Chim. Acta*, **286**, 243-255 (1999).
- 5) Arai T., Yamashita S., Hirano K., Sakai N., Kotani K., Fujioka S., Nozaki S., Keno Y., Yamane M., Shinohara E., *Arterioscler Thromb.*, **14**, 1129-1136 (1994).
- 6) Chatterjee C., Sparks D.L., *Am. J. Pathol.*, **178**, 1429-1433 (2011).
- 7) Perret B., Mabile L., Martinez L., Tercé F., Barbaras R., Collet X., *J. Lipid Res.*, **43**, 1163-1169 (2002).
- 8) D'Armiento M., Lacerna F., Lauro R., Modesti A., Verna R., Ceccarelli G., *Eur. J. Pharmacol.*, **65**, 243-247 (1980).
- 9) Armenia A., Munavvar A.S., Abdullah N.A., Helmi A., Johns E.J., *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 719-726 (2004).
- 10) Lepor H., *Urol. Clin. North. Am.*, **17**, 651-659 (1990).
- 11) Jaillon P., *Clin. Pharmacokinet.*, **5**, 365-376 (1980).
- 12) Erve J.C., Vashishtha S.C., Demaio W., Talaat R.E., *Drug. Metab. Dispos.*, **35**, 908-916 (2007).
- 13) Hu Z.W., Shi X.Y., Hoffman B.B., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **31**, 833-839 (1998).
- 14) Gee E., Mikiewicz M., Haas T.L., *J. Cell. Physiol.*, **222**, 120-126 (2010).
- 15) Lin S.C., Chueh S.C., Hsiao C.J., Li T.K., Chen T.H., Liao C.H., Lyu P.C., Guh J.H., *Neoplasia.*, **9**, 830-839 (2007).
- 16) Katsouri L., Vizcaychipi M.P., McArthur S., Harrison I., Suárez-Calvet M., Lleo A., Lloyd D.G., Ma D., Sastre M., *Neurobiol. Aging.*, **34**, 1105-1115 (2013).
- 17) Green B., *J. Psychiatr. Pract.*, **20**, 253-259 (2014).
- 18) Takabatake T., Ohta H., Maekawa M., Yamamoto Y., Ishida Y., Hara H., Hattori N., *Am. J. Med.*, **76**, 113-116 (1984).
- 19) Jansen H., Lammers R., Baggen M.G., Birkenhäger J.C., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13**, s5-s10 (1989).

- 20) Belahsen R., Deshaies Y., *J. Nutr.*, **123**, 520-528 (1993).
- 21) Krone W., Müller-Wieland D., Nägele H., Behnke B., Greten H.,
J. Cardiovasc. Pharmacol., **10**, s199-s202 (1987).
- 22) Cutler R., *Am. J. Caldiol.*, **51**, 628-631 (1983).
- 23) Borst S.E., Oliver R.J., Scarpance P.J., *J. Gerontol.*, **49**, B18-B21 (1994).
- 24) Michelotti G.A., Price D.T., Schwinn D.A., *Pharmacol. Ther.*, **88**, 281-309 (2000).
- 25) Hiraizumi-Hiraoka Y., Tanaka T., Yamamoto H., Suzuki F., Muramatsu I.,
J. Pharmacol. Exp. Ther., **310**, 995-1002 (2004).
- 26) Milligan G., Bond R.A., *Trends. Pharmacol. Sci.*, **18**, 468-474 (1997).
- 27) White D.L., Saunders V.A., Dang P., Engler J., Zannettino A.C., Cambareri A.C.,
Quinn S.R., Manley P.W., Hughes T.P., *Blood.*, **108**, 697-704 (2006).
- 28) Ueki H., Yamasaki Y., Higo K., Motoyashiki T., Kawabata H., Mortia T.,
Biol. Pharm. Bull., **23**, 214-218 (1995).
- 29) Tagashira H., Kerakawati R., Motoyashiki T., Morita T.,
J. health. Sci., **52**, 85-90 (2006).
- 30) Berry M.N., Friend D.S., *J. Cell Biol.*, **43**, 506-520 (1969).
- 31) Mori M., Morita T., Ikeda F., Amaya Y., Tatibana M., Cohen P.P.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **78**, 6056-6060 (1981).
- 32) Schotz M.C., Garfinkel A.S., Huebotter R.J., Stewart J.E.,
J. Lipid Res., **11**, 68-69 (1970).
- 33) Bradford M.M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 34) Laemmi U.K., *Nature.*, **227**, 680-685 (1970).
- 35) Towbin H., Staehelin T., Gordon J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 36) Davis R.J., Czech M.P., *J. Biol. Chem.*, **260**, 2543-2551 (1985).
- 37) Shiraishi T., Domoto T., Imai N., Shimada Y., Watanabe K.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., **147**, 322-328 (1987).
- 38) Gates A., Hohenester S., Anwer M.S., Webster C.R.,
Am. J. Physiol. Gastrointest Liver. Physiol., **296**, 764-774 (2009).
- 39) Chen M.C., Solomon T.E., Perez Salazar E., Kui R., Rozengurt E., Soll A.H.,
Am. J. Physiol. Gastrointest Liver. Physiol., **283**, 893-899 (2002).

- 40) Uehara Y., Fukazawa H., Murakami Y., Mizuno S.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., **163**, 803-809 (1989).
- 41) Guzelian P.S., Bissell D.M., Meyer U.A., *Gastroenterology.*, **72**, 1232-1239 (1977).
- 42) Nakamura T., Kerakawati R., Morita T., *J. health. Sci.*, **56**, 462-466 (2010).
- 43) Bardelli A., Maina F., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D., Comoglio P.M., Ponzetto C.,
Oncogene., **7**, 1973-1978 (1992).
- 44) Kin M.J., Kim E., Ryu S.H., Suh P.G., *Exp. Mol. Med.*, **32**, 101-109 (2000).
- 45) Kerakawati R., Morita T., *J. health. Sci.*, **56**, 467-471 (2010).
- 46) Higashi K., Ogawara H., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 157-160 (1992).
- 47) Kayali A.G., Eichhorn J., Haruta T., Morris A.J., Nelson J.G., Vollenweider P.,
Olefsky J.M., Webster N.J., *J. Biol. Chem.*, **273**, 13808-13818 (1998).
- 48) Thompson A.K., Mostafapour S.P., Denlinger L.C., Bleasdale J.E., Fisher S.K.,
J. Biol. Chem., **266**, 23856-23862 (1991).
- 49) Xu G.G., Geng Z., Zhou X.C., He Y.G., He T.T., Mei J.X., Yang Y.J., Liu Y.Q., Xu C.S.,
Genet. Mol. Res., **14**, 5710-5723 (2015).
- 50) Motoyashiki T., Miyake M., Yoshida A., Morita T., Ueki H.,
- 51) Manalan A.S., Klee C.B., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 780-786 (1999).
Adv.Cyclic. Nucleotide. Protein. Phosphorylation. Res., **18**, 227-278 (1984).
- 52) Kakiuchi S., Yamazaki R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1104-1110 (1970).
- 53) Tagashira H., Nakahigashi S., Kerakawati R., Motoyashiki T., Morita T.,
Biol. Pharm. Bull., **28**, 409-412 (2005).
- 54) Holen I., Gordon P.B., Seglen P.O., *Biochem. J.*, **15**, 633-636 (1992).
- 55) Goueli B.S., Hsiao K., Tereba A., Goueli S.A., *Anal. Biochem.*, **225**, 10-17 (1995).
- 56) Mijares A., Altamirano F., Kolster J., Adams J.A., Lopez J.R.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., **452**, 1054-1059 (2014).
- 57) Adachi T., Nakashima S., Nakamura T., Nozawa Y., *Hepatology.*, **23**, 1225-1253 (1996).
- 58) Kanuck M.P., Ellsworth J.L., *Life. Sci.*, **57**, 1981-1991 (1995).
- 59) Moteki H., Kimura M., Ogihara M., *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 980-986 (2011).
- 60) Baldanzi G., Mitola S., Cutrupi S., Filigheddu N., van Blitterswijk W.J., Sinigaglia F.,
Bussolino F., Graziani A., *Oncogene.*, **23**, 4828-4838 (2004).
- 61) Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J., *J. Cell Biol.*, **94**, 325-334 (1982).

- 62) Melien O., Nilssen L.S., Dajani O.F., Sand K.L., Lversen J.G., Sandnes D.L., Christoffersen T., *BMC. Cell Biol.*, **3**, 5 (2002).
- 63) Hidaka H., Sasaki Y., Tanaka T., Endo T., Ohno S., Fujii Y., Nagata T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4354-4357 (1981).
- 64) Holen I., Gordon P.B., Seglen P.O., *Biochem. J.*, **284**, 633-636 (1992).
- 65) Rezazadeh S., Claydon T.W., Fedida D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 292-299 (2006).
- 66) Wie L.H., Chen F., Karagueuzian H.S., Weiss J.N., *Circ. Res.*, **104**, 79-86 (2009).
- 67) Niki I., Okazaki K., Saitoh M., Niki A., Tamagawa T., Iguchi A., Hidaka H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 255-261 (1993).
- 68) Scott J.D., *Pharmacol. Ther.*, **50**, 123-145 (1991).
- 69) Fu D., Wakabayashi Y., Lippincott-Schwartz J., Arias I.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 1403-1408 (2011).
- 70) Shibasaki T., Takahashi T., Takahashi H., Seino S., *Diabetes. Obes. Metab.*, **16**, 118-125 (2014).
- 71) Morita T., Ueki H., Kanagawa A., *Cancer. Lett.*, **122**, 37-42 (1998).
- 72) Park S.J., Ahmad F., Philp A., Baar K., Williams T., Luo H., Ke H., Rehmann H., Taussig R., Brown A.L., Kim M.K., Beaven M.A., Burgin A.B., Manganiello V., Chung J.H., *Cell.*, **148**, 421-433 (2012).
- 73) Horton J.K., Martin R.C., Kalinka S., Cushing A., Kitcher J.P., O'Sullivan M.J., Baxendale P.M., *J. Immunol. Methods*, **155**, 31-40 (1992).
- 74) Cartier C., Hemonnot B., Gay B., Bardy M., Sanchiz C., Devaux C., Briant L., *J. Biol. Chem.*, **278**, 35211-35219 (2003).
- 75) Olaus T.H., Anand-Srivastava M.B., Johnson R.A., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **26**, 269-279 (1982).
- 76) Guinzberg R., Uribe S., Díaz-Cruz A., Hernández Cruz A., Piña E., *Life Sci.*, **79**, 382-390 (2006).
- 77) Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T., Hidaka H., *J. Biol. Chem.*, **265**, 5267-5272 (1990).
- 78) Li J., Yang S., Billiar T.R., *J. Biol. Chem.*, **275**, 13026-13034 (2000).
- 79) Morita T., Sakata K., Kanagawa A., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 577-580 (1994).

80) Sundaram G.S., Shakir K.M., Barnes G., Margolis S.,
J. Biol. Chem., **253**, 7703-7710 (1978).