

家鶏胚の培養網膜色素上皮におけるプロテインキナーゼCの アデニレートシクラーゼ-cAMP系への影響

広 田 篤

広島大学医学部眼科学教室

要 約

家鶏の培養網膜色素上皮細胞を使用し、イソプロテレノール (ISO), フォルスコリンの cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 産生能を検討した。また、情報伝達系の相互作用を検討するために、プロテインキナーゼC (PKC) 刺激剤の phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA) 前処置で ISO, フォルスコリンの cAMP 産生能の変化を検討した。 10^{-9} ~ 10^{-5} M の ISO, フォルスコリンで、濃度依存性に cAMP 濃度は著明な増加をした。しかし、 10^{-10} ~ 10^{-5} M の PMA では、cAMP の上昇は認められなかった。100 nM PMA の前処置で、ISO, フォルスコリンの cAMP 産生はともに抑制され、ISO での抑制効果が高かった。しかし、PMA の類似物質 (4 α -phorbol 12, 13, didecanoate) の前処置では、その抑制効果は明らかでなかった。PMA の阻害剤 (staurosporine, H-7) で、PMA の cAMP 増加に対する抑制効果が減弱した。これらの結果から、網膜色素上皮で PKC は、cAMP 系を抑制すると考えられた。(日眼会誌 96:1412-1417, 1992)

キーワード：網膜色素上皮, 情報伝達系, クロストーク, アデニレートシクラーゼ-cAMP, プロテインキナーゼC

Modulation of the Adenylate Cyclase-cAMP Pathway by Protein Kinase C in Chick Retinal Pigment Epithelium

Atsushi Hirota

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

Abstract

I investigated stimulation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate (cAMP) production by isoproterenol and forskolin in cultured chick embryo retinal pigment epithelium. In addition, in order to study the interaction between signal transduction systems, I studied the effects of phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA), a protein kinase C (PKC) activator, on isoproterenol- or forskolin-stimulated cAMP production. After stimulation with 10^{-9} ~ 10^{-5} M isoproterenol and forskolin, a marked and concentration-dependent increase in cAMP level was observed. However, addition of 10^{-10} ~ 10^{-5} M PMA had no effect on the cAMP level. Preincubation of isoproterenol and forskolin with 100 nM PMA suppressed the increase of cAMP. The suppressive effect of PMA was stronger on isoproterenol-stimulated production than on forskolin-stimulated production. 4 α -phorbol 12, 13, didecanoate, a weak activator of PKC, had a weak suppressive effect on cAMP-production stimulated

別刷請求先：734 広島市南区霞 1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 広田 篤
(平成3年12月27日受付, 平成4年5月22日改訂受理)

Reprint requests to: Atsushi Hirota, M.D. Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(Received December 27, 1991 and accepted in revised form May 22, 1992)

by isoproterenol. Both staurosporin and H-7, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-methylpiperazine, inhibitors of PKC, decreased the suppression of cAMP production by PMA. It is speculated that in chick retinal pigment epithelium PKC stimulators, such as PMA, may inhibit the adenylate cyclase pathway. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96 : 1412-1417, 1992)

Key words : Retinal pigment epithelium, Signal transduction system, Crosstalk, Adenylate cyclase-cAMP, Protein kinase C

I 緒 言

細胞の機能は、外界からの情報によって支配されており、その情報伝達は細胞膜の受容体にホルモンや神経伝達物質が到達し、二次伝達物質等を介して行われている。これまで細胞の情報伝達系には、cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate(cAMP)を二次メッセンジャーとするアデニレートシクラーゼ (AC)系¹⁾、Ca²⁺動員やプロテインキナーゼ C (PKC) と連動するイノシトールリン脂質代謝回転 (PI)系²⁾、細胞の増殖制御や癌化に関与しているチロシンキナーゼ系³⁾が報告されている。また、最近これらの情報伝達系間に相互作用 (クロストーク)⁴⁾があることが報告され注目されている。

網膜色素上皮細胞 (RPE) の情報伝達系として、 α_1 -受容体⁵⁾、 β -受容体^{6,7)}、ドーパミン⁸⁾、マンノース^{9,10)}、種々の成長因子¹¹⁾の報告がある。RPE は貪食能¹²⁾、遊走能¹³⁾、能動輸送¹⁴⁾などの機能をもつが、これらの機能は情報伝達系によって制御されていると思われる。また、RPE に複数の情報伝達系が存在することから、それぞれの情報伝達系間にクロストークが存在する可能性があるのでないかと考えられる。

著者は、RPE の情報伝達系の一部を解明するために、培養家鶏胚の RPE での β -受容体の刺激ならびに AC を直接に刺激した場合の AC-cAMP 系の反応状況、また PI 系の PKC が AC-cAMP 系へどのような影響を及ぼすかを検討したので報告する。

II 実験材料および方法

1. 化学薬品

培養に使用した Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) は、日水製薬 (東京) から、牛胎児血清 (FBS) は、GIBCO (USA) から入手した。

PKC の刺激剤として phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA), PMA の類似物質として 4 α -phorbol 12, 13, didecanoate (4 α -PDD), PKC の阻害剤とし

て、スタウロスポリンと H-7, 1-(5-isoquinoline-sulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), AC の直接の刺激剤としてフォルスコリンを使用した。すべて Sigma Chemical Co. (USA) から入手した。

2. 培養方法

培養 RPE の作成手順は、Eguchi ら¹⁵⁾の変法でおこなった。すなわち、孵化 11 日前後の白色レグホン種家鶏卵 (Hamburger-Hamilton 分類, 第 35, 36 期) の卵殻を 70% エタノールで消毒し、無菌的に家鶏胚を取り出し、眼球を摘出した。リン酸緩衝液 (Ca²⁺, Mg²⁺ 不含) 中で、赤道部のやや前方で半切し、前半部、硝子体ならびに網膜を含めた視神経索を除去した。残された部分を 0.05% EDTA で処理し、RPE 層を剥離した。得られた RPE 層は、0.25% トリプシンでさらに処理し、単離浮遊細胞液として回収した。洗浄のため、遠沈 (1,000 rpm, 5 分) した後、上清を捨て、10% FBS 加 MEM で再び単離浮遊細胞液とした。60 mm プラスチックシャーレ (Falcon No. 3802) に、この単離浮遊細胞液を RPE が約 3×10^5 個になるように分注し、37°C, 5% CO₂ で培養した。培養皿は平均 21 日でコンフルエントとなった。

3. cAMP 測定

初代培養の RPE がコンフルエントとなった培養皿 (約 4×10^6 個) のみを使用した。全ての培養 RPE 細胞は、cAMP phosphodiesterase 阻害剤である 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) で 15 分間前処置した後に種々の薬剤で刺激した。

RPE の刺激は、0.1% dimethyl sulfoxide 加 MEM に、イソプロテレノール、フォルスコリン、PMA, 4- α -PDD, H-7 を溶解して行った。リン酸緩衝液で RPE を洗浄し、20% 過塩素酸で抽出後、水酸化カリウムで中和したものを検体とした。cAMP 濃度測定は、高感度な競合的結合能 (スクシニル化) によるラジオイムノアッセイ (RIA) 法で 2 度行い、ヤマサ社製 cAMP 測定キット「ヤマサ」(YSI-7701) を使用した。

III 結 果

1. インキュベーション時間と cAMP 濃度

10^{-8} M のイソプロテレノールの刺激では、培養 RPE の cAMP 濃度は約 7 分で平衡状態に達した、100 nM の PMA で 15 分間前処置すると同条件のイソプロテ

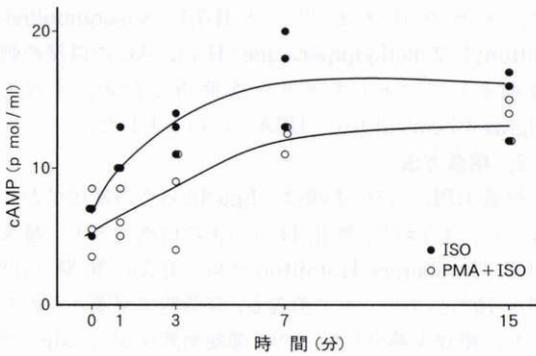


図1 培養 RPE での 10^{-8} M のイソプロテレノールのインキュベーション時間と cAMP 濃度 (n=3). cAMP 濃度は、PMA の前処置にかかわらず 7 分前後で平衡に達した。

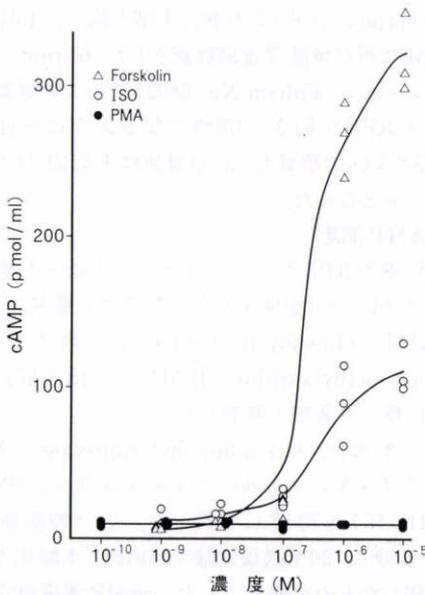


図2 培養 RPE でのイソプロテレノール、フォルスコリン、PMA の刺激濃度と cAMP 濃度 (n=3). 横軸は各薬剤の刺激濃度を示す。イソプロテレノール、フォルスコリンでは濃度依存性に cAMP 濃度が上昇した。

レノールのみの時より cAMP 産生は抑制されたが、やはり 7 分前後で平衡に達した (図 1)。

2. 薬剤の刺激濃度と cAMP 濃度

10^{-9} ~ 10^{-5} M のイソプロテレノール、フォルスコリンまたは、 10^{-10} ~ 10^{-5} M の PMA で培養 RPE を 15 分間培養し、cAMP 濃度を測定した。イソプロテレノール、フォルスコリンでは濃度依存性に cAMP 濃度が上昇し、フォルスコリンの cAMP 産生能がより高かった。しかし、PMA 刺激では cAMP 濃度の上昇は認められなかった (図 2)。

3. PMA の前処置と cAMP 濃度

培養 RPE を、100 nM PMA で 15 分間前処置した後、 10^{-9} ~ 10^{-5} M のイソプロテレノール、フォルスコリンで 15 分間培養してそれぞれの cAMP 濃度を測定した。 10^{-6} M のイソプロテレノールのみの培養では、cAMP 濃度が 88.0 ± 25.43 pmol/ml (平均値 \pm 標準偏差) であったが、PMA の前処置で 31.0 ± 3.61 pmol/ml へ有意に減少した ($p < 0.05$)。また、 10^{-5} M のイソプロテレノールでは、 110.0 ± 13.54 pmol/ml から 40.33 ± 5.51 pmol/ml へ有意の低下を示した ($p < 0.05$)。また、PMA は、フォルスコリンの cAMP 産生

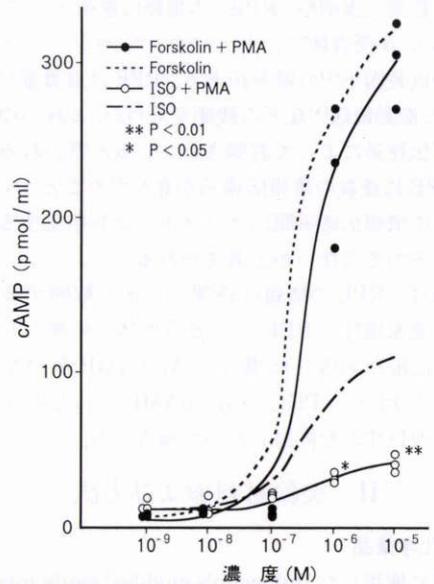


図3 培養 RPE における 100 nM の PMA の前処置が、イソプロテレノール、フォルスコリンの cAMP 産生能に及ぼす影響 (n=3). 横軸は各薬剤の刺激濃度を示す。PMA は、 10^{-6} 、 10^{-5} M のイソプロテレノールの cAMP 産生能を有意に低下させた。

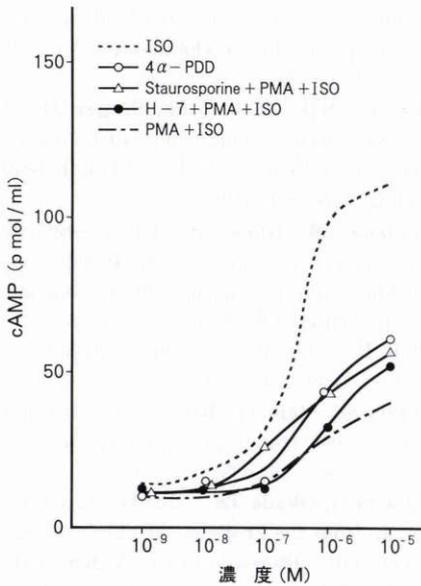


図4 培養RPEにおけるPMA類似物質ならびにPKC阻害剤がイソプロテレノールのcAMP産生能に及ぼす影響(平均値, $n=3$).

PMA類似物質の前処置は、イソプロテレノールのcAMP産生能を有意に低下させなかった。PKC阻害剤で、PMAのcAMP産生抑制作用が有意でなくなった。

能に抑制効果を示したが、有意差はなかった(図3)。

4. PMA類似物質, PKC阻害剤とcAMP濃度

培養RPEを、PMA類似物質(100 nMの4 α -PDD)で15分間前処置した後、 10^{-9} M~ 10^{-5} Mのイソプロテレノールで15分間培養してcAMP濃度を測定した。PMAがイソプロテレノールのcAMP産生を有意に抑制したのになら、4 α -PDDの前処置は、有意のcAMP産生抑制作用を示さなかった(図4)。

つぎに培養RPEを、PKC阻害剤(5×10^{-5} MのH-7, または 10^{-9} Mのスタウロスポリン)で15分間前処置し、等量の200 nMのPMAを加え15分間培養した後、 10^{-9} ~ 10^{-5} Mのイソプロテレノールで15分間培養してcAMP濃度を測定した。各PKC阻害剤で前処置すると、PKCのイソプロテレノールによるcAMP産生抑制作用は、有意差を示さなかった(図4)。

IV 考 按

RPEのAC系は、人胎児の培養RPEの反応をUssing chamberを用いて測定したもの⁶⁾や、家鶏胚の培養RPE細胞をRIA法で測定したもの⁷⁾が報告されて

いる。今回著者は、 β -刺激剤ならびにACの直接の刺激剤で培養細胞を刺激し、高感度なスクシニル化を利用したRIA法で家鶏胚の培養RPEにAC-cAMP系が存在することを確認した。

これまで情報伝達系間に、チロシンキナーゼ系¹⁶⁾、PKC系¹⁷⁾、cAMP系¹⁸⁾¹⁹⁾の間のクロストークが知られている。PKC系のAC-cAMP系へのクロストークは非常に多彩なことが報告されている。マウスのマクロファージ(J 774 cells)²⁰⁾、ラットの褐色細胞腫(PC 12 cells)²¹⁾、ラットの松果体細胞²²⁾、ヒトのリンパ腫細胞²³⁾では、PKCがAC-cAMP系を促進させると報告されている。機能的にもPKCがハムスター²⁴⁾やヒト²⁵⁾の精子のアクロゾーム反応や血小板凝集能²⁶⁾を、クロストークを介して促進させると考えられている。一方、ラットの細網細胞²⁷⁾、七面鳥の赤血球²⁸⁾、ラットの膠細胞腫(C 6 cells)²⁹⁾、マウスの表皮細胞³⁰⁾ではPKCは、cAMP系に抑制的に働く。

今回は、培養RPEにおけるPKC系のAC-cAMP系へのクロストークを検討した。培養RPEにおいては、PKC刺激剤のPMAがイソプロテレノールのcAMP産生能を有意に低下させた。しかし、PMAの類似物質は、有意に低下させなかった。また、PKCの阻害剤の前処置で、PMAのcAMP産生抑制作用は有意差を示さなかった。これらからPMAのAC-cAMP抑制作用はPKCを介したもので、PKCはAC-cAMP系を抑制すると思われる。

PKCは、タンパク質中のセリン、スレオニン残基をリン酸化する酵素³¹⁾であるが、同時にPI系の情報伝達を調節する蛋白質間の共役を阻害する³²⁾か、これらの蛋白質をリン酸化³³⁾し、脱感作を行うと考えられている。培養RPEにおけるPKCの抑制作用も、PI系の脱感作と同じくAC-cAMP系の一部をリン酸化するか、共役を阻害している可能性がある。

PMAで β -受容体刺激によるcAMP産生能が有意に低下したため、PKCが細胞膜の情報伝達系を構成している受容体、G蛋白、ACのいずれかのリン酸化を行ったか、またはそれぞれの共役阻害を行ったと考えられる。ACの直接刺激によるcAMP産生能は、PMAで変化しなかったとはいえず、PKCの作用部位として、ACのリン酸化も考えられる。しかし、G蛋白とACの共役がはずれるとACのフォルスコリン結合部位が減少すること³⁴⁾³⁵⁾が報告されており、PKCがG蛋白とACの共役を阻害し、 β -受容体刺激ならびにACの直接刺激によるcAMP産生能を低下させた可能性も

ある。いずれにしても、PKCがAC-cAMP系のどの部分に作用し、抑制効果が出現しているのかは証明できていない。

近年、細胞の情報伝達系について多くの経路、相互作用が新たに発見され、混沌としてきた。しかし、細胞膜の情報伝達系ならびにクロストークを解明することは、生体の調節機序を知るうえできわめて重要な課題であり、さらに研究が必要と思われる。

稿を終えるにあたり、ご校閲頂いた調枝寛治教授に深謝申し上げます。また、終始ご指導頂きました三嶋 弘助教授ならびにご助言頂いた薬学科の石橋貞彦教授、黒川知則講師に御礼申し上げます。なお、本論文の要旨は第95回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) **Rodbell M**: The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284: 17-22, 1980.
- 2) **Hokin MR, Hokin LE**: Enzyme secretion and the incorporation of P³² into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem* 203: 967-977, 1953.
- 3) **Hunter T, Sefton BM**: Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1311-1315, 1980.
- 4) **Houslay MD**: 'Crosstalk': A pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur J Bio Chem* 195: 9-27, 1991.
- 5) **Frambach DA, Valentine JL, Weiter JJ**: Alpha-1 adrenergic receptors on rabbit retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 737-741, 1988.
- 6) **Frambach DA, Fain GL, Farber DB, et al**: Beta adrenergic receptors on cultured human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1767-1772, 1990.
- 7) **Koh S-WM, Chader GJ**: Retinal pigment epithelium in culture demonstrates a distinct beta-adrenergic receptor. *Exp Eye Res* 38: 7-13, 1984.
- 8) **Gallemore RP, Steinberg RH**: Effects of dopamine on the chick retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 67-80, 1990.
- 9) **Shepherd V, Tarnowski BI, McLaughlin BJ**: Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1779-1784, 1991.
- 10) **Boyle D, Tien L, Cooper NGF, et al**: A mannose receptor is involved in retinal phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1464-1470, 1991.
- 11) **Leschey KH, Hackett SF, Singer JF, et al**: Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 839-846, 1990.
- 12) **Spitznas M, Hogan S**: Outer segments of photoreceptors and the retinal pigment epithelium: Interrelationship in the human eye. *Arch Ophthalmol* 84: 810-819, 1970.
- 13) **Boll F**: Zur Anatomie und Physiologie der Retina. *Arch Anat Physiol* 4: 783-787, 1977.
- 14) **Miller SS, Steinberg RH**: Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 25: 235-248, 1977.
- 15) **Eguchi G, Okada TS**: Differentiation of lens tissue from the progeny of chick retinal pigment cells cultured in vitro: A demonstration of a switch of cell types in clonal cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1495-1499, 1973.
- 16) **Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, et al**: Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64: 281-302, 1991.
- 17) **Wheeler MB, Veldhuis JD**: Interactions of protein kinase C with receptor and non-receptor-mediated cyclic AMP generation in swine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 59: 195-203, 1988.
- 18) **Olbrich C, Siess W**: Epinephrine and the Ca⁺⁺ ionophore A23187 synergistically induce platelet aggregation without protein kinase C activation. *FEBS Lett* 243: 275-279, 1988.
- 19) **Siess W, Lapetina EG**: Platelet aggregation induced by alpha₂-adreno receptor and protein kinase C activation. *Biochem J* 263: 377-385, 1989.
- 20) **Chambaut-Guerin AM, Thomopoulos P**: Protein kinase C potentiates isoproterenol-mediated cyclic AMP production without modifying the homologous desensitization process in J774 cells. *Eur J Biochem* 170: 381-387, 1987.
- 21) **Hollingsworth EB, Ukeno D, Daly JW**: The protein kinase C activator phorbol-12-myristate-13-acetate enhances cyclic AMP accumulation in pheochromocytoma cells. *FEBS Lett* 196: 131-134, 1986.
- 22) **Sugden D, Vanecek J, Klein DC, et al**: Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 314: 359-361, 1985.

- 23) **Nordstedt C, Kvanta A**: Dual effects of protein kinase C on receptor-stimulated cAMP accumulation in a human T-cell leukemia line. *European J Pharmacol* 172: 51-60, 1989.
- 24) **Visconti PE, Tezon JG**: Phorbol esters stimulate cyclic AMP accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 40: 223-231, 1989.
- 25) **De Jonge CJ, Han HL, Mack SR, et al**: Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. *J Androl* 12: 62-70, 1991.
- 26) **Gloria GV, Adolfo GS**: Activation of protein kinase C inhibits hormonal stimulation of the GTPase activity of Gi in human platelets. *FEBS Lett* 279: 316-318, 1991.
- 27) **Yamashita A, Kurokawa T, Danura T, et al**: Induction of desensitization by phorbol ester to beta-adrenergic agonist stimulation in adenylate cyclase system of rat reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 125-130, 1986.
- 28) **Kelleher DJ, Pessin JE, Ruoho AE, et al**: Phorbol ester induces desensitization of adenylate cyclase and phosphorylation of the beta-adrenergic receptor in turkey erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4316-4320, 1984.
- 29) **Mallorga P, Tallman JF, Henneberry RC, et al**: Mepacrine blocks β -adrenergic agonist-induced desensitization in astrocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1341-1345, 1980.
- 30) **Mufson RA, Simsimon PC**: The effect of the phorbol ester tumor promoters on the basal and catecholamine-stimulated levels of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse skin and epidermis in vivo. *Cancer Res* 37: 665-669, 1977.
- 31) **Nishizawa Y**: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698, 1984.
- 32) **Paris S, Pouyssegur J**: Further evidence for a phospholipase C-coupled G protein in hamster fibroblasts. *J Biol Chem* 262: 1970-1976, 1987.
- 33) **Sauvage C, Cash CD, Maitre M**: Isolation of human brain protein kinase C: Evidence for kinase C catalytic fragment modulating G protein-GTPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 593-599, 1991.
- 34) **Seamon KB, Vaillancourt R, Daly JW**: Modulation of forskolin binding to rat brain membranes. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 10: 535-549, 1985.
- 35) **Seamon KB, Daly JW**: High affinity binding of forskolin to rat brain membranes. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 19: 125-135, 1985.