

## ヒト血液細胞における Protein Kinase C 活性の基礎的検討

白戸 りさ

Ca<sup>2+</sup>-リン脂質依存性 protein kinase C 活性 (PKC) をヒト血液細胞において測定した。細胞の種類による PKC 活性の差を検討するため、正常ヒト末梢血好中球及びリンパ球において測定し、総活性はそれぞれ、 $187.3 \pm 97.9$ ,  $418.0 \pm 183.4$  pmol/min/mg protein であり、その 99.6%, 94.7% を細胞質画分が占めていた。

また、同系統の細胞においてその分化段階による PKC 活性の差を検討するため、慢性骨髄性白血病症例の末梢血白血病細胞を Percoll 不連続勾配によって分画し、芽球層と、成熟好中球層の PKC 活性を測定した。その結果、幼若な細胞が成熟細胞に比し、総活性は  $48.3 \pm 17.4\%$  と低値を示し、膜画分比率は幼若な細胞では 5.7%, 成熟細胞では 1.0% と幼若な細胞がより高値を示した。以上より、血液細胞であっても、その分化の方向により PKC 活性が異なり、また細胞の分化度によっても差異が認められた。

(平成2年2月28日採用)

### Basic Studies on Protein Kinase C Activity in Human Blood Cells

Lisa Shirato

Ca<sup>2+</sup>-phospholipid dependent protein kinase C (PKC) activities in human blood cells were measured. Total PKC activities in peripheral neutrophils and lymphocytes from healthy volunteers were  $187.3 \pm 97.9$  pmol/min/mg protein and  $418.0 \pm 183.4$ , and the activities in cytosols were 99.6% of the total activities and 94.7%, respectively.

PKC activities were also determined in the peripheral leukemic cells at various differentiation stages, which were obtained from patients with chronic myelocytic leukemia. The leukemic cells were fractionated by discontinuous density gradient with Percoll. In immature cells, total PKC activities were  $48.3 \pm 17.4\%$  of mature neutrophils, and those in the membrane fractions were  $5.7 \pm 5.0\%$ , which were higher than those in mature cells ( $1.0 \pm 0.5\%$ ). Total activities of PKC and its activities in subpopulation such as in the membrane fraction may be varied in the kind of cell lineages and the extent of maturation in human blood cells.

(Accepted on February 28, 1990) *Kawasaki Igakkaishi* 16(1): 1-6, 1990

**Key Words** ① Protein kinase C ② Normal human leukocytes  
③ Differentiation ④ Chronic myelocytic leukemia

## はじめに

Ca<sup>2+</sup>-リン脂質依存性 protein kinase C (以下 PKC と略す) は、種々の細胞において、細胞応答に重要な役割を果たしていることが近年明らかになってきており、<sup>1),2)</sup> また PKC が発癌プロモーターである phorbol ester によって直接活性化されることが明らかになって以来、細胞の増殖や癌化の過程における重要性も示唆されている。<sup>3),4)</sup>

血液細胞においても、リンパ球に対する mitogen 刺激や、好中球がその機能発現を来す際に、PKC の活性化が認められている。<sup>5)~8)</sup> また、株化された血液悪性細胞への分化誘導剤の投与により、PKC が活性化されることも認められている。<sup>9)~11)</sup> そこで、ヒト血液細胞の分化における PKC の役割を検討する目的で、正常ヒト末梢血好中球及びリンパ球の PKC 活性を測定し、酵素活性の正常範囲を求めるとともに、慢性骨髄性白血病細胞の分化段階と PKC 活性の関連についても検討した。

## 材料と方法

### 1) 細胞の採取と分画

ヒト末梢血リンパ球は、健康人末梢血を比重遠心分離液 (Lymphoprep, Nycomed A5, Oslo, Norway, 比重 1.077) にて分離し単核球層を採取した。また、ヒト末梢血好中球は、単核球・多核球比重遠心分離液 (Mono-Poly Resolving Medium, Flow Laboratories, Inc., North Ryde, Australia, 比重 1.114) を用いて分離、採取した。

慢性骨髄性白血病細胞は、慢性骨髄性白血病慢性期の患者末梢血より採取した。症例は白血球数 10,000/ $\mu$ l 以上で、その分画に骨髄芽球が 1~3% の割合で出現している症例を選択した。なお、全例とも busulfan の投与は受けていない。

Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に、1.5 M NaCl を 9:1 (v/v) の比率で加えて調整したストック液を 100% Percoll とし、それに phosphate-buffered-saline (PBS) を

一定量加えて、各濃度の Percoll 液を作製した。この各濃度の Percoll 液を順次重層し、下層より 100%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40% の不連続勾配を作製した。患者末梢血 2 ml をこの最上層に重層し、400×g, 20 min の遠心で分画した。密度の基準は、密度マーカービーズの使用によった。

### 2) PKC 活性の測定

細胞はそれぞれ PBS にて洗浄した後、25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EGTA, 20 mM 2-mercaptoethanol, 40  $\mu$ g/ml phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) を含む Buffer A 1 ml に浮遊させ、超音波にて細胞破碎後、100,000×g, 60 min, 4°C にて遠心し、細胞質画分と膜画分とに分離した。膜画分は再度 Buffer A に浮遊させ、1% Nonidet P-40 を加えて氷上に 1 時間おいた後、100,000×g, 60 min, 4°C にて遠心し、この上清を膜画分として用いた。細胞質、膜画分はそれぞれ Buffer A にてあらかじめ平衡化した 0.35 ml DEAE-Sephacel カラム (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に吸着し、Buffer A 10 ml にて洗浄した後、0.15 M NaCl を含む Buffer A 1.4 ml で PKC 画分を溶出した。

PKC 活性は、ヒストンのリン酸化能を測定し、phosphatidylserine, diolein 存在、及び非存在下での [<sup>32</sup>P- $\gamma$ ] ATP (New England Nuclear, Wilmington, USA) の、比リン酸化活性 (pmol/min/mg protein) をもって表現した。反応液は 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM Mg acetate, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 nM [<sup>32</sup>P- $\gamma$ ] ATP, 50  $\mu$ g histone (Type III-S) (Sigma, St. Louis, USA), 20  $\mu$ g phosphatidylserine (Sigma, St. Louis, USA), 0.4  $\mu$ g 1,2-diolein (Sigma, St. Louis, USA), sample protein とした。30°C, 6 min の孵置後に、2 ml の 5% トリクロロ酢酸溶液を加えて反応を停止し、5% トリクロロ酢酸にて洗浄した後、液体シンチレーションカウンターにて <sup>32</sup>P の放射活性を測定した。<sup>12),13)</sup>

**Table 1.** Protein kinase C activity of human lymphocytes

No.	Total (pmol/min/ mg protein)	Cytosol	Membrane	Cytosol/Total ratio (%)
1	644.5	636.6	7.9	98.8
2	164.9	150.8	14.1	91.4
3	140.8	140.0	0.8	99.4
4	491.8	485.1	6.7	98.6
5	522.8	490.9	31.9	93.9
6	410.6	391.8	18.8	95.4
7	517.6	497.3	20.3	96.1
8	732.2	698.8	33.4	95.4
9	251.4	250.6	0.8	99.7
10	516.2	495.5	20.7	96.0
11	301.2	239.0	62.2	79.3
12	443.8	422.6	21.2	95.2
13	304.1	297.7	6.4	97.9
14	545.0	515.0	30.0	94.5
15	320.1	307.1	13.0	95.9
16	724.4	661.7	62.7	91.3
17	632.0	590.2	41.8	93.4
18	437.2	422.8	14.4	96.7
19	283.0	261.9	21.2	92.5
20	264.2	253.4	10.8	95.9
21	129.9	117.8	12.1	90.7
	418.0±183.4	396.5±175.4	21.4±17.3	94.7±4.4

**Table 2.** Protein kinase C activity of human neutrophils

No.	Total (pmol/min/ mg protein)	Cytosol	Membrane	Cytosol/Total ratio (%)
1	120.1	119.4	0.7	99.4
2	263.1	260.3	2.8	98.9
3	219.8	219.6	0.2	99.9
4	171.9	171.6	0.3	99.8
5	249.2	249.1	0.1	99.9
6	316.9	316.8	0.1	99.9
7	129.3	129.2	0.1	99.9
8	324.4	319.3	5.1	98.4
9	100.9	100.1	0.8	99.2
10	142.6	141.0	1.6	98.9
11	186.9	186.4	0.5	99.7
12	426.7	426.1	0.6	99.9
13	154.9	154.8	0.1	99.9
14	186.5	186.4	0.1	99.9
15	162.8	162.7	0.1	99.9
16	83.0	82.9	0.1	99.9
17	64.9	64.8	0.1	99.8
18	67.8	67.3	0.5	99.3
	187.3±97.9	186.5±97.4	0.8±1.3	99.6±0.5

## 成 績

## 1) 正常ヒトリンパ球における PKC 活性

正常人 21 例についてヒトリンパ球における PKC 総活性, 細胞質画分活性, Nonidet P-40 により可溶化した膜画分活性, 及び細胞質画分/総活性比の結果を示した(**Table 1**). 正常ヒトリンパ球においては, 細胞質画分  $396.5 \pm 175.4$ , Nonidet P-40 により可溶化した膜画分  $21.4 \pm 17.3$ , 総活性  $418.0 \pm 183.4$  pmol/min/mg protein ( $n=21$ ) であった.

## 2) 正常ヒト好中球における PKC 活性

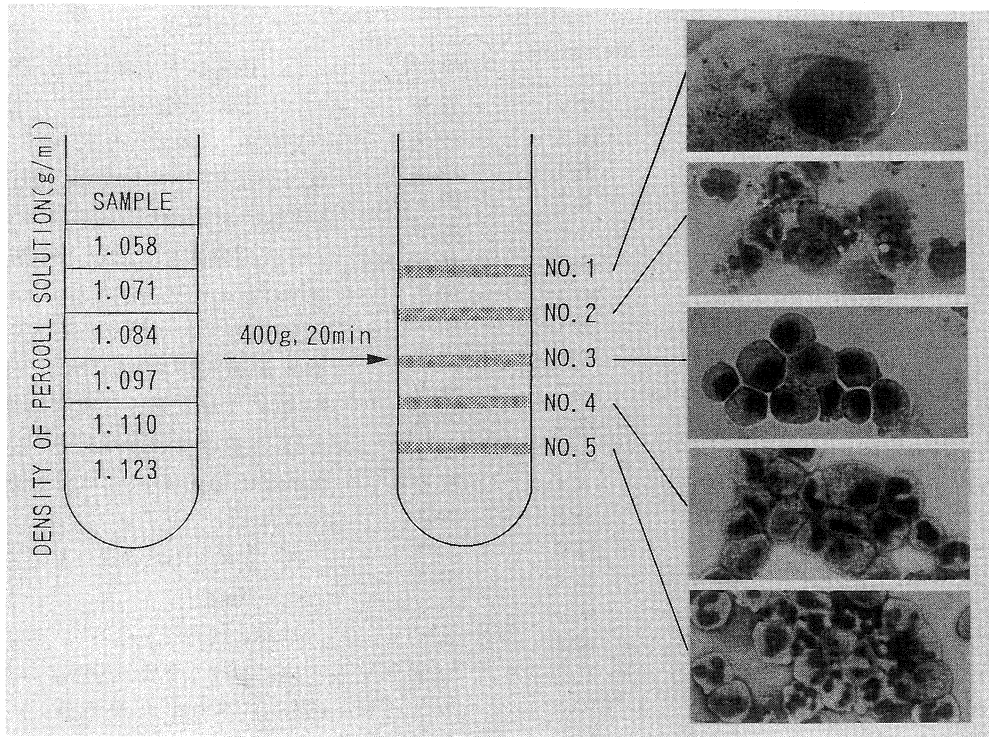
正常人 18 例におけるヒト末梢血好中球における PKC 活性は, 細胞質画分  $186.5 \pm 97.4$ , 膜画分  $0.8 \pm 1.3$ , 総活性  $187.3 \pm 97.9$  pmol/min/mg protein ( $n=18$ ) であった (**Table 2**).

## 3) 細胞の成熟度と PKC 活性

血液細胞の成熟度による PKC 活性に対する影響を検討する目的で典型的慢性骨髄性白血病 4 症例を選び, Percoll 法によって各成熟段階の白血病細胞を分画し, 各々について PKC 活性を測定した.

慢性骨髄性白血病細胞は, Percoll 不連続勾配により, 5 層に分画され (**Fig. 1**), 最上層 (比重 1.062) は幼若な細胞により占められ, 最下層 (比重 1.120) はより成熟した桿状核好中球, 分葉核好中球により占められた. また, 中間の各 3 層は上層より下層へと分化度に合わせて成熟好中球の占める割合が多くなる結果となった.

最下層の分葉核好中球が存在する層の PKC 総活性を 100% とすると,



**Fig. 1.** Fractionation of leukocytes from a patient with chronic myelocytic leukemia by discontinuous density gradient with Percoll.

A representative result is shown.

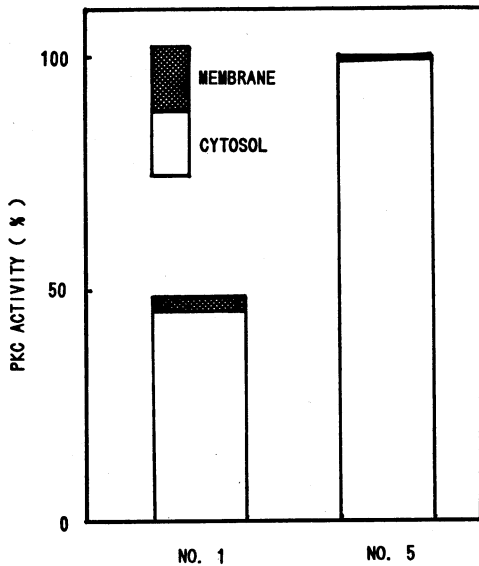
Heparinized blood was obtained from a CML patient. Percoll was prepared as follows: Nine parts of Percoll were mixed with one part of 1.5M NaCl and sequentially diluted in PBS to obtain solutions containing 100%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%. Two ml of each of the Percoll solutions were layered. On the top of the solutions, heparinized blood was layered and centrifuged at  $400\times g$ , for 20 min. (Giemsa stain, No. 1,  $\times 1,000$ , No. 2~No. 5  $\times 400$ )

より幼若な細胞の層は  $48.3 \pm 17.4\%$  ( $n=4$ ) であり、慢性骨髄性白血病の幼若な細胞は成熟した細胞より PKC 総活性は低値であった。また両層の膜画分の総活性に対する比率は各々最上層  $5.7 \pm 5.0\%$ 、最下層  $1.0 \pm 0.5\%$  であり、幼若な細胞のほうが膜画分での活性比率が高い結果であった (Fig. 2)。

#### 考 察

今回ヒト血液細胞における PKC 活性の正常範囲を検討したが、リンパ球及び好中球の PKC 活性を比較すると、まず総活性では、好中球はリンパ球の  $44.8\%$  と低値であった。また、膜

画分活性の総活性に対する比率は、リンパ球においては  $5.3\%$ 、好中球においては  $0.4\%$  であり、リンパ球は好中球よりも膜画分での PKC 活性比率が高値であった。異なった組織間では PKC 活性、膜画分比率とも差異が認められており、ラット大脳においては PKC 活性の  $45\%$  が膜画分に存在し、<sup>2)</sup> 今回測定した血液細胞の好中球、リンパ球と比較すると膜画分比率は著しく高値である。しかし、ほとんどの組織では PKC 活性は主に細胞質画分に存在しており、<sup>2)</sup> 今回のヒト好中球、リンパ球の結果も同様であった。リンパ球と好中球の間に認められた総活性及び膜画分比率の差が何によるものかは



**Fig. 2.** PKC activity in leukocytes fractionated by discontinuous density gradient with Percoll in CML patients. Hatched areas denote PKC activities in the membrane fraction and non-hatched areas depict those in the cytosol fraction. PKC activities were only shown at the No. 1 and No. 5 fractions, as shown in **Fig. 1**.

現在のところ判然としない。それぞれ PKC がその役割の一端を担っているとされるリンパ球への mitogen 刺激及び好中球への機能発現の刺激の際に、リンパ球ではその後幼若化現象が導かれ、細胞の増殖が引き起こされる。<sup>5)~8)</sup> よって、リンパ球では静止期にあっても細胞側において、その準備がなされており、今回のと

ころ PKC 総活性、膜画分比率の高値がその一部を示しているのかもしれない。

PKC はその活性化によって、細胞質から膜へとトランスロケーションするといわれており、種々の細胞において報告がなされている。<sup>14), 15)</sup> 慢性骨髄性白血病細胞をその分化段階により分画した際、より幼若な細胞が成熟した細胞より PKC 総活性が低値で、膜画分比率が相対的に高値であったことは、幼若な細胞においては PKC の活性化が起こっており、ある程度の膜へのトランスロケーションと、ダウンレギュレーションが起こっているとも考えられる。しかし、PKC のアイソザイムに視点を移すと、<sup>16)</sup> 血液細胞では、leukemia や lymphoma の cell line の分化段階によりアイソザイムの比率が異なることも報告されており、<sup>17)</sup> 慢性骨髄性白血病細胞の分化段階による PKC 活性の差もこのアイソザイムの違いによるものかもしれない。

以上、正常ヒトリンパ球及び好中球における PKC 活性について、その総活性、細胞質画分活性、膜画分活性を測定し、細胞の成熟度による PKC 活性の差異について検討した。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った川崎医科大学血液内科 八幡義人教授、またご教示いただいた岐阜大学医学部生化学教室 野沢義則教授、中島茂先生に深甚なる謝意を捧げます。

なお、本論文の要旨は第51回日本血液学会総会（平成元年4月8日、前橋）において発表した。

## 文 献

- 1) Nishizuka, Y.: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233 : 305—312, 1986
- 2) Nishizuka, Y.: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334 : 661—665, 1988
- 3) Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257 : 7847—7851, 1982
- 4) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308 : 693—698, 1984
- 5) White, J. R., Huang, C. K., Hill, J. M., Jr., Naccache, P. H., Becker, E. L. and Sha'afi R. I.: Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate and its analogue 4  $\alpha$ -phorbol 12, 13 didecanoate

- on protein phosphorylation and lysosomal enzyme release in rabbit neutrophils. *J. Biol. Chem.* 259 : 8605-8611, 1984
- 6) Gennaro, R., Florio, C. and Romeo, D.: Activation of protein kinase C in neutrophil cytoplasts. Localization of protein substrates and possible relationship with stimulus-response coupling. *FEBS Lett.* 180 : 186-190, 1985
  - 7) Kaibuchi, K., Takai, Y. and Nishizuka, Y.: Protein kinase C and calcium ion in mitogenic response of macrophage-depleted human peripheral lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 260 : 1366-1369, 1985
  - 8) Nel, A. E., Wooten, M. W., Goldschmidt-Clermont, P. J., Miller, P. J., Stevenson, H. C. and Galbraith, R. M.: Polymixin B causes coordinate inhibition of phorbol ester-induced C-kinase activity and proliferation of B lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128 : 1364-1372, 1985
  - 9) 鎌田 徹: 細胞増殖とプロテインキナーゼC. *蛋・核・酵* 33 : 2156-2165, 1988
  - 10) 千田和広, 黒木登志夫: 細胞増殖とプロテインキナーゼC. *蛋・核・酵* 31 : 1983-1993, 1986
  - 11) Melloni, E., Pontremoli, S., Michetti, M., Sacco, O., Cakiloglu, A.G., Jackson, J. F., Rifkind, R. A. and Marks, P. A.: Protein kinase C activity and hexamethylenebisacetamide-induced erythroleukemia cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 5282-5286, 1987
  - 12) Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. and Nishizuka, Y.: Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 257 : 13341-13348, 1982
  - 13) Nagao, S., Nagata, K., Kohmura, Y., Ishizuka, T. and Nozawa, Y.: Redistribution of phospholipid/Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase in mast cells activated by various agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 : 645-653, 1987
  - 14) Nishihara, J., McPhail, L. C. and O'Flaherty, J. T.: Stimulus-dependent mobilization of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134 : 587-594, 1986
  - 15) Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B., Sacco, O. and Horecker, B. L.: Differential mechanism of translocation of protein kinase C to plasma membranes in activated human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136 : 228-234, 1986
  - 16) Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K., Hagiwara, M., Watanabe, M., Ohta, H., Ito, Y., Tsurudome, M. and Yoshida, T.: Cell type-specific protein kinase C isozymes in the rabbit cerebellum. *J. Biol. Chem.* 263 : 4523-4526, 1988
  - 17) Sawamura, S., Ase, S., Berry, N., Kikkawa, U., McCaffrey, P. G., Minowada, J. and Nishizuka, Y.: Expression of protein kinase C subspecies in human leukemia-lymphoma cell lines. *FEBS Lett.* 247 : 353-357, 1989