

血小板由来細胞増殖因子処理 Balb/c3T3 細胞における
モノアシルグリセロールからの 1,2 ジアシルグリセロールの生成

畑 裕

①

血小板由来細胞増殖因子処理Balb/c3T3 細胞におけるモノアシルグリセロールからの
1,2 ジアシルグリセロールの生成

畑 裕

目次

はじめに	2
方法	8
結果	12
考察	25
文献	30

はじめに

血小板由来細胞増殖因子 (PDGF) は、血清の線維芽細胞・血管平滑筋細胞に対する増殖刺激活性が血小板除去血漿の活性より強い事実をきっかけとして発見された細胞増殖因子であり、血小板アルファ顆粒に含まれている (1)。PDGF は A 鎖・B 鎖 2 種のポリペプチドの組合せから成るが、ヒト血小板中の PDGF は AB タイプである。骨肉種からは AA タイプの PDGF が、ブタ血小板からは BB タイプの PDGF が分離されている (2-5)。また *v-sis* gene によってコードされる産物は BB タイプの PDGF に関連している (6, 7)。細胞膜には PDGF の結合するレセプターが存在する (8-14、最近の総説として 15)。PDGF-AB に対する結合活性を指標として精製、クローニングされた PDGF レセプターは分子量 180-190 K の膜糖蛋白であり、4 つのシステイン残基間結合を有する免疫グロブリン類似の細胞外ドメインと、アミノ酸 25 個からなる膜貫通ドメイン、そしてチロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメインから形成されている (16)。このレセプターは PDGF-AA も結合するが、PDGF-BB に対しより親和性が高い (17)。この他 PDGF-AA に対するレセプターなど複数のレセプターが報告されている (18-21)。PDGF との結合性の解析から、PDGF レセプターは $\alpha \cdot \beta$ ふたつのサブユニットから構成されるという解釈も行なわれている (22)。PDGF レセプターは前駆体として生成され、細胞膜表面に到達する以前に小胞体・ゴルジ体でプロセッシングを受ける (23, 24)。また PDGF が結合するとレセプターの degradation が促進される (9, 25)。

PDGF がレセプターに結合すると、レセプターのチロシンキナーゼの活性化 (26-28)、ホスファチジルイノシトールの水解 (29-31)、細胞内 pH の上昇 (32)、細胞内カルシウム濃度の上昇 (33)、遺伝子発現の誘導 (34-36)、cAMP の上昇 (37) などの変化が惹起される。PDGF の細胞増殖刺激作用、すなわち DNA 合成とこれらの変化とがどのように関係しているかは未だに明らかでない。ホスファチジルイノシトール水解反応はその結果イノシトール 3 リン酸とジアシルグリセロールを生じカルシウムの動員と C キナーゼの活性化を引き起こすので、PDGF の competence 作用のキープポイントであると考えられていた。しかし PDGF レセプターのキナーゼインサートドメインにポイントミューテーションを導入すると、ホスファチジルイノシトール水解反応は起こるが DNA 合成は起こさないレセプターをつくりうることから、ホスファチジルイノ

シトール水解反応はPDGFのcompetence作用にとって必要かもしれないが十分ではないことが明らかとなった(38)。PDGFレセプターのチロシンキナーゼによって170-185K、130K、85K、75Kなどの蛋白質がリン酸化される(26、39)。このうち170-185K蛋白質はPDGFレセプターである(39-41)。PDGFレセプターの自己リン酸化部位はTyr-857、Tyr-751であり、後者はキナーゼインサートドメインに属する。Tyr-751を他のアミノ酸に置き換えると下記のホスファチジルイノシトールキナーゼ(PIキナーゼ)との相互作用が失われることが知られている(42)。85K蛋白質はPIキナーゼである可能性がある。PDGFレセプターに対する抗体によってレセプターと共にPIキナーゼ活性が沈降すること、レセプターのチロシンキナーゼによりPIキナーゼ自身がリン酸化され活性が上昇すること、前述のキナーゼインサートドメインにミューテーションを導入したDNA合成能をもたないレセプターが同時にPIキナーゼ活性をもたないことなどから、PIキナーゼがPDGFレセプターの細胞内シグナル伝達の重要な構成要素であることが推定されている(43、44)。このPIキナーゼにはホスファチジルイノシトール(PI)、PI-4-P、PI-4,5-P₂の3位をリン酸化する活性があり、従来知られていた代謝経路以外のホスファチジルイノシトール代謝系の存在が示唆されている(45、46)。75K蛋白質はRaf-1蛋白質である可能性がある。PDGFで刺激したBalb/c3T3細胞ではPDGFレセプターに対する抗体でRaf-1蛋白質が、Raf-1蛋白質に対する抗体でPDGFレセプターが沈降すること、自己リン酸化したPDGFレセプターによってRaf-1蛋白質のチロシン残基がリン酸化され、セリン・スレオニンキナーゼ活性が亢進することが知られている(47、48)。またホスホオリパーゼC IIもPDGFレセプターのチロシンキナーゼによってリン酸化され活性が上昇することが報告されている(49)。ただしこれらの蛋白質のPDGFレセプターによるリン酸化と活性調節についてはまだ評価が定まっていない。

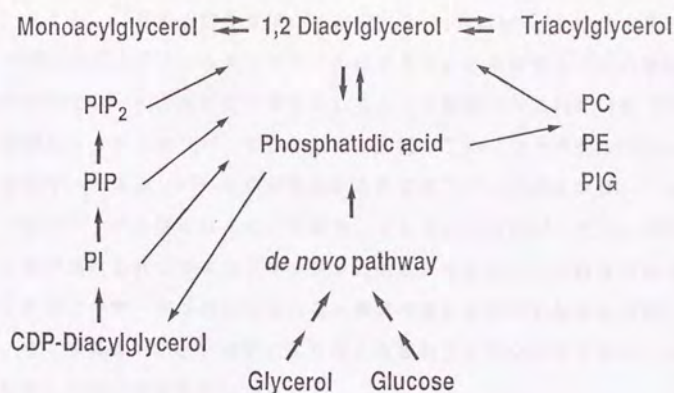
プロテインキナーゼC(Cキナーゼ)はカルシウム・ホスホリリドにより活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞増殖、分化、分泌、平滑筋収縮など多彩な細胞機能に重要な役割をはたしていると考えられている。現在まで7種のアイソザイムが同定され、それぞれ異なる役割を担っている可能性が想定されている。Cキナーゼはジアシルグリセロールの存在によりカルシウムイオンに対する親和性が高まり、生理的カルシウムイオン濃度下で完全な活性を獲得する。このジアシルグリセロール依存性もアイソザイ

ム毎に異なる (50-52)。

Cキナーゼが細胞増殖に関与していることは、Cキナーゼを直接活性化する 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) によって細胞増殖が惹起されること (53-56)、phorbol 12,13 dibutyrate (PDBu) によってCキナーゼをダウンレギュレートするとPDBuやバソプレッシンによる細胞増殖が抑制されること (57)、血清によって細胞増殖を誘発すると細胞増殖とパラレルにCキナーゼの基質と考えられている蛋白質のリン酸化が *in vivo* で起こること (58)、更にCキナーゼを線維芽細胞に発現させると増殖の血清依存性が減ること (59、60) 等から示唆されている。またPDBuでCキナーゼをダウンレギュレートしたSwiss3T3細胞にCキナーゼをマイクロインジェクトすると再びPDBuに反応してDNA合成を起こすようになることも報告されている (61)。PDGFの増殖刺激作用にCキナーゼが関与しているかについては、PDGFの刺激によりCキナーゼの基質とされる80K蛋白質のリン酸化がおこなわれるので、少なくともCキナーゼはPDGFの増殖作用の一部を担っていると考えられる (62、63)。しかしPDBuでCキナーゼをダウンレギュレートしてもPDGFによる増殖刺激は完全には抑制されないで、Cキナーゼ以外の経路も関与しているはずである (57)。また、PDGFによって *c-fos* (36)、*c-myc* (35)、*c-jun* (64) あるいは *small inducible gene* (34、65) などの一群の遺伝子が誘導されるが、この作用にもCキナーゼを介する経路とCキナーゼと別の経路のふた通りが存在する (66)。これらの遺伝子の誘導はサイクロヘキシミドで抑制されず蛋白合成を必要としないが、中でもプロモーター領域にSerum response element (SRE) をもつ *c-fos* は最も速く誘導される (67)。*c-fos* は *c-jun* 産物と類似のAP-1と複合体を形成してTPAによって誘導される遺伝子のプロモーター領域に存在するTPA response element (TRE) に作用することが知られている (68、69、総説として70)。前述のようにPDGFはRaf-1をリン酸化しそのキナーゼ活性を高めるが、活性型のRaf-1 cDNAをtransfectすると、Cキナーゼと独立にSREやTREをもつ遺伝子の発現が亢進することが最近報告された (71)。これらの知見からPDGFによる遺伝子誘導にはCキナーゼを含む複数の経路が互に関係しあっていると予測される。

PDGFによるCキナーゼの活性化機構に関しては、ホスホリパーゼCの活性化を介してホスファチジルイノシトールが水解され、その結果イノシトール3リン酸によるカルシ

ジアシルグリセロールの生成経路



PI = Phosphatidylinositol
 PC = Phosphatidylcholine
 PE = Phosphatidylethanolamine
 PIg = Phosphatidylinositol
 glycan

ウム動員とジアシルグリセロールの生成がおこりCキナーゼの活性化に至ると考えられている(29-31)。しかし、ホスファチジルイノシトールのプールは比較的限られており、ホスファチジルイノシトールの水解のみではCキナーゼの持続的活性化に見合うジアシルグリセロールの生成は説明し難く、それ以外の供給ルートが存在すると推測される。ホスファチジルイノシトールの水解以外のジアシルグリセロール生成経路としては、ホスファチジルコリンの水解(72)、ホスフォグリコリピドの水解(73、74)、トリアシルグリセロールの水解(75)、ホスファチジン酸からの新生(76)、があげられる(付図参照)。線維芽細胞や血管平滑筋細胞にPDGFを作用させるとアラキドン酸・プロスタグランジン・トリアシルグリセロールの生成やホスファチジルイノシトールのリン酸化が亢進するなど(77-80)、PDGFは線維芽細胞の脂質代謝にさまざまな影響を与えるので、ホスファチジルイノシトールの水解以外の経路がPDGFによるジアシル

グリセロール生成に関与する可能性がある。事実、PDGFによってホスファチジルコリンが水解されジアシルグリセロールが生成されることが報告されている(72)。またPIIP・PIP₂に対する抗体を用いた研究により、Balb/c3T3細胞をPDGF刺激したとき、初期に生じるジアシルグリセロールはPIP₂に由来するがその後は別の脂質からジアシルグリセロールが生じると考えられるという指摘もなされている(81)。さらにTPA刺激によりホスホリパーゼCの活性が亢進してホスファチジルコリンが水解されるという報告や、ホスホリパーゼDが活性化されてホスファチジルコリン・ホスファチジルエタノールアミンが分解されるという報告、そしてホスホリパーゼA₂の活性が亢進しアラキドン酸が産成されプロスタグランジンの生成が高まるという報告があり(82-90)、ひとたびCキナーゼが活性化されると脂質代謝にさまざまな変化が起こることが予測される。そこで私はPDGF刺激により起こる細胞内ジアシルグリセロール代謝変化の詳細を検討する目的で本研究を行なった。

細胞としてはBalb/c3T3細胞を選択した。Balb/c3T3細胞はマウスの線維芽細胞から確立された細胞株であり、density arrestにより静止期に入ると、再びDNA合成を開始するまでにPDGFに代表されるcompetence factorとIGFI・インシュリンに代表されるprogression factorの2種類の成長因子を必要とする。まずcompetence factorの働き(competence作用)によりprogression factorに感受性の状態(competence state)になる。一度PDGFに暴露されると5時間でcompetence stateに入り、その後にPDGFを除去しても数時間はcompetence stateが維持される。PDGFのcompetence作用は蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキシミドによっては影響されないがmRNA転写阻害作用のあるアクチノマイシンDにより阻害される(91、92)。このように細胞周期が明確で成長因子要求性が厳密であり、PDGFの作用について詳細な知見が集積していることがこの細胞を選択した理由である。

1) まずPDGF処理細胞と静止期の細胞に、外部からアイソトープラベルした脂質を加え、両者における1,2 ジアシルグリセロールへの取込を比較し、PDGF処理細胞では飽和脂肪酸がきわめて迅速に1,2 ジアシルグリセロールに取り込まれることを明らかにした。2) 次に1,2 ジアシルグリセロール以外の脂質への取込と比較することにより1,2 ジアシルグリセロールへの飽和脂肪酸取込の経路を検討した。3) 更にその変化がPDGFのcompetence作用と平行するか否かを検討した。4) また1,2 ジアシルグリセロールへの

方法

試料

PDGFは日本赤十字社の期限切れ血小板から部分精製した。[メチル³H]チミジン(42Ci/mmol)、[9,10-³H]ミリスチン酸(22.4Ci/mmol)、[2-³H]グリセロール(200mCi/mmol)、[1-¹⁴C]アラキドン酸(54.9mCi/mmol)、[1-¹⁴C]パルミチン酸(8.9mCi/mmol)、[1-¹⁴C]無水酢酸(10mCi/mmol)、D-[1-¹⁴C]グルコース(16mCi/mmol)はNew England Nuclear社から、[¹⁴C]ミリストイルCoA(54mCi/mmol)はAmersham Corp.社より購入した。2-モノ-C_{18:1}-アシルグリセロール以外の脂質およびRhizopus arrhizus トリアシルグリセロール・リパーゼはSigma社より、2-モノ-C_{18:1}-アシルグリセロールはSerdary Research Laboratories社より購入した。薄層クロマトグラフィ用の silica gel G plate はMerck社製を使用した。

細胞培養

液体窒素中で保存したBalb/c3T3細胞(clone A31)は解凍後、10%ウシ血清加Dulbecco's modified Eagles (DME)培地中で継代し、すべての実験を6週以内に行なった。脂質取込実験には35mm Falcon plastic plateに2mlの10%ウシ血清加DME培地を入れて2X10⁵コの細胞を、DNA合成実験にはCorning 24-well plateに1mlの10%ウシ血清加DME培地を入れて5X10⁴コの細胞を、モノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼの測定には100mm Falcon plastic plateに10mlの10%ウシ血清加DME培地を入れて1X10⁶コの細胞をまき、6日目に実験を行なった。

脂質の抽出と薄層クロマトグラフィー

中性脂質は、35mm Falcon plastic plate 1枚分の細胞を0.8mlの生理食塩水中で27ゲージの注射針を用いて破砕し、Blighの方法(93)に準じ1.0mlクロロホルム/2.0mlメタノール/0.1ml濃塩酸を加え抽出した後、水1.0ml/クロロホルム1.0mlを加え遠心により分離した下層を集め窒素ガスで乾固し、60μlのクロロホルムに溶かし40μlを薄層プレートで展開した。溶媒はベンゼン/クロロホルム/メタノール(16:3:1 by vol)を用いた。リン脂質は0.5mlクロロホルム/1.0mlエタノールで抽出し、水0.5ml/クロロホルム0.5mlを加え遠心分離しクロロホルム層を集め、クロロホルム/メタノール/28 Mアン

モニア水 (13:7:1 by vol) の溶媒で展開した。この方法ではホスファチジルセリンとホスファチジルイノシトールは十分分離されないで、両者をあわせて解析した。またメタノール/水/しゅう酸カリウム/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (40ml/60ml/1g/1mM) であらかじめ展開した薄層プレートを用いた。ホスファチジン酸を分析する場合は、クロロホルム/メタノール/酢酸/0.1M ほう酸 (125:50:25:25:3 by vol) を溶媒として用いた。

薄層クロマトグラフィーで分離した脂質は、ヨード蒸気によって検出した。 ^{14}C でラベルした場合にはオートラジオグラフィーを用いた。必要に応じてニンヒドリン、ローダミン 6 G を併用した。

トリアシルグリセロール・リパーゼ処理

35mm Falcon plastic plate で培養し静止状態に達した細胞を PDGF で 3 時間処理し $1\ \mu\text{Ci/ml}$ の $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸、 $0.1\ \mu\text{Ci/ml}$ の $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸を含む DME 培地で 10 分間ラベルした。前述の方法により細胞から抽出した中性脂質を薄層クロマトグラフィーで展開し、ジエチルエーテルによって 1,2 ジアシルグリセロールに相当する部分をプレートから抽出し窒素ガスで乾固し、 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸と $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸でラベルされた 1,2 ジアシルグリセロールを調整した。35mm Falcon plastic plate 5 枚分の 1,2 ジアシルグリセロールを基質として 0.02M acetate buffer, pH 5.6, 1mg/ml ウシ血清アルブミン, 20mM CaCl_2 を含む反応液 10ml 中で 40 単位/ml の Rhizopus arrhizus トリアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼを作用させた。インキュベーションはよく攪拌しながら 30°C で 60 分続け、生じた遊離脂肪酸とモノアシルグリセロールをヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (80:40:1 by vol) を溶媒とする薄層クロマトグラフィーで分析した。

DNA 合成

Corning 24-well plate で培養し静止期に入った細胞を、100mM acetic acid $10\ \mu\text{l}$ に溶かした 10 単位の PDGF を含む 1ml DME 培地で所定の時間インキュベートし、PDGF 処理細胞とした。対照は 100mM acetic acid $10\ \mu\text{l}$ のみを含む 1ml DME 培地で同じ時間インキュベートした。処理のすんだプレートを DME 培地で 3 回洗浄し、所定時間 DME 培地

中でインキュベートした後、 $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H] チミジンを含む5%血小板除去血漿加 DME 培地に置き換え、24時間にDNAに取り込まれた放射活性を測定した。この際10% トリクロロ酢酸沈降物をDNAとして評価した(94)。

モノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼの *in vitro* assay

100mm Falcon plastic plateの細胞を静止状態のまま或いはPDGF処理後、rubber policeman を用い1プレートあたり4 ml の10mM Tris/HCl, pH 7.4, 10mM EDTA, 2mM phenylmethanesulfonyl fluoride 緩衝液で回収し、氷上で超音波で破碎しwhole cell lysateとした。細胞の破碎はassay の直前に行なった。

モノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼの測定はColeman らの方法に準じた(95)。反応は175mM Tris/HCl, pH 7.0, 1mg/mlウシ血清アルブミン, 7.5 μg ホスファチジルコリン, 7.5 μg ホスファチジルセリン, 10nCi[^{14}C]ミリストイルCoA、75 nM-sn- モノ-C_{18:1}-アシルグリセロールと測定サンプルを含む200 μl の反応液中で、37°Cで行なった。所定時間後に3.1ml のメタノール/クロロホルム/濃塩酸(10:20:1 by vol)を加え反応を停止し、産生された1,2 ジアシルグリセロールを測定した。

ジアシルグリセロール量の測定

ジアシルグリセロールの測定はBanschbachらの方法で行なった(96)。100mm Falcon plastic plate に培養した細胞から、DNA合成実験と同じ手順でPDGF処理細胞と静止状態の細胞を調整した。PDGF処理時間は3時間とした。この細胞から抽出した中性脂質を展開した薄層プレートから、1,2 ジアシルグリセロールに相当する部分を削りジエチルエーテルで回収した。100mm Falcon plastic plate 10 枚分の1,2 ジアシルグリセロールに25 μl ピリジン, 0.3 μl 過塩素酸, 6.0 μl [^{14}C] 無水酢酸(オリジナルの[^{14}C] 無水酢酸を非放射性無水酢酸で希釈し0.15mCi/mlに調整して使用した)を加え、室温で30分インキュベートしてジアシルグリセロールを完全にアセチル化した。アセチル化したジアシルグリセロールは水0.3ml/ヘプタン0.5ml を加えヘプタン層から回収し、ヘプタン/ジエチルエーテル/酢酸(40:10:1 by vol)で展開し、取り込まれた放射活性を測定した。既知量の1,2 ジパルミトイルグリセロールを用いて標準曲線を作成した。この方法では0.02 μmol から 0.4 μmol 迄の範囲で測定が可能であった。

蛋白定量

蛋白の定量はウシ血清アルブミンをスタンダードとしてBradfordの方法で行なった(97)。

結果

静止状態およびPDGF処理細胞における1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸の取込

静止状態およびPDGF処理細胞における1,2 ジアシルグリセロール代謝状態を比較する目的で、静止状態・PDGF処理後のBalb/c3T3細胞への脂肪酸の取込を、ラベルした脂肪酸を用いて測定した。

静止状態・PDGF処理細胞は“方法”の項目に記載した方法で調整した。これらの細胞に $1\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] ミリスチン酸、 $0.05\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C] アラキドン酸、 1mg/ml 脂肪酸除去アルブミンを含む 1ml のDME培地を加えてインキュベートし、図1の横軸に示した各時間に冷生理食塩水 1ml によって反応を停止し、1,2 ジアシルグリセロール分画に取り込まれた放射活性を測定した。

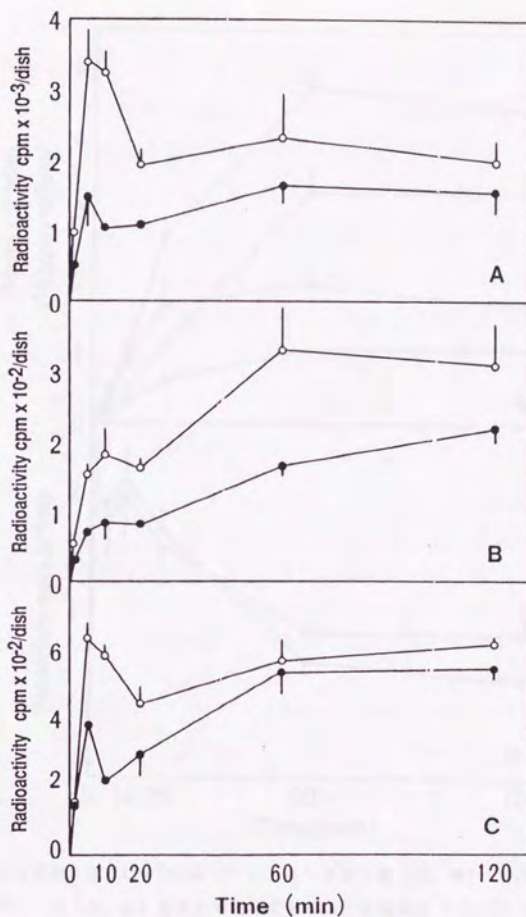
静止状態の細胞におけるミリスチン酸の1,2 ジアシルグリセロールへの取込は5分後にピークを示し、その後少なくとも120分間はほぼ一定のレベルを保った。PDGF処理細胞の1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸の取込は2峰性で、5分後にピークを示した後、ピークの60%前後のプラトーに移行した。PDGF処理細胞のピークは静止状態の細胞に認められるピークの約2倍の値であり、プラトーの値もPDGF処理細胞でより高い傾向を示した(図1A)。

アラキドン酸の1,2 ジアシルグリセロールへの取込も、PDGF処理細胞で静止状態の細胞より亢進していた。アラキドン酸の取込のtime courseはミリスチン酸にみられるような顕著な初期ピークを示さず、60分後までほぼ漸増した(図1B)。

次に他の飽和脂肪酸の1,2 ジアシルグリセロールへの取込を調べるため、放射性のパルミチン酸を用いた。パルミチン酸もミリスチン酸と同じようにPDGF処理細胞で2峰性の取込を示した(図1C)。

トリアシルグリセロールへのミリスチン酸の取込は、1,2 ジアシルグリセロールへの取込に遅れて、ゆっくりと上昇し60分後に最大値に達した。トリアシルグリセロールへのアラキドン酸の取込も飽和脂肪酸とほぼ同様のパターンを示した。またPDGF処理細胞と静止状態の細胞を比較すると、ミリスチン酸・アラキドン酸のいずれもPDGF処理細胞で取込の亢進を認めた(図2A)。なおパルミチン酸でもミリスチン酸と同様の結果であった。

図1 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸、 $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸、 $[^{14}\text{C}]$ パルミチン酸の
1,2 ジアシルグリセロールへの取込



35mm Falcon plastic plate に6日間培養し静止期に達したBalb/c3T3細胞をPDGFを含むDME培地(○)あるいはPDGFのvehicleを含むDME培地(●)で3時間インキュベートした後、 $1\mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸(A)、 $0.05\mu\text{Ci/ml}$ $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸(B)、 $0.05\mu\text{Ci/ml}$ $[^{14}\text{C}]$ パルミチン酸(C)を含む培地に置き換え、横軸に示す各時間に1,2ジアシルグリセロールに取り込まれた放射活性を測定した。以下特に断らないかぎりデータは3つの培養の平均と標準誤差で表示した。

図2 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸、 $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸のトリアシルグリセロール
および細胞内遊離脂肪酸プールへの取込

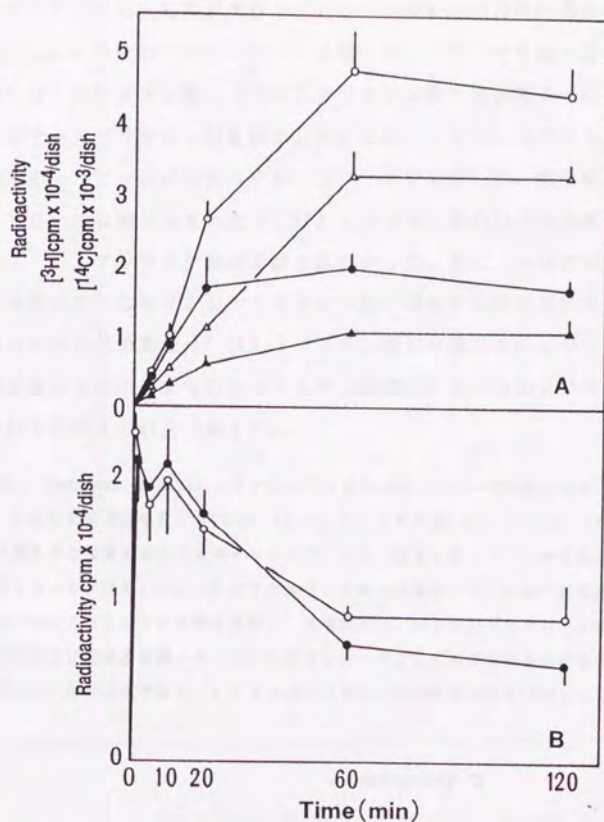


図1と同様の方法で $1 \mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸 (○、●)、 $0.05 \mu\text{Ci/ml}$ $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸 (△、▲) を含む培地中でPDGF処理細胞 (○、△) あるいは静止状態の細胞 (●、▲) のトリアシルグリセロール (A) および細胞内遊離脂肪酸プール (B) に取り込まれた放射活性を測定した。

一方、細胞内の遊離脂肪酸プールに取り込まれた $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸の放射活性にはPDGF処理細胞と静止状態とで有意な違いはなかった (図2B)。

ミリスチン酸の取り込まれる位置

ミリスチン酸が1,2 ジアシलगリセロールのsn-1分枝とsn-2分枝のいずれに取り込まれるかを明らかにするため、1,2 ジアシलगリセロールのsn-1分枝に選択的に作用する *Rhizopus arrhizus* 由来のトリアシलगリセロール・リパーゼを用いた。PDGF処理した細胞を [³H] ミリスチン酸、[¹⁴C] アラキドン酸で10分間ラベルし、両者が取り込まれた1,2 ジアシलगリセロールを抽出した。この1,2 ジアシलगリセロールを *Rhizopus arrhizus* 由来のトリアシलगリセロール・リパーゼで分解した。60分間の処理で、1,2 ジアシलगリセロールに取り込まれた [³H] ミリスチン酸の70%が遊離脂肪酸として回収されたが、[¹⁴C] アラキドン酸は遊離されなかった。更に、トリアシलगリセロール・リパーゼ処理後に生じるモノアシलगリセロールに残存する放射活性を測定した。モノアシलगリセロールには少量の [³H] ミリスチン酸しか検出されなかったが、[¹⁴C] アラキドン酸は検出された。すなわちミリスチン酸は1,2 ジアシलगリセロールのsn-1分枝に取り込まれると考えられた(表1)。

表1 *Rhizopus arrhizus* トリアシलगリセロール・リパーゼ処理の効果

PDGF処理細胞に1 μ Ci/ml [³H] ミリスチン酸、0.1 μ Ci/ml [¹⁴C] アラキドン酸を含む培地を加え10分間インキュベートし、両者によってラベルされた1,2 ジアシलगリセロールを得た。この1,2 ジアシलगリセロールを用いて"方法"に記載したようにトリアシलगリセロール処理を行ない、処理後に1,2 ジアシलगリセロールに残存する放射活性および遊離脂肪酸・モノアシलगリセロールとして回収される放射活性をそれぞれ測定した。結果は処理前の1,2 ジアシलगリセロールの放射活性を100%として表示した。

	Radioactivity %					
	Free Fatty Acid		Monoacylglycerol		1,2 Diacylglycerol	
	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C
Before	—	—	—	—	100	100
After	70 \pm 6	20 \pm 8	14 \pm 5	63 \pm 6	14 \pm 5	19 \pm 5

図3 $[^3\text{H}]$ グリセロールの1,2 ジアシルグリセロールおよび
トリアシルグリセロールへの取込

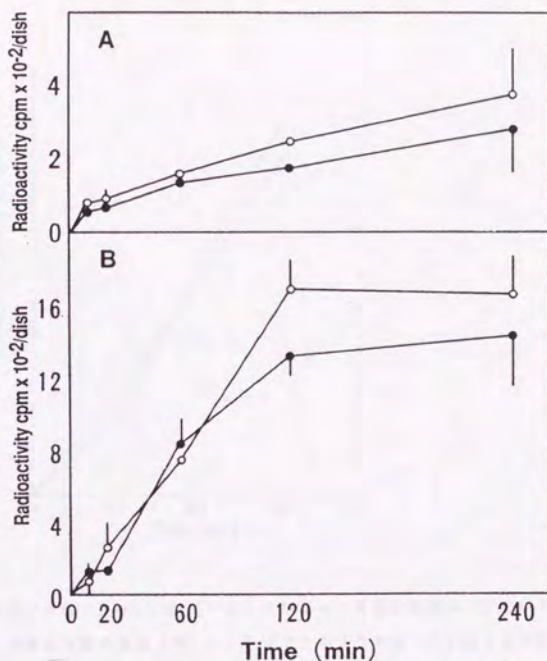


図1と同様の方法で2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ $[^3\text{H}]$ グリセロールを含む培地中でPDGF処理細胞 (○) あるいは静止状態の細胞 (●) の1,2 ジアシルグリセロール (A) およびトリアシルグリセロール (B) に取り込まれた放射活性を測定した。

1,2 ジアシルグリセロールのde novo 合成

PDGF処理細胞において、1,2 ジアシルグリセロールのde novo 合成が亢進しているか否かを調べた。

$[^3\text{H}]$ グリセロールの取込をPDGF処理細胞と静止状態の細胞で比較した。PDGF処理細胞でやや高い傾向がみられたが、少なくとも飽和脂肪酸にみられる初期のピークに対応する取込亢進はなかった (図3)。グルコースからのグリセロール生成を考慮し、 $[^{14}\text{C}]$ グルコースの取込も比較したが、やはり1,2 ジアシルグリセロールへの取込に有意な違いを認めなかった (図4)。

図4 $[^{14}\text{C}]$ グルコースの1,2 ジアシルグリセロールへの取込

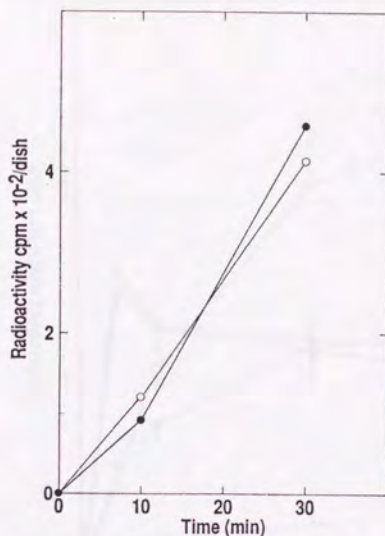


図1と同様の方法で2 $\mu\text{Ci/ml}$ $[^{14}\text{C}]$ グルコースを含む培地中でPDGF処理細胞 (○) あるいは静止状態の細胞 (●) の1,2 ジアシルグリセロールに取り込まれた放射活性を測定した。データは独立した2回の実験結果を代表する。

リン脂質へのミリスチン酸・アラキドン酸の取込

PDGF処理細胞にみられるミリスチン酸取込の初期ピークと1,2 ジアシルグリセロールの主要な供給源であるリン脂質の水解の関係を知るために、ミリスチン酸のリン脂質への取込のtime courseを調べた。ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン+ホスファチジルイノシトールへのミリスチン酸取込はPDGF処理細胞で亢進していたが、そのtime courseは1,2 ジアシルグリセロールへの取込とは異なり、120分まで漸増していった。ホスファチジルエタノールアミンへの取込は初期にピークを形成したが、PDGF処理細胞と静止状態の細胞で有意差がなかった (図5)。

図5 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸のリン脂質への取込

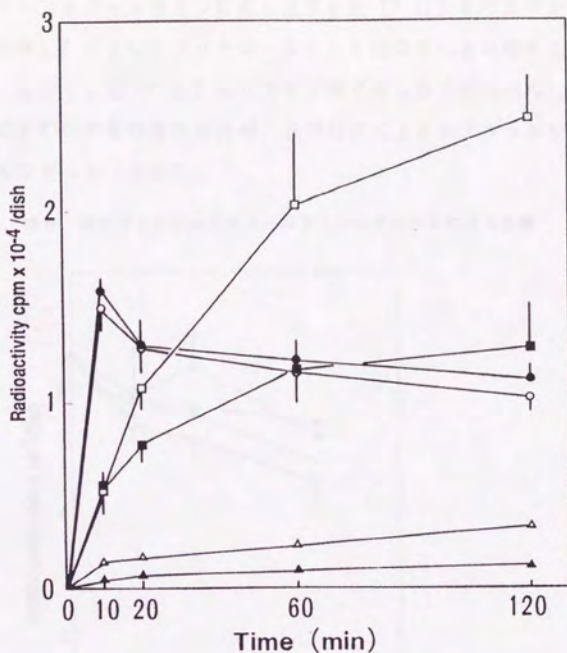
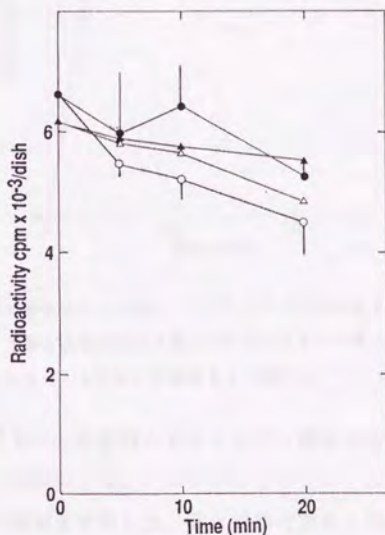


図1と同様の方法で $1\ \mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸を含む培地中でPDGF処理細胞 (○、□、△) あるいは静止状態の細胞 (●、■、▲) のホスファチジルエタノールアミン (○、●)、ホスファチジルコリン (□、■)、およびホスファチジルイノシトール+ホスファチジルセリン (△、▲) に取り込まれた放射活性を測定した。

PDGFによりホスファチジルエタノールアミンに対するホスホリパーゼCが活性化され、ホスファチジルエタノールアミンに取り込まれた $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸がPDGF処理細胞においてのみ1,2 ジアシलगリセロールとして回収される可能性を除外するため、 $[^{14}\text{C}]$ エタノールアミンと $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸であらかじめラベルした静止状態のBalb/c3T3細胞にPDGFを作用させたが、PDGFによるホスファチジルエタノールアミンの水解は認めなかった(図6)。

図6 ホスファチジルエタノールアミンのPDGFによる分解



Balb/c3T3細胞を10%ウシ血清および $1\ \mu\text{Ci/ml}$ $[^{14}\text{C}]$ エタノールアミン、 $1\ \mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸を含むDME培地で6日間培養し静止状態に導いた後、PDGFを含む培地(○、△)あるいはPDGFのvehicleを含む培地(●、▲)を加え、横軸に示す各時間にホスファチジルエタノールアミン中に残存する ^{14}C (○、●)、 ^3H (△、▲)の放射活性を測定した。

ホスファチジン酸への取込はホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン+ホスファチジレイノシトールへの取込よりははやくtime courseを示したが、PDGF処理細胞と静止状態の細胞ではやはり有意な差がなかった(図7)。

図7 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸のホスファチジン酸への取込

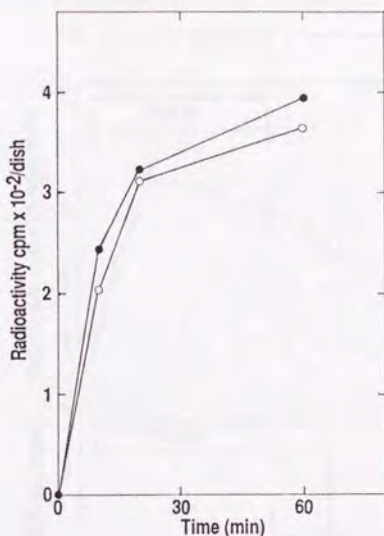


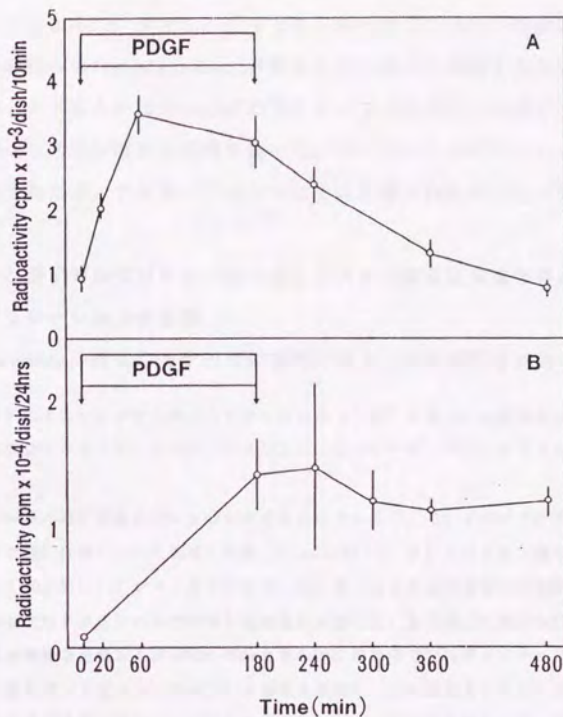
図1と同様の方法で $1\ \mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸を含む培地中でPDGF処理細胞(○)あるいは静止状態の細胞(●)のホスファチジン酸に取り込まれた放射活性を測定した。データは独立した2回の実験結果を代表する。

1, 2 ジアシルグリセロール分画へのミリスチン酸取込亢進とPDGF処理時間の関係

次に、PDGF処理による1, 2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進とcompetence作用の相関を検討した。静止状態の細胞に10単位/mlのPDGFを加えると60分でcompetence状態に達し血小板除去血漿に反応してDNA合成を行なうようになった。180分の処理後PDGFを除去しても、少なくとも300分間はcompetence状態にとどまり血小板除去血漿に対する反応性が維持された(図8B)。

培地にラベルしたミリスチン酸を加えたとき10分間に1, 2 ジアシルグリセロールに取り込まれる放射活性を指標としてミリスチン酸取込を評価すると、PDGF60分処理後にミリスチン酸の取込活性は静止状態の約3倍に達し最大値を示した。180分間のPDGF処理後にPDGFを除去すると、漸次ミリスチン酸取込活性は低下し300分後には静止状態と同レベルになった(図8A)。

図8 PDGF処理後およびPDGF除去後の1,2 ジアシルグリセロールへの
 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸取込およびcompetence状態の変化



A. 静止状態のBalb/c3T3 細胞にPDGFを含むDME 培地を加え20分間、60分間、180分間インキュベートした後、 $1\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸を含む培地に置き換えそれぞれ10分間に1,2 ジアシルグリセロールに取り込まれる放射活性を測定した。また180分間PDGF存在下でインキュベートした後、PDGFを含まない培地に移し1時間、3時間、5時間後に、 $1\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸を含む培地に置き換え10分間に1,2 ジアシルグリセロールに取り込まれる放射活性を測定した。

B. 静止状態のBalb/c3T3 細胞をPDGF存在下で180分インキュベートした後、PDGFを含まない培地に移し1時間、2時間、3時間、5時間後に、5%血小板除去血漿および $1\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ $[^3\text{H}]$ チミジンを含む培地に置き換え、24時間に10%トリクロロ酢酸沈降物に取り込まれる放射活性を測定した。

PDGFによる1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進作用に対するサイクロヘキシミドおよびアクチノマイシンDの影響

PDGFのcompetence作用はサイクロヘキシミドに影響されずアクチノマイシンDで抑制される。PDGFによる1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進作用に、蛋白合成あるいはmRNAへのtranscription が関与しているかを検討する目的で、100 μ g/mlのサイクロヘキシミドあるいは10 μ g/mlのアクチノマイシンDの共存下で180 分間PDGF処理した後のミリスチン酸取込活性を調べた。サイクロヘキシミドによりミリスチン酸取込亢進は抑制されたが、アクチノマイシンDでは影響されなかった(表2)。

PDGFによる1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進作用に対するCキナーゼ・ダウンレギュレーションの影響

PDGFのcompetence作用はCキナーゼ依存性の部分と非依存性の部分があると考えら

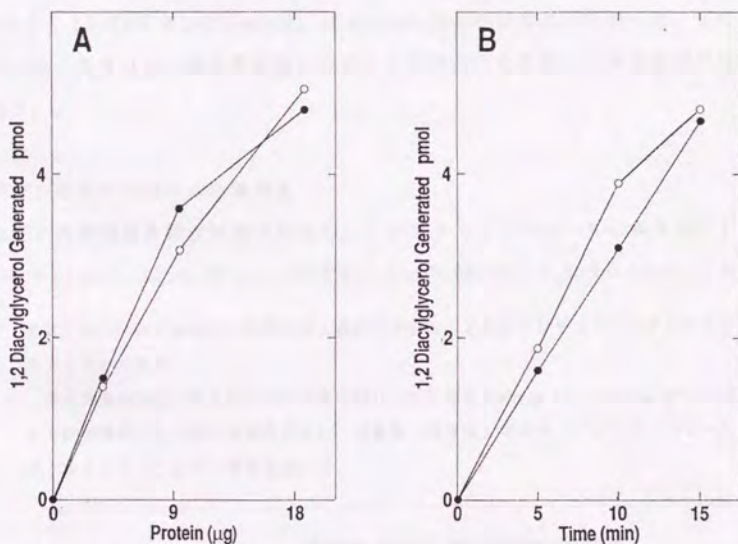
表2 PDGFによる1,2 ジアシルグリセロールへの [3 H] ミリスチン酸取込亢進作用に対するサイクロヘキシミド、アクチノマイシンD、Cキナーゼ・ダウンレギュレーションの影響

静止状態のBalb/c3T3 細胞を100 μ g/mlサイクロヘキシミド、10 μ g/mlアクチノマイシンD存在下で180 分間PDGF処理した後、1 μ Ci/ml [3 H] ミリスチン酸を含むDME 培地を加え10分間に1,2 ジアシルグリセロールに取り込まれる放射活性を測定し、静止状態の細胞およびPDGFのみで処理した細胞と比較した。また静止状態のBalb/c3T3 細胞を5 %血小板除去血清および200nM PDBuを含むDME 培地中で24時間インキュベートしてCキナーゼをダウンレギュレーションした細胞を調整し、この細胞をPDGF処理したときの [3 H] ミリスチン酸の1,2 ジアシルグリセロールへの取込を検討した。さらに静止状態のBalb/c3T3 細胞を100nM TPA を含むDME 培地中で5 分間インキュベートした後、10分間に1,2 ジアシルグリセロールに取り込まれる [3 H] ミリスチン酸を測定した。

	Quiescent Cell	PDGF Treatment	Cyclo- heximide	Actino- mycin D	PDBu	TPA
Radioactivity cpm/dish	1498 \pm 221	4079 \pm 259	1592 \pm 209	3266 \pm 176	2563 \pm 61	1290 \pm 65

れる。PDGFによる1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進作用が、Cキナーゼ系の下流に位置するかどうかを検討するため、200nM のPDBuに24時間細胞を暴露しCキナーゼをダウンレギュレートした後、PDGF処理を行なった。PDBu結合能からは、この処置によりCキナーゼは40%以下に抑制されると推定される(57)。Cキナーゼ・ダウンレギュレーションによって、ミリスチン酸取込亢進作用は部分的に抑制された(表2)。しかし、短期間のTPA処理によりCキナーゼを刺激しても、PDGFのミリスチン酸取込亢進作用はmimic されなかった(表2)。

図9 Balb/c3T3 細胞のwhole cell lysate 中の
モノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼ活性



PDGF処理Balb/c3T3細胞(O)、静止状態のBalb/c3T3細胞(●)のwhole cell lysateを用い、モノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼ活性を"方法"に記載したように測定した。A、インキュベーションの時間を10分に設定し横軸に示す各蛋白量を用いた。B、蛋白量を10µgに設定し横軸に示す各時間インキュベートした。

モノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼの*in vitro*での測定

ここまでの結果から、PDGF処理細胞における1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進は、モノアシルグリセロールのsn-1分枝へのミリスチン酸の直接的な取込亢進を反映していると考えられた。この反応が酵素的過程であるか、非酵素的過程であるかを検討するため、この反応を媒介する酵素活性がBalb/c3T3細胞に存在するか、そしてPDGF処理によってその活性が刺激されるかを*in vitro*で調べた。

3時間のPDGF処理細胞と静止状態の細胞のwhole cell lysateを用いてモノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼ活性を測定した。酵素活性は4-20 μ gの蛋白量の範囲で直線性を示し、また10 μ gの蛋白量を用いたとき15分のインキュベーション時間まで直線性を示した(図9)。PDGF処理細胞、静止状態の細胞の酵素活性はそれぞれ 33.4 ± 4.0 、 33.9 ± 3.9 pmol/min/mg of proteinであり有意差がなかった。更にwhole cell lysateを膜分画と細胞質分画に分離して酵素活性を比較したが有意差は認めなかった(表3)。

1.2 ジアシルグリセロールの絶対量

PDGF処理細胞と静止状態の細胞の1,2 ジアシルグリセロールの量を測定した。100 mm Falcon plastic plateあたりそれぞれ 1.27 ± 0.25 nmol、 1.95 ± 0.53 nmolであった。

表3 Balb/c3T3細胞の可溶性画分・膜画分中のモノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼ活性

静止状態のあるいはPDGF処理後のBalb/c3T3細胞のwhole cell lysateを100,000Xで60分間遠心し上清(可溶性画分)、沈殿物(膜画分)中のモノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼを測定した。

	Enzyme Activity pmol/min/mg of protein	
	Cytosol Fraction	Membrane Fraction
Quiescent Cell	40.1 ± 5.2	51.0 ± 2.0
PDGF-treated Cell	40.3 ± 2.1	54.6 ± 1.3

考察

本研究の結果以下のことが明らかになった。1) PDGF処理を受けたBalb/c3T3細胞では、細胞外から加えた飽和脂肪酸が1,2 ジアシルグリセロールのsn-1分枝へ急速に取り込まれる。2) この飽和脂肪酸取込亢進作用の最大発現には60分のPDGF処理が必要である。またPDGF除去後は、細胞がcompetence状態にとどまっても、この作用は漸次失われていく。3) PDGFのこの作用はサイクロヘキシミドで抑制され、蛋白合成のプロセスが直接ないし間接に関与していると考えられる。またCキナーゼを抑制すると部分的に抑制されるがCキナーゼの活性化のみでは起こらない。4) Balb/c3T3細胞にはモノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼの活性が存在するが、この酵素活性はPDGF処理によって変化しない。

ジアシルグリセロールはリン脂質や糖脂質の水解、ホスファチジン酸からのde novo合成、トリアシルグリセロールの脱アシル化、モノアシルグリセロールのアシル化によって生成される(72-76)。PDGFは主としてホスファチジルイノシトールの水解によってジアシルグリセロールを生成するが、ホスファチジルコリンの水解も関与していると報告されている(72)。しかし、本研究にみられるミリスチン酸の1,2 ジアシルグリセロールへの取込はホスファチジルイノシトール・ホスファチジルコリンへの取込に先行している。従って、一度これらのリン脂質に取り込まれたミリスチン酸が、水解によって1,2 ジアシルグリセロールの分画に検出されているとは考えにくい。ホスファチジルエタノールアミンへのミリスチン酸の取込ははよいtime courseを示すが、PDGF処理細胞と静止状態の細胞の間に有意差がない。またPDGFを作用させたとき、ホスファチジルエタノールアミンの水解は認められず、ホスファチジルエタノールアミンを経由して

[³H] ミリスチン酸が1,2 ジアシルグリセロールとして回収される可能性も否定的である。グリセロール・グルコースの取込はPDGF処理細胞でも軽度な上昇を示すのみであった。またトリアシルグリセロールへのミリスチン酸取込は1,2 ジアシルグリセロールへの取込に遅れていた。すなわちde novo合成やトリアシルグリセロールへの取込とその後の脱アシル化を介して、1,2 ジアシルグリセロール分画へのミリスチン酸取込が起こっているとは考えにくい。以上から、PDGF処理細胞で顕著にみられる1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込は、モノアシルグリセロールのアシル化によると想定した。但し、ホスファチジン酸へのミリスチン酸の取込はPDGF処理細胞と静止状態の細胞に

有意差を認めなかったが、はやいtime courseを示した。従って、ホスファチジン酸に対するホスファターゼ活性がPDGF処理細胞において亢進しているかについては検討していないので、ホスファチジン酸を経由して1,2 ジアシルグリセロールにミリスチン酸が取り込まれている可能性は残る。

次に1,2 ジアシルグリセロールのsn-1分枝にミリスチン酸が取り込まれていることを、sn-1分枝に選択的に作用するRhizopus arrhizus 由来のトリアシルグリセロール・リパーゼを用いて示した。1,2 ジアシルグリセロールのsn-1分枝には飽和脂肪酸が、sn-2分枝には不飽和脂肪酸が位置すると従来より報告されており(98)、今回の私の結果は従来の結果と一致する。

モノアシルグリセロールのアシル化はモノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼによって起こる。この酵素は小腸細胞と肝細胞に存在が報告されている(95、99)。この酵素活性がBalb/c3T3細胞にも存在することがin vitroの系で明らかになったがPDGF処理細胞と静止状態の細胞の間に酵素活性の違いを認めなかった。また酵素活性の可溶性画分・膜画分間の分布もPDGFにより変化しなかった。in vivoの系との相違の原因として以下の可能性があげられた。1) 外から加えた放射性ミリスチン酸がPDGF処理細胞でより活発に取り込まれ、細胞内の放射性ミリスチン酸の比活性が上昇する。2) モノアシルグリセロールのアシル化のステップは1,2 ジアシルグリセロール代謝の律速段階でない。すなわち、PDGFにより活性が亢進するステップが他にあり、モノアシルグリセロールのアシル化は二次的に亢進している。3) モノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼの活性はPDGF処理細胞で亢進しているが、細胞を破碎する過程でその活性亢進が失われる。4) PDGF処理細胞のモノアシルグリセロールの絶対量が増加しており、酵素活性が一定であっても取り込まれるミリスチン酸の量がふえる。第一の可能性については細胞内の遊離脂肪酸の放射活性を測定したが、PDGF処理細胞と静止状態の細胞の間に相違がなかった。但し、アシルCoAの放射活性は測定していないので遊離脂肪酸がアシルCoAに転換されるステップに相違がある可能性は残る。第二の可能性をチェックするためには、ジアシルグリセロールの代謝に関わる酵素、ジアシルグリセロール・リパーゼ、キナーゼ、アシルトランスフェラーゼの活性を測定しなければならない。ジアシルグリセロール・リパーゼは血小板で検出されている(100、101)。この酵素はsn-1分枝の脂肪酸をsn-2分枝の脂肪酸より速く水解するので、この酵素がPD

G F 処理細胞でより活性化していれば、sn-1分枝へのミリスチン酸の取込がPDGF処理で亢進するという本研究の結果に整合する。ジアシルグリセロール・キナーゼはジアシルグリセロールからホスファチジン酸を生成する。血小板でこの酵素を抑制することによりCキナーゼが活性化されることが知られている(102、103)。これらの事実からはジアシルグリセロール・キナーゼはジアシルグリセロール代謝において重要な役割を果たしていると推定される。この酵素活性の測定をBalb/c3T3細胞で試みたが、酵素活性が低く十分な結果を得られなかった。MacDonaldらはPDGF刺激を受けたSwiss3T3細胞ではジアシルグリセロールのリン酸化が亢進しているが、キナーゼ活性には変化がなくむしろジアシルグリセロールの絶対量の変化を反映していると報告している(104)。ミリスチン酸のジアシルグリセロールおよびトリアシルグリセロールへの取込のtime courseからは、Balb/c3T3細胞においてもジアシルグリセロールはアシル化によってトリアシルグリセロールに代謝されていると考えられる。しかしこのステップにPDGF依存性の調節が存在するかは明らかでない。

PDGF処理を受けたBalb/c3T3細胞のモノアシルグリセロール・アシルトランスフェラーゼ活性は35mm Falcon plastic plate 1枚あたり6.78pmol/minと推定される。96時間 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸あるいは $[^3\text{H}]$ グリセロールでBalb/c3T3細胞をラベルしたときの放射活性の分布から、Balb/c3T3細胞の遊離脂肪酸は1.2ジアシルグリセロールの約1.7倍と推定される。従って35mm Falcon plastic plate 1枚あたりの遊離脂肪酸は0.79nmolと概算される。放射性ミリスチン酸を外から加えたときはじめの1分間に細胞内に取り込まれる放射活性は 2.32×10^4 cpmであり、細胞内のミリスチン酸の比活性は29.3 cpm/pmolになる。すなわちはじめの1分間に1.2ジアシルグリセロールに取り込まれた放射活性960cpmはミリスチン酸33pmolに相当する。このことはin vitroの系で検出される酵素活性はin vivoの系の20%しか反映していないことを意味し、細胞を破碎する過程で酵素活性が失われている可能性が示唆される。或いはこの酵素活性に依存しないミリスチン酸の取込が起こっている可能性もある。

第四の可能性に関しては、モノアシルグリセロールの絶対量は直接測定しなかったが、1,2ジアシルグリセロールの絶対量はPDGF処理細胞ではむしろやや減少していた。この結果は前述のMacDonaldの報告とは一致しない。この解離の理由は本研究で使用した1,2ジアシルグリセロールの定量法の感度が低いことにあるかもしれない。

PDGFによる1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進は、PDGFを除去すると細胞がcompetence状態にとどまっても漸次失われる。またサイクロヘキシミド、アクチノマイシンDに対する反応性もcompetence状態とは異なる。すなわち1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進の現象は一度成立したcompetence状態の維持には必要でない。また直接ないし間接的に蛋白合成を必要とし、PDGFの作用のなかではむしろ遅い現象に属すると考えられる。更にPDBuによるダウンレギュレーションで部分的に抑制されるので、Cキナーゼが関係していることが示唆される。

本研究で報告した1,2 ジアシルグリセロールの代謝経路の生理的意義は不明だが、PDGFによりホスファチジルイノシトールの水解以外にも1,2 ジアシルグリセロールの代謝状態が変化することが明らかになった。

まとめ

血小板由来増殖因子(PDGF)を含む培地中でインキュベートしたBalb/c3T3細胞にミリスチン酸を加えると1,2 ジアシルグリセロールのsn-1分枝に急速に取り込まれる。このミリスチン酸取込はリン脂質・トリアシルグリセロールへの取込に先行するので、モノアシルグリセロールのsn-1分枝に直接取り込まれると考えられる。実際、Balb/c3T3細胞にはモノアシルグリセロールから1,2 ジアシルグリセロールを生成する酵素活性が存在する。しかしこの酵素活性はPDGF処理細胞と静止状態の細胞の間で有意な差を認めず、酵素活性の調節によってはPDGF処理細胞におけるこの現象を説明できない。1,2 ジアシルグリセロールへのミリスチン酸取込亢進は、培地からPDGFが除去されると漸次減少しcompetence状態とは解離する。またサイクロヘキシミドにより抑制され、蛋白合成を介すると考えられる。

本研究をご指導くださいました東京大学第四内科尾形悦郎教授、小島至博士(現群馬大学内分泌研究所教授)に深謝いたします。

本論文中で使用了る略号は以下の通りである。

PDGF; platlet-derived growth factor

PI; phosphatidylinositol

PI-4-P; phosphatidylinositol 4 phosphate

PI-4,5-P₂ ; phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate

PDBu; phorbol 12,13 dibutyrate

SRE; serum response element

TRE; TPA response element

DME; Dulbecco's modified Eagles

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

TPA; 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate

文献

- 1)Scher,C.D., Shepard,R.C., Antoniades,H.N., and Stiles,C.D. (1979) Platelet-derived growth factor and the regulation of the mammalian fibroblast cell cycle Biochim.Biophys.Acta 560, 217-241
- 2)Deuel,T.F., Huang,J.S., Proffitt,R.T., Baenziger,J.U., Chang,D., and Kennedy,B B. (1981) Human platelet-derived growth factor. J. Biol.Chem. 256, 8896-8899
- 3)Antoniades,H.N. (1981) Human platelet-derived growth factor(PDGF):Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A. 78, 7314-7317
- 4)Heldin,C.H., Johnsson,A., Wennergren,S., Wenstedt,C., Betsholtz,C., and Westermark,B. (1986) A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. Nature 319, 511-514
- 5)Stroobant,P.and, Waterfield,M.D. (1984) Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. EMBO J. 2, 2963-2967
- 6)Doolittle,R.F., Hunkapiller,M.D., Hood,L.E., Devare,S.G., Robbins,K.C., Aaronson,S.A., and Antoniades,H.N.(1983) Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene(or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science 221, 275-277
- 7)Waterfield,M.D., Scrace,G.T., Whittle,N., Stroobant,P., Johnsson,A., Wasteson, A., Westermark,B., Heldin,C.H., Huang,J.S., and Deuel,T.F. (1983) Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28^{sis} of simian sarcoma virus. Nature 304, 35-39
- 8)Bowen-Pope,D.F., and Ross,R. (1982) Platelet derived growth factor; specific binding to cultured cells. J.Biol.Chem. 257, 5161-5171
- 9)Heldin,C.H., Wasteson,A., and Westermark,B. (1982) Interaction of platelet-derived growth factor with its fibroblast receptor. J.Biol.Chem. 257, 4216-4221
- 10)Huang,J.S., Huang,S.S., Kennedy,B., and Deuel,T.F. (1982) Platelet-derived growth factor; specific binding to target cells. J.Biol.Chem. 257, 8130-8136
- 11)Williams,L.T., Tremble,P., and Antoniades, H.N. (1982) Platelet-derived

- growth factor binds to specific receptors on vascular smooth muscle cells and becomes non-dissociable. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 79, 5067-5070
- 12) Glenn.K., Bowen-Pope,D.F., and Ross,R., (1982) Platelet-derived growth factor Identification of platelet-derived growth factor receptor by affinity labelling J.Biol.Chem. 257, 5172-5176
- 13) Heldin.C.H., Ek,B., and Ronnstrand,L. (1983) Characterization of the receptor for platelet-derived growth factor on human fibroblasts. J.Biol.Chem. 258, 10054 -10061
- 14) Williams.L.T., Tremble,P.M., Lavin,M.F., and Sunday,M.E. (1984) Platelet-derived growth factor receptors form a high affinity state in membrane preparations. J.Biol.Chem. 259, 5287-5294
- 15) Williams.L.T. (1989) Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. Science 243, 1564-1570
- 16) Yarden,Y., Escobedo,J.A., Kuang.W.J., Yang-Feng,T.L., Daniel,T.O., Tremble,P.M., Chen,E.Y., Ando,M.E., Harkins,R.N., Francke,U., Fried,V.A., Ullrich,A., Williams,L.T. (1986) Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. Nature 323, 226-233
- 17) Escobedo,J.A., Navankasatussas,S., Cousens,L.S., Coughlin,S.R., Bell,G.I., and Williams,L.T. (1988) A common PDGF receptor is activated by homo-dimeric A and B forms of PDGF. Science 240, 1532-1534
- 18) Gronwald,R.G.K., Grant,F.J., Haldeman,B.A., Hart,C.E., O'Hara,P.J., Hagen,F., Ross,R., Bowen-Pope,D.F., and Murray,M.J. (1988) Cloning and expression of a cDNA coding for the human platelet-derived growth factor receptor: Evidence for more than one receptor class. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85, 3435-3439
- 19) Heldin,C.H., Backstrom,G., Ostman,A., Hammacher,A., Ronstrand,L., Rubin,K., Nister,M., and Westermark,B. (1988) Bindings of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: Evidence for two separate receptor types. EMBO J. 7, 1387-1394

- 20) Claesson-Welsh, L., Hammacher, A., Westermark, B., Heldin, C.H., and Nister, M. (1989) Identification and structural analysis of the A type receptor for platelet-derived growth factor. J.Biol.Chem. 264, 1742-1747
- 21) Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., Rochelle, W.L., Kraus, M., Pierce, J., and Aaronson, S. (1989) Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. Science 243, 800-804
- 22) Seifert, R., Hart, C.E., Phillips, P.E., Forstrom, J.W., Ross, R., Murray, M.J., and Bowen-Pope, D. (1989) Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. J.Biol.Chem. 264, 8771-8778
- 23) Keating, M.T., and Williams, L.T. (1987) Processing of the platelet-derived growth factor receptor. J.Biol.Chem. 262, 7932-7937
- 24) Claesson-Welsh, L., Ronnstrand, L., and Heldin, C.H. (1987) Biosynthesis and intracellular transport of the receptor for platelet-derived growth factor. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84, 8796-8800
- 25) Hart, C.E., Seifert, R.A., Ross, R., and Bowen-Pope, D.F. (1987) Synthesis, phosphorylation, and degradation of multiple forms of the platelet-derived growth factor receptor studied using a monoclonal antibody. J.Biol.Chem. 262, 10780-10785
- 26) Ek, B., Westermark, B., Wasteson, A., and Heldin, C.H. (1982) Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor. Nature 295 419-420
- 27) Nishimura, J., Huang, J.S., and Deuel, T.F. (1982) Platelet-derived growth factor stimulates tyrosine-specific protein kinase activity in Swiss mouse 3T3 cell membranes. Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. 79, 4303-4307
- 28) Cooper, J.A., Bowen-Pope, D.F., Raines, E., Ross, R., and Hunter, T. (1982) Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. Cell 31, 263-273
- 29) Habenicht, A.J.R., Glomset, J.A., King, W.C., Nist, C., Mitchell, C.D., and Ross, R. (1980) Early changes in phosphatidylinositol and arachidonic acid metabolism in

quiescent Swiss3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor
J.Biol.Chem. 256, 12329-12335

30)Berridge,M.J., Heslop,J.P., Irvine,R.F., and Brown,K.D. (1984) Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. Biochem.J. 222, 195-201

31)Hasegawa-Sasaki,H. (1985) Early changes in inositol lipids and their metabolites induced by platelet-derived growth factor in quiescent Swiss mouse 3T3 cells. Biochem.J. 232, 99-109

32)Cassel,D., Rothenberg,P., Zhuang,Y., Deuel,T.F., and Glaser,L. (1983) Platelet-derived growth factor stimulates Na^+/H^+ exchange and induces cytoplasmic alkalinization in NR6 cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 80, 6224-6228

33)Ives,H.E., and Daniel,T.O. (1987) Interrelationship between growth factor-induced pH changes and intracellular Ca^{2+} . Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84, 1950-1954

34)Cochran,B.H., Reffel,A.C.,and Stiles,C.D. (1983) Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. Cell 3, 939-947

35)Kelly,K., Cochran,B.H., Stiles,C.D., and Leder,P (1983) Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell 35, 603-610

36)Kruijer,W., Cooper,J.A., Hunter,T., and Verma,I.M. (1984) Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. Nature 312, 711-716

37)Rozengurt,E., Stroobant,P., Waterfield,M.D., Deuel,T.F., and Keehan,M. (1983) Platelet-derived growth factor elicits cyclic AMP accumulation in Swiss 3T3 cells: Role of prostaglandin production. Cell 34, 265- 272

38)Escobedo,J.A., and Williams,L.T. (1988) A PDGF receptor domain essential for mitogenesis but not for many other responses to PDGF. Nature 335, 85-87

39)Ek,B., and Heldin,C.H. (1984) Use of an antiserum against phosphotyrosine for the identification of phosphorylated components in human fibroblasts stimulated

- by platelet-derived growth factor. J.Biol.Chem. 259, 11145-11152
- 40) Pike, L.J., Bowen-Pope, D.F., Ross, R., and Krebs, E.G. (1983) Characterization of platelet-derived growth factor stimulated phosphorylation in cell membranes. J.Biol.Chem. 258, 9383-9390
- 41) Frackelton, A.R., Tremble, P.M., and Williams, L.T. (1984) Evidence for the platelet-derived growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor in vivo. J.Biol.Chem. 259, 7909-7915
- 42) Kazlauskas, A., and Cooper, J.A. (1989) Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. Cell 58, 1121-1133
- 43) Kaplan, D.R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Pallas, D.C., White, M., Cantley, L., and Roberts, T.M. (1987) Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. Cell 50, 1021-1029
- 44) Coughlin, S.R., Escobedo, J.A., and Williams, L.T. (1989) Role of phosphatidylinositol kinase in PDGF receptor signal transduction. Science 243, 1191-1194
- 45) Whitman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T., and Cantley, L. (1988) Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. Nature 332, 644-646
- 46) Auger, K.R., Serunian, L.A., Soltoff, S.P., Libby, P., and Cantley, L.C. (1989) PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. Cell 57, 167-175
- 47) Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Rapp, U., and Roberts, T.M. (1988) Signal transduction from membrane to cytoplasm: Growth factors and membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85, 8855-8859
- 48) Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Escobedo, J.A., Rapp, U.R., Roberts, T.M., and Williams, L.T. (1989) Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF β -receptor. Cell 58, 649-

- 49) Meisenhelder, J., Suh, P.G., Rhee, S.G., and Hunter, T. (1989) Phospholipase C- γ is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. Cell 57, 1109-1122
- 50) Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature 308, 693-698
- 51) Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. Science 233 305-312
- 52) Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. Nature 334, 661-665
- 53) Sivak, A. (1972) Induction of cell division: Role of cell membrane sites. J.Cell.Physiol. 80, 167-174
- 54) Boynton, A.L., Whitfield, J.F., and Isaacs, R.J. (1976) Calcium-dependent stimulation of Balb/c3T3 mouse cell DNA synthesis by a tumour-promoting phorbol ester (PMA). J.Cell.Physiol. 87:25-87:32
- 55) Dicker, P., and Rozengurt, E. (1978) Stimulation of DNA synthesis by tumour promoter and pure mitogenic factors. Nature 276, 723-726
- 56) Franz, C.N., Stiles, C.D., and Scher, C.D. (1979) The tumour promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate enhances the proliferative response of Balb/c3T3 cells to hormonal growth factors. J.Cell.Physiol. 100, 413-423
- 57) Collins, M.K., and Rozengurt, E. (1984) Homologous and heterologous mitogenic desensitization of Swiss 3T3 cells to phorbol esters and vasopressin: Role of receptor and postreceptor steps. J.Cell.Physiol. 118, 133-142
- 58) Rozengurt, E., Rodriguez-Pena, M., and Smith, K.A. (1983) Phorbol esters, phospholipase C, and growth factors rapidly stimulate the phosphorylation of a Mr 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 80 7244-7248
- 59) Housey, G.M., Johnson, M.D., Hsiao, W.L.W., O'Brian, C.A., Murphy, J.P., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. (1988) Overproduction of protein kinase C

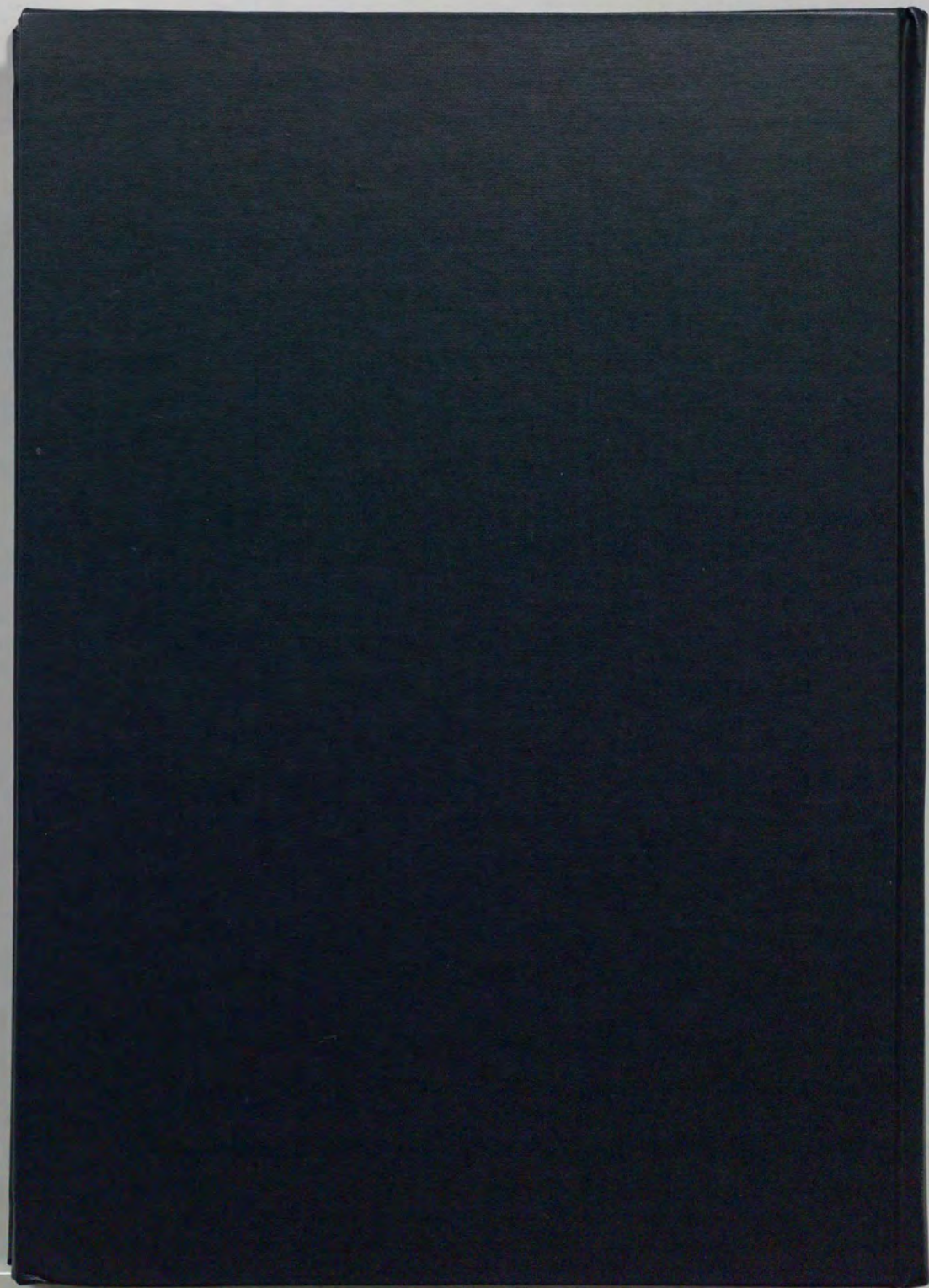
- causes disordered growth control in rat fibroblasts. Cell 52, 343-354
- 60) Persons, D.A., Wilkison, W.O., Bell, R.B., and Finn, O.J. (1988) Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-1 cDNA. Cell 52, 447-458
- 61) Pasti, G., Lacal, J.C., Warren, B.S., Aaronson, S.A., and Blumberg, P.M. (1986) Loss of mouse fibroblast cell response to phorbol esters restored by micro-injected protein kinase C. Nature 324, 375-377
- 62) Blackshear, P.J., Witters, L.A., Girard, P.R., Kuo, J.F., and Quamo, S.N. (1985) Growth factor-stimulated protein phosphorylation in 3T3-L1 cells. J.Biol.Chem. 260, 13304-13315
- 63) Blackshear, P.J., Wen, L., Glynn, B.P., and Witters, L.A. (1986) Protein kinase C-stimulated phosphorylation in vitro of a Mr 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factors in intact fibroblasts. J.Biol.Chem. 261, 1459-1469
- 64) Ryder, K., and Nathans, D. (1988) Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85, 8464-8467
- 65) Lau, L.F., and Nathans, D. (1987) Expression of a set of growth-related immediate early genes in Balb/c3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84, 1182-1186
- 66) Coughlin, S.R., Lee, W.M.F., Williams, P.W., Giels, G.M., and Williams, L.T. (1985) c-myc Gene expression is stimulated by agents that activate protein kinase C and does not account for the mitogenic effect of PDGF. Cell 43, 243-251
- 67) Mueller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., and Curran, T. (1984) Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. Nature 312 716-720
- 68) Franza, B.R., Rauscher, F.J., Josephs, S.F., and Curran, T. (1987) The fos complex and fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. Science 239, 1150-1153
- 69) Rauscher, F.J., Sambucetti, L.C., Curran, T., Distel, R.J., and Spiegelman, B.M.

- (1988) A common DNA binding site for fos protein complexes and transcription factor AP-1. Cell 52, 471-480
- 70)Curran,T., and Franza,B.R. (1988) Fos and jun: the AP-1 connection. Cell 55, 395-397
- 71) Kaibuchi,K., Fukumoto,Y., Oku,N., Hori,Y., Yamamoto,T., Toyoshima,K., and Takai,Y. (1989) Activation of the serum response element and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate response element by the activated c-raf-1 protein in a manner independent of protein kinase C. J.Biol.Chem. 264, 20855-20858
- 72)Besterman,J.M., Duronio,V., and Cuatrecasas,P. (1986) Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: A pathway for generation of a second messenger. Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. 83, 6785-6789
- 73)Saltiel,A.R., Sherline,P., and Fox,J.A. (1987) Insulin-stimulated diacylglycerol production results from the hydrolysis of a novel phosphatidylinositol glycan. J.Biol.Chem. 262, 1116-1121
- 74)Mato,J.M., Kelly,K.L., Abler,A., and Jarrett,L. (1987) Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatoma cells. J.Biol.Chem. 262, 2131-2137
- 75)Denning,G.M., Figard,P.H., Kaduce,T.L., and Spector,A.A. (1983) Role of triglycerides in endothelial cell arachidonic acid metabolism. J.Lipid Res. 24, 993-1001
- 76)Farese,R.V., Konda,T.S., Davis,J.S., Standaert,M.L., Pollet,R.J., and Cooper, D.R. (1987) Insulin rapidly increases diacylglycerol by activating de novo phosphatidic acid synthesis. Science 236, 586-589
- 77)Shier,W.T. (1980) Serum stimulation of phospholipase A₂ and prostaglandin release in 3T3 cells is associated with platelet-derived growth-promoting activity. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 77, 137-141
- 78)Coughlin,S.R., Moskowitz,M.A., Zetter,B.R., Antoniades,H.N., and Levine,L. (1980) Platelet-dependent stimulation of prostacyclin synthesis by platelet-derived growth factor. Nature 288, 600-602

- 79)Habenicht,A.J.R., Glomset,J.A., Goerig,M., Gronwald,R., Grulich,J., Loth,U., and Schettler,G. (1985) Cell cycle-dependent changes in arachidonic acid and glycerol metabolism in Swiss 3T3 cells stimulated by platelet-derived growth factor. J.Biol.Chem. 260, 1370-1373
- 80)MacDonald,M.L., Mack,K.F., and Glomset,J.A. (1987) Regulation of phosphoinositide phosphorylation in Swiss 3T3 cells stimulated by platelet-derived growth factor. J.Biol.Chem. 262, 1105-1110
- 81)Fukami,K., and Takenawa,T. (1989) Quantitative changes in polyphosphoinositides 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate by platelet-derived growth factor and prostaglandin $F_2 \alpha$. J.Biol.Chem. 264, 14985-14989
- 82)Warden,C.H.,and Friedkin,M. (1984) Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis by mitogenic growth factors. Biochim.Biophys.Acta 792, 270-280
- 83)Daniel,L.W., Waite,M., and Wykle,R.L. (1986) A novel mechanism of diglyceride formation. J.Biol.Chem. 261, 9128-9132
- 84)Muir,J.G., and Murray,A.W. (1987) Bombesin and phorbol ester stimulate phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase C: Evidence for a role of protein kinase C. J.Cell.Physiol. 130, 382-391
- 85)Takuwa,N., Takuwa,Y., and Rasmussen,H. (1987) A tumour promoter,12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, increases cellular 1,2-diacylglycerol content through a mechanism other than phosphoinositide hydrolysis in Swiss-mouse 3T3 fibroblasts. Biochem.J. 243, 647-653
- 86)Liscovitch,M., Blusztajn,J.K., Freese,A., and Wurtman,R.J. (1987) Stimulation of choline release from NG108-15 cells by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. Biochem.J. 241, 81-86
- 87)Bocckino,S.B., Blackmore,P.F., Wilson,P.B., and Exton,J.H. (1987) Phosphatidate accumulation in hormone-treated hepatocytes via a phospholipase D mechanism. J.Biol.Chem. 262, 15309-15315
- 88)Liscovitch,M.(1989) Phosphatidylethanol biosynthesis in ethanol-exposed NG108-15 neuroblastoma X glioma hybrid cells. J.Biol.Chem. 264, 1450-1456

- 89)Kiss,Z., and Anderson,W.B. (1989) Phorbol ester stimulates the hydrolysis of phosphatidylethanolamine in leukemic HL-60, NIH 3T3, and Baby Hamster Kidney cells. J.Biol.Chem. 264, 1483-1487
- 90)Parker,J., Daniel,L.W., and Waite,M. (1987) Evidence of protein kinase C involvement in phorbol diester-stimulated arachidonic acid release and prostaglandin synthesis. J.Biol.Chem. 262, 5385-5393
- 91)Pledger,W.J., Stiles,C.D., Antoniades,H.N., and Scher,C.D. (1978) An ordered sequence of events is required before Balb/c-3T3 cells become committed to DNA synthesis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 75, 2839-2843
- 92)Smith,J.C., and Stiles,C.D. (1981) Cytoplasmic transfer of the mitogenic response to platelet-derived growth factor. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 78, 4363-4367
- 93)Bligh,E.G., and Dyer,W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can.J.Biochem.Physiol. 37, 911-917
- 94)McNeil,P.L., McKenna,M.P., and Taylor,D.L. (1985) A transient rise in cytosolic calcium follows stimulation of quiescent cells with growth factors and is inhibitable with phorbol myristate acetate. J.Cell.Biol. 101, 372-379
- 95)Coleman,R.A., and Haynes,E.B. (1986) Monoacylglycerol acyltransferase. J.Biol.Chem. 261, 224-228
- 96)Banschbach,M.W., Geison,R.L., and O'Brien,J.F. (1974) Use of [1- ^{14}C]acetic anhydride to quantitate diglycerides: A new analytical procedure. Anal.Biochem. 59, 617-627
- 97)Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72, 248-254
- 98)Akesson,B. (1969) Composition of rat liver triacylglycerols and diacylglycerols. Eur.J.Biochem. 9, 463-477
- 99)Coleman,R.A., and Haynes,E.B. (1984) Hepatic monoacylglycerol acyltransferase. J.Biol. Chem. 259, 8934-8938

- 100) Bell, R.L., Kennerly, D.A., Stanford, N., and Majerus, P.W. (1979) Diglyceride lipase: A pathway for arachidonate release from human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3238-3241
- 101) Prescott, S.M., and Majerus, P.W. (1983) Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. J. Biol. Chem. 258, 764-769
- 102) de Courcelles, D.C., Roevens, P., and Belle, H.V. (1985) R 59022, a diacylglycerol kinase inhibitor. J. Biol. Chem. 260, 15762-15770
- 103) Bishop, W.R., Ganong, B.R., and Bell, R.M. (1986) Attenuation of sn-1,2-diacylglycerol second messengers by diacylglycerol kinase. J. Biol. Chem. 261, 6993-7000
- 104) MacDonald, M.L., Mack, K.F., Richardson, C.N., and Glomset, J.A. (1988) Regulation of diacylglycerol kinase reaction in Swiss 3T3 cells. J. Biol. Chem. 263, 1575-1583





Centimetres

KODAK Color Control Patches

© The Tiffen Company, 2000

Kodak
LICENSED PRODUCT

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19