

サイトカインによる好中球のプライミング： 特にタンパク質チロシン残基のリン酸化と関係して

渡部 嘉哉*・小渕 浩嗣**・秋丸 国広***・佐藤 英介****・水上佳与子*****
神原 哲也****・友田 三保****・小林 純郎*****・吉岡 保**・内海 耕慥*

(*高知医科大学医学部生物学教室・**倉敷成人病センター医科学研究所

テキサス大学 MD アンダーソン癌研究所・*高知医科大学医学部麻酔蘇生学教室

*****高知医科大学医学部小児科学教室・*****新居浜基礎医学研究所)

Neutrophil Priming by Cytokines : in Relation to the Protein Tyrosyl Phosphorylation of Neutrophils Proteins.

Yoshiya WATANABE*, Hirotsugu KOBUCHI**, Kunihiro AKIMARU***,
Eisuke F. SATO****, Kayoko MINAKAMI*****, Tetsuya KANBARA*****,
Miho TOMODA****, Sumio KOBAYASHI*****, Tamotsu YOSHIOKA**
and Kozo UTSUMI*

Department of Medical Biology, **Department of Anesthesiology and *****Department of Pediatrics, Kochi Medical School, Kochi 783, Japan ; **Medical Research Institute, Center for Adult Diseases Kurashiki, Kurashiki 710, Japan ; ***MD Anderson Cancer Center, The University of Texas, Houston, Texas 77030, USA ; ******

Abstract. We have investigated the effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on human peripheral neutrophils (HPPMN). TNF- α and G-CSF enhanced fonylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) -stimulated O_2^- generation of HPPMN in concentration and time dependent manners.

The enhancement of O_2^- generation was inhibited by tyrosine kinase inhibitors. These cytokines also enhanced the tyrosyl phosphorylation of neutrophil proteins, such as 115, 110, 98, 83, 72, 70, 60, 54 kDa and many of low molecular weight proteins. Both tyrosine kinase and phosphotyrosine phosphatase might regulate the protein tyrosyl phosphorylation since the phosphorylation inhibited by tyrosine kinase inhibitor, genistein. The TNF- α enhanced tyrosyl phosphorylation of 115 and 108 kDa proteins, which distributed in the membrane fraction, was increased in manners of incubation and concentration dependent. The kinetics of TNF- α enhanced FMLP

-dependent O_2^- generation was quite similar to that of tyrosyl phosphorylation of neutrophil proteins by $TNF-\alpha$. Furthermore, cepharanthine specifically inhibited either $TNF-\alpha$ or G-CSF enhanced FMLP-stimulated O_2^- generation and tyrosyl phosphorylation of some neutrophil proteins, 115 kDa. Taken together with this finding, it is concluded that substrate proteins for tyrosin kinases might act as critical effector molecules in the mechanism for priming in neutrophils.

緒 言

ヒト末梢血の好中球 (HPPMN) は刺激応答性が極めて低いが、種々の物質によるプライミングによりスーパーオキシド (O_2^-) 生成を初めとして様々な刺激応答反応が著しく増大される。このプライミング作用は、Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor- α ($TNF-\alpha$), platelet activating factor (PAF) 等のサイトカインによって誘導される。近年、プライミングの機構に関し多くの研究が報告されているが、その詳細な機構はなお明らかでない^{1,2,3,4,5,6)}。先に我々は、 $TNF-\alpha$ や G-CSF による好中球のプライミング反応がチロシンキナーゼの阻害剤で強く阻害されるが、C-キナーゼ阻害剤ではむしろ促進されることを明らかにし、プライミングの機構にタンパク質のチロシンリン酸化が深く関わっている可能性を示唆した^{7,8,9)}。本研究は、ヒト末梢血好中球の刺激応答性 O_2^- 生成に対する $TNF-\alpha$ や G-CSF のプライミング作用とその好中球タンパク質のチロシン-リン酸化促進作用を中心に解析することを目的とした。

材料と方法

試薬：Ferricytochrome c (Cyt. c), formylmethionyl leucyl phenylalanine (FMLP), staurosporine はシグマ社より、H-7 は生化学工業より購入した。 $TNF-\alpha$ 及び G-CSF はそれぞれ林原生物科学研究所及び中外製薬より恵与されたものを、ST638は鐘ヶ淵化学、白石忠雄博士より恵与されたものを使用した。その他の試薬はナカライテスク社の特級試薬を使用した。また、genistein, ST638はdiethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、添加 DMSO の終末濃度が0.5%を越えないように実験に供した。また $TNF-\alpha$ と G-CSF は0.5 mg/ml BSA を含む 2 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解して使用した。

好中球：HPPMN は健康な成人男子より採血し、Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心法⁸⁾にて分離し、Krebs-Ringer-phosphate (KRP) (pH7.4) にて2回洗浄し、細胞数が 10^8 cells/ml になるように KRP に再懸濁後、0 °C に保ち実験に供した。

刺激物：好中球の刺激は、 1.25×10^{-8} M FMLP で行った。

プライミング：HPPMN のプライミングは $TNF-\alpha$ や G-CSF にて37°C で preincubation により行った^{8,10)}。

O_2^- の測定： O_2^- の測定は、Cyt. c の還元による $A_{550-540}$ の吸光度変化を $37^\circ C$ にて反応液を攪拌しながら、島津二波長分光光度計 (UV-300) にて連続的に測定した¹⁰⁾。

タンパク質のチロシン残基リン酸化の検出：McColl らの方法^{11,12)}を一部改変して行った。すなわち、HPPMN (1×10^7 cells/ml) を 10 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$ を含む KRP に懸濁し、 $37^\circ C$ にて $TNF-\alpha$ や G-CSF を添加して、10分間の preincubation によりプライミングした。2 mM phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF) と 2 mM sodium vanadate を含む氷冷最終濃度 15% TCA を添加して反応を停止させた。30分間氷上に静置後、遠心し、沈殿物を氷冷エーテル：エタノール (1:1) にて洗浄した。この沈殿物を SDS-PAGE sample buffer に完全に溶解し、SDS-PAGE にてタンパク質を分離後、semi-dry blotting 装置にて Immobilon-P に転写し、5 % スキンミルクを含む TBS-0.05% Tween 20 (TBS-T) でブロッキング後、一次抗体としてリン酸化チロシンに特異的なモノクローナル抗体 (PY-20) と反応させ、二次抗体としてペロキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体と反応させた。抗体陽性タンパク質の検索は ECL Western blotting detection system (Amersham) により行った。

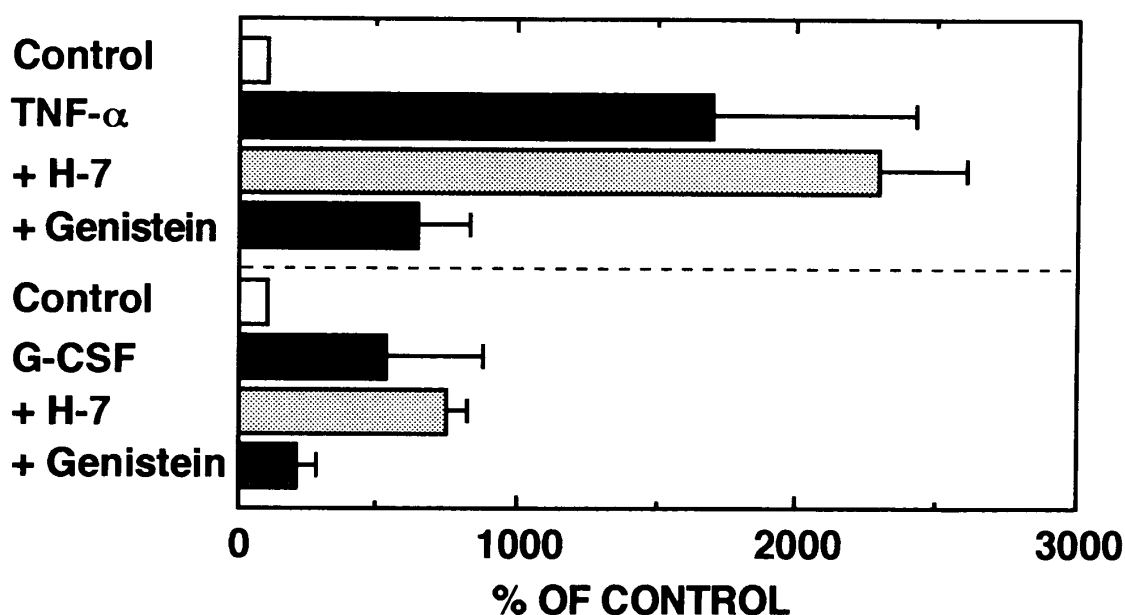


Fig. 1. Enhancement of FMLP-induced O_2^- generation by $TNF-\alpha$ and G-CSF and the effect of H-7 and genistein.

HPPMN (1×10^6 cells/ml) were incubated in KRP (pH 7.4) containing 1 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose, 20 μM Cyt. c at $37^\circ C$. Cells were incubated with 10 U/ml $TNF-\alpha$ or 50 ng/ml G-CSF for 10 min and stimulated by $1.25 \times 10^{-8} M$ FMLP. O_2^- generation was monitored by reduction of Cyt. c at 5 min after addition of FMLP. Genistein and H-7 were used at 2 μM and 50 μM , respectively. 100 % of O_2^- generation by FMLP without $TNF-\alpha$ treatment was 0.42 ± 0.17 nmol O_2^- /5 min/ 10^6 cells. Data are the means \pm SD of five different experiments.

好中球の細胞質分画と顆粒分画の分離法：HPPMN (10^7 cells/ml) を500 U/ml TNF- α または2.5 μ g/ml G-CSF と37°C で20分間反応し、低温の20 mM HEPES buffer (pH7.5), 6 mM KCl, 2 mM EGTA, 2 mM PMSF, 2 mM sodium orthovanadate, 20 μ M ZnCl₂, 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 0.5 mg/ml digitonin を含む生理的食塩水を同量添加し反応を停止した。この液を1000 \times g にて遠心分離し、その上清分画を細胞質分画とし、沈殿分画を同じ溶液に再懸濁し顆粒分画とした。これらに最終濃度15% TCA 溶液を添加後、上述と同様の方法を用いてチロシンリン酸化タンパク質の検出を行なった¹²⁾。

結果と考察

TNF- α 及び G-CSF による好中球 FMLP 刺激依存性 O₂⁻生成の促進とチロシンキナーゼ、C-キナーゼ阻害剤による変化：前回の報告に示したように、HPPMN の FMLP 刺激に依存した O₂⁻生成は TNF- α や G-CSF の前処理により促進され、それは C-キナーゼ阻害剤の H-7 により更に促進されたが、チロシンキナーゼ阻害剤の genistein¹³⁾では強く阻害された⁸⁾ (Fig. 1)。**HPPMN の FMLP 刺激による O₂⁻生成の TNF- α による促進作用とその濃度及び処理時間依存性**：FMLP による O₂⁻生成は TNF- α の濃度に依存して促進され、15 U/ml においてその最大促進効果が認められた (Fig. 2)。また10 U/ml TNF- α 処理による促進効果は処理時間に依

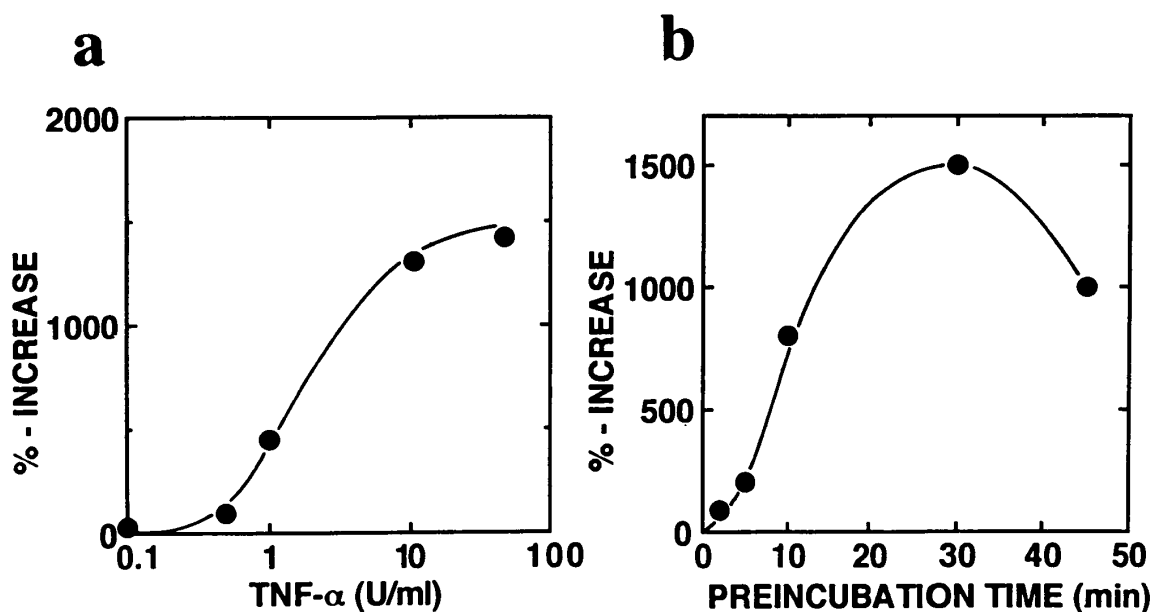


Fig. 2. Concentration- and time-dependent enhancement of FMLP induced O₂⁻ generation of HPPMN.

Experimental conditions were as in Fig. 1. a, concentration-dependent O₂⁻ generation by TNF- α -primed HPPMN. b, incubation time-dependent O₂⁻ generation of TNF- α -primed HPPMN.

存して増大するが、それは30分間で最高値に達し、10分間で1/2最高値の促進が認められ (Fig. 2), これらの結果は、これまでに報告した結果と一致していた⁸⁾。

HPPMN タンパク質の TNF- α と G-CSF によるチロシン残基のリン酸化：既に明らかにされているように、チロシンキナーゼは 0°C においても高い酵素活性が示され¹⁴⁾, Fig. 1 に示したように低温 (4°C) に保たれた好中球では、多くの好中球のタンパク質チロシン残基のリン酸化が認められた。すなわち、150, 115, 110, 98, 72, 70, 60, 54, 53 kDa や多くの低分子のタンパク質が強くリン酸化され、それらは抗リン酸化チロシン抗体により確認された。このとき、そのような好中球でも 37°C で incubation した場合, Fig. 1 に示すごとくリン酸化チロシンは速やかに脱リン酸化された。このことから 37°C においてホスファターゼの活性上昇を伴うことが

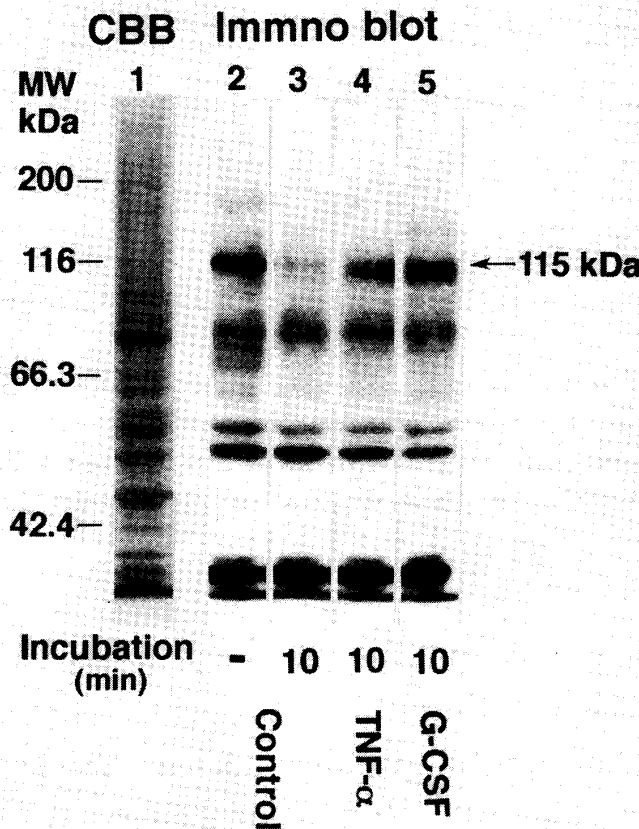


Fig. 3. Enhancement of tyrosyl phosphorylation of neutrophil proteins by G-CSF and TNF- α .

HPPMN (1×10^6 cell/ml) were incubated as in Fig. 1, and stop the reaction with TCA solution as described in Material and Methods. Neutrophil proteins were subjected to SDS-PAGE followed by transfer to Immobilon-P and incubated with phosphotyrosine-specific monoclonal antibody. The antibody was detected by peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG using ECL Western blotting detection system (Amersham). Lane 1, CBB stained; lane 2-5, immuno blotted; lane 2, without incubation; lane 3, 10 min incubation; lane 4, 10 min incubation with 10 U/ml TNF- α ; lane 5, with 50 ng/ml G-CSF.

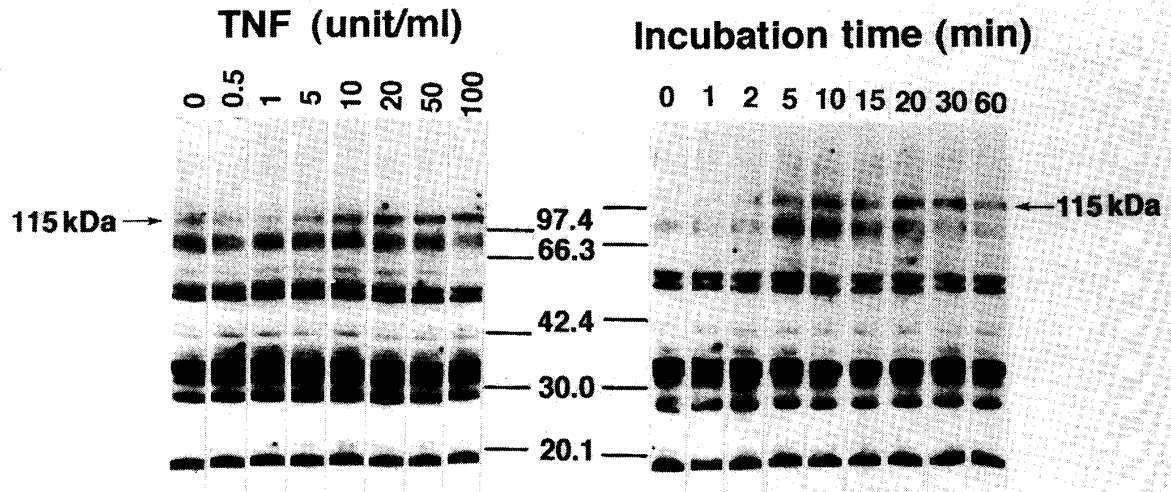


Fig. 4. Time- and dose-dependent tyrosyl phosphorylation of neutrophil proteins induced by $\text{TNF-}\alpha$.

Experimental conditions were as in Fig. 3 and shows immunoblotting pattern of neutrophil proteins with anti-phosphotyrosine antibody. Light and left panels show the dose- and time-dependent patterns, respectively. For the experiment, incubation time was 10 min, and the concentration of $\text{TNF-}\alpha$ used in experiment for time dependency was 10 U/ml.

示唆された。しかし、 37°C で10分間10 U/ml $\text{TNF-}\alpha$ や50 ng/ml G-CSF で処理を行うと、再び先に観察された多くのタンパク質のチロシン残基のリン酸化の亢進が認められた。

このような好中球タンパク質のチロシン残基のリン酸化は、GM-CSF, platelet activating factor (PAF) によっても認められ^{11,15)}、さらに他の多くの細胞も GM-CSF, $\text{TNF-}\alpha$ によってリン酸化の促進が認められた^{16,17)}。またこれらタンパク質のチロシンリン酸化は、好中球に対する種々の刺激物の処理によってさらに促進された。すなわち、サイトカインによるチロシンリン酸化は刺激物によって更に増加することが明らかとなった。

タンパク質チロシン残基リン酸化のサイトカイン濃度と処理時間依存性： $\text{TNF-}\alpha$ と G-CSF による好中球タンパク質のチロシン残基リン酸化は、両者共に濃度と処理時間に依存して促進された (Fig. 4, 5)。Fig. 4 に示すように $\text{TNF-}\alpha$ の濃度及び処理時間に依存して70-115 kDa タンパク質のチロシンリン酸化が変化した。チロシンリン酸化は20 U/ml までは上昇したが、それ以上では変化がなかった。この図にも見られるように、タンパク質の種類によって TNF-

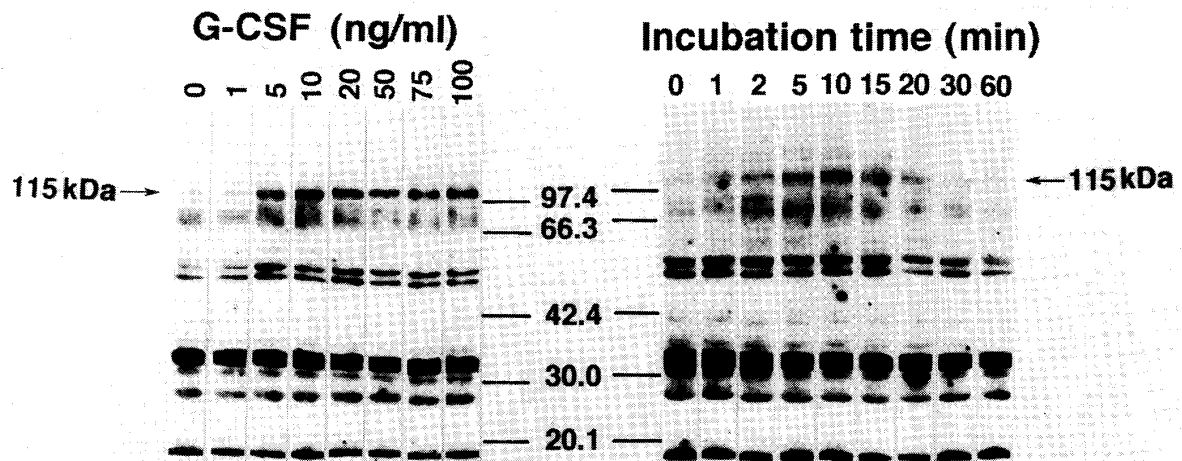


Fig. 5. Time- and dose-dependent tyrosyl phosphorylation of neutrophil proteins induced by G-CSF.

Experimental conditions were the same as described in Fig. 4 and shows immunoblotting pattern of neutrophil proteins with antiphosphotyrosine antibody. Light and left panels show the time- and dose-dependent patterns, respectively. For the experiment, incubation time was 10 min, and the concentration of G-CSF for time dependent experiment was 50 ng/ml.

α の濃度依存性や処理時間依存性が異なるが、115-110 kDa タンパクでは FMLP 刺激による O_2^- 生成に対する $TNF-\alpha$ の促進作用と特によく一致したリン酸化反応が認められた。また、G-CSF においても同様の作用が認められた。すなわち、G-CSF の濃度と処理時間に依存してタンパク質チロシン残基のリン酸化が変化した、それは $TNF-\alpha$ による変化とかなり類似しており、70-115 kDa タンパク質の著しい変化が認められた。しかしその詳細な反応は必ずしも両者で一致せず、例えば長い処理時間に伴う脱リン酸化は $TNF-\alpha$ のそれとかなり異なり、比較的にすみやかに進行した (Fig. 5)。

これらの結果から、好中球のサイトカイン処理による priming においては、共通した細胞内タンパク質のチロシン残基のリン酸化が促進しているものと考えられる。

チロシン残基リン酸化タンパク質の細胞内分布：次に HPPMN を細胞質分画と顆粒分画に分けた後、各々の分画におけるチロシン—リン酸化タンパク質の検索を行った。Fig. 6 はその結果を示す。特定の例えば 54 kDa 付近のリン酸化タンパク質は細胞質に分布するが、多くのチロシ

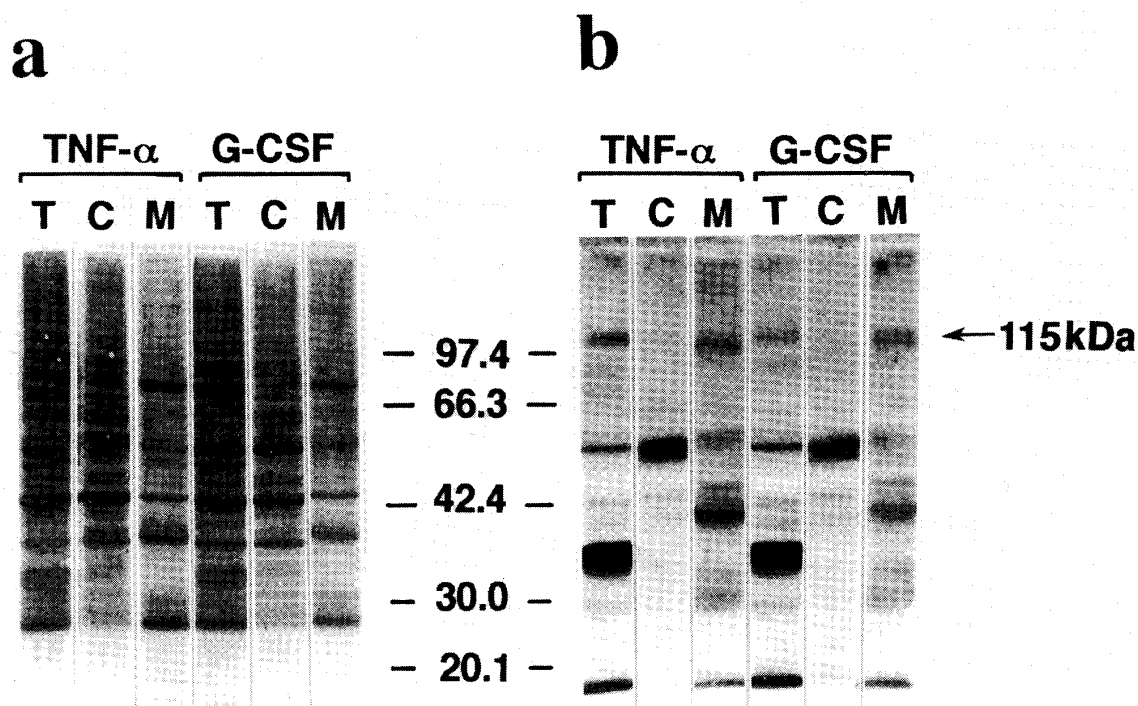


Fig. 6. Distribution of tyrosyl phosphorylated neutrophil proteins in HPPMN after treatment with $\text{TNF-}\alpha$ and G-CSF. After treatment with 500 U/ml $\text{TNF-}\alpha$ and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ G-CSF/ml for 20 min at 37°C, HPPMN (10^7 cells/ml) were fractionated into membrane and non-membrane fractions as described in the text. Other conditions were the same as in Fig. 4 and 6. a, protein distribution expressed by CBB staining; b, distribution of tyrosyl phosphorylated proteins in membrane and non-membrane fraction detected by anti-phosphotyrosine antibody.

ンーリン酸化タンパク質は膜分画に局在していた。特に115-110 kDa のタンパク質は膜分画にしか認められなかった。すなわち、115-110 kDa タンパク質は膜タンパク質であることが示唆された。

ビスコクラウリン型アルカロイド **cepharanthine** による好中球のプライミング阻害：これまでの研究により、cepharanthine は好中球の種々の刺激による O_2^- 生成を阻害し、その阻害機構としてC-キナーゼによる基質タンパク質のリン酸化阻害が一部関与していることを明らかにした^{18,19,20,21)}。cepharanthine は HPPMN の G-CSF によるプライミングに対してもかなり強い阻害作用が認められた。しかもその作用には時間依存性があり、G-CSF によるプライミングに要する時間の種々の時点で cepharanthine を添加すると、その阻害度合は異なっていた。すなわち G-CSF 処理によるプライミングに対して長時間 cepharanthine を作用させると、より強い阻害作用が認められた (Fig. 7)。このことはプライミングの間に進行する何らかの反応に

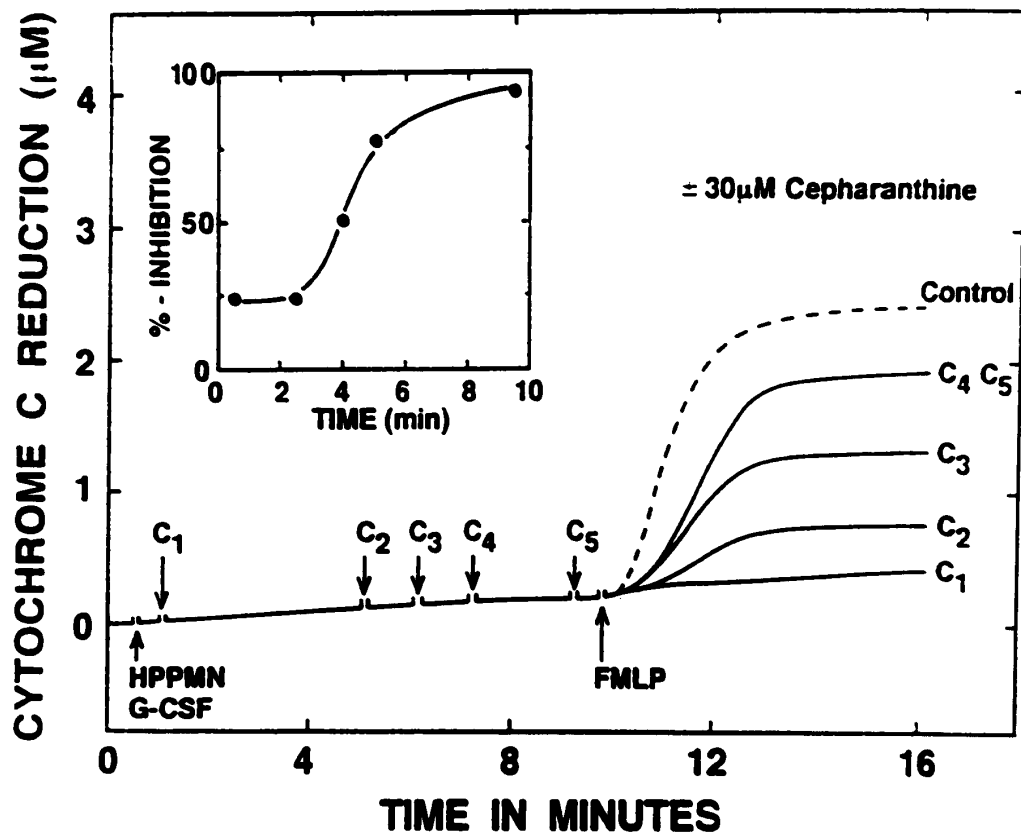


Fig. 7. Effect of preincubation time with cepharanthine on FMLP-induced LCL-response of G-CSF-treated HPPMN.

Experimental conditions were the same as those described in Fig. 1. Cepharanthine was added at various times before the addition of FMLP. C₁-C₅ shows the time of cepharanthine addition. Inset shows the time-dependent inhibition curve for cepharanthine.

対して cepharanthine が阻害作用を示すことを示唆した。つまり既にプライミングに必要な反応の終わっている好中球に対しては cepharanthine の阻害作用は極めて弱かった。従って FMLP 刺激直前に添加した cepharanthine による O₂生成阻害作用はプライミングに関係しない作用と考えられた。

cepharanthine による G-CSF 依存性タンパク質チロシンリン酸化の阻害：cepharanthine が G-CSF による好中球のプライミングを阻害することから、G-CSF によるタンパク質チロシンリン酸化に対する cepharanthine の作用について検討した。Fig. 8 はその結果を示す。G-CSF を添加していない対照では line 1 に見られるように 65-115 kDa に渡る種々のタンパク質のチロシンリン酸化は極めて弱かった。また cepharanthine の溶媒として使用した DMSO の存在下にも G-CSF によって 65-115 kDa タンパク質のリン酸化が著しく促進された。これに対し cepharanthine を種々の時間処理すると、処理時間に対応してリン酸化反応が阻害され、FMLP 添加直前の処理ではリン酸化阻害、特に 115-110 kDa のリン酸化阻害が著しく低下していた。同様の阻害作用は TNF- α による好中球のプライミングにおいても観察された。

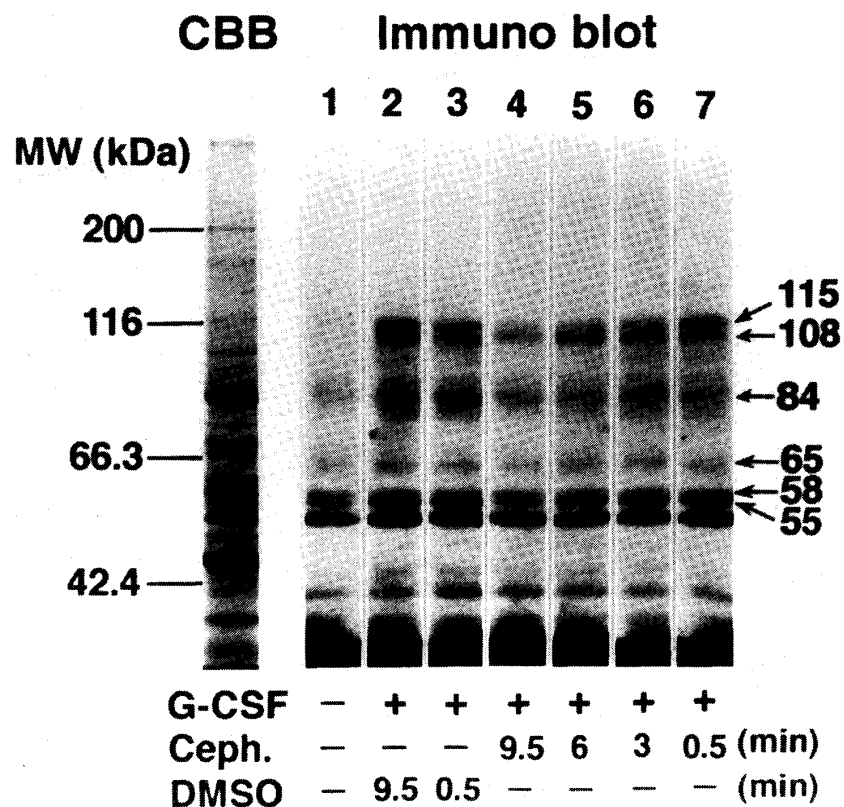


Fig. 8. Effect of preincubation time with cepharanthine on tyrosyl phosphorylation in G-CSF-treated HPPMN.

Experimental conditions were the same as those described in Fig. 7. Time of treatment with cepharanthine was changed from 30 sec to 9.5 min. Tyrosyl phosphorylation of 115, 108 and 84 kDa proteins were inhibited when treatment with cepharanthine exceeded 5 min.

これらの結果から、cepharanthine は好中球の G-CSF や $\text{TNF-}\alpha$ によるプライミングに伴うタンパク質チロシンリン酸化をかなり特異的に阻害することが示唆される。

結 論

以上の結果から、種々のサイトカインによるプライミングにより HPPMN は受容体依存性 O_2^- 生成及びそれと並行した多くのタンパク質のチロシン残基のリン酸化が促進されることが明らかにされた。すなわちこの O_2^- 生成とチロシンリン酸化の促進作用は、共にサイトカイン濃度依存的であり、また時間依存性が強く、両者の依存性は極めてよく一致した。このことは好中球のタンパク質チロシンリン酸化がプライミングに強く関与していることを示唆した。またこのことは cepharanthine のプライミング阻害作用とチロシンリン酸化阻害の解析からも支持された。

References

- 1) Ingraham, L. M., Coates, T. D., Allen, J.M., Higgines, C.P., Baehner, R.L., and Boxer, L.A., Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood* **59**, 1259-1266 (1982).
- 2) Vosbeck, K., Tobias, P., Muller, H., Allen, R.A., Arfors, K.E., Ulevitch, R.J. and Sklar, L.A. Priming of polymorphonuclear granulocytes by lipopolysaccharides and its complexes with lipopolysaccharide binding protein and high density lipoprotein. *J Leukocyte Biol* **47**, 97-104 (1990).
- 3) Reibman, J., Korchak, H.M., Vossball, L.B., Haines, K.A., Rich, A.M. and Weissmann, G. Changes in diacylglycerol labeling, cell shape, and protein phosphorylation distinguish "triggering" from "activation" of human neutrophils. *J Biol Chem* **263**, 6322-6328 (1988).
- 4) McColl, S.R., Beauseigle, D., Gilbert, C. and Naccache, P. Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- α involves regulation at a post-cell surface receptor level. *J Immunol* **145**, 3047-3053 (1990).
- 5) Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., Dusi, S. and Rossi, F. Fluoride can activate the respiratory burst independently of Ca^{2+} , stimulation of phosphoinositide turnover and protein kinase C translocation in primed human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **150**, 955-964 (1988).
- 6) Bauldry, S.A., Bass, D.A., Cousar, S.L. and McCall, C.E. Tumor necrosis factor α priming of phospholipase D in human neutrophils. *J Biol Chem* **266**, 4173-4179 (1991).
- 7) Utsumi, T., Klostergaard, J., Akimaru, K., Sato, E.F., Yoshioka, T. and Utsumi, K. Effect of tumor necrosis factor- α on the stimulus-coupled responses of neutrophils and their modulation by various inhibitors. *Physiol Chem & Phys and Med NMR* **24**, 77-88 (1992).
- 8) Utsumi, T., Klostergaard, J., Akimaru, K., Edashige, K., Sato, E.F., and Utsumi, K. Modulation of TNF- α priming and stimulation dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* **294**: 271-278, (1992).
- 9) Tanimura, M., Kobuchi, H., Utsumi, T., Yoshioka, T., Kataoka, S., Fujita, Y. and Utsumi, K. Neutrophil priming by granulocyte colony stimulating factor and its modulation by protein kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol* in press (1992).
- 10) Takahashi, R., Edashige, K., Sato, E.F., Inoue, M., Matsuno, T. and Utsumi, K. Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* **285**, 325-330 (1991).
- 11) McColl, S.R., DiPersio, J.F., Caon, A.C., Ho, P. and Naccache, P.H. Involvement of tyrosine-kinase in the activation of human peripheral blood neutrophils by granulocytemacrophage colony-stimulating factor. *Blood* **78**, 1847-1852 (1991).
- 12) Akimaru, K., Utsumi, T., Sato, E.F., Edashige, K., Yoshioka, T. and Utsumi, K. Involvement of protein kinases in the priming and activation of superoxide generation in human neutrophils. in *Active Oxygen, Lipid peroxides and Antioxidants* (ed. by Niki, E., Yagi, K. and Yoshikawa T) Excerpta Medica, Ltd. 39-42 (1992).
- 13) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biochem.* **262**, 5592-5595 (1987).
- 14) De, B.K., Misono, K.S., Lukas, T.J., Mroczkowski, B. and Cohen, S., A calcium dependent

- 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. *J Biol Chem* **261**, 13784-13792 (1986).
- 15) Gomez-Cambronero, J., Wang, E., Johnson, G., Huang, C. and Sha'afi, R.I. Platelet activating factor induces tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Biol Chem* **266**, 6240-6245 (1991).
 - 16) Donato, N.C., Gallick, G.E., Steck, P.A. and Rosenblum, M.G. Tumor necrosis factor modulates epidermal growth factor receptor phosphorylation and kinase activity in human tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20474-20481 (1989).
 - 17) Li, W., Yeung, Y.G. and Stanley, E.R. Tyrosine phosphorylation of a common 57-kDa protein in growth factor-stimulated and -transformed cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 6808-1814 (1991).
 - 18) Matsuno, T., Orita, K., Sato, E.F., Nobori, K., Inoue, B. and Utsumi, K. Inhibition of metabolic response of polymorphonuclear leukocyte by biscoclaurine alkaloids. *Biochem Pharmacol* **36**, 1613-1616 (1987).
 - 19) Matsuno, T., Orita, K., Edashige, K., Kobuchi, H., Sato, E.F., Inoue, B., Inoue, M. and Utsumi, K. Inhibition of active oxygen generation in guinea-pig neutrophils by biscoclaurine alkaloids. *Biochem Pharmacol* **39**, 1255-1259 (1990).
 - 20) Edashige, K., Utsumi, T. and Utsumi, K., Inhibition of 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate promoted tumorigenesis by cepharanthine, a biscoclaurine alkaloid, in relation to the inhibitory effect on protein kinase C. *Biochem Pharmacol* **41**, 71-78 (1992).
 - 21) Edashige, K., Utsumi, T., Sato, E.F., Ide, A., Kasai, M. and Utsumi, K., Requirement of protein association with membranes for phosphorylation by protein kinase C. *Arch Biochem Biophys.* **296**, 296-301 (1992).

(1992年 8 月 7 日受理)