

# 皮膚保護作用を有するセラミドの生理作用発現機構に関する研究

東北大学大学院 薬学研究科

中 畑 則 道、大 久 保 聡 子

It is well known that ceramide forms corneocyte lipid-bound envelop in skin to protect from external stimuli. In order to clarify the other physiological role of ceramide, neurotrophic factor biosynthesis and secretion from Swiss 3T3 fibroblasts were examined. C-2 ceramide and C-6 ceramide potently augmented the secretion of neurotrophic factors from 3T3 cells, determined by the differentiation of PC-12 cells when they were cultured under the conditioned medium of 3T3 cells with the ceramides. Sphingomyelinase and phosphatidylcholine-specific phospholipase C, which produce endogenous ceramides, also elicited the secretion of neurotrophic factors from 3T3 cells. Stimulation of cannabinoid receptors is known to produce ceramide through an activation of sphingomyelinase. 3T3 cells express CB1 and CB2 receptors, and the stimulation of the receptors in the cells by 2-arachidonylethanolamide resulted in the secretion of neurotrophic factors. Sphingomyelinase and phosphatidylcholine-specific phospholipase C stimulated the NGF and IL-6 mRNA expressions, which were inhibited by GF109203X, a protein kinase C inhibitor. In addition, C2-ceramide activated the phosphorylation of MAPK/ERK, p38 MAPK and JNK. These results suggest that ceramide may have neurogenerative and/or neuroprotective activity in peripheral tissues including skin by a mediation of the secretion of neurotrophic factors. Therefore, the drugs, which activate ceramide biosynthesis, inhibit ceramide degradation, or activate ceramide-mediated cellular signaling pathway, may be useful for neurotrophic factor secretion. The neurotrophic factor secretion would contribute to the protection of skin from external stimuli by forming the functional systems of the tissues.

## 1. 緒 言

セラミドはスフィンゴミエリンからスフィンゴリエリナーゼによって生合成される脂質成分であり、皮膚を構成する細胞間脂質の中で最も多く存在することが知られている<sup>1)</sup>。皮膚は生体を構成する臓器の中で最も大きなものであり、常に変化する外界と接しており、体内の恒常性を維持するためのバリアとして機能している。このバリアの実質的な担い手がセラミドと考えられており、皮膚の表皮細胞を取り囲むようにして存在しラメラ構造という層状の構造をとることが知られている。一方、最近の脂質研究の進展により、セラミドが静的な構造物としてだけでなく、細胞内において、その機能を調節する生理活性を有する物質であることが明らかになってきた<sup>2)</sup>。組織全体のバランスを保持するために特定の細胞が積極的に死を迎えるメカニズムであるアポトーシスや、細胞の分化誘導などに、セラミドが関わる事が明らかにされている<sup>3)</sup>。したがって、皮膚に存在するセラミドも静的なバリア形成能に加えて、皮膚周辺における細胞間情報伝達を介した、ダイナミックな皮膚構造の維持に関与する可能性が考えられる。すなわち、皮膚機能を維持するためには、血管新生やその循環作用や

神経機能の維持も重要な問題となる。そこで本研究では、セラミドの細胞機能に対する作用、とくに神経細胞の機能維持に焦点をあて、神経細胞の再生や機能維持を司る神経栄養因子の生合成および分泌作用について検討を加えるとともに、その生理機構発現のメカニズムの解明を目的とした。

## 2. 実 験

### 2.1. 細胞培養

線維芽細胞株 Swiss 3T3 細胞は 5% 牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS)、ペニシリン (50 unit/mL) およびストレプトマイシン (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加したダルベッコ変法イーグルスメディウム (DMEM) を用い、150mm のディッシュで継代培養した<sup>4)</sup>。3T3 細胞は、37°C で、95% air-5% CO<sub>2</sub> で飽和したインキュベーター中で培養し、メデイウムは 3-4 日間隔で交換した。PC-12 細胞は 10% FCS、5% ウマ血清 (horse serum) および上記抗生物質を添加した DMEM 中、150mm のディッシュで継代培養した<sup>5)</sup>。PC-12 細胞は、37°C で、95% air-5% CO<sub>2</sub> で飽和したインキュベーター中で培養し、メデイウムは 3-4 日間隔で交換した。

### 2.2. 神経栄養因子の分泌能の測定

3T3 細胞を  $4 \times 10^4$  個/mL の濃度で 0.5mL ずつ 24 ウエルプレートに分注し、上記培養液中で 3 日間培養した後、0.5% FCS 含有 DMEM に置換し、薬物を加えて 2 日間培養した。一方、PC-12 細胞は  $4 \times 10^4$  個/mL の濃度で 0.25mL ずつ 48 ウエルプレートに分注し、2 日間培養した後、メデイウムを薬物処理を行った 3T3 細胞の培養上清 (0.25mL)



Research for the mechanism of cellular response to ceramides that show skin protection

Norimichi Nakahata, Satoko Ohkubo

Graduate School of Pharmaceutical Sciences  
Tohoku University

と交換し、さらに2日間培養した。また、薬物を直接PC-12細胞に作用させたものを比較実験として行った。PC-12細胞は顕微鏡（オリンパス IX-70）を用いて形態変化を観察し、3T3細胞から分泌された神経栄養因子による細胞の分化を調べた<sup>6)</sup>。

### 2.3. RT-PCR

3T3細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/well) を6-wellのディッシュに播き、通常のもediumで2日間培養してから、FCSを含まないmediumで1日間培養した。細胞から総RNA画分を抽出した後、逆転写反応によってcDNAとし、それを水で4倍希釈してPCRのテンプレートとした。PCR反応は94°Cで2分間加熱したサンプルを、熱変性を94°Cで30秒、アニーリングを56°Cで30秒、伸長反応を72°Cで20秒行い、このサイクルを16-30回繰り返した。得られたDNA断片は1.5%アガロース電気泳動を行って分離し、エチジウムブロマイドにて染色後、そのバンドの濃淡を撮影装置（FAS-III, Toyobo）によって記録した<sup>7)</sup>。Nerve growth factor (NGF) については、センスプライマー（CTTCAACAGGACTCACAGGA）およびアンチセンスプライマー（GTGCGATATGAGTTCCAGTG）を用いた。インターロイキン-6 (IL-6) については、センスプライマー（GAGGAGACTTCACAGAGGAT）、アンチセンスプライマー（TCCTTAGCCACTCCTTCTGT）を用いた。カンナビノイド受容体 (CB) については、CB1（センスプライマー：ATAAGAGGATCGTCACCAGG、アンチセンスプライマー：AGTTCAGCAGGCAGAGCATA）およびCB2（センスプライマー：AAGCCCTCGTACCTGTTTCAT、アンチセンスプライマー：AGGCACAGCATGGAACAGAA）を用いた。なお、比較のために $\beta$ -アクチンのcDNAもRT-PCRによって測定した（センスプライマー：AGGGAAATCGTGCGTGACAT、アンチセンスプライマー：TCCTGCTTGCTGATCCACAT）。

### 2.4. ウェスタンブロッティング

細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/well) を12-wellのディッシュに播き、通常のもediumで2日間培養してから、FCSを含まないmediumで1日間培養した。薬物で刺激した後、500  $\mu$ Lのサンプルバッファー（75mM Tris-HCl, 2% SDS, 15% glycerol, 3% 2-mercaptoethanol, pH6.8）で反応を停止した。サンプルを95°Cで5分間煮沸し、完全にタンパク質を変性させた後、11%の分離ゲルを用いてSDS-PAGEを行った。泳動終了後、セミドライ・トランスファー装置（ATTO）を用い、ゲルからPVDF膜（Immobilon; polyvinylidene difluoride, Millipore）へタンパク質を転写した。転写終了後、PVDF膜をTBST（Tris-buffered saline; 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH

7.4）に2% BSAを加えたブロッキングバッファーにより室温で2時間処理した。TBSTで洗浄後、ブロッキングバッファーで500倍に希釈した一次抗体とインキュベートした（4°C, overnight）。用いた一次抗体は、抗phospho-p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 抗体、抗phospho-p38 MAPK 抗体、抗phospho-JNK 抗体の三種である。TBSTで洗浄後、ブロッキングバッファーで1000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体とインキュベートした（室温、2時間）。化学発光検出キットを用いて、パーオキシダーゼと基質により生じた化学発光を化学発光検出フィルム（Hyperfilm ECL, Amersham）に感光させて検出した<sup>8)</sup>。

## 3. 結果

### 3.1. 外来性セラミドによる3T3細胞からの神経栄養因子分泌による神経細胞の分化誘導

線維芽細胞は皮膚組織に存在することが知られているが、その細胞株である3T3細胞からの神経栄養因子の分泌についてバイオアッセイを行った。すなわち、3T3細胞を薬物存在下に2日間培養し、その培養上清を用いて神経のモデル細胞であるPC-12細胞を培養し、PC-12細胞の形態的な分化を観察した（図1）。3T3細胞から神経栄養因子が分泌されるとすれば、PC-12細胞は形態的な分化を示すことになる。コントロールの実験として、NGFの生合成を促進させることが知られているプロテインキナーゼCの活性化薬PMA<sup>9)</sup>について検討を加えた。その結果、3T3細胞の培養時にPMAを加えなかったものと相違し、PMAを加えたものの培養上清はPC-12細胞を強く分化させた（図1）。

本実験系を用いて、セラミドの作用について検討を加えた。その結果、C2-セラミドを3T3細胞とともに培養した培養上清には神経栄養因子が含まれており、PC-12細胞を強く分化させた（図2）。同様な作用がC6-セラミドにも認められることから、セラミドによって線維芽細胞内の情報伝達系が活性化され、神経栄養因子の生合成が促進されることが推定された。なお、C2-セラミドやC6-セラミドを直接PC-12細胞に作用させても、形態的な分化は認められなかった。

### 3.2. 内因性セラミドによる神経栄養因子分泌による神経細胞の分化誘導

次に、内因性のセラミドの生合成を促進させるスフィンゴミエリナーゼとホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCを3T3細胞とともに培養し、その培養上清中でPC-12細胞の培養を行った。セラミドの生合成を促進すると考えられる、二つの酵素処理は3T3細胞からの神経栄養因子の分泌を促進し、その結果PC-12細胞の分化誘

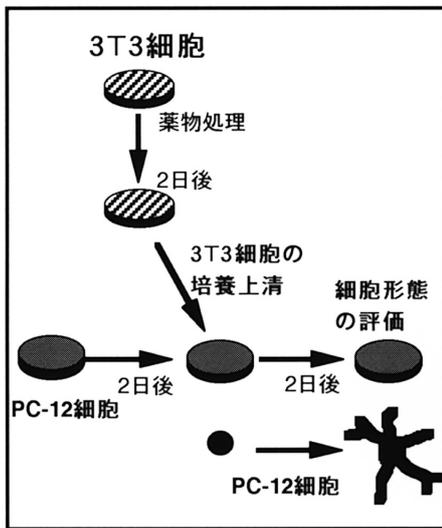
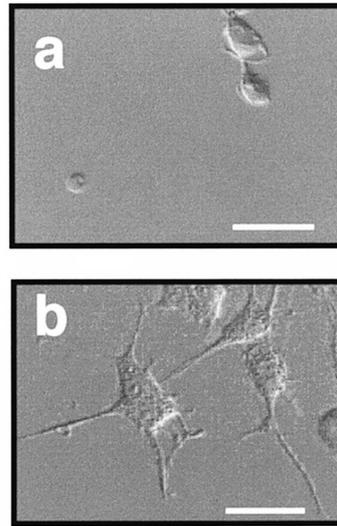
**A****B**

図1 神経栄養因子分泌の評価方法 (A) と PC-12 細胞の分化作用 (B)

A: 3T3 細胞を薬物と 2 日間培養し、その培養上清で PC-12 細胞を培養した。3T3 細胞が神経栄養因子を分泌すると、PC-12 細胞の形態的分化が引き起こされる。B: 3T3 細胞を薬物非存在下 (a) あるいは PMA (100nM) 存在下 (b) で培養した上清を用いた場合の PC-12 細胞の形態。スケール: 50  $\mu\text{m}$ 。

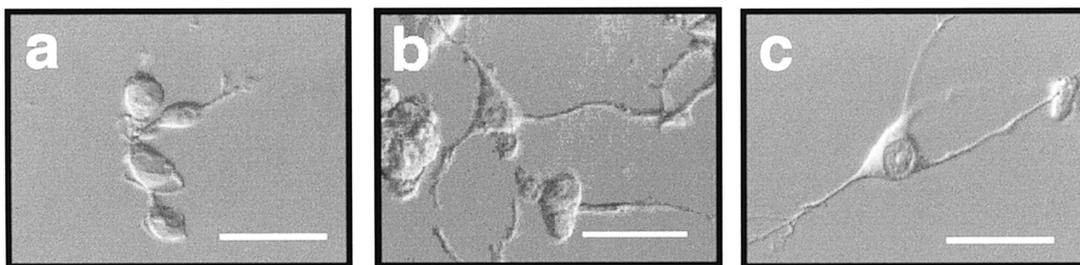


図2 外来性セラミドによる 3T3 細胞からの神経栄養因子分泌による PC-12 細胞の分化

3T3 細胞を薬物非存在下 (a)、C2-セラミド 10  $\mu\text{M}$  存在下 (b) および C6-セラミド 10  $\mu\text{M}$  存在下 (c) で培養した上清を用いたときの PC-12 細胞の分化作用。スケール: 50  $\mu\text{m}$ 。

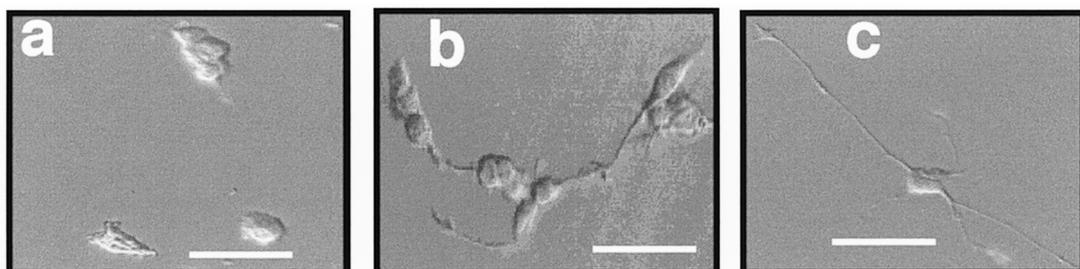


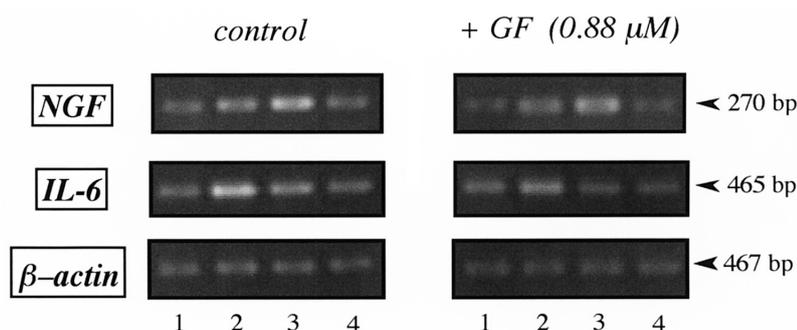
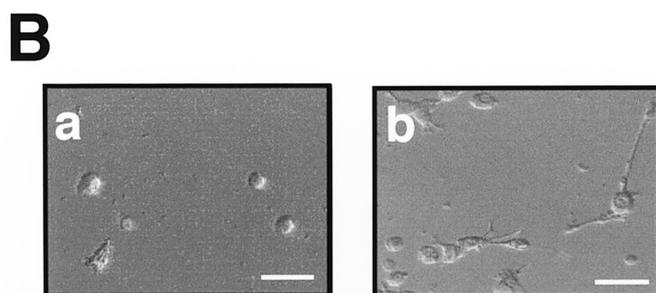
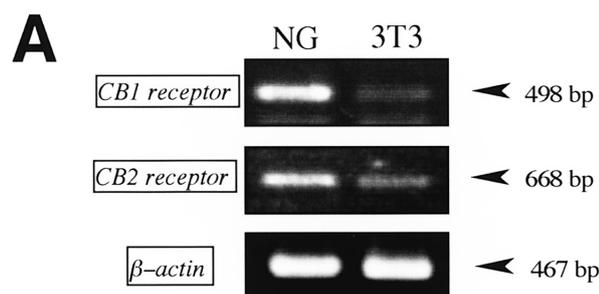
図3 内因性セラミドによる 3T3 細胞からの神経栄養因子分泌による PC-12 細胞の分化

3T3 細胞を薬物非存在下 (a)、スフィンゴミエリナーゼ 0.01 U/mL 存在下 (b) およびホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C 0.01 U/mL 存在下 (c) で培養した上清を用いたときの PC-12 細胞の分化作用。スケール: 50  $\mu\text{m}$ 。

導が強く引き起こされた (図3)。なお、スフィンゴミエリナーゼとホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C を直接 PC-12 細胞に作用させた場合には、PC-12 細胞の分化は引き起こされなかった。

### 3.3. カンナビノイド受容体刺激による神経細胞の分化誘導

マリファナの成分である  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol はカンナビノイド受容体を介して作用を現し、時間感覚や空間感覚の混乱、記憶の障害、多幸感、幻覚、離人症などの多彩な精



神症状が発現する<sup>10)</sup>。カンナビノイド受容体にはCB1受容体とCB2の二つが存在し、中枢神経とともに末梢にも存在することが報告されている<sup>11)</sup>。中枢神経系的作用については多くの研究が為されているが、末梢におけるカンナビノイド受容体の生理的な意義については不明な点が多い。カンナビノイド受容体はGiと共役し、サイクリックAMPを減少させる作用が認められているが<sup>12)</sup>、最近、その細胞内情報伝達にスフィンゴミエリナーゼの活性化を介するセラミドの生成が重要な役割を担っていることが報告された<sup>13)</sup>。そこで、3T3細胞にカンナビノイド受容体が発現しているか否かをはじめに検討したところ、CB1およびCB2受容体ともに3T3細胞に発現していることが見出された(図4A)。さらに、内因性カンナビノイド受容体刺激薬である2-arachidonylglycerol (2-AG)は、3T3細胞に作用して神経栄養因子の分泌を促進し、その培養上清中で培養したPC-12細胞の形態的分化を強く引き起こした(図4B)。なお、2-AGはPC-12細胞の分化を直接は引き起こさなかった。

### 3.4. セラミドによる神経栄養因子の遺伝子発現

3T3細胞およびPC-12細胞を用いた神経栄養因子を介

図4 3T3細胞におけるカンナビノイド受容体の発現と2-アラキドニルグリセロールによる3T3細胞からの神経栄養因子分泌によるPC-12細胞の分化

A:3T3細胞のCB1およびCB2受容体の発現をRT-PCRによって調べた。対照として、これらの受容体の発現が知られているNG108-15細胞(NG)を用いた。ハウスキーピング遺伝子として $\beta$ -アクチンを用いた。B:3T3細胞を薬物非存在下(a)および2-アラキドニルグリセロール10 $\mu$ M存在下(b)で培養した上清を用いたときのPC-12細胞の分化作用。スケール:50 $\mu$ m。

図5 3T3細胞におけるスフィンゴミエリナーゼおよびホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCによるNGFおよびIL-6mRNA遺伝子発現

3T3細胞をGF109203X存在下(右)非存在下(左)の条件で、薬物無添加(lane 1)スフィンゴミエリナーゼ0.5U/mL(lane 2)、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼC0.2U/mL(lane 3)およびPMA100nM(lane 4)とともに3時間培養し、NGFおよびIL-6mRNAをRT-PCRで解析した。ハウスキーピング遺伝子として $\beta$ -アクチンを用いた。

する神経機能変化の検討により、細胞内に増加したセラミドは神経栄養因子の生合成を促進し、神経細胞の機能的活性化を引き起こすことが示唆された。そこで、3T3細胞における神経栄養因子の遺伝子発現について検討を加えた(図5)。内因性のセラミドを増加させることが知られているスフィンゴミエリナーゼおよびホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCは顕著なNGF mRNAの発現を亢進し、また、インターロイキン-6(IL-6)mRNAの発現誘導も引き起こした。この作用はプロテインキナーゼC阻害薬のGF109203Xによって顕著に抑制された。したがって、セラミドは神経栄養因子の遺伝子発現を介した生合成の促進作用を有するとともに、その経路にPKCの介在することが示唆された。皮膚などの末梢組織において、細胞内セラミドの増加が神経の伸長作用を促し、機能的な組織へと構築する役割を担うものと考えられる。

### 3.5. セラミドの情報伝達系

そこで、細胞内に増加したセラミドによってどのような細胞内情報伝達系が活性化されるかについて検討を加えた。とくに、mitogen-activated protein kinase (MAPK)

ファミリーのうち、p42/44 MAPK、p38 MAPK および JNK のリン酸化について検討した (図6)。その結果、C2 セラミドは p42/44 MAPK、p38 MAPK および JNK のリン酸化を引き起こすことが明らかになった。

#### 4. 考 察

細胞膜を構成するリン脂質は、その構造体であるばかりではなく、細胞情報伝達系の基質や情報伝達分子として巧みに利用されている。例えば、リン脂質の分解系として、炎症などに関与するアラキドン酸/プロスタグランジン類の生成を担うホスホリパーゼ A<sub>2</sub><sup>4)</sup>、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇を引き起こすイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C<sup>15)</sup>、さらにコリンリン脂質を分解するホスホリパーゼ D<sup>16)</sup> やホスホリパーゼ C の活性調節機構<sup>17)</sup> などリン脂質を利用する多彩な情報伝達系が知られている。すなわち、生体を形成する物質が、単一な役割を担っているのではなく、複数の機能を有しているものと考えられる。

リン脂質の1つとして知られているスフィンゴミエリンの代謝物であるセラミドの生理的な役割が、皮膚組織の構造維持によって外界の刺激から皮膚を静的に守ることに加えて、細胞内の情報を動的に伝え、細胞機能に変化を与えることが本研究によって明らかになった。すなわち、セラミドには神経栄養因子の生合成・分泌の促進作用があり、このセラミドの作用は、皮膚組織などの末梢における神経機能維持に重要な役割を担っているものと推定される。スフィンゴミエリナーゼやホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C による NGF mRNA 発現作用は PKC の阻害薬である GF109203X で阻害されたことより PKC の介在が考えられるが、この作用はセラミドが PKC アイソフォームのうち PKC- $\zeta$  の活性化を引き起こすという報告<sup>18)</sup> と一致する。一方、セラミドには積極的に細胞死を惹起するアポトーシスを引き起こし、組織全体としてのバランスを

保持する作用のあることが知られており<sup>3)</sup>、本研究においても、JNK や p38 などの MAPK 活性化作用が示された。これらの結果は、動的な皮膚機能維持においても、セラミドは重要な役割を担っているものを示唆するものである。したがって、セラミドの化粧品としての利用方法あるいはその価値を考える場合、セラミド自身を化粧品中に加える方法とともに、セラミドの生合成を刺激する薬物、分解を阻害する薬物、さらにセラミドの情報伝達系を刺激する薬物を開発し、それらを化粧品として用いると、より生理的な機能性に富む化粧品になる可能性が示唆された。

#### 5. 総 括

皮膚に多量に存在するセラミドがその周辺細胞にて生合成されると、他の細胞機能に影響を与える可能性があることから、特に神経機能に影響を与える神経栄養因子の生合成に対するセラミドの作用について検討を加えた。線維芽細胞株 3T3 細胞に外来性の C2-セラミドおよび C6-セラミドを添加して培養すると、神経モデル細胞である PC-12 を分化させる因子の分泌を促した。スフィンゴミエリナーゼおよびホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C を 3T3 細胞に作用させて細胞内セラミドを増加させると、神経栄養因子の生合成・分泌が促進され、それによって PC-12 は分化した。カンナビノイド (CB) 受容体刺激はセラミドの生合成を引き起こすことが知られているが、3T3 細胞に CB1 および CB2 受容体が発現していることを RT-PCR 法を用いて確認した。内因性 CB 受容体アゴニストである 2-アラキドニルグリセロールは 3T3 細胞に作用して神経栄養因子の合成・分泌を引き起こし、PC-12 細胞を分化させた。スフィンゴミエリナーゼやホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C は NGF および IL-6 mRNA の発現を顕著に増大し、その作用はプロテインキナーゼ C 阻害薬の GF109203X によって減弱された。一方、

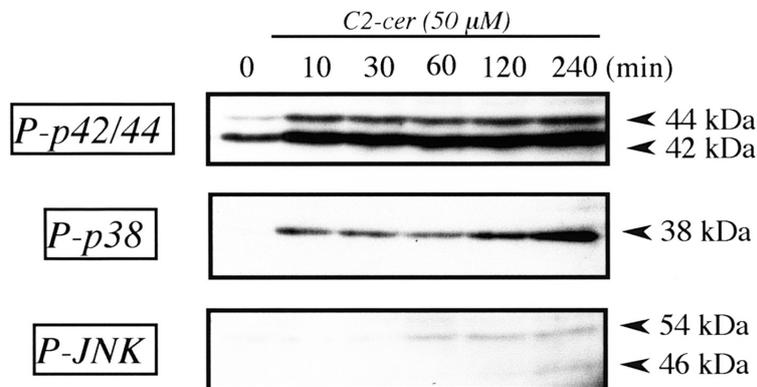


図6 C2-セラミドによる MAPK 群のリン酸化反応

3T3 細胞に C2-セラミド 50 $\mu$ M を添加した後、240 分まで経時的にサンプリングし、そのリン酸化 p42/44 MAPK (P-p42/44)、リン酸化 p38 (P-p38) およびリン酸化 JNK (P-JNK) をウエスタンブロッティングにて測定した。

セラミドの細胞内情報伝達系について MAPK のリン酸化を検討したところ、p42/44 MAPK、p38 MAPK および JNK いずれのリン酸化反応も活性化し、その情報伝達の一部には MAPK カスケードの活性化が考えられる。以上の結果より、セラミドには NGF をはじめとする神経栄養因子の生合成・分泌の促進作用があることが明らかになった。このセラミドの作用は、皮膚組織などの末梢における神経機能維持に重要な役割を担っているものと推定され、セラミドは皮膚表皮角層に形成されるラメラ構造の形成とともに、皮膚の神経機能維持をも制御している可能性が示唆された。

#### (引用文献)

- 1) 内田良一、原真里子、濱中すみ子：表皮角層におけるセラミドの役割とその起源. *生化学* **73**, 268-270, 2001.
- 2) Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol*, **10**, 73-80, 2000.
- 3) De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, et al.: The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 8375-8380, 1998.
- 4) Nakatani K, Nakahata N, Tsurufuji, S, et al.: Preconditioning of 3T3 cells by fresh edium together with genistein enhances prostaglandin E<sup>2</sup> release. *Eur J Pharmacol* **432**, 135-142, 2001.
- 5) Obara Y, Nakahata, N, Ohizumi Y. A new factor derived from 1321N1 human astrocytoma cells causes differentiation of PC-12 cells mediated through mitogen-activated protein kinase cascade. *Brain Res* **806**, 79-88, 1998.
- 6) Obara Y, Nakahata, N, Kita T, et al.: Stimulation of neurotrophic factor secretion from 1321N1 human astrocytoma cells by novel diterpenoids, scabronines A and G. *Eur J Pharmacol* **370**, 79-84, 1999.
- 7) Ohkubo S, Kimura J and Matsuoka I: Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells: a key enzyme mediating P1 antagonist sensitive ATP response. *Br J Pharmacol* **131**, 1667-1672, 2000.
- 8) Ohkubo S, Nakahata N and Ohizumi, Y: Thromboxane A<sup>2</sup> stimulates mitogen-activated protein kinase and arachidonic acid liberation in rabbit platelets. *Prostaglandins* **52**, 403-413, 1996.
- 9) Obara Y, Kobayashi H, Ohta T, et al.: Scabronine G-methylester enhances secretion of neurotrophic factors mediated by an activation of protein kinase C- $\zeta$ . *Mol Pharmacol* **59**, 1287-1297, 2001.
- 10) Dewey WL: Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* **38**, 159-178, 1986.
- 11) Felder CC, Glass M: Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 179-200, 1998.
- 12) Howlett AC: Pharmacology of cannabinoid receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **35**, 607-634, 1995.
- 13) Guzman M, Galve-Roperh I, Sanchez C: Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trend Pharmacol Sci*. **22**, 19-22, 2001.
- 14) Nakatani K, Nakahata N, Hamada Y, et al.: Medium change amplifies mitogen-activated protein kinase-mediated prostaglandin E<sup>2</sup> synthesis in 3T3 fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* **356**, 91-100, 1998.
- 15) Rho M-C, Nakahata N, Nakamura H et al.: Involvement of phospholipase C- $\gamma$ 2 in activation of mitogen-activated protein kinase and phospholipase A<sup>2</sup> by zoxanthellatoxin-A in rabbit platelets *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**, 496-504, 1997.
- 16) Mizuno K, Nakahata N, Ohizumi Y: Mastoparan-induced phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D activation in human astrocytoma cells. *Brit. J. Pharmacol.* **116**, 2090-2096, 1995.
- 17) Kobayashi H, Honma S, Nakahata N, et al.: Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in thromboxane A<sup>2</sup>-induced activation of mitogen-activated protein kinase in human astrocytoma cells *J. Neurochem.* **74**, 2167-2173, 2000.
- 18) Nakanishi H and Exton JH: Purification and characterization of the zeta isoform of protein kinase C from bovine kidney. *J Biol Chem* **267**, 16347-16354, 1992.