イヌ胃体部粘膜におけるガストリンの 作用機序に関する研究(第2報)

—— Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinase 活性と
リン脂質代謝におよぼすガストリンの影響 ——

京都大学医学部核医学科

野口 正 人, 安 達 秀 樹, 鳥 塚 莞 爾

The Cellular Mechanism of Action of Gastrin
on the Corporal Mucosa of the Canine Stomach
(2) Ca^{2+} -Activated, Phospholipid-Dependent Protein Kinase
and Phospholipids Turnover – Possible Mediator of Gastrin Action

Masato NOGUCHI, Hideki ADACHI and Kanji TORIZUKA

Department of Nuclear Medicine and Radiology, Kyoto
University School of Medicine, Kyoto 606, Japan

The existence of Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C), the effect of gastrin on phospholipid metabolism and guanylate cyclase activity were investigated to elucidate the cellular mechanism of action of gastrin on the corporal mucosa of the canine stomach.

Protein kinase activity was determined by measuring the incorporation of [^{32}P] into calf thymus H_1 -histone from [^{32}P]-ATP. One unit of protein kinase was defined as the amount of enzyme which incorporated 1 pmol of phosphate from ATP into H_1 -histone. Protein kinase C was found in 100,000xg supernatant of homogenate fractionated by a DEAE-cellulose column chromatography. Characteristics of further purified protein kinase C, such as dependency on divalent cations and phospholipids, were in agreement with those of previously reported protein kinase C in other tissues. Furthermore, the gastric corporal mucosa was found to contain protein kinase C in large quantities. The specific activity of protein kinase C was 26,000 units/mg protein.

The phospholipid metabolism was evaluated by the incorporation of [^{14}C]-glycerol-3-phosphate and the change of the radioactivity of [^{32}P] in individual phospholipids. Each phospholipid was extracted from the gastric corporal mucosa and isolated by thin layer chromatography. Guanylate cyclase activity was determined by measuring the cGMP produced, using radioimmunoassay.

Gastrin significantly increased the incorporation of [^{14}C]-glycerol-3-phosphate into phosphatidylethanolamine in the presence of acetylcholine (Ach). Ach increased the uptake of the tracer into phosphatidylinositol significantly, and the increase was enhanced

by the simultaneous addition of gastrin. In the experiments with [^{32}P]-labeled phospholipids, gastrin increased the incorporation of [^{32}P] into phosphatidylethanolamine significantly. The significant increase of the radioactivity in phosphatidylinositol by Ach failed to be enhanced by gastrin, but that of phosphatidylethanolamine by Ach was enhanced by gastrin.

No stimulation of guanylate cyclase activity by gastrin was detected in the dispersed gastric corporal mucosal cells.

These results indicate that gastric corporal mucosa was one of the most abundant tissues in which protein kinase C was contained, when compared with various mammalian tissues previously reported by Minakuchi, Nishizuka, et al. Nishizuka et al, recently proposed the novel hypothesis that phosphatidylinositol turnover activated by cAMP-independent agonists will be essentially required to activate protein kinase C. Our results suggest that gastrin can provoke phospholipids turnover including phosphatidylinositol turnover in gastric corporal mucosa.

Therefore, our data indicate the possibility that the protein kinase C system plays an important role in the cellular mechanism of action of gastrin on gastric corporal mucosa.

I. 緒 言

胃酸分泌に代表される胃体部粘膜の生理作用に関する, ガストリン, ヒスタミン, アセチルコリン刺激の作用機序やそれらの相互作用は, 単離した胃粘膜や壁細胞を用いた検討^{15) 21) 23)}で次第に明らかになりつつある。ヒスタミンの胃酸分泌亢進作用は壁細胞に対する直接作用であり, その刺激はCAMPをsecond messengerとして細胞内へ伝達される^{17) 20) 24)}。しかし, ガストリン, アセチルコリンの作用機序はまだ不明の点が多く, それらの相互作用も明らかでない。

著者らは, ガストリンがイヌ胃体部粘膜の細胞膜や細胞のadenylate cyclase (AC) 活性を刺激せず, その作用機序はAC-CAMP系に非依存性であるとの成績¹⁴⁾を得たので, 近年高井・西塚ら²⁴⁾により報告され, ホルモンや生理活性物質の作用の細胞内伝達系として注目されている Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinaseの胃粘膜における存在および本酵素とガストリン作用の関連について検討したので, その成績を報告する。

なお, Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinaseおよびCAMP-dependent protein kinaseはそれぞれprotein kinase C, protein kinase Aと略して述べる。

II. 材料および方法

1) 材 料

脱血死させた雑種成犬の胃体部粘膜から粘液を除去した後, スライドガラスで粘膜を剥離した。

(1) 遊離細胞の調製: 10gの胃体部粘膜を細切した後, 粘膜細片を0.075%コラゲナーゼ(sigma; type I)を含むEagle MEM, 20mM Hepes, PH 7.4溶液中で, 37°C, 1時間処理し, 遊離細胞を得た。コラゲナーゼを含む処理溶液は15分交換し, そのたびに95% O_2 , 5% CO_2 を封入した。細胞の生存率および壁細胞含有率は, それぞれErythrosin Bを用いた色素排除試験, Eosino-stain法¹⁴⁾で算定した。

(2) **Protein kinase Cの調製**: protein kinase Cは井上らの方法⁵⁾に準じて調製された。胃体部粘膜7.5gを、250mM sucrose, 2mM EDTA, 10mM ethylen glycol bis-N, N, N', N'-tetra-acetic acid (EGTA)を含む20mM Tris-HCl, PH 7.5溶液中で細切した後、粘膜細片を3ml / g tissueの同溶液中で、Potter-Elvehjem Teflon-glass homogenizerを用いてhomogenizeした。ホモジネートを100,000×g, 60分間超遠沈し、その上清、即ちcytosol分画を得た。cytosol分画21mlを、50mMメルカプトエタノール, 2mM EDTA, 5mM EGTAを含む20mM Tris-HCl, PH 7.5で平衡化したDEAE-cellulose (30ml)カラムに上層し、150mlの同溶液でwash outした後0-0.3M NaClの連続密度勾配をもつ同溶液160mlでカラムに吸着した分画を溶出した。後述する方法でprotein kinase C活性を検討し、活性を示した分画を3mlに濃縮した後、Sephadex G-150カラム(1.6×80cm)に上層し50mMメルカプトエタノール, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTAを含む20mM Tris-HCl, PH 7.5でゲルろ過した。protein kinase C活性を示した分画を採取し、再び濃縮した後、Ca²⁺-freeの20mM Tris-HCl, PH 7.5で30倍希釈しprotein kinase Cとして用いた。なお、酵素分画の濃縮はPM-10membraneを用いたultrafiltration法(Amicon)で行なった。

(3) **薬品**: 合成ヒトガストリン I (Calbiochem), ペンタガストリン (住友化学), アセチルコリン (半井化学)を使用した。

また、[γ -³²P]ATPはGlynn, Chapellの方法⁶⁾で作製した。ウシ胸腺H₁-ヒストンはOliverらの方法¹⁰⁾で調製された。phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), total phospholipidは京都薬科大学、藤井博士より提供を受けた。また、phosphatidylinositol (PI)はSerdary Res. Ltd. より購入した。diacylglycerolとしてdiolein (半井化学)を用いた。

2) 方法

(1) Protein Kinase活性の検討

Protein Kinase活性はウシ胸腺H₁-ヒストリンのリン酸化によって測定した。2.5n mol [γ -³²P]-ATP (5-9×10⁴cpm/n mol), 50 μ g H₁-ヒストン, 1.25 μ mol 酢酸マグネシウムを含む20mM Tris-HCl溶液, PH 7.5に20 μ lの酵素分画を添加し、250 μ lとした後、30℃, 3分間incubateした。protein kinase C, protein kinase Aの活性は上記の反応液に各々Ca²⁺, phospholipid, diacylglycerolまたはCAMPを添加して検討した。反応は25%トリクロル酢酸で停止し、沈澱をmembrane filter (東洋口紙; pore size 0.45 μ)でろ過した後、ガスフローカウンターでその沈澱の³²P放射活性を測定した。protein kinase CのCa²⁺, phospholipid依存性を検討する実験では、すべての溶液はchelex-100カラムを用いて、Ca²⁺-freeに調製され、試験管はプラスチックチューブを用いた。各種のphospholipid, diacylglycerolは20mM Tris-HCl, PH 7.5溶液中で、4分間sonicationした後反応液に添加した。

protein kinaseの活性は1分間に1p molのリン酸をATPからH₁-ヒストンに結合する酵素活性を1単位として表示した。

(2) リン脂質代謝の検討

50-60mgの胃体部粘膜で、[¹⁴C]-グリセロール3リン酸, [³²P]-リン酸を用いてリン脂質代謝を検討した。

① 胃体部粘膜をリン酸塩を除いたHanks, 10mM Hepes, PH 7.4 (Hanks-P) 溶液1.0ml中で0.5 μ Ci [¹⁴C]-グリセロール3リン酸または10 μ Ci [³²P]-リン酸と37℃, 15分間incubateした。そ

の後氷冷した生食水で粘膜を3回洗浄した後, リン脂質を抽出した²⁾。即ち粘膜をメタノール1.2 ml, クロロホルム0.6 ml 中で攪拌し, さらにクロロホルム0.6 ml を添加して攪拌した後, 0.2 M KCl 0.6 ml を加えて攪拌後3,000 rpm, 5分間遠沈して下層のクロロホルム層を採取した。窒素ガスで抽出されたリン脂質を乾固した後, 50 μ l のクロロホルムで再溶解し, リン脂質の同定まで -80°C に保存した。

② また, 胃体部粘膜をHanks-P溶液中で室温, 30分間攪拌しリン酸塩を枯渇させた後, 500 μCi の $[\text{}^{32}\text{P}]$ -リン酸を含む同溶液で室温, 30分間incubateし粘膜内リン脂質を $[\text{}^{32}\text{P}]$ で標識した。その後粘膜を氷冷した生食水で3回洗浄した後, Hanks-P溶液1 ml 中で 37°C , 5分間反応させ, 前述のごとくリン脂質を抽出し保存した。

(3) $[\text{}^{14}\text{C}]$ または $[\text{}^{32}\text{P}]$ 標識リン脂質の同定

(2)で抽出されたリン脂質は薄層クロマトグラフィー(HP-TLC シリカゲル60プレート, No. 5547; Merck)で各リン脂質に分離・同定された。薄層クロマトグラフィーの展開はクロロホルム25:メタノール15:酢酸4:水2で行ない, また必要に応じてクロロホルム10:アセトン4:メタノール2:酢酸2:水1で2次元展開された。分離された各リン脂質は0.8%ヨードを含むメタノールを噴霧して同定し, シンチレーター(アクアゾール2; New England Nuclear)の中で, その放射活性を液体シンチレーション・カウンター(Packard. Model 460C)にて測定した。

(4) Guanylate Cyclase (GC) 活性の検討

$3-10 \times 10^5$ の遊離細胞を10mM Theophyllineを含むEagle MEM, 20mM Hepes, PH 7.4 溶液200 μ l に入れ, 37°C , 15分間incubateした。10%トリクロル酢酸200 μ l で反応を停止し, 3,000 rpm, 15分間遠沈した後その上清から水飽和エチルエーテルでトリクロル酢酸を除去し, 上清を温風乾固した。産生されたCGMPをRIA kit (三井東圧)で測定し, CGMP産生能でGC活性を検討した。

なお, Protein Kinase分画の蛋白量はLowry法¹⁰⁾で測定した。実験は特記した以外すべて 4°C で行なった。成績の推計学的検討はt検定で行ない, 特記した以外の数値は平均値 $\pm$ 標準偏差で記載した。

III. 成 績

1) 胃体部粘膜 protein kinase C の検討

胃体部粘膜cytosol分画のprotein kinase C活性値は320 U/mg proteinであった。

Fig. 1にcytosol分画をDEAE-celluloseカラムで分画した各分画のprotein kinase活性を示した。protein kinase C活性を示す分画は7-15番目に, protein kinase A活性を示す分画は19-27番目に溶出され, 両者は明瞭に分離された。Fig. 1から H_1 -ヒストンを基質としたこの検討では, 胃体部粘膜のprotein kinase Cの活性はprotein kinase A活性の約2倍であった。またDEAE-celluloseカラムで得られたprotein kinase C活性値は4,000 U/mg proteinであった。

この酵素分画をSephadex G-150カラムでゲルろ過すると, protein kinase C活性を示す分画は単一のピークで溶出され, その分画の活性値は26,000 U/mg proteinであった(Fig. 2)。即ち, Sephadex G-150カラムで得られた分画は, cytosol分画の約81倍, DEAE-cellulose分画の約6倍に精製された。

Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of protein kinase from gastric corporal mucosa. Protein kinase activity was assayed as described under Method.

The specific activity of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ used was 90,000 cpm/nmol. Protein kinase activity in the presence of 1 mM calcium, 10 μg total phospholipid, 0.25 μg diolein (●—●); in the presence of 1 μM cyclic AMP (○—○), in the presence of 0.5 mM EGTA (▲—▲).

Fig. 2. Sephadex G-150 column chromatography of protein kinase C obtained from gastric corporal mucosa. Protein kinase activity was assayed as described under Method.

The specific activity of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ used was 70,000 cpm/nmol. Protein kinase activity in the presence of 1 mM calcium, 10 μg total phospholipid, 0.25 μg diolein (●—●); in the presence of 0.5 mM EGTA (▲—▲).

Table 1. Effect of calcium and phospholipid on protein kinase C activation.

Reaction system	Protein kinase activity (Units / mg of protein)
Control (- protein kinase)	0
- phosphatidylserine	4,100
- Ca ²⁺	4,000
+ phosphatidylserine, + Ca ²⁺ ^a	26,500

+ ; presence

- ; absence

^a ; The complete reaction mixture (0.25 ml) contained 5 μ molTris/HCl, pH 7.5, 2.5 nmol [γ -³²P] ATP, 50 μ g H₁-histone,1.25 μ mol magnesium nitrate, 0.2 μ g diolein, protein kinase C(3 μ g of protein), 2x10⁻⁴M calcium chloride and 2 μ g phosphatidylserine.

Table 2. Specificity of divalent cation for activation of protein kinase C.

Divalent cation ^a	Protein kinase activity (Units / mg of protein)	
	5x10 ⁻⁵ M	5x10 ⁻⁴ M
None ^b	1,500	-
CaCl ₂	29,100	20,900
MnCl ₂	5,300	6,500
CoCl ₂	4,100	3,200
NiCl ₂	2,400	2,700
ZnCl ₂	400	200
SrCl ₂	3,300	15,700

Protein kinase activity was assayed as described in Table 1.

^a ; 5x10⁻⁵M and 5x10⁻⁴M of various divalent cations were employed.^b ; 5 mM magnesium nitrate was used in all assays.

本酵素のCaイオンおよびリン脂質依存性を表1に示した。Caイオンまたはリン脂質単独添加時のProtein Kinase 活性値は低く、両者を同時に添加するとその活性値は単独添加時の約6倍に明らかに増加した。このようにCaイオン、リン脂質に依存して活性化される本酵素の2価イオン特異性、リン脂質特異性を表2、表3に示した。Mgイオン5 mMの存在下で、本酵素は2価イオンのなかでCaイオンにより、またリン脂質のなかでPSにより特異的に活性化された。PS以外のリン脂質では、PE、PIが活性化作用を有し、それらの作用はPSの約30-40%であった。

以上の成績の再現性は、別のイヌ胃体部粘膜を用いて確認された。

Table 3. Effect of various phospholipids on activation of protein kinase C.

Phospholipid ^a	Protein kinase activity (Units / mg of protein)	
	A	B
None	600	1,000
Sphingomyelin	1,100	1,000
Phosphatidylcholine	1,000	1,100
Phosphatidylinositol	1,800	7,100
Phosphatidylethanolamine	1,900	8,800
Phosphatidylserine	6,900	22,800

Protein kinase activity was assayed as described in Table 1.

A ; absence of diacylglycerol

B ; presence of diacylglycerol (0.2 μ g diolein)

a ; 2 μ g each of various phospholipids was employed.

Table 4. Effect of gastrin and acetylcholine on the incorporation of [¹⁴C]-glycerol-3-phosphate into individual phospholipids.

Phospholipid type	Specific activity (cpm / g tissue)			
	None (4)	Gastrin 10 ⁻⁷ M (3)	Ach 10 ⁻³ M (3)	Gastrin 10 ⁻⁷ M + Ach 10 ⁻³ M (3) ^a
Total	5594 $\pm$ 1373	6885 $\pm$ 1127	7193 $\pm$ 1516	9201 $\pm$ 2090 [*]
Phosphatidylethanolamine	410 $\pm$ 225	676 $\pm$ 82	451 $\pm$ 307	1250 $\pm$ 123 ^{***}
Phosphatidylinositol	963 $\pm$ 287	1434 $\pm$ 184	2439 $\pm$ 492 ^{***}	3689 $\pm$ 1250 ^{***}
Phosphatidylcholine	2090 $\pm$ 697	2480 $\pm$ 553	1824 $\pm$ 410	2172 $\pm$ 635
Sphingomyelin	164 $\pm$ 61	164 $\pm$ 20	82 $\pm$ 41	123 $\pm$ 61
Others ^b	1865 $\pm$ 492	1988 $\pm$ 430	2234 $\pm$ 328	1906 $\pm$ 205

Mucosal fragments of gastric corpus used were 49 $\pm$ 1 mg of wet weight (SDM ; n=13).

Values are means of each experiment with SD.

a ; Figures in parentheses indicate the number of preparations of gastric mucosal fragments.

b ; Others includes phosphatidic acid and neutral lipids.

* ; significantly different from basal, P<0.05 .

*** ; significantly different from basal, P<0.01 .

2) 胃体部粘膜のリン脂質代謝の検討

[³²P], [¹⁴C] のリン脂質への取込みを 2 次元展開の薄層クロマトグラフィーで検討すると, PS への取込みは各々 1.2 $\pm$ 2.1% (n = 7), 1.5 $\pm$ 1.9% (n = 4) と非常に少量であった。またガストリン, アセチルコリンの添加で, PS への [³²P], [¹⁴C] の取込みは変化しなかった。

[¹⁴C]-グリセロール 3 リン酸のリン脂質への取込みに対するガストリン, アセチルコリンの影響を表 4 に示した。ガストリンは [¹⁴C]-PE, PI を増加させる傾向を示したが有意ではなかった。

しかしアセチルコリンが同時に存在すると有意に $[^{14}\text{C}]\text{-PE}$ を増加させた($P < 0.01$)。その値はガストリン単独時の185%, アセチルコリン単独時の278%であった。アセチルコリンは有意に $[^{14}\text{C}]\text{-PI}$ を増加させ($P < 0.01$)、その効果はガストリンの存在で増強した。また、ガストリン、アセチルコリンの同時添加時には、 $[^{14}\text{C}]\text{-PI}$, PE の増加のため、 $[^{14}\text{C}]\text{-リン脂質総量}$ が有意に増加した($P < 0.05$)。

$[^{32}\text{P}]\text{-リン脂質}$ の代謝に対するガストリン、アセチルコリンの影響を表5に示した。ガストリンは有意に $[^{32}\text{P}]\text{-PE}$ を増加させた($P < 0.05$)。アセチルコリンは $[^{32}\text{P}]\text{-リン脂質総量}$, PI および PE を有意に増加させた(各々 $P < 0.01$, 0.01 , 0.02)。またガストリン、アセチルコリンの同時添加時には、各々の単独添加時より $[^{32}\text{P}]\text{-PE}$ の増加が増大した。しかし $[^{32}\text{P}]\text{-PI}$ の増加はアセチルコリン単独添加時と変化しなかった。

3) 胃体部粘膜遊離細胞のGC活性に対するガストリンの影響

遊離細胞の生存率は $68.7 \pm 12.4\%$ ($n = 4$)で、壁細胞含有率は $23.8 \pm 15.8\%$ ($n = 4$)であった。基礎GC活性値は $0.32 \pm 0.11 \text{ p mol}/10^6 \text{ viable cells} \cdot 15 \text{ min}$ で、 10^{-8} M ペンタガストリン添加時のGC活性値は $0.28 \pm 0.17 \text{ p mol}/10^6 \text{ viable cells} \cdot 15 \text{ min}$ であった。ペンタガストリンは遊離細胞のGC活性を刺激しなかった。

Table 5. Gastrin and/or acetylcholine dependent changes in $[^{32}\text{P}]\text{-phosphate}$ labelled phospholipids.

Phospholipid type	Specific activity (cpm / g tissue)			
	None	Gastrin 10^{-7} M	Ach 10^{-3} M	Gastrin $10^{-7} \text{ M} + \text{Ach } 10^{-3} \text{ M}$
Total	4206 ± 1095	5102 ± 490	$6430 \pm 761^{***}$	$7096 \pm 1502^{***}$
Phosphatidic acid	184 ± 141	190 ± 83	253 ± 101	287 ± 104
Phosphatidyl-ethanolamine	1765 ± 267	$2556 \pm 239^*$	$2714 \pm 294^{**}$	$3445 \pm 860^{***}$
Phosphatidylinositol	1606 ± 220	2024 ± 249	$3073 \pm 377^{***}$	$2963 \pm 650^{***}$
Phosphatidylcholine	280 ± 108	314 ± 90	371 ± 126	363 ± 135
Sphingomyelin	34 ± 45	18 ± 41	174 ± 229	39 ± 29

Mucosal fragments of gastric corpus employed were $51 \pm 1 \text{ mg}$ of wet weight (SDM; $n=20$).

Values are means of five preparations with SD.

* ; significantly different from basal, $P < 0.05$.

** ; significantly different from basal, $P < 0.02$.

*** ; significantly different from basal, $P < 0.01$.

IV. 考 按

近年, Ca イオンで直接活性化される protein kinase が発見され⁹⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²⁵⁾, その生理的意義が検討されている。それらのなかで、高井、西塚らの提唱する protein kinase C は体内の各組織に広く分布¹³⁾し、またトロンビンにより惹起される血小板の凝集反応に重要な役割を果していることが知られている⁸⁾。著者らは、ガストリンが胃体部粘膜の AC-CAMP 系および GC-CGMP 系を刺激しなかったことから、胃体部粘膜の protein kinase C の存在について検討した。その結果、本酵素

がイヌ胃体部粘膜のcytosol分画に多量存在することを明らかにした。Caイオン, phosphatidylserineにより活性化されるprotein kinase Cは心筋, 平滑筋, 脳, 血小板, 白血球等に存在することが明らかにされているが^{13) 20)}, 胃粘膜に関する報告は著者らの成績が初めてと思われる。

胃粘膜のprotein kinase Cは低濃度のCaイオン ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) およびPS, PE, PIで活性化され, その活性化はdiacylglycerolによって著明に増強された。これらの性状は脳のprotein kinase Cの性状^{24) 25)}と一致しており, 本酵素が生体内に広く存在することを支持するものと言える。胃粘膜のprotein kinase Cの比活性を, すでに報告されている各組織中の同酵素の比活性¹³⁾と比較すると脳, 血小板と同程度またはそれ以上であり, 胃体部粘膜は本酵素を多量に含む組織と考えられ, その生理的意義は興味深い。

Fig. 3. A proposed mechanism of new transmembrane signalling for protein phosphorylation by Takai, Nishizuka, et al.²⁶⁾. The figure was slightly modified by the author, and was added de novo pathway of phosphatidylinositol.

ところで, Michellらの総説^{11) 12)}によれば, 細胞膜のリン脂質は種々の組織において細胞機能と密接に関連しており, なかでもPIの代謝は細胞機能の発現に重要な役割を演じているとされている。PIはdiacylglycerolとinositolに分解され, diacylglycerolはphosphatidic acidとなり再びPIへと合成される¹¹⁾。このPI代謝回転が数多くの生理活性物質やホルモンで惹起されることは古くから知られており, ガストリン・ファミリーの消化管ホルモンであるコレチストキニン(CCK)も膵のPI代謝を刺激する¹⁾。近年, このPI代謝回転がprotein kinase Cを活性化している可能性が, トロンビンによる血小板の凝集反応において示されている^{8) 20)}。Kawaharaら⁸⁾はヒト血小板に多量のprotein kinase Cが存在し, トロンビンによる血小板の凝集反応に伴ないdiacylglycerolの生成が亢進し, ついで40K proteinのリン酸化反応が特異的に惹起されること, またこれらの反応がPIを分解してdiacylglycerolを生成するphospholipase Cやprotein kinase Cで同様に惹起されることを示した。図3に高井, 西塚らのprotein kinase C活性化機構の仮説のスキーマにPIのde novo経路を付記したスキーマを示した。著者らは胃体部粘膜に多量のprotein kinase Cが存在することから, リン脂質代謝に対するガストリン, アセチルコリンの影響を検討した。各種リン脂質はde novo経路としてグリセロール3リン酸からphosphatidic acidを経て形成されるが, この経路の検討でアセチルコリンは $[^{14}\text{C}]$ -グリセロール3リン酸のPIへの取込みを増加させ, ガスト

リンはアセチルコリンと協同して標識PIの増加を増強するとともに、特異的に標識PEを増加させた。また $[^{32}\text{P}]$ -リン脂質の検討では、アセチルコリンは標識PI, PEを増加させ、ガストリンは標識PEを増加させた。さらにガストリン、アセチルコリンが同時に存在すると、標識PEは相加的に増加したが、標識PIはアセチルコリン刺激時の増加に比べて増加しなかった。両者の検討は標識PCの量をみると明らかなように、 $[^{14}\text{C}]$ がリン脂質構造のグリセロールに、 $[^{32}\text{P}]$ がコリン、エタノール、イノシトール等の物質に伴なってリン脂質構造に入るため、おのおののリン脂質の生合成、代謝の異なった側面をみている。しかし、ガストリン、アセチルコリン刺激で両検討において共通した事実は、ガストリンがアセチルコリンと協同して標識PEを増加させ、アセチルコリンは標識PIを増加させることである。これらの事実はアセチルコリンがphosphatidic acidからPIの生成を刺激し、またガストリンはアセチルコリンで増加したPIからdiacylglycerolを経てPEの生成を刺激することを示唆している。

以上の成績はガストリン、アセチルコリンの作用がCaイオンおよびPS, PE, PI等のリン脂質により活性化されるprotein kinase Cと密接に関連している可能性を示しており、今後生物活性やリン酸化反応との関連が検討される必要がある。

一方、カエル胃粘膜でヒスタミンによる胃酸分泌細胞の形態学的変化とリン脂質代謝を検討したKasbekarら⁷⁾は、ヒスタミンが $[^{32}\text{P}]$ -PC, PEを増加させると報告しており、これは著者らのガストリン、アセチルコリンの成績と明らかに異なっている。ヒスタミンが壁細胞のAC-CAMP系を刺激し、ガストリン、アセチルコリンがAC-CAMP系を刺激しないとされているので、これら3種類の胃酸分泌刺激物質のリン脂質代謝に与える影響の相違は合理的であると思われる。また、Hirataら³⁾⁴⁾によりPEからPCの代謝がAC-CAMP系を作動させる初期反応である可能性が示唆されており、ガストリンが胃粘膜においてアセチルコリンと協同してPI代謝を促進し、また標識PEを増加させることは、胃粘膜におけるガストリン、アセチルコリン、ヒスタミンの相互作用を考えるうえで非常に興味深い。

今後、細胞レベルでのprotein kinase Cやリン脂質代謝に関するガストリンの影響を検討することは、ガストリンのホルモン作用および関連物質との相互作用を解明する重要な手掛りになると思われる。

V. 総括ならびに結語

イヌ胃体部粘膜を用いて、 Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinaseの存在およびガストリンのリン脂質代謝に与える影響を検討し、以下の結論を得た。

胃体部粘膜は多量の Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinaseを含んでいた。アセチルコリンは胃体部粘膜のリン脂質代謝において $[^{14}\text{C}]$ -および $[^{32}\text{P}]$ -phosphatidylinositolを増加させ、ガストリンはアセチルコリンと協同して $[^{14}\text{C}]$ -および $[^{32}\text{P}]$ -phosphatidylethanolamineを増加させた。またガストリンは胃体部粘膜細胞のGuanylate cyclase-CGMP系を刺激しなかった。

以上の成績から、ガストリンは胃体部粘膜のリン脂質代謝においてphosphatidylinositolからphosphatidylethanolamineへの経路を刺激すると推察され、ガストリンの胃粘膜における作用機序は Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinaseと密接に関連していることが示唆された。

本論文の要旨の一部は第68回日本消化器病学会総会で発表した。

本論文の一部の実験は神戸大学医学部第2生化学教室で行なった。御指導いただいた西塚泰美教授、高井義美博士に深謝いたします。

本研究の一部は文部省科研費 No. 56770370 (1981) に負うものである。

文 献

- 1) Bauduin, H. and Cantraine, F.: "Phospholipid effect" and secretion in the rat pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, 270: 248–253, 1972.
- 2) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911–917, 1959.
- 3) Hirata, F., Viveros, O.H., Diliber-To, Jr. E.J. and Axelrod, J.: Identification and properties of two methyltransferases in conversion phosphatidyl-ethanolamine to phosphatidylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1718–1721, 1978.
- 4) Hirata, F., Strittmatter, W.J. and Axelrod, J.: β -adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and β -adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 368–372, 1979.
- 5) Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. and Nishizuka, Y.: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 252: 7610–7616, 1977.
- 6) Glynn, I.M. and Chappell, J.B.: A simple method for the preparation of ^{32}P -labelled adenosine triphosphate of high specific activity. *Biochem. J.*, 90: 147–149, 1964.
- 7) Kasbekar, D.K., Forte, G.M. and Forte, J.G.: Phospholipid turnover and ultrastructural changes in resting and secreting bullfrog gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta*, 163: 1–13, 1968.
- 8) Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R., Sano, K. and Nishizuka, Y.: Phospholipid turnover as a possible transmembrane signal for protein phosphorylation during human platelet activation by thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 97: 309–317, 1980.
- 9) Krebs, E.G. and Fisher, E.H.: Phosphorylase to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 20: 150–157, 1956.
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 625–275, 1951.
- 11) Michell, R.H.: Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta*, 415: 81–147, 1975.
- 12) Michell, R.H.: Inositol phospholipids in membrane function. *Trends Biochem. Sci.*, 4: 128–131, 1979.
- 13) Minakuchi, R., Takai, Y., Yu, B. and Nishizuka, Y.: Widespread occurrence of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase in mammalian tissues. *J. Biochem. (Tokyo)*, 89: 1651–1654, 1981.
- 14) 野口正人, 安達秀樹, 鳥塚莞爾: イヌ胃体部粘膜におけるガストリンの作用機序に関する研究 (第1報)。日内分泌誌; 投稿中,
- 15) 大江慶治, 松本春樹, 白川敏夫, 藤原 卓, 岡田善臣, 井上正規, 三好秋馬: Histamine, gastrin ならびに choline 作動性薬物による胃酸分泌刺激の細胞内伝達機構に関する *in vitro* 実験系による比較検討。医学のあゆみ, 119: 548–551, 1981.
- 16) Oliver, D., Sommer, K.R., Panyim, S., Spiker, S. and Chalkley, R.: A modified procedure for fractionating histones. *Biochem.*

- J., 129: 349–353, 1972. 17) Pires, E., Perry, S.V. and Thomas, M.A.W.: Myosin light-chain kinase, a new enzyme from striated muscle. *FEBS Lett.*, 41: 292–296, 1974. 18) Rall, T.W., Sutherland, E.W. and Wosilait, W.D.: The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, 218: 483–495, 1956. 19) Scholes, P., Cooper, A., Jones, D., Major, J., Walters, M. and Wilde, C.: Characterization of an adenylate cyclase system sensitive to histamine H₂-receptor excitation in cells from dog gastric mucosa. *Agents Actions*, 6: 677–682, 1976. 20) Schulman, H. and Greengard, P.: Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by “calcium-dependent regulator”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5432–5436, 1978. 21) Soll, A.H.: The action of secretagogues on oxygen uptake by isolated mammalian parietal cells. *J. Clin. Invest.*, 61: 370–380, 1978. 22) Soll, A.H. and Wollin, A.: Histamine and cyclic AMP in isolated canine parietal cells. *Am. J. Physiol.*, 237: E444–450, 1979. 23) Sonnenberg, A., Berglin, T., Lewin, M.J.M., Fisher, J.A., Sachs, G. and Blum, A.L.: Stimulation of acid secretion in isolated gastric cells. 337–348. Ed. by G. Rosselin, P. Fromgeot and S. Bonfils, In *Hormone Receptors in Digestion and Nutrition*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979. 24) Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y.: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 252: 7603–7609, 1977. 25) Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y.: Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 254: 3692–3695, 1979. 26) Takai, Y., Kishimoto, A., Kawahara, Y., Minakuchi, R., Sano, K., Kikkawa, U., Mori, T., Yu, B., Kaibuchi, K. and Nishizuka, Y.: Calcium and phosphatidylinositol turnover as signalling for transmembrane control of protein phosphorylation. 301–313. Ed. by G.I. Drummond, P. Greengard and G.A. Robison, In *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. 14, Raven Press, New York, 1981. 27) Wollin, A., Soll, A.H. and Samloff, I.M.: Action of histamine, secretin, and PGE₂ on cyclic AMP production by isolated canine fundic mucosal cells. *Am. J. Physiol.*, 237: E437–443, 1979. (受付日：57. 10. 4)