β -Endorphin 分泌に対する Cholera toxin の影響

——下垂体中葉遊離細胞における検討——

熊本大学医学部産科婦人科学教室

(主任: 前山昌男教授)

古 木 義 弘, 迫 田 芳 生, 畑 田 泰 行

宗 村 正 英, 前 山 昌 男

徳島大学医学部第二内科学教室

松 村 光 博

The Effects of Cholera Toxin in the Release of β -Endorphin
from the Dispersed Cells of the Rat Neurointermediate Lobe

**Yoshihiro FURUKI, Yoshio SAKODA, Yasuyuki HATADA,
Masahide MUNEMURA, Masao MAEYAMA and Mitsuhiro MATSUMURA***

Department of Obstetrics and Gynecology,

Kumamoto University Medical School,

Kumamoto, Japan

(Director: Prof. Masao MAEYAMA)

*Second Department of Internal Medicine,

Tokushima University Medical School,

Tokushima, Japan

The intermediate lobe cells of pituitary gland synthesize and secrete bioactive peptides derived from proopiomelanocortin. In the present study, we investigated the effects of cholera toxin on the release of β -endorphin (β -Ep) from dispersed-intermediate lobe cells of rats. Cholera toxin added into culture medium, enhanced the intracellular accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) and the release of β -endorphin like immunoreactive substance (β -END-LIS). A positive dose-response relationship existed between the concentration of cholera toxin and the release of β -END-LIS or the accumulation of cAMP. Maximal response was obtained with approximately 3×10^{-10} M (in β -END-LIS release) and 1×10^{-9} M (in cAMP accumulation) concentration of cholera toxin. Incubation with cholera toxin (3×10^{-8} M) resulted in a significant rise of cAMP accumulation after 20 ~ 30 min, and a 2 ~ 2.5 fold increase of β -END-LIS release occurred after 60 min in comparison with nontreated cells. cAMP analog and phosphodiesterase inhibitor also increased the β -END-LIS release¹⁰⁾. These results suggested the close relationship between cAMP accumulation and its biological effect (i.e. β -END-LIS release).

緒 言

β -Endorphin (β -Ep) は, proopiomelanocortin と称される前駆物質に由来する polypeptide であるが,^{7) 20)} 産婦人科領域においては, 妊娠・分娩に関連して母体血・臍帯血・羊水中でのその値の変動や, 性成熟ならびに排卵機構への関与等の報告がなされている。^{12) 17) 20)} しかし, 細胞レベルでの β -Ep 分泌についての報告は少なく不明の点が多い。^{18) 22) 25)} 下垂体中葉は均一な細胞集団により構成され, proopiomelanocortin を前駆物質とする ACTH や lipotropin (LPH) に関連した多くの peptides を合成・分泌する。^{1) 7) 21)} β -Ep の局在は生体内の諸臓器で報告されているが, ラットでは, 下垂体, 特に中葉は前葉の約10倍の濃度を含有することが知られている。²⁴⁾ ラット下垂体中葉における catecholamine β -receptor (β -adrenoceptor), dopamine receptor の存在は, α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) や β -Ep の放出¹⁰⁾ ならびに adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) 生成を促進する種々の薬物の効果, あるいは特異的なリガンドの結合実験から推測された。⁵⁾ 我々は β -Ep 放出機序への β -adrenoceptor および dopamine receptor の関与とその際, cAMP の変動が重要であることを報告した。¹⁰⁾ 一方, cholera toxin はその特異的な adenylate cyclase の活性化作用で知られている興味ある物質である。^{2) 8)} 本実験では, 酵素処理により分離したラット下垂体中葉遊離細胞を用いる in vitro の系において, radioimmunoassay (RIA) を用いて β -endorphin-like immunoreactive substance (β -END-LIS) および cAMP を測定して, β -Ep 放出に及ぼす cholera toxin の効果を, その際の cAMP の変動を含めて検討をおこなった。

実 験 方 法

1) 試 薬

Bovine serum albumin (Armour), cholera toxin, DNase (Sigma), Earle's balanced salt solution (Gibco), Na^{125}I (NEN), synthetic human β -Endorphin (Protein Research Foundation), trypsin, trypsin inhibitor (Worthington), その他の薬剤はすべて特級を用いた。

2) ラット下垂体中葉遊離細胞の作製

Sprague-Dawley 系雄ラット (250~300 g) を断頭後, 下垂体を摘出し, 実体顕微鏡下に中・後葉を分離し, Munemura et al. の方法¹⁹⁾ に従い, penicilline (100 IU/ml), streptomycin (100 μg /ml) を含む Earle's balanced salt solution (EBSS) 中に trypsin (2.5 mg/ml), DNase (40 μg /ml) を加え, 95% O_2 -5% CO_2 ガス環境で gentle agitation をおこない, 細胞を分離し, 得られた遊離細胞を 37°C, 2 時間, 0.25% bovine serum albumin を含む EBSS-BSA 中にて preincubation した後, 実験に使用した。Trypan blue による細胞の viability check は常に 95% 以上であった。

3) ラット下垂体中葉細胞の incubation

Incubation は薬剤を含む EBSS-BSA 中に, 一定数の細胞を添加することにより開始した。 β -Ep 放出実験では, Beckman microfuge を用いて細胞を分離後, 上清中に放出された β -END-LIS を測定した。また, cAMP accumulation の実験では 20% PCA を添加することにより反応を停止した。細胞内外の cAMP 測定は, Beckman Microfuge にてすみやかに細胞を分離後, 上清中に 20% PCA を添加した。

4) β -END-LIS の定量

Synthetic human β -endorphin を Hunter and Greenwood の方法¹³⁾ でヨード化をおこない, Sephadex

G-25 (medium; 0.9 x 18 cm) にて精製した。使用した β -Ep 抗血清は human β -LPH とは 4.5% の交叉反応を示したが、その他の peptides とは交叉しなかった。なお、測定方法の詳細は、Matsumura et al. の方法¹⁸⁾に従った。

5) cAMP の定量法

YAMASA cAMP assay kit を用いて Honma et al. の方法¹⁴⁾に従い sample を succinylation 後、測定を行なった。

6) 中葉細胞培養液の Gel-filtration

Incubation 終了後の medium を Sephadex G-50 (fine; 0.9 x 45 cm) を用いて、0.1% BSA を含む 0.1N 酢酸にてゲル濾過をおこない、1 ml ずつ分画採取し、凍結乾燥後 β -Ep 測定用 buffer に溶解し、sample 中に含まれる β -END-LIS を測定した。Calibration には ^{125}I -synthetic human β -endorphin, ^{125}I -human synthetic β -lipotropin (NIH)¹⁸⁾ および Na^{125}I を用いた。

7) 統計学的処理

β -END-LIS および cAMP の数値はすべて incubation 後、sample 中の値より、incubation 開始時に sample 中に含まれていた値 (0-min sample) を減じて平均値 $\pm$ 標準誤差 (S. E.) にて表現した。実験グループ間の有意差検定は Student t-test (two tailed) を用いた。

Table 1. Cell number and β -Ep release.

cells	β -END-LIS (ng/180 min)
1×10^4	2.67 ± 0.48
3×10^4	4.87 ± 0.41
5×10^4	6.60 ± 0.82

Fig. 1. Effect of cholera toxin on time course of β -Ep release.

成 績

1) 細胞数ならびに incubation time の検討

ラット下垂体中葉細胞からの β -END-LISの基礎放出は、細胞数の増加に伴って増加し (Table 1), また incubation time の経過とともに増加し、時間依存性であった (Figure 1.)。

2) β -END-LIS 放出に対する cholera toxin の効果

Cholera toxin は特異的な adenylate cyclase の活性化作用で知られているが、cholera toxin の β -END-LIS 放出に及ぼす効果は、(Figure 1.) に示すように、時間の経過とともに、 β -END-LIS 放出を増加させ、60分後には、 $P < 0.001$ で control に対して、有意な β -END-LIS 放出促進効果が認められた。さらに、(Figure 2) に示すように、180分間の incubation で cholera toxin と β -END-LIS 放出との間には、dose response relationship が観察され、maximal response は 1 nM の cholera toxin によってもたらされ EC_{50} は約 10 pM であり、強力な β -END-LIS 放出促進効果を有していることを示した。

Fig. 2. Effect of cholera toxin on β -Ep release and cAMP accumulation.

3) cAMP accumulation に及ぼす cholera toxin の効果

Cholera toxin の cAMP 蓄積に及ぼす効果をみると (Figure 2) に示すように、180分間の incubation で $10^{-12} \sim 10^{-9}$ M の濃度にて cholera toxin の濃度と cAMP 蓄積とのあいだには、dose dependent relationship が観察された。Cholera toxin による cAMP 蓄積の half maximal stimulation は約 20 pM であった。細胞数 3×10^4 個にて 180分までの incubation をおこない cholera toxin (3×10^{-8} M) 添加時の cAMP 蓄積量を control と比較すると、control は測定感度以下であるのに対して、cholera toxin (3×10^{-8} M) 添加群では、cAMP 蓄積量の経時的増加が認められた (Figure 3)。さらに、細胞数 5×10^4 個にて、cholera toxin (3×10^{-8} M) 存在下に細胞内・外の cAMP accumulation を観察すると (Figure 4) の如くなる。細胞外 cAMP は経時的に増加しつづけるのに対して、細胞内 cAMP の増加は 120分 で停止した。

Fig. 3. Effect of cholera toxin on time course of cAMP accumulation.

Fig. 4. Effect of cholera toxin on time course of cAMP accumulation.

Fig. 5. Effect of cholera toxin on short time course of β -Ep release and cAMP accumulation.

Fig. 6. Gel-filtration chromatography of β -END-LIS released into the incubation medium.

4) 短時間の incubation による β -END-LIS 放出と細胞内・外の cAMP 量の変動

細胞数 9×10^4 個にて30分までの incubation にて β -END-LIS 放出と細胞内・外 cAMP accumulation の総和ならびに細胞外 cAMP accumulation を control と cholera toxin (3×10^{-8} M) 存在下とで比較して (Figure 5) に示す。(Figure 5 A) に示すように, control では cAMP は 2 分後に peak を示す。それ以降の incubation においては, 測定感度近く値をとる。一方, (Figure 5 B) に示すように, cholera toxin (3×10^{-8} M) 存在下で, cAMP は経時的に増加し, 20 分後に有意差が認められた。

β -END-LIS 放出については, 30 分までの incubation にて control と cholera toxin 添加群とのあいだで有意差は認められない。

5) 下垂体中葉遊離細胞から放出される β -END-LIS の size heterogeneity の検討

Control medium および cholera toxin (3×10^{-8} M) 添加 medium を incubation 終了後、ただちに各々、 0.9×45 cm の Sephadex G-50 (fine) を用いる column chromatography をおこなうと (Figure 6) に示すように β -Ep の単一の peak が得られた。これは synthetic human β -endorphin と同一部位に溶出された。

考 案

下垂体中葉は複雑な細胞構成を有する前葉と異なり、単一な実質細胞より成る極めて有用性の高い組織であり、成績の分析において隘路が少なく。ラット下垂体における β -Ep 抗血清を用いた免疫組織学的手法で、前葉の corticotrophs ならびに中葉実質細胞のすべてに β -Ep が存在するが、後葉細胞には存在しないことが知られている³⁾。このため、ラット下垂体中・後葉を酵素処理して得られた遊離細胞を用いた我々の実験系における成績は、中葉細胞の機能を反映していると考えられる。さらに、Rossier et al.²⁰⁾ は中葉細胞の組織内 β -Ep 濃度は、前葉に比し高いことを報告している。

我々は、既に、下垂体中葉細胞に存在するとされる β -adrenoceptor, dopamine receptor に作用する薬物の β -Ep 放出に及ぼす効果について、cAMP の変動を含めて報告した¹⁰⁾。

ホルモン感受性 adenylate cyclase について、以下のモデルが提唱されている¹⁰⁾。細胞膜上にある受容体 (R: 下垂体中葉では β -adrenoceptor) への刺激は、GTP 結合制御蛋白 (Ns), さらに adenylate cyclase 触媒蛋白 (C) へと伝わる R-Ns-C の経路で cAMP 生成促進がおこると考えられている^{11) 23)}。下垂体中葉細胞においては、cAMP 生成促進系のみでなく、抑制効果を示す経路として、受容体 (R: dopamine receptor), 抑制系の GTP 結合制御蛋白 (Ni), adenylate cyclase 触媒蛋白 (C) の R-Ni-C の経路があるとされ、下垂体中葉細胞に存在する dopamine receptor は D_2 -type であるとされている¹⁰⁾。

Cholera toxin はその多彩な腸管外作用の面から注目を集めている物質であり、cholera toxin の intact cells に対する作用メカニズムについては、fibroblast を利用した詳細な報告がある¹³⁾。また、一方、adenylate cyclase に対する特異的な活性化機構により cAMP との関連から興味ある物質であり、cholera toxin は、直接 GTP 結合制御蛋白に作用して、adenylate cyclase 触媒蛋白を経て、adenylate cyclase を活性化し、cAMP 生成増加がおこるとされている^{2) 23)}。

下垂体中葉遊離細胞を用いる in vitro の系において、 β -adrenoceptor を刺激する l-isoproterenol や β_2 -stimulant である terbutaline sulfate により、細胞内 cAMP 蓄積が増加するとともに、 β -Ep 放出が増加した¹⁰⁾。さらに cAMP 蓄積と β -Ep 放出との関連を検討するために、cAMP analog や phosphodiesterase inhibitor を添加して incubation を行ない、 β -Ep 放出をみると、これらの薬剤によっても β -Ep 放出促進効果が認められた¹⁰⁾。cAMP の β -Ep 放出への関与をさらに検討するために、特異的な adenylate cyclase 活性化作用を有する cholera toxin を用いて、実験を行なった。

Cholera toxin は $10^{-12} \sim 3 \times 10^{-9}$ M の濃度で dose dependent に、cAMP 蓄積を増加させるとともに、 $10^{-12} \sim 10^{-9}$ M の濃度で dose dependent に β -END-LIS 放出促進効果を示し、その EC_{50} は約 10 pM であった (Figure 2)。すなわち、下垂体中葉細胞において、他の cAMP 蓄積作用をもつ薬剤と同様に cholera toxin は、 β -Ep 放出促進効果を示した。これは、下垂体中葉細胞からの β -Ep 放出機序に cAMP の変動が関与している可能性を支持するものであると考えられる。cAMP accumulation

についての短時間のincubationによる検討では(Figure 5)に示すように, 20分間でcontrolに比し, 有意な上昇を示した。これは1-isoproterenolによるcAMP生成増加が, 1分間のincubationで有意差を示すのに対して¹⁰⁾, time lagが認められる。ウシ副甲状腺を用いた実験系においてBrown et al.⁴⁾は120分間のincubationで $10^{-12} \sim 10^{-10}$ Mの濃度において, cAMP accumulationとcholera toxinの濃度とのあいだに, また, $10^{-12} \sim 10^{-9}$ Mの濃度においてparathyroid hormone(PTH)放出とcholera toxinの濃度とのあいだにdose response relationshipが認められること, さらにcAMP増加には50~60分のtime lagがあることを報告している。Cholera toxinによるcAMP accumulationにtime lagが存在するのは, cholera toxinのadenylate cyclase活性化様式によるものと考えられる⁹⁾。Cholera toxinはA, Bのsubunitより構成され, その作用は, まず, 細胞表面にあるGM₁ gangliosideと考えられるreceptorにB-subunitが結合することにより始まる⁸⁾⁹⁾。この過程においてtime lagが生ずると考えられる。

cAMP生成増加に続いておこる β -Ep放出までの時間的な差は, まだ, 解明されていない β -Epの放出機序における過程によるものと考えられ, さらに詳細に検討を進めている。

中葉細胞培養液のcolumn chromatography(Figure 6)ではcontrol mediumにおいてもcholera toxin添加mediumにおいても β -Epのsingle peakのみを示し, cholera toxinによって増加した β -END-LISは β -Ep自身であることを示唆している。

結 語

下垂体中葉遊離細胞を用いるin vitroの系においてCholera toxinは $10^{-12} \sim 10^{-9}$ Mの濃度で, dose dependentに β -Ep放出促進効果を示し, また, その際cAMPの著明な増加が認められた。他のcAMP増加作用をもたらす薬剤やcAMP analogと同様に, cholera toxinが β -Ep放出促進作用を示したことは, β -Ep放出機序にcAMPが, 重要な役割を有することを示唆するものである。さらに, cAMPの変動と β -Ep放出とのあいだの時間的關係についての詳細な検討は β -Ep放出様式の面ばかりでなく, cholera toxinの作用メカニズムの面からも興味を生起するものと考えられる。

本論文の要旨は第55回日本内分泌学会総会(1982年5月30日)において発表した。本研究の一部は文部省科学研究費(No. 58570693)によった。

文 献

- 1) Bäch, N., Hervonen, H. and Rechartdt, L.: Synthesis and storage of hormonal granules in cultured cells of the rat pituitary pars intermedia. *Acta Endocrinologica*, 101: 507–516, 1982.
- 2) Bennet, V., Mong, L. and Cuatrecasas, P.: Mechanism of activation of adenylate cyclase by *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J. Membrane Biol.*, 24: 107–129, 1975.
- 3) Bloom, F., Battenberg, E., Rossier, J., Ling, N., Leppaluoto, J., Vargo, T.M. and Guillemin, R.: Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland, not in the neurohypophysis. *Life Sciences*, 20: 43–48, 1977.
- 4) Brown, E.M., Gardner, D.G., Windeck, R.A. and Aurbach, G.D.: Cholera toxin stimulates 3', 5'-adenosine monophosphate accumulation and parathyroid hormone release from dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 104: 218–225, 1979.
- 5) Cote, T., Munemura, M., Eskay, R.L. and Kebabian, J.W. with the technical assistance

- of Long, R.: Biochemical identification of β -adrenoceptor and evidence for the involvement of an adenosine 3', 5'-monophosphate system in the β -adrenergically induced release of α -melanocyte-stimulating hormone in the intermediate lobe of the rat pituitary gland. *Endocrinology*, 107: 108–116, 1980.
- 6) Cote, T.E., Grewe, C.W., Tsuruta, K., Stoof, J.C., Eskay, R.L. and Kebabian, J.W.: D-2 dopamine receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase activity in the intermediate lobe of the rat pituitary gland requires guanosine 5'-triphosphate. *Endocrinology*, 110: 812–819, 1982.
- 7) Crine, P., Gianoulakis, C., Seidah, N.G., Gossard, F., Pezalla, P.D., Lis, M. and Chretien, M.: Biosynthesis of β -endorphin from β -lipotropin and a larger molecular weight precursor in rat pars intermedia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 4719–4723, 1978.
- 8) Cuatrecasas, P.: Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin. *Biochemistry*, 12: 3558–3566, 1973.
- 9) Fishman, P.H.: Mechanism of action of cholera toxin: Studies on lag period. *J. Membrane Biol.*, 54: 61–72, 1980.
- 10) Y. Furuki, Y. Hatada, M. Munemura, M. Maeyama and M. Matsumura: Involvement of Catecholamine and Adenosine 3', 5'-monophosphate on the release of beta-Endorphin-Like Immunoreactivity from dispersed Cells of the Intermediate Lobe of Rat Pituitary Gland: 7th Asia & Oceania Congress of Endocrinology, Abstract 192, 1982.
- 11) Gill, D.M.: Mechanism of action of cholera toxin. 85–118, Ed. by Greengard, P. and Robinson, G.A. *Advances in cyclic nucleotide research*, Vol. 8. Raven Press, 1977.
- 12) Grossman, A. and Rees, L.H.: The neuroendocrinology of opioid peptides. *British Medical Bulletin*, 39: 83–88, 1983.
- 13) Hollenberg, M.D. and Cuatrecasas, P.: Epidermal growth factor: Receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 2964–2968, 1973.
- 14) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. *Biochemical Medicine*, 18: 257–273, 1977.
- 15) Hunter, W.H. and Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194: 495–496, 1962.
- 16) Kebabian, J.W. and Calne, D.B.: Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277: 93–96, 1979.
- 17) Kimball, C.D., Chang, C.M., Huang, M.S. and Houck, J.C.: Immunoreactive endorphin peptides and prolactin in umbilical vein and maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 140: 157–164, 1981.
- 18) Matsumura, M., Yamanoi, A., Yamamoto, S. and Saito, S.: In vivo and in vitro effects of substance P on the release of β -endorphin-like immunoreactivity. *Neuroendocrinology*, 35: 163–168, 1982.
- 19) Munemura, M., Eskay, R.L. and Kebabian, J.W. with the technical assistance with Long, R.: Release of α -melanocyte-stimulating hormone from dispersed cells of the intermediate lobe of the rat pituitary gland: Involvement of catecholamines and adenosine 3', 5'-monophosphate. *Endocrinology*, 106: 1875–1883, 1980.
- 20) Nakai, Y., Nakao, K., Oki, S. and Imura, H.: Presence of immunoreactive β -lipotropin and β -endorphin in human placenta. *Life Sciences*, 23: 2013–2018, 1978.
- 21) Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Numa, S.: Nucleotide sequence of cloned cDNA for

bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature*, 278: 423–427, 1979.

22) Przewlocki, R., Holtt, V. and Herz, A.: Release of β -endorphin from rat pituitary in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 51: 179–183, 1978.

23) Rodbell, M.: The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*, 284: 17–22, 1980.

24) Rossier, J., Vargo, T.M., Minick, S., Ling, N., Bloom, F.E. and Guillemin, R.: Regional dissociation of β -endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5162–5165, 1977.

25) Simantov, R.: Basal and potassium stimulated, calcium dependent, endorphins release from pituitary cells. *Life Sciences*, 23: 2503–2508, 1978.

(受付日: 59. 2. 20)