膵腺房細胞 somatostatin 受容体特性に関する研究

—— 第一報 ——

C 端 octapeptide CCK, carbachol 前処理の somatostatin 結合抑制効果

神戸大学医学部内科学第2講座

坂 本 長 逸, 的 崎 尚
長 尾 宗 彦, 馬 場 茂 明

CCK and Carbachol Differently Modulate Somatostatin Binding to Rat Pancreatic Acinar Membranes

Choitsu SAKAMOTO, Takashi MATOSAKI,
Munehiko NAGAO and Shigeaki BABA

Second Department of Internal Medicine,
Kobe University School of Medicine

Somatostatin binding to its receptors on rat pancreatic acinar membranes was characterized with [^{125}I -Tyr 1] somatostatin. The COOH-terminal octapeptide of cholecystokinin (CCK $_8$), when present at various concentrations in the reaction mixture for the binding study, reduced labeled somatostatin binding in a dose-dependent manner, whereas carbachol or Ca^{2+} ionophore did not affect the binding. By contrast, when pancreatic acini were first treated with carbachol and thereafter [^{125}I -Tyr 1] somatostatin binding to membranes prepared from these acini was examined, carbachol reduced subsequent somatostatin binding in a dose-dependent manner. Scatchard analysis of the labeled somatostatin binding revealed that carbachol pretreatment decreased the maximum binding capacity from 142 ± 20 fmol/mg of membrane protein to 63.5 ± 3.5 fmol/mg of membrane protein without significantly affecting the binding affinity. To test for the possibility that CCK $_8$ also may affect labeled somatostatin binding through an intracellular process, pancreatic acini were first treated with CCK $_8$ and then the membrane bound CCK $_8$ was washed out. Subsequent labeled somatostatin binding to membranes from these acini was also decreased. When 1 mM EDTA was present in the pretreatment medium, the inhibitory effect of carbachol or CCK $_8$ was partially abolished, suggesting that an intracellular process to modulate somatostatin binding is dependent on Ca^{2+} . On the other hand, pretreatment of acini with Ca^{2+} ionophore almost failed to affect subsequent labeled somatostatin binding.

Results therefore suggest that 1) CCK $_8$ can modulate labeled somatostatin binding to pancreatic acinar membranes not only acting through an intracellular process but also at membrane sites and 2) carbachol- or CCK $_8$ -activated intracellular process to modulate somatostatin binding is dependent on Ca^{2+} , but Ca^{2+} mobilization itself is not sufficient to affect subsequent somatostatin binding.

緒 言

視床下部より単離された somatostatin は膵や胃においても内外分泌腺機能調節作用を有していることが明らかにされている^{2) 5) 10)}。すなわち膵・胃外分泌腺 cyclic AMP 含量に対して somatostatin は抑制的に作用するし⁴⁾, phosphoprotein phosphatase 活性は somatostatin によって増加することが報告されている¹⁰⁾。

しかしながら somatostatin がその受容体に結合したのちこれら細胞内刺激伝達系へのどのようにして抑制的にあるいは刺激的に関与するのかについては詳細な研究は未だなされていない。最近私達は膵腺房細胞細胞膜 somatostatin 受容体が Mr = 90 K の蛋白であることを明らかにし、これら細胞膜受容体への標識 somatostatin の結合が各種 somatostatin アナログによって競合的に抑制されるだけではなく、cholecystokinin (CCK) アナログによってもその生物活性に比例して抑制されることを明らかにした¹¹⁾。膜標品を用いた私達の結果とは異なり Esteve ら⁵⁾は膵腺房細胞に対する somatostatin の結合は CCK や carbamylcholine (carbachol) 等の刺激によって生じる膵腺房細胞細胞内 Ca^{2+} 移動によって抑制されると報告した。このように現在までのところ膵 somatostatin 受容体が外因性刺激に対してどのような制御を受けるかについての詳細は不明である。従って膵分泌刺激が膵腺房細胞 somatostatin 受容体への somatostatin 結合反応に影響を与える機序の一端を明らかにするために、膵分泌刺激物質にて一定時間膵腺房細胞を前処理したのちこれら膵腺房より単離した膜標品に対する標識 somatostatin の結合反応を検討した。私達はこの一連の実験において、CCK が膵腺房細胞細胞膜で直接 somatostatin 結合を抑制するだけではなく、 Ca^{2+} 依存性刺激伝達系を介しても somatostatin 結合を抑制するのに対して、carbachol は Ca^{2+} 依存性刺激伝達系を介してのみ somatostatin 結合に影響を与えることを明らかにした。

実 験 方 法

(I) 単離膵腺房の作製

Wistar 系雄性ラットを断頭屠殺後、Williams ら⁷⁾の方法に従い摘出された膵を 0.1 mg/ml collagenase (Worthington Chemicals, Freehold, NJ) を含む Krebs Henseleit bicarbonate buffer とともに 50 分間 incubation した。消化された膵組織を 4% bovine serum albumin (BSA, fraction V, Miles Laboratories, Elkhart, IN) を含む buffer 中に浮遊させ 100xg, 4 分間の遠心にて膵腺房小葉を単離した。次いで膵腺房小葉を 10 mM Hepes, 129 mM NaCl, 0.58 mM MgCl_2 , 11.1 mM glucose, MEM アミノ酸溶液, 5 mg/ml BSA 及び 0.2 mg/ml soybean trypsin inhibitor (Sigma chemicals, St. Louis, NO) からなる Hepes buffer (pH 7.4) 中で各種膵分泌刺激物質とともに 37°C, 120 分間前処理した。

(II) 膵腺房細胞細胞膜結合 CCK の除去

CCK, C 端 octapeptide (CCK_8) にて膵腺房小葉を前処理した際には、細胞膜結合 CCK_8 がひき続く somatostatin 結合反応を抑制するのを防ぐため、膵腺房を上記 buffer 中の Hepes に代わり 10 mM Tris を加えた Tris buffer (pH 7.8) にて 37°C 30 分間洗滌した。この操作を 3 回くり返し膜結合 CCK_8 を除去した。

標識 CCK の膵腺房細胞細胞膜への結合は pH 5.5 にて最大となり pH の増加とともに結合は低下すると報告されている¹⁴⁾。

(III) 膵腺房細胞細胞膜の単離と細胞膜に対する標識 somatostatin の結合反応

膜標品は基本的には膵分泌刺激物質にて前処理した膵腺房小葉より作製したが、実験によっては(図1の実験)膵腺房を何ら前処理することなく作製した。CCK₈にて前処理された膵腺房は先に記載したように充分洗滌のち膜標品を作製した。10mM Hepes, 1mM benzamidine (Nakarai Chemicals, Osaka, Japan) を含む0.3M Sucrose 中でテフロン・ガラス homogenizer を用いて膵腺房小葉を破碎し, TOMY SEIKO R-L-7000遠心機にて homogenate を 2000 r.p.m. まで遠心のち直ちに遠心機を停止させ, のち上清を 1000xg, 10分間遠心して pellet を粗膜標品とした⁹⁾。coomassie blue 蛋白測定用試薬 (Bio Rad, Richmond, CA) を用いて蛋白含量を測定のち, binding buffer (10mM Hepes, 120mM NaCl, 4.7mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 5 mg/ml BSA, 0.2 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 1.0mg/ml bacitracin) にて0.3mg/ml の濃度の膜蛋白浮遊液を作製した。Schonbrunn¹⁰⁾ らの方法に従い標識化した [¹²⁵I-Tyr¹] somatostatin 50pM を 0.3mg/ml の濃度の膜蛋白とともに binding buffer 中で 24℃, 60分間 incubation した。非特異的結合は 1 μM 非標識 somatostatin の存在下で測定し総結合より非特異的結合を差し引くことにより特異的結合を算出した。

結合及び遊離 [¹²⁵I-Tyr¹] somatostatin の分離は 10000xg, 1分間の遠心にて行ない, pellet の放射活性を γ-counter にて測定した。結果は 3 回の実験結果の mean ± SE あるいは mean にて表わした。

Fig. 1. Dose dependent inhibition of [¹²⁵I-Tyr¹]somatostatin binding to pancreatic acinar membranes.

Tyr¹-somatostatin, CCK₈, carbachol and Ca²⁺ionophore at the indicated concentrations were added to the reaction mixture for the binding study.

実験結果

1. CCK₈, carbachol, Ca²⁺ionophore A 23187 の somatostatin 結合に及ぼす効果

この実験に関してのみ無処置膵腺房より膵腺房細胞細胞膜を単離し, 標識 somatostatin との結合反応に及ぼす CCK₈, carbachol, Ca²⁺ionophore の効果を検討した。図 1 に示すように結合反応 med-

ium 中の CCK₈ は容量反応的に標識 somatostatin の結合を抑制したが, carbachol 及び Ca²⁺ ionophore はそれぞれ 10⁻⁵ M の濃度にても標識 somatostatin 結合反応にはまったく影響を与えなかった。

2. carbachol 前処理の somatostatin 結合に及ぼす効果

そこで次に各種濃度の carbachol にて 37°C 2 時間前処理した膵腺房より膜標品を作製し, 標識 somatostatin との結合反応を行なった。図 1 で示した実験とは異なり, 前処理された carbachol は濃度依存性に標識 somatostatin の結合反応を抑制し, 10⁻³ M carbachol にて図 2 に示すように最大抑制効果が観察された。

一方 Ca²⁺ ionophore A23187 前処理は 10⁻⁷ M までの濃度においてまったく抑制効果がなく, 非特異的に膜リン脂質の分解を刺激し, 内因性 diacylglycerol の形成を促進する濃度⁶⁾ 10⁻⁶ M にはじめてわずかに 10% の抑制が観察された。従って私達の実験ではこれ以上の濃度の Ca²⁺ ionophore は使用しなかった。

膜標品に対する somatostatin 結合を Scatchard 分析すると, 一側性の結合部位を示す対照の結合親和性 K_d = 0.33 ± 0.2 nM, 結合容量 capacity = 142 ± 20 fmol/mg 蛋白 (n = 6) に比し, 10⁻⁴ M carbachol 前処理では K_d には変化を認めず capacity が 63.5 ± 3.5 fmol/mg 蛋白 (n = 3) にまで減少した (図 3)。

Fig. 2. Dose dependent inhibition of [¹²⁵I-Tyr¹]somatostatin binding to acinar membranes by carbachol pretreatment.

Pancreatic acini were pretreated with carbachol or Ca²⁺ ionophore at the indicated concentrations. Thereafter [¹²⁵I-Tyr¹]somatostatin binding to membranes prepared from these acini was determined.

3. 1 mM EDTA の carbachol 前処理による somatostatin 結合抑制作用に及ぼす効果

carbachol の膵酵素分泌刺激作用は Ca²⁺ 依存性であることが知られている⁷⁾。そこで次に carbachol 前処理の somatostatin 結合に及ぼす効果が Ca²⁺ 依存性か否かを検討した。1 mM EDTA を carbachol 前処理 medium に同時に添加すると図 4 に示すように 10⁻⁴ M carbachol 前処理による somatostatin 結合抑制作用は有意に解除された。すなわち carbachol の膵腺房細胞細胞内過程を介した somatostatin 結合抑制作用は Ca²⁺ 依存性であることが示唆された。

Fig. 3. Competitive inhibition curve and scatchard analysis of $[^{125}\text{I-Tyr}^1]$ somatostatin binding after carbachol pretreatment.

Fig. 4. Effect of 1 mM EDTA on the inhibition of $[^{125}\text{I-Tyr}^1]$ somatostatin binding induced by carbachol.

Pancreatic acini were preincubated for 120 min in the absence (control) or presence of either 10^{-4} M carbachol or 10^{-4} M carbachol plus 1 mM EDTA.

4. CCK₈前処理と膵腺房細胞細胞膜結合 CCK₈除去の somatostatin 結合に及ぼす効果

CCK の膵酵素分泌刺激作用もまた Ca^{2+} 依存性であり, CCK も carbachol 同様細胞内過程を介して somatostatin 結合を抑制する可能性がある。そこで CCK₈ 10^{-7} M 及び CCK₈ 10^{-7} M と 1 mM EDTA を含む medium にて膵腺房を 2 時間前処理後, 細胞膜結合 CCK₈ の somatostatin 結合抑制作用を防ぐために, 実験方法に記載したように膵腺房小葉を充分洗滌した。これら膵腺房小葉より作製

した膜標品に対する標識 somatostatin 結合は図 5 に示すように 10^{-7} M CCK₈ 前処理にて対照の $42.4 \pm 4.1\%$ にまで抑制され、1 mM EDTA は CCK₈ 前処理による somatostatin 結合抑制作用を有意に解除した。これらの結果は膵腺房洗滌によって細胞膜結合 CCK₈ が有効に除去され、CCK₈ 前処理が膵腺房細胞細胞内過程を介しても somatostatin 結合を抑制しうること示している。又このようにして作製した膜標品に対する標識 somatostatin 結合を Scatchard 分析すると図 6 に示すように、carbachol 前処理同様に Kd に変化を認めず、capacity (71.5 ± 8.5 fmol/mg 蛋白, $n = 3$) の減少を認めた。

Fig. 5. Effect of CCK₈ pretreatment followed by washing bound CCK₈ on subsequent [¹²⁵I-Tyr¹]somatostatin binding.

Pancreatic acini were preincubated for 120 min in the absence (control) or presence of either 10^{-7} M CCK₈ or 10^{-7} M CCK₈ plus 1 mM EDTA and thereafter washed three times to dissociate the bound CCK₈.

Fig. 6. Competitive inhibition curve and Scatchard analysis of [¹²⁵I-Tyr¹]somatostatin binding after CCK₈ pretreatment and washing bound CCK₈.

考 案

CCKが膵臓細胞細胞膜に対する標識 somatostatin 結合を細胞膜 CCK 受容体を介し直接制御することは既に報告したが, 今回の実験結果によって CCK₈は更に膵臓細胞細胞内過程を介しても somatostatin 結合を抑制することが明らかとなった。一方 carbachol は CCK とは異なり膜標品においては somatostatin 結合に対して何ら直接作用はないが, 膵臓細胞とともに incubation することにより膵臓細胞細胞内過程を介して somatostatin 結合を抑制することが明らかとなった。これら CCK₈や carbachol によって刺激される細胞内過程は, CCK₈や carbachol 前処理による somatostatin 結合抑制作用が 1mM EDTA 同時処理により減弱することから Ca²⁺に依存していることが示唆される。又 CCK₈や carbachol によって活性化された細胞内過程を介する somatostatin 結合抑制作用は Scatchard 分析によると, ともに binding capacity の減少に基づくものであることから, これら Ca²⁺依存性の細胞内過程は同一のものである可能性がある。一方, Ca²⁺ionophore 前処理が somatostatin 結合にはほとんど影響を与えなかったことより, 細胞内 Ca²⁺移動のみでは somatostatin 結合の抑制には不十分であることも同時に明らかとなった。

CCKや carbachol は膵外分泌腺組織細胞膜のイノシトールリン脂質の代謝回転を促進し diacylglycerol を生成することが知られている¹⁰⁾。最近この diacylglycerol に代わり Ca²⁺, リン脂質依存性蛋白キナーゼ (C キナーゼ) を直接活性化するとされる phorbol ester, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)¹¹⁾ は単離膵臓細胞に対する somatostatin 結合を抑制することがフランスのグループにより報告された¹⁹⁾。私達も膵臓細胞 somatostatin 受容体特性に関する研究 (第2報) で明らかにするように TPA あるいは diacylglycerol の合成アナログによる前処理がひき続く膜標品に対する somatostatin 結合を抑制することから, 今回の検討で明らかとなった somatostatin 結合を抑制する Ca²⁺依存性細胞内過程は CCK₈あるいは carbachol によって活性化された C キナーゼそれ自身である可能性がある。

膵における somatostatin 結合反応と同様に下垂体腫瘍 GH₄C₁細胞においても thyrotropin releasing hormone (TRH) による前処理は, somatostatin 結合反応を有意に抑制することが明らかにされている¹³⁾。下垂体腫瘍細胞系では TRH が C キナーゼを活性化することが明らかにされており³⁾, TPA による GH₄C₁細胞前処理が somatostatin 結合を抑制することも報告されているため, 下垂体においても活性化された C キナーゼが somatostatin 結合を制御することが強く示唆される。somatostatin と TRH や CCK はそれぞれ GH 細胞系におけるホルモン分泌や膵外分泌腺からの酵素分泌に対しては逆の作用を有していることから, これら細胞系における異なった分泌刺激物質による somatostatin 結合の制御は下垂体細胞系や膵外分泌腺のペプチドホルモンによる制御という点において非常に重要な意味を有しているかもしれない。

結 語

ラット膵臓細胞細胞膜に対する標識 somatostatin の結合反応を検討し以下の結果を得た。

1. CCK₈は膵臓細胞細胞膜上で直接 somatostatin 結合を抑制すると同時に, 細胞内過程を介しても細胞膜に対する somatostatin 結合を抑制した。
2. carbachol は膵臓細胞細胞内過程を介してのみ細胞膜に対する somatostatin 結合を抑制した。
3. CCK₈や carbachol によって活性化され, somatostatin 結合を抑制する細胞内過程は Ca²⁺依存性である。

4. Ca^{2+} ionophore によって刺激される膵腺房細胞細胞内 Ca^{2+} 移動のみでは細胞膜に対する somatostatin 結合抑制作用は不完全である。

文 献

- 1) Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257: 7847–7851, 1982.
- 2) Chariot, J., Roze, C., Vaille, C. and Debray, C.: Effect of somatostatin on the external secretion of the pancreas of the rat. *Gastroenterology*, 75: 832–837, 1978.
- 3) Drust, D.S. and Martin, T.F.J.: Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates protein phosphorylation in GH_3 pituitary cells by a lipid-linked, protein kinase C-mediated pathway. *J. Biol. Chem.*, 259: 14520–14530, 1984.
- 4) Esteve, J.P., Vaysse, N., Susini, C., Kunsch, J.M., Fourmy, D., Pradayral, L., Wunsch, E., Moroder, L. and Ribet, A.: Bimodal regulation of pancreatic exocrine function in vitro by somatostatin 28. *Am. J. Physiol.*, 245: G208–G216, 1983.
- 5) Esteve, J.P., Susini, C., Vaysse, N., Antoniotti, H., Wunsch, E., Berthon, G. and Ribet, A.: Binding of somatostatin to pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.*, 247: G62–G69, 1984.
- 6) Kajikawa, N., Kaibuchi, K., Matsubara, T., Kikkawa, U., Takai, Y. and Nishizuka, Y.: A possible role of protein kinase C in signal-induced lysosomal enzyme release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116: 743–750, 1983.
- 7) Mathews, E.K., Petersen, O.H. and Williams, J.A.: Pancreatic acinar cells: acetylcholine-induced membrane depolarization, calcium efflux and amylase release. *J. Physiol. (London)*, 234: 689–701, 1973.
- 8) Osborne, R. and Tashjian, A.H. Jr.: Modulation of peptide binding to specific receptors on rat pituitary cells by tumor-promoting phorbol esters: decreased binding of thyrotropin-releasing hormone and somatostatin as well as epidermal growth factor. *Cancer Res.*, 42: 4375–4381, 1982.
- 9) Ponnappa, B.C., Dormer, R.N. and Williams, J.A.: Characterization of an ATP-dependent Ca^{2+} uptake system in mouse pancreatic microsomes. *Am. J. Physiol.*, 240: G122–G129, 1981.
- 10) Reyl, F. and Lewin, M.J.M.: Evidence of an intracellular somatostatin receptor in pancreas: A comparative study with reference to gastric mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109: 1324–1331, 1982.
- 11) Sakamoto, C., Goldfine, I.D. and Williams, J.A.: The somatostatin receptor on isolated pancreatic acinar cell plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 259: 9623–9627, 1984.
- 12) Schonbrunn, A. and Tashjian, A.H. Jr.: Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 253: 6473–6483, 1978.
- 13) Schonbrunn, A. and Tashjian, A.H. Jr.: Modulation of somatostatin receptors by thyrotropin-releasing hormone in a clonal pituitary cell strain. *J. Biol. Chem.*, 255: 190–198, 1980.
- 14) Steigerwalt, R.W. and Williams, J.A.: Characterization of cholecystokinin receptors on rat pancreatic membranes. *Endocrinology*, 109: 1746–1753, 1981.
- 15) Susini, C., Esteve, J.P., Bommelaer, G., Vaysse, N. and Ribet, A.: Inhibition of exocrine pancreatic secretion by somatostatin in dogs. *Digestion*, 18: 384–393, 1978.
- 16) Tennes,

K.A. and Roberts, M.L.: The role of calcium in agonist-stimulated hydrolysis of phosphatidylinositol in mouse pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, 719: 238–243, 1982.

17) Williams, J.A., Korc, M. and Dormer, R.N.: Action of secretagogues on a new-preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol.*, 235: E517–E524, 1978.

18) Wilson, R.M., Boden, G., Shore, L.S. and Essa-Koumar, N.: Effect of somatostatin on meal-stimulated pancreatic exocrine secretions in dogs. *Diabetes*, 26: 7–10, 1977.

19) Zeggari, M., Susini, C., Viguerie, N., Esteve, J.P., Uaysse, N. and Ribet, A.: Tumor promoter inhibition of cellular binding of somatostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 128: 850–857, 1985.

(受付日; '86. 1. 28)