Cholecystokinin の膵外分泌刺激作用における guanine nucleotide 制御蛋白質の役割に関する研究(第2報)

——コレラ毒素及び、百日咳毒素の効果——

神戸大学医学部第二内科学教室

的 崎 尚, 坂 本 長 逸, 長 尾 宗 彦
西 崎 朗, 誉 田 芳 孝, 馬 場 茂 明

Role of a Guanine Nucleotide Regulatory Protein
in Exocrine Pancreatic Secretion
— Effects of Cholera Toxin and Pertussis Toxin on Cholecystokinin Action —

**Takashi MATOZAKI, Choitsu SAKAMOTO, Munehiko NAGAO,
Hogara NISHISAKI, Yoshitaka KONDA and Shigeaki BABA**

Second Department of Internal Medicine,
Kobe University School of Medicine,
Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650, Japan

We have recently shown that F^- can mimic the actions of cholecystokinin (CCK) on amylase release, Ca^{2+} mobilization and inositol phosphate generation in pancreatic acinar cells. We have concluded, therefore, that pancreatic CCK receptors may be coupled to the activation of polyphosphoinositide hydrolysis by a guanine nucleotide regulatory protein (N protein), which seems to be sensitive to F^- . In the present study, in order to further characterize this N protein coupled to pancreatic CCK receptors, we have examined the effects of bacterial toxins, pertussis toxin (PT) and cholera toxin (CT) on both CCK- and NaF-induced cellular responses in isolated rat pancreatic acini. Neither PT or CT pretreatment of acini affected both CCK- and NaF-stimulated increases in intracellular Ca^{2+} concentration monitored by quin2. Furthermore, pretreatments of acini with PT and CT didn't alter the effects of CCK on inositol phosphate generation in acini. Similarly, NaF-induced inositol phosphate generation was not changed by these toxin treatments. However, pretreatment procedures employed in this study were considered to catalyze complete ADP-ribosylation of α -subunit of the stimulatory (N_s) and inhibitory (N_i) N protein. These results, therefore, strongly suggest that a N protein coupling pancreatic CCK receptors to the breakdown of polyphosphoinositide may be distinct from N_s or N_i like protein.

結 言

私達は、既に、本研究第一報⁷⁾において、

1) ラット膵腺房細胞膜に対する標識 cholecystokinin (CCK) 結合反応は、guanine nucleotide analog により特徴的に制御を受けること。2) 刺激性 guanine nucleotide regulatory protein (Ns) 及び、抑制性 guanine nucleotide regulatory protein (Ni) を直接活性化することが知られる $^{23}\text{F}^-$ は、膵腺房細胞に対し、CCK 類似の作用を有し、PI 代謝回転の活性化の結果、誘導される細胞内 Ca^{2+} 移動を介して膵腺房小葉からのアミラーゼ放出を刺激すること。3) ^3H -inositol 標識膵腺房細胞膜を用いた cell-free 系において CCK の inositol phosphates 生成に及ぼす効果が、GTP の存在下で相乗的に増強されることを明らかにした。即ち、膵腺房細胞 CCK 受容体は guanine nucleotide regulatory protein (N 蛋白) に関連し、CCK・受容体 complex は、この N 蛋白を介して細胞膜イノシトールリン脂質 (PI) 代謝回転とそれに引き続く細胞内情報伝達系を活性化する可能性を示した。最近、他の細胞系においても、同様に受容体刺激の PI 代謝回転の活性化には、N 蛋白が機能していることを示す成績が報告されており、さらに、これら一部の N 蛋白は、Ni それ自身であることが示唆されている⁴⁾。そこで、今回は、この F^- により刺激され、膵 CCK 受容体と PI 代謝回転の活性化に共役する N 蛋白の性質を、更に明らかにする目的で、従来より Ns 及び、Ni をそれぞれ特異的に修飾することが知られているコレラ毒素 (cholera toxin, CT)²⁾ 及び、百日咳毒素 (pertussis toxin, PT)²⁾ を用い、これら毒素によるラット膵腺房小葉の前処理が、CCK や F^- により惹起される PI 代謝回転や細胞内 Ca^{2+} 移動に与える効果を検討した。

実 験 方 法

1. 単離膵腺房小葉の作製と CT 及び PT による前処理

ラット単離膵腺房小葉は、Williamsらの方法¹³⁾に従い、Wistar 系雄性ラット膵より精製コラゲナーゼを用い作製した。これを 10mM Hepes, 129mM NaCl, 0.58mM MgCl_2 , 1 mM Na_2HPO_4 , 4.7mM KCl, 1.28mM CaCl_2 , 11.1mM glucose, essential amino acid solution, 5 mg/ml bovine serum albumin (fraction v) (Miles Laboratories, Elkhart, IN), 及び、0.1mg/ml soybean trypsin inhibitor (Type 1-S, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) よりなる Hepes buffered Ringer 液 (HR buffer) に浮遊させ、各実験に供した。CT (Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo) による膵腺房小葉の前処理は、 $10\mu\text{g/ml}$ CT を含む HR buffer 中にて 100% O_2 通気下で膵腺房小葉を 37°C で 4 時間、incubate することにより行なった。又、 $50\mu\text{g}$ の PT (科研製薬) をラット腹腔内投与したのち 72 時間で作製した膵腺房小葉を、PT 前処理膵腺房小葉として用いた。

2. 膵腺房細胞内 free Ca^{2+} 濃度測定

膵腺房細胞の細胞内 free Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定は、Tsien の方法¹¹⁾に準じて行なった。即ち、CT 前処理膵腺房小葉は、前処理終了前の 30 分間に $50\mu\text{M}$ quin 2 /AM (ドータイ社) と共に incubate することにより、quin 2 を負荷した。又、PT 前処理膵腺房小葉は、膵腺房小葉作製後、同様に $50\mu\text{M}$ quin 2 /AM と共に 37°C で、30 分間 incubate した。これらの quin 2 負荷膵腺房小葉の浮遊液 2 ml を持続的に攪拌しつつ、蛍光分光光度計 (日立社製/model 1650-60) を用い、励起波長 339nm、蛍光波長 492nm の条件下で quin 2・ Ca^{2+} complex の特異的蛍光波長を測定した。

3. 単離膵腺房小葉における PI 代謝回転の測定

CT 前処理及び対象膵腺房小葉を用いる実験においては、前処理の後半 2 時間に、 $25\mu\text{Ci/ml}$ myo

- [2- ^3H] inositol (^3H -inositol) (Amersham 社) を添加し、膵腺房小葉を標識した。又、PT 前処理及び対照膵腺房小葉は、膵の collagenase 消化の後半40分間に $100\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -inositol を添加することにより標識した。これら ^3H -inositol 標識膵腺房小葉を、 10mM LiCl (半井化学) を含む HR buffer 中で各種濃度の CCK-octapeptide (CCK 8) (Squibb 社) 及び NaF (半井化学) と共に 37°C で一定時間反応させた後、 1.88ml の chloroform/metanol/HCl (1 : 2 : 0.02, v/v) を添加し、反応を停止させた。この後、Berridge の方法⁹⁾に準じ sample 中に含まれる inositol monophosphate (I P_1)、inositol bisphosphate (I P_2)、inositol trisphosphate (I P_3) を各々分離し、各 fraction 中に含まれる放射活性を液体 scintillation counter にて測定した。結果は、3 回の実験結果を、 $\text{mean} \pm \text{S. E.}$ で表した。

4. CT 及び PT による膵腺房細胞膜蛋白の ADP リボシル化反応

対照の膵腺房小葉、及び CT, PT により前処理された膵腺房小葉より、既報⁹⁾のごとく、膵腺房細胞膜を作製した。得られた $100\mu\text{g}$ の膜蛋白を既報¹⁰⁾に準じ、 10mM thymidine (Sigma chemical), 1mM MgCl_2 , 1mM adenosine trisphosphate (Sigma chemical) を含む $50\mu\text{l}$ の 100mM Tris buffer 中で、 $10\mu\text{M}$ [^{32}P] Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) ($26\text{Ci}/\text{mmol}$) (New England Nuclear 社) 及び、あらかじめ活性化された $100\mu\text{g}/\text{ml}$ PT あるいは CT と共に 30°C で30分間反応させた。CT 及び PT の活性化は 100mM Tris buffer (pH7.4) 中で CT を 20mM dithiothreitol (DTT) と 37°C で10分間、又、PT を 50mM DTT と 25°C で1時間反応させることにより行なった。又、CT による ADP リボシル化反応には、反応液中に $100\mu\text{M}$ GTP をも添加した。反応は、氷冷した $500\mu\text{l}$ の 100mM Tris buffer (pH7.4) を反応液中に添加し、これを、 $10000 \times g$ で3分間遠心することで停止させた。得られた pellet は 4.6% sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む 62.5mM Tris HCl (pH6.8) 中で可溶化された標識膜蛋白の解析は、SDS スラブ電気泳動法で行ない、乾燥ゲルより autoradiogram を得た。

実験結果

対照膵腺房小葉において、静止時 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $180 \pm 24\text{nM}$ ($\text{mean} \pm \text{S. E.}$, $n=10$) であったが、 10^{-9}M CCK 8はこれを、 $728 \pm 32\text{nM}$ ($\text{mean} \pm \text{S. E.}$, $n=4$) へと $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を急速に増加させた。

Fig. 1. Effects of pretreatments with CT and PT on CCK8- or NaF-stimulated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of isolated pancreatic acini.

The addition of 10^{-9}M CCK8(A) or 10mM NaF(B) was indicated by the arrow. CT; cholera toxin, PT; pertussis toxin

一方, IAP 及び CT により前処理された膵腺房小葉においても, この CCK の $[Ca^{2+}]_i$ への効果は有意に変化しなかった (Fig. 1 A)。既に本研究第1報⁷⁾で明らかにしたように, 10mM NaF は quin 2 負荷対照膵腺房小葉において $[Ca^{2+}]_i$ を増加させたが, PT 及び CT による膵腺房小葉の前処理は NaF による細胞内 Ca^{2+} 移動に対しても何ら効果を有しなかった (Fig. 1 B)。次に, CCK 8 及び NaF の PI 代謝回転に与える効果を検討した。³H-inositol 標識対照膵腺房小葉を各種濃度 CCK 8 と共に90秒間反応させると $10^{-11}M$ 以上の濃度で, 添加 CCK 8 濃度依存性に inositol phosphates 形成が刺激された (Fig. 2)。この CCK 8 の効果は, PT 及び CT 処理膵腺房小葉においても変化しなかった (Fig. 2)。

各種濃度 NaF と共に対照 ³H-inositol 標識膵腺房小葉を3分間反応させると, 5 mM 以上の濃度で, 濃度依存性に inositol phosphates 形成が刺激されたが, この NaF の効果も CT や PT による膵腺房小葉の前処理によっては, 有意の変化を受けなかった (Fig. 3)。

そこで, 次に, 今回用いた CT 及び PT による膵腺房小葉の前処理が膵腺房細胞膜の Ns 及び Ni に充分作用しているか否かを検討した。CT 及び PT は Ns 及び Ni の α -subunit を特異的に ADP-リボシル化することが知られている²⁾が, 対照膵腺房細胞細胞膜を ³²P-NAD の存在下で充分量の CT (Fig. 3 lane 1) 及び PT (Fig. 3 lane 2) と共に反応させ, 標識膜蛋白を SDS 電気泳動法にて解析すると, Ns 及び Ni の α subunit と思われる45K (Fig. 3 lane 1) 及び41K のバンドが観察された (Fig. 3 lane 2)。一方, CT (lane 3) 及び PT (lane 4) 前処理膵腺房細胞膜を用いて同様に充分量の CT 及び PT の存在下で ADP-リボシル化反応を検討しても, これら toxin 前処理細胞膜においては45K (lane 3) 及び41K (lane 4) バンドの出現は観察されなかった。

Fig. 2. Effects of pretreatments with CT and PT on CCK8-stimulated inositol phosphate generation in acini.

Each value expressed as the radioactivity of IP_2 plus IP_3 formed during incubation is the mean $\pm$ S.E. for three separate experiments. CT; cholera toxin, PT; pertussis toxin

Fig. 3. Effects of pretreatments with CT and PT on NaF-stimulated inositol phosphate generation in acini.

Each value expressed as the radioactivity of IP_2 plus IP_3 formed during incubation is the mean $\pm$ S.E. for three separate experiments. CT; cholera toxin, PT; pertussis toxin

考 案

CTは、Nsの α subunitをADP-リボシル化することによりNsを持続的に活性化することが明かにされている²⁾。一方、PTは、Niの α subunitをADP-リボシル化することにより受容体とNiとの関連を失活させることが知られている²⁾。そして、近年、種々のホルモンや神経伝達物質刺激による刺激応答に関連し、NsやNiが機能しているか否かを、明らかにする目的で、これら毒素による細胞の処理が有力な実験手段として用いられつつある²⁾。今回の研究において、我々は、CT及びPTによる膵腺房小葉の前処理は、CCKにより刺激される細胞内 Ca^{2+} 移動や、PI代謝回転に有意の効果を与えないことを明らかにした。一方、両毒素前処理膵腺房細胞膜を ^{32}P -NADの存在下で、充分量のCT、PTと共に反応させると、Nsの α subunit及び、Niの α subunitと思われる²⁾45K、41Kのバンドは対照細胞膜を用いた場合とは異なり、まったく観察されないことから、今回用いた両毒素前処理はその前処理の過程で、充分膵腺房細胞膜のNs及び、NiをADP-リボシル化しているものと思われた。即ち、以上の結果は膵CCK受容体に関連し、PI代謝回転を刺激するN蛋白はNs及びNiとは異なるN蛋白である可能性を強く示唆している。最近、Merrittらも、permeabilized膵腺房小葉においてGTP analogやcaeruleinによって刺激されるinositol phosphates生成はCTやPTによる膵腺房小葉の前処理によってもななら影響を受けないことを報告しており⁸⁾、今回の我々の実験結果とよく一致した。さらに、我々は、本研究においてCCK同様、 F^- により刺激される細胞内 Ca^{2+} 移動や、PI代謝回転もCT及び、PTによる膵腺房小葉の前処理には非感受性

であることを示した。この結果は、我々が、既に本研究第一報で明らかにした、膵腺房細胞において、F⁻によって刺激され、PI代謝回転の活性化に連関するN蛋白が、膵CCK受容体に連関するN蛋白それ自身であることをさらに支持するものであると考えられる。

N蛋白は、従来、知られているadenylate cyclase活性制御に関与するのみならず、最近では、我々が膵腺房細胞において明らかにしたように、PI代謝回転の活性化⁴⁾や、他の細胞系においては、イオンchannelの制御³⁾、又、アラキドン酸生成刺激への関与⁹⁾等、種々の細胞刺激応答反応に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。さらに、これらの生物学的反応に機能するN蛋白の一部は、PT感受性のN蛋白、即ちNiと同一の性質を有するN蛋白であることが示唆されている。一方、肝細胞のvasopressin受容体¹²⁾やGH₃下垂体細胞のTRH受容体⁸⁾に連関し、PI代謝回転を制御するN蛋白は、今回、我々が明らかにした膵CCK受容体に連関すると想定されるN蛋白同様、CTやPTには非感受性あることが報告されており、今後、これらNsやNiとは異なるN蛋白の同定及び、精製が必要であると思われる。

Fig. 4. CT and PT catalyzed ADP-ribosylation in membranes from control and toxin-treated acini.

Acini were pretreated with CT(lane 2), PT(lane 4) or toxin's vehicle(lane 1,3). Membranes prepared from each batch of acini were incubated with 10 μ M [³²P] NAD in the absence(lane 5) or presence of 100 μ g/ml preactivated CT(lane 1,3) and PT(lane 2,4) for 30 min at 30°C. CT; cholera toxin, PT; pertussis toxin

結 語

ラット単離膵腺房小葉において、CT及びPTを用いた前処理が、CCK及びNaF刺激の細胞内Ca²⁺移動、PI代謝回転に及ぼす効果を検討し以下の結果を得た。

- 1) CCK の $[Ca^{2+}]_i$ への効果及び, inositol phosphates 生成への効果は, CT 及び PT による膵腺房小葉の前処理によっては影響を受けなかった。
- 2) NaF の細胞内 Ca^{2+} 移動と inositol phosphate 生成への効果も, CT 及び PT による膵腺房小葉の前処理によっては影響を受けなかった。
- 3) 用いた膵腺房小葉の前処理は, 膵腺房細胞膜の Ns 及び Ni の α -subunit を充分, ADP-リボシル化しているものと思われた。

以上の結果より, 膵 CCK 受容体に関連し, PI 代謝回転の活性化を制御する N 蛋白は, F⁻感受性であるが, Ns や Ni とは異なる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Berridge, M.J.: Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem. J.*, 212: 849–858, 1983.
 - 2) Gilman, A.G.: G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, 36: 577–579, 1984.
 - 3) Holz IV, G.G., Rane, S.G. and Dunlop, K.: GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature*, 319: 670–672, 1986.
 - 4) Litosch, I.: Regulatory GTP-binding proteins: emerging concepts on their role in cell function. *Life Sci.*, 41: 251–258, 1987.
 - 5) Martin, T.F.J., Bajjalieh, S.M., Lucas, D.O. and Kowalchuk, J.A.: Thyrotropin-releasing hormone stimulation of polyphosphoinositide hydrolysis in GH₃ cell membranes is GTP dependent but insensitive to cholera or pertussis toxin. *J. Biol. Chem.*, 261: 10041–10049, 1986.
 - 6) Matozaki, T., Sakamoto, C., Nagao, M. and Baba, S.: Phorbol ester or diacylglycerol modulates somatostatin binding to its receptors on rat pancreatic acinar membranes. *J. Biol. Chem.*, 261: 1414–1420, 1986.
 - 7) 的崎 尚: Cholecystokinin の膵外分泌作用における guanine nucleotide 制御蛋白質の役割に関する研究. *日内分泌会誌*, 64: 1051–1064, 1988.
 - 8) Merritt, J.E., Taylor, C.W., Rubin, R.P. and Putney, J.W., Jr.: Evidence suggesting that a novel guanine nucleotide regulatory protein couples receptors to phospholipase C in exocrine pancreas. *Biochem. J.*, 236: 337–343, 1986.
 - 9) Nakamura, T. and Ui, M.: Simultaneous inhibition of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin. *J. Biol. Chem.*, 260: 3584–3593, 1985.
 - 10) Sakamoto, C., Matozaki, T., Nagao, M. and Baba, S.: Coupling of guanine nucleotide inhibitory protein to somatostatin receptors on pancreatic acinar membranes. *Am. J. Physiol.*, 253: G308–314, 1987.
 - 11) Tsien, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J.: Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytosolic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescence indicator. *J. Cell Biol.*, 94: 325–334, 1982.
 - 12) Uhing, R.J., Prpic, V., Jiang, H. and Exton, J.H.: Hormone-stimulated polyphosphoinositide breakdown in rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 261: 2140–2146, 1986.
 - 13) 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: E517–524, 1978.
- (受付日: '88. 3. 1)