Involvement of GTP-binding Proteins in Activation of Cathepsin B by Bradykinin in Fibroblasts of the Tooth Pulp

Bo-Fan Zhu, Teruo Kudo, Sadaaki Maeda and Reizo Inoki

Department of Pharmacology, Osaka University Faculty of Dentistry, Suita, Japan

(Received 27 September, accepted 27 November 1991)

Abstract

The aim of this study is to investigate the mechanism of activation of cathepsin B in cultured fibroblasts of the rat dental pulp with bradykinin (BK) and the cleavage products, des-Arg⁹-BK or L-arginine (L-Arg). The activation of cathepsin B by BK or des-Arg⁹-BK in the fibroblasts was inhibited by des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, a B₁-receptor antagonist, but not by Leu-Arg, a kyotorphin antagonist. The enhanced activity of cathepsin B by L-Arg was markedly inhibited by Leu-Arg, but not by des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK. The effect of BK or des-Arg⁹-BK was inhibited by pretreatment of the cells with pertussis toxin, islet-activating protein (IAP), but IAP did not have any influence on the effect of L-Arg. These results suggest that the activation of cathepsin B by BK or des-Arg⁹-BK in the fibroblasts may be mediated through GTP-binding protein(s) coupled to B₁-receptor, while the activation of cathepsin B by L-Arg may be mediated through a production of kyotorphin.

Key Words: cathepsin B, bradykinin, IAP, fibroblast, dental pulp

歯髄線維芽細胞における bradykinin による cathepsin B 活性化に対する GTP 結合タンパク質の関与

朱 伯範 工藤 照夫 前田 定秋 猪木 令三

大阪大学歯学部 薬理学教室

はじめに

歯髄組織に enkephalin (EK) および EK 前駆体タンパクが存在し、歯髄組織が侵害刺激を受けたとき、

歯髄中の EK 含量が増大することを我々はすでに報告してきた¹⁻³⁾。この EK 含量の増加、すなわち、EK の産生増大は、侵害刺激により歯髄中に産生された bradykinin (BK) により歯髄組織中の EK 産生酵素

が活性化され、EK 前駆体タンパクから EK が産生されたことによることが、これまでの *in vivo* および *in vitro* でのラット切歯歯髓組織を用いた実験から筆者らによって報告されてきた⁴⁻⁷⁾。その後、歯髓組織における EK 産生酵素は、歯髓細胞のライソソームに存在する cysteine proteinase である cathepsin B であること、さらにこの cathepsin B は BK によって活性化されることが証明された⁸⁻¹³⁾。また、BK による cathepsin B の活性化機序については、歯髓組織を用いた *in vitro* での実験により BK の B₁ 受容体を介しており¹⁰⁻¹³⁾、Ca²⁺ が必須因子であることが示されてきた^{7,10,12)}。最近、筆者らは歯髓組織の EK および EK 前駆体タンパクを含有する細胞が線維芽細胞であることを示し、この培養歯髓線維芽細胞を用いて、BK による cathepsin B の活性化、およびこの活性化が細胞内 Ca²⁺ に依存することを明らかにした¹⁴⁾。

本研究では、ラット切歯の培養歯髓線維芽細胞を用いて、BK およびその carboxypeptidase B による分解産物である des-Arg⁹-BK と L-arginine (L-Arg) の cathepsin B 活性化機序について GTP 結合タンパク質と細胞内情報伝達機構との関連においてさらに比較検討を加え、cathepsin B 活性化の作用機序がそれぞれ異なることを明らかにしたので報告する。

材料および方法

1. 細胞培養

Sprague-Dawley 系の雄性ラット (体重 200 ~ 250g) の上、下顎切歯歯髓を、無菌的に摘出し、penicillin (200 IU/ml), streptomycin (200 mg/ml) を含む phosphate-buffered saline (PBS) で数回洗浄し、細切した後、酵素 (0.5% trypsin, 0.02% EDTA) 処理により細胞を採取した。細胞を直径 35 mm のシャーレにまき、10% calf serum, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml) を含む Eagle's MEM 培地中 37°C, 5% CO₂ 気相下で培養を行った。培地は 1 日おきに交換し、細胞の増殖が confluent になった後、実験に供した。

2. 薬物処理

Islet-activating protein (IAP, pertussis toxin) による前処置は IAP を 10 ng/ml の濃度で培地に加え、37°C, 18 時間インキュベートを行った。細胞の薬物処理は、シャーレ中の培地を吸引除去した後、各薬物を含む Hanks 液 (pH 7.4) を 0.8 ml を加え、37°C, 一定時間インキュベートした。インキュベート終了後、Hanks 液を吸引除去し、氷冷した蒸留水 0.8 ml を加えて凍結融解操作を行い、得られた懸濁液の cathepsin B 活性を測定した。

3. Cathepsin B 活性の測定

先に報告したように¹⁴⁾、Barrett および Kirschke の方法¹⁵⁾に従い、リン酸緩衝液中 (pH 6.0) にて cathepsin B の特異的基質 carbobenzoxy-L-arginyl-L-arginine-4-methyl-coumaryl-7-amide (Z-Arg-Arg-MCA) (100 μM) 0.1 ml と 2. で得られた細胞懸濁液 0.1 ml とを 37°C で 30 分間インキュベートし、その後、反応停止液 (100 mM sodium monochloroacetate, 30 mM sodium acetate, 70 mM acetic acid, pH 4.3) の添加によって反応を停止させた。産生された 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC) を λ_{ex} = 370 nm, λ_{em} = 440 nm により蛍光測光した。数値は AMC p mole/min/dish として mean ± SEM で表した。有意差の検定は Student's t-test あるいは Mann-Whitney の U-test で行った。

結果および考察

1. BK, des-Arg⁹-BK および Arg の歯髓線維芽細胞における cathepsin B 活性増強作用に対する des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK あるいは Leu-Arg の影響

BK (10 μM), des-Arg⁹-BK (10 μM) および L-Arg (10 μM) による培養歯髓線維芽細胞の cathepsin B 活性化に対する BK の B₁ 受容体の antagonist である des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (10 μM), あるいは中枢神経系において kyotorphin の antagonist と考えられている Leucyl-L-arginine (Leu-Arg) (10 μM) の影響を検討した。Table 1 に示したように、BK, des-Arg⁹-BK の歯髓線維芽細胞における cathepsin B 活

Table 1 Influences of des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK and Leu-Arg on enhancement of cathepsin B activity in the fibroblasts induced by BK, des-Arg⁹-BK and L-Arg

agents		activity of cathepsin B in the fibroblasts (AMC p mole/min/dish)			
		none	BK 10 μ M	des-Arg ⁹ -BK 10 μ M	L-Arg 10 μ M
control		10.2 $\pm$ 0.9 (5)	22.7 $\pm$ 1.1 (5)**	25.4 $\pm$ 2.6 (6)**	18.4 $\pm$ 2.2 (5)**
des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK	10 μ M	9.1 $\pm$ 0.4 (6)	10.0 $\pm$ 0.4 (6)	9.3 $\pm$ 0.5 (6)	18.1 $\pm$ 0.5 (6)**
Leu-Arg	10 μ M	11.4 $\pm$ 1.2 (5)	16.6 $\pm$ 0.6 (5)*	27.0 $\pm$ 2.1 (6)**	6.8 $\pm$ 0.9 (5)*

Cultured fibroblasts of the rat dental pulp were incubated with BK, des-Arg⁹-BK or L-Arg in the presence of des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK or Leu-Arg in Hanks solution (pH 7.4) at 37°C for 30 min, and then the cells and medium were separated. The cells which were placed in cold water and frozen were incubated with Z-Arg-Arg-MCA in phosphate buffer (pH 6.0) at 37°C for 30 min. After incubation, the produced 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC) as cathepsin B activity in the cells was fluorospectrophotometrically (λ_{ex} =370 nm, λ_{em} =440 nm) determined as described in "Materials and Method". That in the medium was also determined, but the data was not shown in this table as cathepsin B activity in the medium did not changed in all experimental groups. Values represent the mean $\pm$ SEM (n), *p<0.05 and **p<0.01, in comparison with "none", respectively.

性増強作用はいずれも des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK によって有意に抑制された。しかし、L-Arg の作用に対しては、BK, des-Arg⁹-BK の場合とは異なり、抑制効果を示さなかった。これらの結果は BK および des-Arg⁹-BK の cathepsin B 活性化作用が BK の B₁ 受容体を介していることを示唆している。また、このことは、先に報告した歯髄線維芽細胞における des-Arg⁹-BK による EK の産生促進作用が BK の B₁ 受容体を介しているという結果¹⁴⁾ をさらに支持するものである。最近、L-Arg が鎮痛作用を有することが報告され、その作用機序としては中枢神経系において L-Arg が神経細胞に取り込まれて、EK-releaser である kyotorphin (Tyrosyl-L-arginine) が合成され、EK を遊離放出することによって考えられている¹⁶⁾。筆者らは、kyotorphin を歯髄組織に作用させたとき、BK と同様に歯髄組織の EK の産生遊離が著明に増強されることを認め、報告している¹⁷⁾。本研究では L-Arg の歯髄 cathepsin B 活性化作用が kyotorphin を介するかどうかを検討するため、kyotorphin の antagonist とされる Leu-Arg を用い、BK, des-Arg⁹-BK および L-Arg の歯髄 cathepsin B 活性増強作用に対する影響を比較検討した。Table 1 に示したように、BK の作用は部分的に Leu-Arg によって抑制され、des-Arg⁹-BK の作用は Leu-Arg によってはまったく影響されなかった。しかし、

L-Arg の作用は Leu-Arg によって著明に抑制された。これらの結果は BK および L-Arg が細胞内において kyotorphin を産生し、これが kyotorphin 受容体を介して作用することを示唆している。

2. 歯髄線維芽細胞における BK, des-Arg⁹-BK および L-Arg による cathepsin B 活性増強作用に対する IAP の影響

GTP 結合性タンパク質 (G タンパク質) を不活性化化する IAP (10 ng/ml) を培養歯髄線維芽細胞に 18 時間作用させ、歯髄線維芽細胞における BK (10 μ M), des-Arg⁹-BK (10 μ M), および L-Arg (10 μ M) による cathepsin B 活性増強作用に対する影響を検討した。Table 2 に示すように、BK, des-Arg⁹-BK の細胞内 cathepsin B 活性増強作用は IAP の前処置によっていずれも著しく抑制されたが、L-Arg のこの増強作用は阻害されなかった。このことは BK および des-Arg⁹-BK が BK の B₁ 受容体と結合し、IAP 感受性 G タンパク質を介して作用していることを示唆している。

以上の結果から、BK の歯髄線維芽細胞における cathepsin B 活性化作用は、細胞に適用した BK が des-Arg⁹-BK と L-Arg に酵素的に分解され、その分解産物 des-Arg⁹-BK と L-Arg とがそれぞれ独自の機序により歯髄線維芽細胞の cathepsin B を活性化するものと考えられた。すなわち、BK の作用は一部

Table 2 Inhibition by IAP of enhancement of cathepsin B activity in the fibroblasts induced by BK, des-Arg⁹-BK and L-Arg

agents		activity of cathepsin B in the fibroblasts (AMC p mole/min/dish)			
		none	BK 10 μ M	des-Arg ⁹ -BK 10 μ M	L-Arg 10 μ M
control		16.4 $\pm$ 1.2 (6)	26.6 $\pm$ 1.2 (6)**	29.4 $\pm$ 1.5 (6)**	27.1 $\pm$ 2.0 (6)**
IAP	10 ng/ml	10.6 $\pm$ 0.7 (6)	10.1 $\pm$ 1.0 (6)	6.3 $\pm$ 0.7 (6)*	18.6 $\pm$ 1.5 (6)**

Cultured fibroblasts of the rat dental pulp were pretreated with IAP in cultured medium at 37°C for 18h, and then the pretreated cells were incubated with BK, des-Arg⁹-BK or L-Arg and Z-Arg-Arg-MCA. After incubation, cathepsin B activity in the cells was determined as described in Table 1. Values represent the mean $\pm$ SEM(n),

*p<0.05 and **p<0.01, in comparison with "none", respectively.

des-Arg⁹-BK と同様に B₁ 受容体を介し G タンパク質とカップリングして、最終的に cathepsin B の活性化に至るものと考えられた。一方、L-Arg は B₁ 受容体を介さず、kyotorphin の産生、さらに kyotorphin 受容体を介して cathepsin B の活性化を起こしている可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金（一般研究 B No. 01480432）の助成によって行われた。

文 献

- 1) Kudo, T., Chang, H.-L., Maeda, S., Uchida, Y., Nakamae, J. and Inoki, R., Changes of the met-enkephalin-like peptide content induced by noxious stimulation in the rat incisor pulp, *Life Sci.*, **33** (sup. 1) (1983) 677-680.
- 2) Kudo, T., Maeda, S. and Inoki, R., Opioid peptides in the tooth pulp, *J. Osaka Univ. Dent. Soc.*, **28** (1983) 167-182.
- 3) Kudo, T., Maeda, S., Nakamae, J., Chang, H.-L., Uchida, Y. and Inoki, R., A possible relationship between processing from precursor proteins to opioid peptides and noxious stimulation in the rat incisor pulp, *Life Sci.*, **33** (sup. 1) (1983) 681-684.
- 4) Kudo, T., Kuroi, M. and Inoki, R., In vitro production and release of opioid peptides in the tooth pulp induced by bradykinin, *Neuropeptides*, **7** (1986) 391-397.
- 5) Inoki, R. and Kudo, T., Enkephalins and bradykinin in dental pulp, *TIPS*, **7** (1986) 275-277.
- 6) Kudo, T., Chang, H.-L., Kuroi, M., Wakisaka, S., Akai, M. and Inoki, R., Influences of bradykinin and substance P on the met-enkephalin-like peptide content in the rat incisor pulp, *Neuropeptides*, **7** (1986) 399-405.
- 7) Kudo, T., Wei, E.-Q. and Inoki, R., Activation of calcium ion-dependent proteinases by bradykinin in dental pulp of the rat, *Adv. Exp. Biol.*, **247B** (1989) 275-278.
- 8) Kudo, T., Wei, E.-Q., Zhu, B.-F. and Inoki, R., Involvement of lysosomal enzymes in enkephalin production in dental pulp of the rat, *Dentistry in Japan*, **26** (1989) 41-44.
- 9) Kudo, T., Wei, E.-Q. and Inoki, R., Is cathepsin B an enkephalin processing enzyme in the tooth pulp? *Progr. Clin. Biochem. Res.*, **328** (1990) 271-274.
- 10) Kudo, T., Wei, E.-Q. and Inoki, R., Proteases in inflammation. In: Inoki, R., Kudo, T. and Olgart, L. (Eds.), *Dynamic Aspects of Dental Pulp*, Chapman and Hall, London, 1990, pp. 445-470.
- 11) Kudo, T., Wei, E.-Q., Zhu, B.-F. and Inoki, R., Enkephalin production in tooth pulp cells by cathepsin B. In: Van Ree, J. M., Mulder, A. H., Wiegant, V. M. and Van Wilmsersma Greidanus (Eds.), *New Leads in Opioid Research*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1990, pp. 27-29.
- 12) Wei, E.-Q., Kudo, T. and Inoki, R., Pharmacological and biochemical study on the mechanism of enkephalin production in rat dental pulp, *J. Osaka Univ. Dent. Sch.*, **30** (1990) 8-30.
- 13) Wei, E.-Q., Kudo, T. and Inoki, R., Subcellular distribution of enkephalin precursor proteins in rat dental pulp and the usefulness as a substrate for enkephalin-producing enzymes, *Life Sci.*, **48** (1991) 667-674.
- 14) Kudo, T., Zhu, B.-F. and Inoki, R., Ca⁺⁺-

- dependency of bradykinin-stimulated enkephalin production in fibroblasts of the tooth pulp, *Pain Res.*, **6** (1991) 105-110.
- 15) Barrett, A. J. and Kirschke, H., Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L, *Methods Enzymol.*, **80** (1981) 535-561.
 - 16) Takagi, H., Physiological and pharmacological actions of a neuroactive dipeptide, kyotorphin, and its precursor, L-arginine, and clinical application, *Folia Pharmacol. Japon*, **96** (1990) 85-96.
 - 17) 植田弘師, 高木博司, 猪木令三, 工藤照夫: 実験動物におけるエンドルフィンの産生遊離, *病態生理*, **6** (1987) 263-270.

Address for correspondence: Bo-Fan Zhu, M. D.,
Department of Pharmacology, Osaka University Faculty
of Dentistry, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan.
Telephone: 06-876-5711