



ラット骨芽細胞様細胞株ROS17/2.8における PTH/PTHrP受容体のごく早期の同種脱感作に及ぼす ベータアドレナリン受容体キナーゼ1の影響

陳, 新
中田, 裕久
馬場, 久光

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 62(1/2):1-10

(Issue Date)

2001-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00097792>



ラット骨芽細胞様細胞株 ROS 17/2.8 における PTH/PTHrP 受容体のごく早期の同種脱感作に及ぼす ベータアドレナリン受容体キナーゼ 1 の影響

陳 新¹⁾, 中田 裕久¹⁾²⁾, 馬場 久光¹⁾²⁾

神戸大学大学院医学系研究科病態情報学¹⁾
神戸大学保健管理センター²⁾

連絡先：陳 新 XIN CHEN
Department of Orthopaedics
Case Western Reserve University
Biomedical Research Building
2109 Adelbert Road, Cleveland,
OH 44106-5000, USA

(平成13年3月2日受付)

要 約

PTH/PTHrP 受容体におけるごく早期の受容体脱感作のメカニズムを明らかにする目的で, ROS 17/2.8細胞におけるヒトPTH(1-34) による細胞内cAMP産生に対するベータアドレナリン受容体キナーゼ1 (β ARK1) の影響を検討した。細胞に 10^{-7} MヒトPTH(1-34) を2分間前投与した後, 10^{-7} MヒトPTH(1-34) を2分間再投与し, ヒトPTH(1-34) を一度だけ2分間投与した場合と比較した。細胞隔解液のcAMP濃度はヒトPTH(1-34) を一度だけ投与した場合に比べて約30%低下し, 同種脱感作の現象が認められた。forskolinを用いた同様の検討では同種脱感作は認められず, ヒトPTH(1-34) によるcAMP産生反応の脱感作は, PTH/PTHrP受容体を含めてadenylyl cyclaseよりも上流のメカニズムが原因となっていることが示唆された。細胞に β ARK1アンチセンスphosphorothioate oligo-DNAを投与して β ARK1の機能を阻害すると, ヒトPTH(1-34) によるcAMP産生のごく早期の同種脱感作は抑制された。同様に, 細胞に β ARK1アンチセンスmRNAを発現させて β ARK1の機能を阻害すると, ヒトPTH(1-34) によるcAMP産生のごく早期の同種脱感作は抑制された。Northern blot法で β ARK1アンチセンスmRNAの発現を確認した。これらの結果から, ROS 17/2.8細胞においてPTH/PTHrP受容体の2分以内というごく早期の同種脱感作に β ARK1が関与していることが示唆された。

緒 言

副甲状腺ホルモン (PTH) は, 高等動物において血中カルシウム濃度を調節し, 体内のカルシウムホメオスターシスを維持する上で重要な役割をもつ⁽¹⁾。84アミノ酸から成るPTHおよびそのN末端の34アミノ酸断片は, おもに腎や骨などの標的臓器の細胞膜にある特異的なPTH/PTHrP受容体を介してその生理作用を発現する⁽²⁻⁵⁾。PTH/PTHrP受容体の機能異常は, Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia⁽⁶⁾におけるPTH/PTHrP受容体の構成的な活性化やpseudohypoparathyroidismを伴う早期に発症するHTLV-I-associated myelopathy にみられるPTH受容体の変化⁽⁷⁾に認められるように, いくつかの疾患でのカルシウム代謝異常の原因となることがある。これらのことから, PTH/PTHrP受容体の機能異常は高カルシウム血症や骨粗鬆症などの骨代謝異常に関与している可能性が考えられる。ある受容体をリガンドで刺激し続けるとその受容体の反応性が急速に低下する受容体脱感作の現象は, 最も重要な受容体制御機能の一つである。ある種の心不全におけるベータアドレナリン受容体の不応性の原因としてベータアドレナリン受容体の脱感作機構の異常が指摘されているように⁽⁸⁾, PTH/PTHrP受容体脱感作機構の異常が骨代謝異常の原因となることも考えられる。

PTHに対するPTH/PTHrP受容体反応の同種脱感作はin vivoで観察され⁽⁹⁾, 種々の細胞株において

キーワード: PTH/PTHrP 受容体, ベータアドレナリン受容体キナーゼ1 (β ARK1), 同種脱感作, 副甲状腺ホルモン, 細胞内cAMP, G 蛋白共役型受容体キナーゼ

in vitroでも観察されているが^(10, 11), PTHに対する反応における脱感作のメカニズムは各種の実験においても異なっており、未だ明らかではない。受容体の脱感作にはさまざまなメカニズムが関与しているが^(12, 13), ベータアドレナリン受容体キナーゼ1 (β ARK1) による受容体リン酸化はベータアドレナリン受容体などの同種脱感作⁽¹⁴⁾に関与する重要なメカニズムの一つである。我々のこれまでの研究では、ヒト胃癌細胞株MKN45において β ARK1はヒスタミン H_2 受容体の同種脱感作に関与していることが示された⁽¹⁵⁾。近年の研究により、 β ARK1はベータアドレナリン受容体のみならず、 α_2 アドレナリン受容体⁽¹⁶⁾, m_2 ムスカリン受容体^(17, 18), サブスタンスP受容体⁽¹⁹⁾などのG蛋白共役型受容体の同種脱感作にも関与していることが明らかにされており、 β ARK1はG蛋白に共役する種々の受容体の共通する受容体キナーゼである可能性が考えられる。さらに、ラット骨芽細胞様細胞株ROS 17/2.8において β ARK1活性が認められるという報告があり⁽²⁰⁾, ヒト骨芽細胞様細胞株SaOS-2において β ARK1ないしごく類縁のG蛋白共役型受容体キナーゼの活性化がPTH/PTHrP受容体のcAMP産生の早期同種脱感作(2時間以内)に重要な役割を果たしていることも示されている⁽²¹⁾。ロドプシンなどを含むG蛋白共役型受容体キナーゼの一つである β ARK1はごく短時間にベータアドレナリン受容体のリン酸化を来すことが知られている⁽²²⁾。しかし、 β ARK1がごく早期のPTH/PTHrP受容体の同種脱感作に関与しているか否かについては解明されていない。

この研究ではROS 17/2.8細胞におけるPTH/PTHrP受容体のごく早期の受容体脱感作のメカニズムを明らかにすることを目的とし、PTH/PTHrP受容体のごく早期の受容体脱感作に β ARK1が関与するかどうかを検討した。

方 法

使用試薬

Ham's F12はICN Biomedicals (Aurora, OH) 製, ウシ胎児血清(FBS)は大日本製薬(大阪)製のものを用いた。合成ヒトPTH(1-34)はPeptide Institute (大阪)より入手し, 0.01N酢酸+0.2%ウシ血清アルブミン(BSA)に溶解した。 $[^{32}P]$ α -deoxyadenine triphosphate (3,000 Ci/mM)はAmersham (Buckinghamshire, UK) 製を用いた。

細胞培養

ラット骨芽細胞様細胞株ROS 17/2.8は, 2 mM

L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) および10% FBSを含むHam's F12培養液を用いて継代維持された。

cyclic AMP (cAMP) 産生量測定

cAMP産生量の測定に際しては, 細胞は24wellプレートを用いて 5×10^4 cells/wellの濃度で播種後24時間培養された。この細胞に 10^{-7} MのヒトPTH(1-34)を 37°C で1~60分間投与した。この際, 10^{-4} M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)を含むHEPES-buffered Krebs-Ringer's bicarbonate buffer (pH 7.4) (KRBG) 緩衝液を用いた。500 μ lの12% trichloroacetic acid (TCA)を加えて反応を停止し凍結解凍を3回くり返した後, 細胞をプレートから回収し遠心分離した。500 μ lの上清をとり, 2 mlのwater-saturated diethyletherで3回抽出した。抽出後, この溶液中のcAMP濃度をcAMP radioimmunoassay kit (Amersham, UK)^(23, 24)を用いて測定した。

PTH(1-34)によるcAMP産生の同種脱感作

10^{-7} MヒトPTH(1-34)存在下ないし非存在下に, 5×10^4 の細胞をKRBG緩衝液中で 37°C で2分間培養を行った。細胞をphosphate-buffered saline (PBS)で 37°C において2分間, 3回洗浄した後, 10^{-4} M IBMXおよび 10^{-7} MヒトPTH(1-34)を含むKRBG緩衝液にて培養した。 37°C において2分間の培養後, 500 μ lの12% TCAを加えて反応を停止した。一方, 対照群として 10^{-5} M forskolin存在下ないし非存在下に, 5×10^4 の細胞をKRBG緩衝液中で 37°C で2分間培養を行った。細胞をPBSで 37°C において2分間, 3回洗浄した後, 10^{-4} M IBMXおよび 10^{-5} Mのforskolinを含むKRBG緩衝液にて培養した。 37°C において2分間の培養後, 500 μ lの12% TCAを加えて反応を停止した。凍結解凍を3回くり返した後, 細胞融解液に含まれるcAMP濃度を上述の方法で測定した。

phosphorothioate oligo-DNAによるROS 17/2.8細胞の処理

ラット β ARK1遺伝子open reading frame (ORF)上の268-287塩基に対応する20merの β ARK1センスまたはアンチセンスphosphorothioate oligo-DNAを合成し, high-pressure liquid chromatography column (東亜合成, 東京)にて精製した。 5×10^4 のROS 17/2.8細胞を24wellプレートに播種後24時間培養し, β ARK1センスまたはアンチセンスphosphorothioate oligo-DNAを2 μ Mまたは10 μ M

の濃度で8時間毎に24時間投与した。その後上述の方法でPTHを投与し、細胞のcAMP産生量を測定した。

アンチセンス β ARK1遺伝子誘導発現系の作製およびROS 17/2.8細胞の処理

ラット β ARK1 cDNA⁽²⁵⁾のORF 82-1103塩基に対応する1022bpのPCR断片を、tetracycline repressorが結合することにより遺伝子発現を抑制するtetracycline responsive elementをもつpTRE expression plasmids (Clontech, Palo Alto, CA)にサブクローニングした。 β ARK1センスmRNAを発現しうるinsertをもつplasmid clone (pTRE- β ARK1-S)、 β ARK1アンチセンスmRNAを発現しうるinsertをもつplasmid clone (pTRE- β ARK1-AS)を選別後、精製した。 3×10^5 のROS 17/2.8細胞を24時間培養し、大腸菌のtetracycline repressorとherpes simplex virusのVP16 protein C末端部との融合蛋白であるtetracycline-responsive transcriptional activatorを発現するpTet-Off plasmid (Clontech, Palo Alto, CA) 2.0 μ gをtransfectした。transfectionは12 μ gのDOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer, Germany)を用いて行い、100 μ g/mlのG418 (Sigma, St. Louis, MO)でstable transfectant cloneを選別した。選別されたROS 17/2.8 Tet-Off細胞に1 μ g/mlのtetracycline (Sigma, St. Louis, MO)の存在下、あるいは非存在下でpTRE- β ARK1-S, pTRE- β ARK1-AS, あるいは対照のpTRE-Luc (Clontech, Palo Alto, CA)を24時間、一過性に導入した。この系では、tetracyclineの非存在はtetracycline repressorをtetracycline responsive elementに結合させ、VP-16 transcriptional activatorにより β ARK1センスあるいはアンチセンスmRNAの発現を促進する。その後上述の方法でPTHを投与し細胞融解液中のcAMP産生量を測定した。

Northern blot法

guanidine isothiocyanate-CsCl₂法を用いて β ARK1を誘導発現するROS 17/2.8 Tet-Off細胞からtotal RNAを抽出した。このROS 17/2.8 Tet-Off細胞は1 μ g/ml tetracyclineの存在下、あるいは非存在下でpTRE- β ARK1-S, pTRE- β ARK1-AS, あるいは対照のpTRE-Lucを24時間、一過性に導入されたものである。それぞれの細胞のtotal RNA 20 μ gを1.0% agarose-formaldehyde gelにて電気泳動し、nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)にtransferを行い、

さらに^[32P]で標識したラット β ARK1 cDNA断片を用いて42°Cにて16時間hybridizationを行った。このfilter membraneを0.2x SSC/0.1% SDS溶液で50°Cにて20分間、2回洗浄した後、auto-radiographyを行った。さらに同じfilter membraneを脱probe処理後、^[32P]で標識したラット β -actin probeを用いて再度hybridizationを行い、同様に洗浄およびauto-radiographyを行った。

統計処理

全ての実験は4回くり返し行った。得られたデータはmean \pm SEで表示し、paired Student's t testにて統計学的に解析した。

結 果

ROS 17/2.8細胞におけるPTH刺激によるcAMP産生の変化

ROS 17/2.8におけるPTH刺激によるcAMP産生の変化を検討するために、細胞に 10^{-7} MヒトPTH (1-34)を投与した。図1に示すように、副甲状腺ホルモンのN末端断片であるヒトPTH(1-34)はROS 17/2.8細胞のcAMP産生を有意に上昇させた。ヒトPTH (1-34)の刺激後1分でその上昇が始まり、10分後には最大の2867 fmol/ 5×10^4 cellsに達した。その後反応はわずかに低下し、60分後まで持続した。

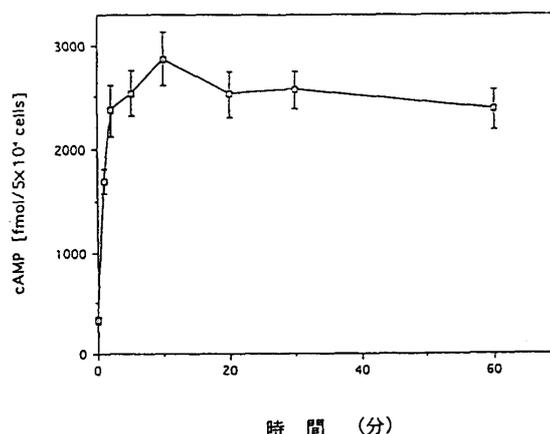


図1 ROS 17/2.8細胞におけるヒトPTH(1-34)によるcAMP産生の時間的变化

5×10^4 ROS 17/2.8細胞を24wellプレートに播種後、10%FBSを加えたHam's F12培養液で24時間培養した。37°C PBSで2回洗浄後、さらに 10^{-4} M IBMXおよび 10^{-7} MヒトPTH(1-34)を含むKRBG緩衝液で種々の時間培養した。500 μ lの12%TCAを加えて反応を停止し、cAMP濃度をRIAにて測定した。

ROS 17/2.8細胞におけるPTH刺激によるcAMP産生の同種脱感作

図2に示すように、ROS 17/2.8細胞にヒトPTH(1-34)を2分間前投与した場合、再投与時のcAMP産生が有意に抑制された。細胞内で産生されたcAMPは初回投与群(■) 3060 ± 314 fmol/ 5×10^4 cellsに対し再投与群(▨) 1733 ± 205 fmol/ 5×10^4 cellsであった。一方、forskolinによるcAMP産生は初回投与群(■) 2913 ± 332 fmol/ 5×10^4 cellsに対し再投与群(▨) 2770 ± 380 fmol/ 5×10^4 cellsと、cAMP産生の有為な低下は認められなかった。

ROS 17/2.8細胞におけるヒトPTH(1-34)刺激によるcAMP産生の同種脱感作に対する β ARK1センスおよび β ARK1アンチセンスphosphorothioate oligo-DNAの影響

ROS 17/2.8細胞におけるヒトPTH(1-34)刺激によるcAMP産生の同種脱感作に対する β ARK1の影響を検討する目的で、細胞に β ARK1センスまたは β ARK1アンチセンスphosphorothioate oligo-DNAを、 $2 \mu\text{M}$ または $10 \mu\text{M}$ の濃度で8時間毎に24時間投与した。図3に示すように、ROS 17/2.8細胞を $2 \mu\text{M}$ または $10 \mu\text{M}$ の濃度の β ARK1センスoligo-DNAで24時間処理した場合、処理なし対照群(H_2O)

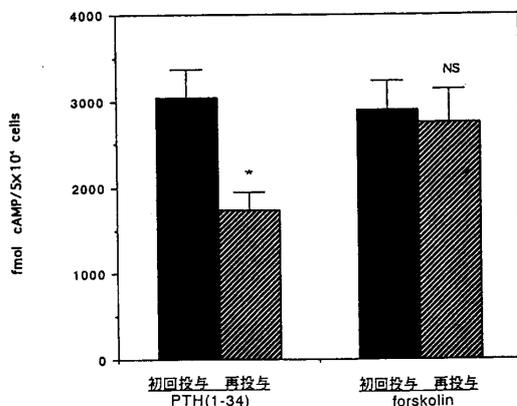


図2 ヒトPTH(1-34)によるcAMP産生の同種脱感作
 5×10^4 ROS 17/2.8細胞を 10^{-7} MヒトPTH(1-34)または 10^{-5} M forskolinの存在下(▨)あるいは非存在下(■)にKRBG緩衝液にて 37°C 2分間培養した。PBSで2回洗浄後、 10^{-4} M IBMXと 10^{-7} MヒトPTH(1-34)もしくは 10^{-5} M forskolinを含むKRBG緩衝液にて培養した。 37°C 2分間培養後、 $500 \mu\text{l}$ の12% TCAを加えて反応を停止し、細胞融解液のcAMP濃度をRIAにて測定した。* $P < 0.05$ NS 有意差なし

と同様、ヒトPTH(1-34)によるcAMP産生は再投与群(▨)では初回投与群(■)の約70%であった。これに対し、 $2 \mu\text{M}$ または $10 \mu\text{M}$ の濃度の β ARK1アンチセンスoligo-DNAで24時間処理した場合、ヒトPTH(1-34)によるcAMP産生は再投与群(▨)では初回投与群(■)のそれぞれ約82%($2 \mu\text{M}$)および約94%($10 \mu\text{M}$)であった。これらの結果は、アゴニストであるヒトPTH(1-34)によるcAMP産生の同種脱感作は β ARK1アンチセンスoligo-DNAで一部抑制されたことを示している。反対に β ARK1センスoligo-DNAは、ヒトPTH(1-34)の前投与で生じる再投与後のcAMP産生の抑制に殆ど影響を与えなかった。

ROS 17/2.8細胞におけるヒトPTH(1-34)刺激によるcAMP産生の同種脱感作に対する β ARK1センスまたはアンチセンスmRNAの影響

ヒトPTH(1-34)刺激によるcAMP産生の同種脱感作における β ARK1の関与をさらに検討する目的で、ROS17/2.8Tet-Off細胞に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のtetracyclineの存在下あるいは非存在下で、pTRE- β ARK1-S、pTRE- β ARK1-AS、あるいは対照群としてpTRE-Lucを一過性に導入した。図4に示すように、導入されたplasmidからのmRNAの発現を抑制するtetra-

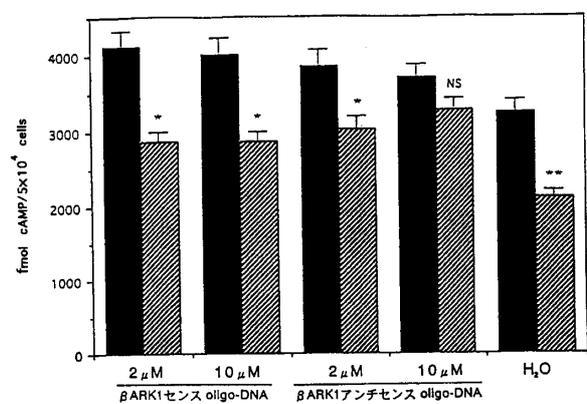


図3 ROS 17/2.8細胞におけるヒトPTH(1-34)刺激によるcAMP産生の同種脱感作に対する β ARK1センスまたはアンチセンスphosphorothioate oligo-DNAの影響

5×10^4 ROS 17/2.8細胞を β ARK1センスoligo-DNA、もしくは β ARK1アンチセンスoligo-DNAあるいは対照としての蒸留水(H_2O)を含む培養液で24時間培養した。PBSで洗浄後 10^{-7} MヒトPTH(1-34)の存在下(▨)もしくは非存在下(■)にKRBG緩衝液で2分間処理し、続いて 10^{-7} MヒトPTH(1-34)でさらに2分間処理した後、細胞融解液のcAMP濃度をRIAにて測定した。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ NS 有意差なし

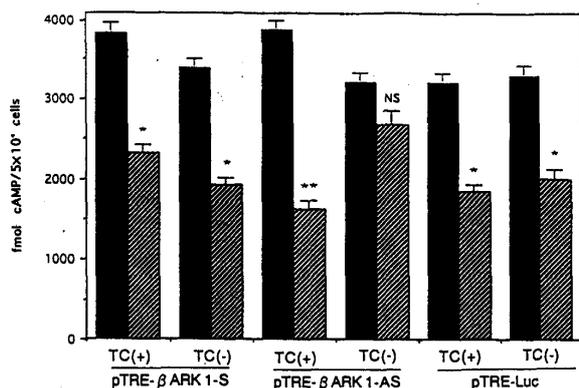


図4 ROS 17/2.8細胞におけるヒトPTH(1-34)刺激によるcAMP産生の同種脱感作に対する β ARK1センスまたはアンチセンスmRNAの影響

5×10^4 ROS 17/2.8Tet-Off細胞に $1 \mu\text{g/ml}$ tetracyclineの存在下[TC(+)]あるいは非存在下[TC(-)]で、pTRE- β ARK1-S, pTRE- β ARK1-AS, あるいはpTRE-Lucを一過性に導入した。PBSで洗浄後 10^{-7} MヒトPTH(1-34)の存在下(▨)もしくは非存在下(■)にKRBG緩衝液で2分間処理し、続いて 10^{-7} MヒトPTH(1-34)でさらに2分間処理した後、細胞融解液のcAMP濃度をRIAにて測定した。
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ NS 有意差なし

cyclineの存在下[TC(+)]では、ROS 17/2.8細胞でのPTH(1-34)によるcAMP産生は再投与群(▨)では初回投与群(■)の約41ないし60%であり、これらのplasmidからのmRNAの発現の抑制は、ROS 17/2.8Tet-Off細胞におけるヒトPTH(1-34)刺激によるcAMP産生の同種脱感作に影響を与えなかった。一方、導入されたplasmidからのmRNAの発現を促進するためのtetracyclineの非存在下[TC(-)]では、ROS 17/2.8細胞でのPTH(1-34)によるcAMP産生は、pTRE- β ARK1-S導入細胞の再投与群(▨)では初回投与群(■)の約56%、pTRE- β ARK1-AS導入細胞で約89%、またpTRE-Luc導入細胞で約63%であり、 β ARK1センスmRNAおよび対照のluciferase mRNAは同種脱感作に影響を与えなかったのに対し、 β ARK1アンチセンスmRNAはヒトPTH(1-34)刺激によるcAMP産生の同種脱感作を有意に抑制した。

tetracyclineの非存在により β ARK1センスまたはアンチセンスmRNAが誘導されていることを確認する目的で、これらの細胞から抽出したtotal RNAをNorthern blot法で検討した。図5に示すように、pTRE- β ARK1-S (lane 1および2)あるいはpTRE- β ARK1-AS (lane 3および4)を導入され、かつtetracyclineの非存在下にあったROS 17/2.8 Tet-Off細胞(lane 2および4)から抽出されたtotal

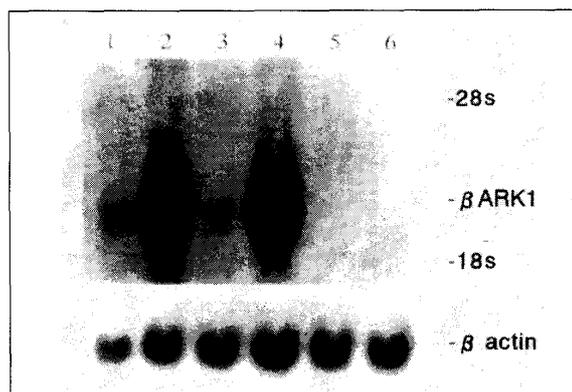


図5 ROS 17/2.8Tet-Off細胞における β ARK1誘導発現のNorthern blot法による検討

$1 \mu\text{g/ml}$ tetracyclineの存在下[TC(+)] (lane 1, 3および5) あるいは非存在下[TC(-)](lane 2, 4および6)で、pTRE- β ARK1-S (lane 1および2), pTRE- β ARK1-AS (lane 3および4), あるいはpTRE-Luc (lane 5および6)を一過性に導入したROS 17/2.8Tet-Off細胞から抽出したtotal RNAをNorthern blot法で解析した。上段はラット β ARK1の、下段はラット β actinの遺伝子DNA断片を標識プローブとして用いた結果を示す。

RNAは β ARK1センスまたはアンチセンスmRNAを強く発現しており、反対にmRNAを抑制するためにtetracyclineの存在下にあった細胞 (lane 1および3) では β ARK1センスまたはアンチセンスmRNAの発現はわずかに留まった。これらの結果はROS 17/2.8Tet-Off細胞においてmRNAの誘導発現系が良好に機能していることを示す。

pTRE-Lucを導入されたROS 17/2.8Tet-Off細胞 (lane 5および6) では、tetracyclineの存在下 (lane 5)でも非存在下 (lane 6)でも β ARK1センスまたはアンチセンスmRNAの発現は認められなかった。

考 察

PTHに対するPTH/PTHrP受容体の同種脱感作についての研究の進展に伴い、いくつかの異なるメカニズムが明らかにされている。cAMP dependent kinase およびcAMPには依存しないその他の機序が受容体脱感作に関与するとされており⁽¹³⁾、また2時間後に最大の効果をあらわすprotein kinase Cの脱感作機序も存在する^(26, 27)。受容体のdown regulationは種々の受容体で脱感作の原因となるが、PTH/PTHrP受容体においてもこのメカニズムが働いていることが確

認されており^(28, 29), 異種のリガンドによるdown regulationのメカニズムでもPTH/PTHrP受容体の脱感作を起こしうるとされている^(30, 31)。なかでも β ARK1はagonistが結合した受容体を特異的にリン酸化することでベータアドレナリン受容体⁽³²⁾およびその他のG蛋白共役型受容体⁽¹⁴⁾の同種脱感作に重要な機能をもつことが知られている。最近の研究では, ROS 17/2.8細胞においてラット β ARK1 mRNAが見い出され, レチナル光受容体であるロドプシンをリン酸化する β ARK1様活性がラット骨芽細胞様細胞UMR 106-H5で確認されている⁽²⁰⁾。さらにヒト骨芽細胞様細胞SaOS-2において β ARK1ないしごく類縁のG蛋白共役型受容体キナーゼの活性化がPTH/PTHrP受容体のcAMP産生の早期同種脱感作(2時間以内)に重要な役割を果たしていることも報告されている⁽²¹⁾。 β ARK1は30分以内など早期にベータアドレナリン受容体のリン酸化を来すことが知られているが⁽²²⁾, β ARK1が数分以内などごく早期のPTH/PTHrP受容体の同種脱感作に関与しているか否かについては知られていない。

今回の研究では, PTH/PTHrP受容体のごく早期の受容体脱感作に β ARK1が関与することを初めて明かにした。PTH(1-34)をROS 17/2.8細胞に投与すると細胞内cAMP産生は急速に上昇し, 最初に投与されたリガンドを十分に洗浄除去した後PTH(1-34)を再投与すると細胞内cAMP産生の上昇は有意に抑制された。この結果はPTH/PTHrP受容体に同種脱感作が生じたことを意味するものである。これに対し, adenylylaseを直接活性化するforskolinでは再投与後の細胞内cAMP産生の抑制が認められなかった。これらの結果より, PTH(1-34)によるPTH/PTHrP受容体に対するcAMP産生反応の脱感作は, PTH/PTHrP受容体を含めてadenylylaseよりも上流のメカニズムが原因となっていることが示唆された。

受容体脱感作におよぼす β ARK1の影響を検討するために, β ARK1アンチセンスphosphorothioate oligo-DNAにより β ARK1の内因性mRNAの翻訳を阻止すると, ごく早期である2分後にPTH(1-34)によるcAMP産生の脱感作は抑制された。これに対して β ARK1センスoligo-DNAは対照群と同様にこの脱感作を抑制しなかった。これらの結果は, β ARK1アンチセンスoligo-DNAが β ARK1の内因性mRNAの翻訳を阻止し, β ARK1蛋白が減少し, そのためにごく早期の受容体脱感作が抑制されたことを示唆する。

これらの結果を確認するために, ROS 17/2.8Tet-Off細胞において β ARK1アンチセンスmRNAを誘

導発現させることにより内因性の β ARK1 mRNAの作用の抑制を試みた。培養液をtetracyclineの非存在状態におくとpTRE- β ARK1-ASを導入されたROS 17/2.8Tet-Off細胞内で β ARK1アンチセンスmRNAが誘導され, PTH(1-34)刺激によるcAMP産生のごく早期の脱感作が抑制された。しかしながら, tetracyclineを投与するとpTRE- β ARK1-ASを導入されたROS 17/2.8Tet-Off細胞内で β ARK1アンチセンスmRNAの発現が抑制され, 脱感作抑制は認められなかった。またpTRE- β ARK1-SあるいはpTRE-Lucを導入されたROS 17/2.8Tet-Off細胞ではtetracyclineは脱感作に影響を与えなかった。これらの結果は, β ARK1アンチセンスmRNAが β ARK1の内因性mRNAの翻訳を阻止し, β ARK1蛋白が減少し, そのために受容体脱感作が抑制されたことを示唆している。遺伝子導入されたROS 17/2.8Tet-Off細胞において β ARK1センスまたはアンチセンスmRNAが誘導されていることを確認する目的で, 抽出されたtotal RNAをNorthern blot法で検討した。pTRE- β ARK1-SあるいはpTRE- β ARK1-ASを導入し, かつ, tetracyclineの非存在下で培養したROS 17/2.8Tet-Off細胞では, total RNA中に, 誘導された β ARK1 mRNAの発現が認められた。これらの結果は β ARK1 mRNAの誘導発現系が良好に働いていることを意味している。

ベータアドレナリン受容体にリガンドが結合すると, β ARK1, 続いてcAMP-dependent kinase (protein kinase A)のリン酸化が起こり, それによって短時間(数秒から数分)の刺激が原因となる同種脱感作が生じることが知られている⁽²²⁾。 β ARK1とG蛋白の $\beta\gamma$ -subunitおよび受容体からなる複合体が形成され受容体のリン酸化が起こると, 今度は受容体とG蛋白の相互作用が抑制され, 細胞内情報伝達系が抑制される。このメカニズムにおけるG蛋白の $\beta\gamma$ -subunitの関与は他のG蛋白共役型受容体のリン酸化においても認められている⁽³³⁾。さらに, 受容体のsequestration(細胞質への一過性の移行)もまた受容体の同種脱感作に関与すると考えられている⁽³⁴⁾。今回の研究では, 細胞内のsecond messengerであるcAMPはPTH(1-34)投与後1分で上昇したため, 細胞内の情報伝達は1分以内に開始されていると考えられる。 β ARK1は数秒から数分で作用するため, ごく早期のPTH/PTHrP受容体の同種脱感作を検討する今回の実験では, PTH(1-34)の初回投与と再投与の間隔を2分とした。最終的にPTH(1-34)によるcAMP産生の同種脱感作は2分で生じること, β ARK1がこの機序に関与していることが見い出された。この結果は,

PTH/PTHrP受容体におけるごく早期の同種脱感作に β ARK1が関与することを示唆している。 β ARK1はベータアドレナリン受容体、 α_2 アドレナリン受容体⁽¹⁶⁾、 m_2 ムスカリン受容体^(17, 18)、ヒスタミン H_2 受容体⁽¹⁵⁾、サブスタンスP受容体⁽¹⁹⁾などいくつかのG蛋白共役型受容体の同種脱感作にも関与しているため、PTH/PTHrP受容体も含めたG蛋白共役型受容体に共通した受容体キナーゼである可能性が考えられる。 β ARK1アンチセンスoligo-DNAも β ARK1アンチセンスmRNAも脱感作を完全には抑制し得なかったため、 β ARK1はROS 17/2.8細胞におけるPTH/PTHrP受容体のごく早期の受容体脱感作のメカニズムに部分的に関与しているとも考えられる。このことはPTH/PTHrP受容体のごく早期の受容体脱感作に β ARK1による受容体リン酸化以外のメカニズムがあることをも示唆している。

文 献

1. Kahn, A.J., Partridge, N.C.: New concepts in bone remodeling: an expanding role for the osteoblast. *Am J Otolaryngol* 8 : 258-264, 1987
2. Horiuchi, N., Caulfield, M.P., Fisher, J.E., Goldman, M.E., McKee, R.L., Reagan, J.E., Levy, J.J., Nutt, R.F., Rodan, S.B., Schofield, T.L.: Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro. *Science* 238 : 1566-1568, 1987
3. Juppner, H., Abou-Samra, A.B., Uneno, S., Gu, W.X., Potts, J.T.Jr., Segre, G.V.: The parathyroid hormone-like peptide associated with humoral hypercalcemia of malignancy and parathyroid hormone bind to the same receptor on the plasma membrane of ROS 17/2.8 cells. *J. Biol. Chem.* 263 : 8557-8560, 1988
4. Segre, G.V., Rosenblatt, M., Reiner, B.L., Mahaffey, J.E., Potts, J.T. Jr.: Characterization of parathyroid hormone receptors in canine renal cortical plasma membranes using a radioiodinated sulfur-free hormone analogue. Correlation of binding with adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 254 : 6980-6986, 1979
5. Nissenson, R.A., Karpf, D., Bambino, T., Winer, J., Canga, M., Nyireddy, K., Arnaud, C.: Covalent labeling of a high-affinity, guanyl nucleotide sensitive parathyroid hormone receptor in canine renal cortex. *Biochemistry* 26 : 1874-1878, 1987
6. Schipani, E., Kruse, K., Juppner, H.: A constitutively active mutant PTH/PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* 268 : 98-100, 1995
7. Yoshida, Y., Sakamoto, Y., Yoshimine, A., Maruyama, Y., Ikegami, N., Inose, M., Imamura, H., Nakahara, K., Nakagawa, M., Osame, M.: Three cases of juvenile onset HTLV-I-associated myelopathy with pseudohypoparathyroidism. *J. Neurol. Sci.* 118 : 145-149, 1993
8. Spiegel, A.M., Weinstein, L.S., Shenker, A.: Abnormalities in G protein-coupled signal transduction pathways in human diseases. *J. Clin. Invest.* 92 : 1119-1125, 1992
9. Drueke, T.B.: Abnormal skeletal response to parathyroid hormone and the expression of its receptor in chronic uremia. *Pediatr. Nephrol.* 10 : 348-350, 1996
10. Mitchell, J., Goltaman, D.: Mechanisms of homologous and heterologous regulation of parathyroid hormone receptors in the rat osteosarcoma cell line UMR-106. *Endocrinol.* 126 : 2650-2660, 1990
11. Bergwitz, C., Abou-Samra, A-B., Hesch, R-D., Juppner, H.: Rapid desensitization of parathyroid hormone dependent adenylate cyclase in perfused human osteosarcoma cell (SaOS-2). *Biochem. Biophys. Acta* 1222 : 447-456, 1994
12. Lohse, M.J., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.: Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* 265 : 3202-3209, 1990
13. Fukayama, S., Tashjian, A.H.Jr., Bringhurst, R.: Mechanisms of desensitization to parathyroid hormone in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinol.* 131 : 1757-1769, 1992
14. Lefkowitz, R.J.: G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 74 : 409-412, 1993
15. Nakata, H., Kinoshita, Y., Kishi, K., Fukuda, H., Kawanami, C., Matsushima, Y., Asahara, M., Okada, A., Maekawa, T.,

- Chiba, T.: Involvement of beta-adrenergic receptor kinase-1 in homologous desensitization of histamine H₂ receptors in human gastric carcinoma cell line MKN-45. *Digestion* 57 : 406-410, 1996
16. Benovic, J.L., Regan, J.W., Matsui, H., Mayor, F.Jr., Cotecchia, S., Leeb-Lundberg, L.M.F., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.: Agonist-dependent phosphorylation of the α_2 -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 262 : 17251-17253, 1987
 17. Richardson, R., Kim, C., Benovic, J., Hosey, M.: Phosphorylation and desensitization of human m₂ muscarinic cholinergic receptors by two isoforms of the β -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 268 : 13650-13656, 1993
 18. Kwatra, M.M., Benovic, J.L., Caron, M.G.: Phosphorylation of chick heart muscarinic cholinergic receptors by the β -adrenergic receptor kinase. *Biochem.* 28 : 4543-4547, 1989
 19. Kwatra, M.M., Schwinn, D., Schreurs, J., Blank, J., Kim, C., Benovic, J.L., Krause, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.: The substance P receptor, which couples to Gq/11, is a substrate of β -adrenergic receptor kinase 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 268 : 9161-9164, 1993
 20. Bliziotis, M., Murtagh, J., Wiren, K.: β -Adrenergic receptor kinase-like activity and β -arrestin are expressed in osteoblastic cells. *J. Bone Mineral Res.* 11 : 820-826, 1996
 21. Fukayama, S., Kong, G., Benovic, J.L., Meurer, E., Tashjian, A.H.Jr.: Beta-adrenergic receptor kinase-1 acutely regulates PTH/PTHrP receptor signalling in human osteoblast-like cells. *Cell Signal* 9 : 469-474, 1997
 22. Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.: Turning off the signal; desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J.* 4 : 2881-2889, 1990
 23. Chiba, T., Yamaguchi, A., Yamatani, T., Nakamura, A., Morishita, T., Inui, T., Fukase, M., Noda, T., Fujita, T.: Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am. J. Physiol.* 256 : E331-E335, 1989
 24. Sato, T., Saito, K., Takezawa, J., Fujishima, T., Ijima, T., Kuninaka, A., Yoshino, H.: Urinary excretion of cyclic nucleotides and principal electrolytes in healthy humans of different ages. *Clin. Chim. Acta* 110 : 215-225, 1981
 25. Penn, R.B., Benovic, J.L.: Structure of the human gene encoding the beta-adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 269 : 14924-14930, 1994
 26. Ikeda, K., Sugimoto, T., Fukase, N., Fujita, T.: Protein kinase C is involved in PTH-induced homologous desensitization by directly affecting PTH receptor in the osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinol.* 128 : 2901-2906, 1991
 27. Fujimori, A., Miyauchi, A., Hruska, K.A., Martin, K.J., Aviole, L.V., Civitelli, R.: Desensitization of calcium messenger system in parathyroid hormone-stimulated opossum kidney cells. *Am. J. Physiol.* 264 : E918-E924, 1993
 28. Fukayama, S., Schipani, E., Jueppner, H., Lanske, B., Kronenberg, H.M., Abou-Samra, A.B., Bringhurst, F.R.: Role of protein kinase-A in homologous down-regulation of parathyroid hormone(PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinol.* 134 : 1851-1858, 1994
 29. Jongen, J.W.J.M., Willemstein-Van Hote, E.C., BOS, M.P., Jueppner, H., Segre, G.V., Abou-Samra, A.B., Feyen, J.H.M., Herrmann-Erlee, M.P.M.: Down-regulation of the receptor for parathyroid hormone(PTH) and PTH-related peptide by PTH in primary fetal rat osteoblasts. *J. Bone Miner Res.* 11 : 1218-1225, 1996
 30. Law, F., Bonjour, J.P.H., Rizzoli, R.: Transforming growth factor- β : A down-regulator of the parathyroid hormone-related protein receptor in renal epithelial cells. *Endocrinol.* 134 : 2037-2043, 1994
 31. Jongen, J.W.J.M., Willemstein-Van Hote, E.C., Van Der Meer, J.M., BOS, M.P., Jueppner, H., Segre, G.V., Abou-Samra, A.B., Feyen, J.H.M., Herrmann-Erlee, M.P.

- M.: Down-regulation of the receptor for parathyroid hormone(PTH) and PTH-related peptide by transforming growth factor- β in primary fetal rat osteoblast. *Endocrinol.* 136 : 3260-3266, 1995
32. Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.: β -Adrenergic receptor kinase: Identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 2797-2801, 1986
33. Haga, K., Haga, T.: Activation by G protein $\beta\gamma$ subunits of agonist- or light-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors and rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 267 : 2222-2227, 1992
34. Yu, S.S., Lefkowitz, R.J., Hausdorff, W.P.: β -Adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 268 : 337-341, 1993

Effect of β -Adrenergic Receptor Kinase 1 on the Very Rapid Phase
Homologous Desensitization of PTH/PTHrP Receptors in
Rat Osteoblastic Osteosarcoma Cells, ROS 17/2.8

XIN CHEN¹⁾, HIROHISA NAKATA¹⁾²⁾, HISAMITSU BABA¹⁾²⁾

Department of Biosignal Pathophysiology, Graduate School of Medicine¹⁾ &
Medical Center for Student Health²⁾, Kobe University

Abstract

The effect of beta-adrenergic receptor kinase 1 (β ARK1) on intracellular cAMP production caused by human PTH(1-34) in ROS 17/2.8 cells was examined to investigate the mechanism of homologous desensitization of PTH/PTHrP receptors in a very rapid phase. After the cells were pretreated with 10^{-7} M hPTH(1-34) for 2 min, they were treated again with 10^{-7} M hPTH(1-34) for 2min. The concentration of cAMP in the cell lysate decreased approximately 30% compared with that of cells treated with 10^{-7} M hPTH(1-34) for 2min only once (homologous desensitization). Homologous desensitization was absent when the cells were treated with 10^{-5} M forskolin in the same way, which indicated that hPTH(1-34) induced desensitization of cAMP was caused by desensitization of the upper stream mechanisms than adenylylcyclase including the PTH/PTHrP receptor. When ROS 17/2.8 cells were treated with $10 \mu\text{M}$ β ARK1 antisense phosphorothioate oligo-DNA to block the function of β ARK1, the homologous desensitization of cAMP response to hPTH(1-34) in the very rapid phase was suppressed. When β ARK1 antisense mRNA was expressed in ROS 17/2.8 cells to block the function of β ARK1, the homologous desensitization of cAMP response to hPTH(1-34) in the very rapid phase was also suppressed. The expression of β ARK1 antisense mRNA was confirmed with Northern blot analysis.

These data suggest that β ARK1 is involved in the PTH/PTHrP receptor homologous desensitization in the very rapid phase in ROS 17/2.8 cells.