



Calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase activation via a guanine nucleotide-dependent process in rat liver plasma membranes

山口, 彰則

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-02-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1251

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001251>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	山口彰則（京 都 府）
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医博ろ第1051号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成元年2月22日
学位論文題目	Calcitonin Gene - Related Peptide Stimulates Adenylate Cyclase Activation via a Guanine Nucleotide - Dependent Process in Rat Liver Plasma Membranes (カルチトニン遺伝子関連ペプチドによるラット肝細胞膜グアニンヌクレオチド依存性アデニレートサイクレーズの活性化)
審 査 委 員	主査 教授 藤 田 拓 男 教授 高 井 義 美 教授 望 月 眞 人

論 文 内 容 の 要 旨

カルチトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、その遺伝子がカルチトニン遺伝子DNA上にコードされる37アミノ酸残基よりなるペプチドである。CGRPは中枢神経、末梢神経および腸管等に広く分布し、胃酸分泌抑制作用をはじめ血管拡張作用、腓外分泌促進作用等を有することが知られている。これらの生理的作用に加えて、近年CGRPが血糖上昇作用を有することが報告されたが、その機序の一つとしてインスリン分泌の抑制が示唆されている。しかしながら、CGRPは腸管に広く分布しているので門脈内へ放出されたCGRPが肝臓に直接作用する可能性も否定できない。実際我々は、ラット肝細胞膜に高親和性のCGRP特異的リセプターが存在していることを確認しており、CGRPが何らかの情報伝達系を介して肝臓で作用発現をしていると推察された。一方ラット腓外分泌細胞やラット大動脈平滑筋細胞において、CGRPがサイクリックAMP (cAMP) 生成を促進することから、CGRPリセプターがアデニレートサイクレーズ (AC) 活性化GTP結合蛋白 (Gs) とカップリングしている可能性が示唆される。そこで本研究においては、ラット肝細胞膜におけるCGRPのAC活性化作用とそれに対するGTP結合蛋白の関与について検討した。

（方 法）

ラット肝細胞膜の作製：体重300～400 gのSD系雄ラットより肝臓を摘出し、速やかにHEPES緩衝液 (PH7.4) 中でホモジナイズした。ホモジネートをガーゼで濾過し、42.5～48.2%ショ糖勾配にかけて取り出した後、HEPES緩衝液中に懸濁して肝細胞膜分画を得た。蛋白含量はLowry法で測定した。

リセプター結合実験：リセプター結合リガンドとして (Tyr⁰) ラットCGRPをクロラミンT法

にてヨード化した（特異的放射活性は2000 Ci/mmol）。25 pMのリガンドと200 μ gの肝細胞膜分画を、5mM MgCl₂の存在下および非存在下で種々のヌクレオチドと共に24℃で60分間インキュベートした後、10,000 gで1分間遠沈し、その上清を捨てペレットのカウントを測定した。特異的結合は全カウントより非特異的結合（1 μ MのラットCGRP存在下で同様に得たカウント）を差し引いて求めた。Scatchard解析は、1.5~770 pMの種々の濃度のリガンドを1 μ M GTPの存在下又は非存在下で肝細胞膜と結合させて行なった。さらにリセプターからの解離に対するヌクレオチドの影響を検討した。すなわち、60分間の通常のインキュベーション後遠沈して得たペレットを25 mlの新鮮な緩衝液に再び混和し、100 μ MのGTP又は非水解性GTPアナログであるGTP γ Sの存在下又は非存在下で種々の期間4℃でインキュベートしたのち遠沈し、ペレットに残存するカウントを測定して解離率を比較した。

AC活性の測定：AC活性は、肝細胞膜およびラットCGRP（又はサケ・カルチトニン）を基質であるATPと共に25mM トリス緩衝液（PH7.6）中で10分間37℃でインキュベートし、上清中に放出されるcAMPをRIAで測定することにより算定した。尚AC活性のGTP依存性を検討するため、100 μ M GTPの存在下および非存在下で実験を行なった。

（結 果）

肝細胞膜におけるAC活性：100 μ MのGTPの存在下で1pM~10nMのラットCGRPは肝細胞膜におけるAC活性を 9.1 ± 0.5 pmol/ protein.minより 26.8 ± 0.7 pmol/mg protein.minまで濃度依存性に上昇させた。この作用は10nMのヒトグルカゴン（ 62.2 ± 2.4 pmol/mg protein.min）よりは弱かったが、1 μ Mのアドレナリン（ 21.2 ± 1.4 pmol/mg protein.min）よりも強力であった。さらにAC活性を最大値の50%上昇させるCGRP濃度は17.8pMで、我々が以前に報告した標識CGRPの肝細胞膜への結合を50%阻害する非標識ラットCGRP濃度である10.5pMとよく一致した。また0.1~1 μ Mのサケ・カルチトニンもAC活性を上昇させたが、その効果はラットCGRPの1万分の1と弱かった。一方GTP非存在下では、ラットCGRPおよびサケ・カルチトニンによるAC活性上昇作用はGTP存在下に比して著明に低下した。

標識CGRPの肝細胞膜への結合：標識CGRPの肝細胞膜リセプター結合に及ぼす各種ヌクレオチドの影響を検討するために、5mMのMgCl₂存在下で種々のヌクレオチドを添加してリセプター結合実験を行なった。その結果、0.1 μ M~0.1mMのGTPとGTP γ Sは濃度依存性に肝細胞膜への標識CGRPの結合を抑制したが、ATPは効果が無かった。一方GTPによる標識CGRPのリセプター結合抑制効果はMgイオン非存在下では著明に低下した。またScatchard解析により、このGTPによるリセプター結合の抑制は主に親和性の低下によるものであることが明らかとなった。さらにGTPおよびGTP γ Sの添加により、肝細胞膜に結合した標識CGRPは5分間で70%が解離し、対照群の9%と比較して著明に促進していた。

(考察および結論)

本研究の結果から、CGRPはラット肝細胞膜においてAC活性を濃度依存性に上昇させることが明らかとなった。しかもAC活性を50%上昇させるラットCGRP濃度は17.8pMと非常に生理的であり、且つ標識CGRPの肝細胞膜への結合を50%阻害する非標識ラットCGRP濃度(10.5pM)とよく一致していた。このことはCGRPがレセプターに結合することによりAC活性を上昇させ、セカンドメッセンジャーとしてのcAMPの生成を促進する可能性を強く示唆している。一方本実験ではサケ・カルチトニンによっても高濃度でAC活性の上昇が認められた。以前に我々は、非標識サケおよびヒト・カルチトニンが標識CGRPの肝細胞膜への結合を高濃度で阻害するものの標識ヒト・カルチトニンは肝細胞膜に結合しないことを報告しており、従って肝ではサケ・カルチトニンもCGRPレセプターに結合してAC活性を上昇させる可能性が考えられる。

さて一般的にアゴニストとレセプターの結合によりAC活性化される場合、まずその反応には刺激性のGTP結合蛋白(Gs)が介在すると考えられている。すなわちレセプターは非刺激下ではGDPと結合したGsとカップリングしているが、レセプターの活性化によりGsの α サブユニット上のGDPがGTPと置換され、さらに β および γ サブユニットと分離することによりACを活性化する。またこの時GTPとGsの α サブユニットの結合にはMgイオンが必要であると報告されている。今回の我々の肝細胞膜分画を用いた実験においても、CGRPによるAC活性化にはGTPの添加が必須であった。さらにGTPを加えておそらくGTP結合型Gsの状態にすると、CGRPレセプターの親和性は低下し、結合したCGRPの解離が促進され、またこのようなGTPのCGRPレセプターに対する効果はMgイオンに依存性であった。

以上の結果は β アドレナージックリセプター等現在までに明らかとなっているGsが関与するレセプターの成績と全く合致している。これらのことから、ラット肝細胞膜にはGsとカップリングしているCGRPレセプターが存在し、アゴニストとの結合によりAC活性を上昇させると考えられた。従ってCGRPがcAMP上昇の結果、例えばグルカゴンの様にグリコーゲン分解や糖新生などの血糖上昇作用を肝細胞において発現するか否かは、今後の研究で明らかにされるべきである。

論文審査の結果の要旨

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) は37のアミノ酸から成るペプチドであって、核酸プロセシングの過程から calcitonin との関連で予測発見されたユニークなペプチドであり、広く中枢及び末梢神経系に分布する他、血管・消化管・脾臓・肝臓等に対する作用が指摘されている。平滑筋や脾上皮細胞ではCGRPはアデニレートサイクレーズを活性化しサイクリックAMPを生成することが指摘されているが、肝におけるCGRPの作用機序は明きらかでないので、本研究者はラット肝プラスマ膜におけるCGRPの受容体の証明につづいてその情報伝達機序について検討した。

pilakis法によってラット肝細胞プラスマ膜を得、25pMの ^{125}I -[Tyr 0]ラットCGRPと200Mg

の膜蛋白を500 μ lの反応液中で、非標識ラット CGRP 又はカルチトニンと反応させて結合度を測定した。アデニレートサイクレス活性は堅田・宇井の方法で測定した。

100 μ M の GTP 存在下ではラット CGRP はアデニレートサイクレス活性を用量依存性に亢進させ 17.8 ± 0.3 pM の CGRP で最大活性が得られた。同様のアデニレートサイクレスの活性を得るためには10000倍のカルチトニンを必要とした。GTP 非存在下では CGRP の作用は著明に低下した。又 GTP とその非水解誘導体である GTP γ S は 125 I - [Tyr⁰] ラット CGRP の肝プラスマ膜との結合を容量依存性して減少させた。この様な結合抑制効果はマグネシウムイオンの除去によって著明に減少した。又 GIP 又は GTP γ S は肝プラスマ細胞膜と結合した 125 I - [Tyr⁰] ラット CGRP の解離を促進した。

即ちラット CGRP はラット肝細胞プラスマ膜のアデニレートサイクレス活性化系を介し Gs の作用を必要とすることが明きらかとなった。CGRP は消化管の広い範囲に分布しており、門脈を介して肝に達することは容易である。従って肝は CGRP の標的器官として重要であり、更に肝細胞におけるサイクリック AMP の産生はグリコーゲン分解や糖新生の上に重要である。

CGRP の肝に対する作用の生理的な意義は明きらかでないが、 β_2 アゴニストによる高血糖を増強したとの報告があり糖代謝調節に何等かの関連を有する可能性がつよい。

以上本研究者は従来殆ど行われなかった CGRP の肝に対する作用機序についての検討を行い、重要な新知見を得たものであって価値ある集積と考えられる。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると考えられる。