

プロスタグランディン $F_2\alpha$ とゴナドトロピン放出ホルモン によるラット黄体細胞の刺激と細胞代謝応答の機構

渡辺 広史 田中 昭一

札幌医科大学産婦人科学講座 (主任 橋本正淑 教授)

佐々木 洋子*

札幌医科大学生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

Mechanism of Cellular Metabolic Responses of Cultured Rat Luteal Cells to Stimulation with Prostaglandin $F_2\alpha$ and Gonadotropin Releasing Hormone

Hiroshi WATANABE and Shoichi TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. M. Hashimoto)

Hiroko SASAKI*

Department of Biochemistry (Section I), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Akino)

ABSTRACT Cellular metabolic responses, determined as the indications of inositol phosphate (IPs) formation, arachidonic acid release and intracellular Ca^{2+} concentration, to stimulation with prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) or gonadotropin releasing hormone (GnRH), were studied in monolayer-cultured rat luteal cells which maintained a function of progesterone production and secretion. The results were as follows:

1. In 5 day-old luteal cells, IPs formation, i. e., activation of phospholipase C, was significantly enhanced by stimulation with $PGF_2\alpha$ or GnRH. Arachidonic acid release, i. e., activation of phospholipase A_2 , was also stimulated by these agonists. The agonist stimulation of [^{14}C] glycerol-labeled cells induced a marked decrease in the labels of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylinositol (PI), and concomitantly an increase in lyso-phosphatidylcholine and lyso-phosphatidylinositol. In mepacrine-pretreated cells, arachidonic acid release from the cells was significantly decreased. Thus, arachidonic acid release from luteal cells by stimulation with $PGF_2\alpha$ or GnRH seems to be mainly derived from PC and PI by the action of phospholipase A_2 .

2. In 9 day-old luteal cells, IPs formation and intracellular Ca^{2+} were not enhanced by GnRH stimulation, while, in contrast, arachidonic acid release was enhanced in the cells. These findings indicate that the degradation of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate to inositol triphosphate and diacylglycerol may not be essential in the activation of phospholipase A_2 , and the activation of phospholipase A_2 and phospholipase C by GnRH stimulation may occur independently.

3. In experiments with GTP γ S added to saponin-permeabilized cells, it was demonstrated that G protein might be involved in the activation of phospholipase C and phospholipase A_2 induced by stimulation of $PGF_2\alpha$ or GnRH. Pertussis toxin (IAP) treatment of luteal cells, which induced ADP-ribosylation of 41K membrane protein, did not block the stimulation effects. Therefore, G proteins

* 現所属: 札幌医科大学癌研究所生化学部 (主任 佐々木輝捷教授)

other than Gi may be involved in the activation of the phospholipases.

(Received October 3, 1989 and accepted November 16, 1989)

Key words: Luteal cells, Phospholipase C, Phospholipase A₂, Prostaglandin F_{2α}, Gonadotropin releasing hormone

1 緒 言

黄体機能の維持と退縮には種々の因子が関与し、黄体刺激因子 (luteotropin) と黄体退縮因子 (luteolysin) によって調節されているが、黄体寿命の直接的調節因子としては、退縮因子がより重要とされている¹⁾。ラット黄体に対し luteolytic に作用する因子としては、プロスタグランジン F_{2α} (PGF_{2α}) とゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) がよく知られている²⁻⁷⁾。PGF_{2α}, GnRH の受容体はラット黄体細胞に存在することが証明されており^{8,9)}、また PGF_{2α} 及び GnRH がラット黄体に直接作用してイノシトールリン脂質の代謝回転を亢進することが報告されている¹⁰⁻¹⁴⁾。またラット黄体細胞で、phospholipase A₂ の作用により主にホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルイノシトール (PI) からアラキドン酸が遊離することが知られている¹⁵⁾。山本ら¹⁵⁾ はラット黄体細胞においてホルボールエステル (PMA) と Ca²⁺ イオノフォア A23187 の組合せがアラキドン酸遊離を促進することを報告した。このことは phospholipase C によりイノシトールリン脂質が最初に分解し、その結果アラキドン酸遊離が二次的に起こる可能性を示唆するものであった。今回我々は、ラット黄体単層培養細胞を用いて、黄体退縮作用を持つといわれる PGF_{2α} と GnRH の刺激が、アラキドン酸遊離とイノシトールリン脂質の水解反応を引き起こすことを確かめた。さらに、細胞代謝応答の機構に関して phospholipase A₂ の活性化が phospholipase C による phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) の加水分解に続いて起こる二次的な反応であるのか否かを検討した。すなわち、本研究は黄体機能抑制因子としての PGF_{2α}, GnRH の黄体細胞への刺激と、それに伴って起こる細胞内代謝応答の機構を解析する目的で行われた。

2 実験方法

2.1 実験材料

実験動物は、人工照明 (午前7時—午後7時) 下に固形飼料及び水を自由に摂取させた26日齢のSprague-Dawley 系雌ラットを用いた。myo-[2-³H]イノシトール

(15.8 Ci/mmol), [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H]アラキドン酸 (83.6 Ci/mmol) および [2-¹⁴C] グリセロール (15.0 mCi/mmol) は New England Nuclear 社より購入した。199 培地, Eagle's MEM 培地は日本製薬社製, Ca²⁺-free MEM, 牛胎仔血清 (FBS) は GIBCO 社製, パーコルは Pharmacia 社製, Type I dispase は合同酒精社製を使用した。Type I collagenase, fatty acid-free 牛血清アルブミン (BSA), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), quina-crine dihydrochloride (mepacrine) は Sigma 社, Ca²⁺ イオノフォア A23187 (A23187) は Calbiochem-Behring 社, Guanosine-5'-o-(3-thiotriphosphate) tetralithium salt は Boehringer Mannheim Yamanouchi, [D-Ala⁶, Des-Gly¹⁰]-GnRH ethyl amide (GnRH_a), [D-Phe², Pro³, D-Phe⁶]-GnRH (GnRH antagonist I), [D-pGlu¹, D-Phe², D-Trp^{3,6}]-GnRH (GnRH antagonist II), は Peninsula Laboratories, Inc. より, pertussis toxin (islet activating protein, IAP) は科研製薬より購入した。PGF_{2α} は小野薬品より, 血清性性腺刺激ホルモン (セロトロピン[®]), 胎盤性性腺刺激ホルモン (ゴナトロピン[®]), human chorionic gonadotropin (hCG, 6450 IU/mg) は帝国臓器より提供を受けた。コールドキャリアーに用いたリン脂質は、当教室でラット肝臓、肺臓より調製したものをを用いた。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

2.2 ラット黄体細胞の分離と培養

26日齢幼雌ラットにセロトロピン[®] 50 IU を皮下注射し多数の卵胞を发育させ、64時間後にゴナトロピン[®] 25 IU を皮下注射し過排卵させた。ゴナトロピン[®] 投与2日目には黄体のみられ、黄体1日齢とし、2日目と6日目にエーテル麻酔下に断頭屠殺し無菌的に出来る限り周辺組織が混入しないように黄体化した卵巣を摘出した。Luborsky and Behrman¹⁶⁾ の変法である山本らの方法¹⁵⁾ に準じて黄体細胞の初代培養を行った。

2.3 培養黄体細胞の検定

培養黄体細胞の0.5% trypan blue 生体染色による細胞生存率は、実験期間中つねに90%以上であった。また細胞数は、0.25%トリプシン-0.02% EDTA 溶液

で細胞をdishより剥離しカウントした。Culture dish 当たり 5.0×10^5 個の割合で培養した黄体細胞数は培養日数の経過とともに増加し、培養4日目にはほぼ confluent (約90%) に達し、 7.0×10^5 cells/dish であった。培養4日目に、亀井の方法¹⁷⁾を用いて 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) 活性を有する細胞を染色した。陽性細胞の占める割合は70~80%であった。黄体細胞の特徴である脂肪顆粒が細胞内に多数認められた。5日齢及び9日齢の黄体細胞と培養液中の lactate dehydrogenase (LDH) 活性を Fanestil らの方法¹⁸⁾で測定した。両日齢ともに細胞の LDH 活性に対する培養液中の LDH 放出 (%LDH 放出) は3%以下であり培養期間中の細胞障害はないと思われた。5日齢黄体とは、黄体1日齢(ゴナドトロピン®投与後2日目)に培養に移し更に4日間培養した場合であり、9日齢黄体とは、黄体5日齢に培養し移し更に4日間培養した場合とした。なお特に記載のない場合には5日齢黄体細胞を用いた実験である。

2.4 黄体細胞への fura-2 の取り込みと蛍光測定

細胞質内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は Gryniewicz の方法¹⁹⁾ に準じて suspended cell で fura-2/AM を用い、日立製の 650-10 形分光蛍光光度計を使用し、二波長励起蛍光測光法によって測定した。

2.5 [³H]イノシトール, [¹⁴C]グリセロール及び [³H]アラキドン酸による培養黄体細胞の標識

培養2日目の黄体細胞を $5 \mu\text{Ci/ml}$ の myo-[2-³H]イノシトールを含む10% FBS-M199 培地で2日間標識した。アラキドン酸標識の場合は [³H]アラキドン酸を少量のエタノールに溶解し培養液に添加した。培養液中のエタノール濃度は0.1%以下とした。 [³H]アラキドン酸による標識時間は長尾の方法²⁰⁾に従い4時間とした。グリセロール標識の場合には $0.1 \mu\text{Ci/ml}$ の [¹⁴C]グリセロールを培養液に添加し、2日間標識した。

2.6 標識黄体細胞の neomycin, PMA, IAP, 及び mepacrine 処理

myo-[2-³H]イノシトール標識黄体細胞の場合、上記の方法で細胞標識後0.1% BSA 及び10 mM LiCl を含む Hepes-buffered saline (HBS) で、また [³H]アラキドン酸標識細胞の場合は0.1% BSA fatty-acid free (FAF) HBS で3回洗浄し、細胞に取り込まれていない [³H]イノシトール、あるいは [³H]アラキドン酸を除去した後、種々の刺激物質を培養液中に添加した。刺激物質は0.1% BSA-HBS (LiCl) に溶解させた PGF₂α, GnRHa をイノシトール代謝実験に、また

0.1% BSA (FAF) HBS に溶解した PGF₂α, GnRHa をアラキドン酸代謝実験に用いた。IAP (100 ng/ml) は10% FBS-M199 培地に加えて24時間前処理した。Neomycin (1 mM) は15分間、PMA (200 nM) は30分間、mepacrine は30分間、同様の培地に加えてそれぞれ前処理した。上記の刺激物質溶液1.0 ml をdishに加えて反応を開始させ、37°Cでインキュベートした。一定時間後dishから刺激物質を吸引除去し、dishを氷水中で冷却することにより反応を停止した。対照は刺激物質を加えないものを用いた。アラキドン酸はクロロホルム/メタノール(2:1, V/V)によるFolch法²¹⁾にて抽出した。刺激後蓄積した [³H]イノシトールリン酸(IP, IP₂, IP₃の総合)濃度は、Hasegawa-Sasaki らの方法²²⁾に準じ、AG1-X8 カラムによるクロマトグラフィーにて分離し測定した。

2.7 細胞脂質の抽出と分析

単層培養黄体細胞にメタノールを1.0 ml 加えた後パーボリスマンで剥離、この剥離細胞とメタノールの混液にクロロホルムを加えクロロホルム/メタノール(2:1, V/V)としFolchの方法²¹⁾で全脂質を抽出した。脂質抽出液にコールドキャリアー脂質を加えた後、個々のリン脂質は二次元薄層クロマトグラフィー(TLC)²⁰⁾で分離した。展開終了後、ヨウ素蒸気で各脂質を検出し、スポット部位のゲルを掻きとり、バイアルへ移しACS-II 10 ml を加えた後、放射活性を測定した。

2.8 黄体細胞のサポニン処理と GTPγS の添加

2.8.1 イノシトールリン酸の産生

実験液(pH 7.4)の組成は、20 mM Hepes, 110 mM KCl, 10 mM LiCl, 1 mM EGTA, 0.5 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂, 5 mM potassium succinate, 5 mM potassium pyruvate, 2.5 mM ATP, 2 mg/ml BSA とし、サポニン (Sigma 社) 濃度は $50 \mu\text{g/ml}$ とした。培養液吸収除去後、0.1% BSA-HBS (LiCl) で3回洗浄、細胞を剥離し、上記のサポニン添加実験液に加えて37°C, 5分間インキュベートした。洗浄後、100 μM GTPγS を加えたものと加えないもので添加実験を行った。反応はクロロホルム/メタノール(1:2, V/V)で停止し、IP, IP₂, IP₃ を AG1-X8 カラムによるクロマトグラフィーにて分離し測定した²²⁾。

2.8.2 アラキドン酸代謝

実験液(pH 7.4)の組成は、20 mM Hepes, 120 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.5 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂, 5 mM potassium succinate, 5 mM potassium pyruvate, 2.5 mM ATP, 2 mg/ml BSA とし、サポニンは $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度を用いた。培養液除去後、

0.1% BSA-HBS (LiCl)で洗浄し細胞を剥離, これをサポニン添加実験液に加えて37°C, 5分間インキュベートした. 洗浄後, 100 μ M GTP γ Sを加えたものと加えないもので実験を行った.

2.9 黄体細胞のADP-リボシル化とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

ラット黄体培養細胞 (7.0×10^5) を10% FBS-M199培養液中で IAP 50 ng/ml を加えたものと加えないものを37°C, 5% CO₂, 95% air で24時間培養した. それぞれ細胞をラバーポリスマンで剥離し, 超音波破碎後, 4°Cで100,000 \times g, 10分間遠心を行い沈渣を膜画分として回収した. 沈渣を20 mM thymidine (Sigma社), 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 10 μ M [³²P]-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (26 Ci/mmol) (New England Nuclear社), 0.2 M GTP, 2 mM ATP, 4 mM DTT を含む0.2 M Tris-HCl (PH 8.0)溶液 150 μ l に懸濁し, 3 μ g IAPを加えて37°Cで60分間インキュベートしADPリボシル化反応を行った. ADPリボシル化が行われた試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル(PAGE)で分離した. SDS-PAGEはLaemmliの方法²³⁾で行った. 泳動終了後の乾燥ゲルをフジX線フィルムに感光させ autoradiogram を得

た.

2.10 その他の分析法

放射活性はACS-IIを用い液体シンチレーションカウンター (Beckman社, LS-9000)で測定した. 統計処理はStudentのt-testにより行いp<0.01を有意差ありとした.

3 成 績

3.1 PGF₂ α 及びGnRH α 刺激によるイノシトールリン酸の産生 (phospholipase Cの活性化)

3.1.1 PGF₂ α 及びGnRH α によるイノシトールリン酸産生の基礎的検討

[³H]イノシトール標識5日齢黄体細胞におけるイノシトールリン酸産生に対するPGF₂ α , GnRH α の濃度依存性を検討した (Fig. 1, A). PGF₂ α , GnRH α 刺激で両者とも10 nM以上の濃度において有意な全イノシトールリン酸(IP₁, IP₂, IP₃)放射活性の産生を認めた. さらにPGF₂ α 100 nM, GnRH α 100 nMでそれぞれ刺激した時イノシトールリン酸の産生は, 刺激時間5分で有意に増加し, 30分でその産生はプラトーに達した (Fig. 1, B). この結果, 以下の [³H] イノシトール標識黄体細胞の実験にはPGF₂ α , GnRH α の濃度はそれ

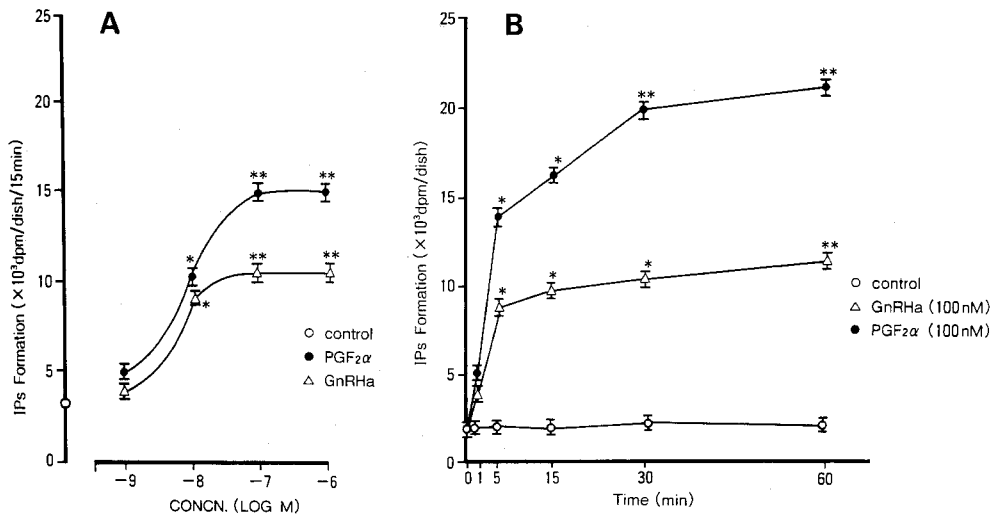


Fig. 1 Effect of the concentration of PGF₂ α or GnRH α (A) and time course (B) on the formation of inositol phosphates in cultured rat luteal cells.

A: Cultured luteal cells were pre-labeled with [³H] inositol for 48h. After thorough washing and an initial 15-min incubation period, the cells were incubated for a further 15 min in the absence (control) or presence of increasing concentrations of PGF₂ α or GnRH α .

B: [³H] inositol-pre-labeled cells were incubated in the absence (○) or presence of PGF₂ α (100 nM) (●) or GnRH α (100 nM) (△) for the indicated times.

The values shown are means \pm S. E. M. of triplicates.

* p<0.01 vs Control

** p<0.001 vs Control

ぞれ 100 nM とし、刺激時間は 15 分間を用いることにした。

3・1・2 PGF₂α及びGnRHa 刺激によるイノシトールリン酸産生に対する neomycin, PMA, IAP 及び細胞外 Ca²⁺ の影響

黄体細胞培養 4 日目に phospholipase C 活性を抑制することが知られている neomycin 1 mM で 15 分間前処理し、PGF₂α, GnRHa によるイノシトールリン酸の産生をみたが、抑制はみられなかった。また、PMA (200 nM) で 30 分間前処理した場合も PGF₂α, GnRHa によるイノシトールリン酸産生作用には抑制がみられなかった。IAP (100 ng/ml) で 24 時間処理した黄体細胞の場合、PGF₂α, GnRHa 受容体を介した phospholipase C 作用に影響は認められなかった。次いで、細胞外 Ca²⁺ の影響を検討するため、細胞外 Ca²⁺ free 液を作製しイノシトールリン酸の産生を検討したが、細胞外 Ca²⁺ free の状態でも、黄体細胞は PGF₂α, GnRHa の刺激に対してイノシトールリン酸を産生した。

3・2 PGF₂α及びGnRHa 刺激によるアラキドン酸の放出 (phospholipase A₂ の活性化)

3・2・1 アラキドン酸放出の基礎的検討

[³H]アラキドン酸標識黄体細胞からのアラキドン酸放出における PGF₂α, GnRHa, GnRH antagonist の

濃度依存性を検討した (Fig. 2, A). アラキドン酸の放出増加は、三者ともに 10 nM で対照に対して有意となり、100 nM でプラトーに達した。次に、PGF₂α 100 nM, GnRHa 100 nM, GnRH antagonist 100 nM でそれぞれ刺激した時に放出されるアラキドン酸の時間的推移を検討した (Fig. 2, B). Medium の [³H]アラキドン酸放射活性は、刺激時間 15 分で対照と比べ有意に増加し、その後徐々に 60 分まで上昇傾向にあった。この結果より、黄体細胞からの [³H]アラキドン酸放出実験においては、PGF₂α, GnRHa それぞれ 100 nM で、15 分間刺激する条件が用いられた。この条件で [³H]アラキドン酸標識黄体細胞を刺激した時、両刺激により細胞外へ放出される [³H]活性の 92~94% がアラキドン酸で、PGE₂, PGF₂α などのアラキドン酸代謝産物への変換は極めて少なかった。

3・2・2 PGF₂α及びGnRHa 刺激によるアラキドン酸放出に対する IAP, PMA 及び mepacrine の影響

培養黄体細胞に IAP (100 ng/ml) を加えて 24 時間処理した後、PGF₂α (100 nM), GnRHa (100 nM) で 15 分間刺激したが、アラキドン酸放出は抑制されなかった。培養 4 日目に PMA (200 nM) で 30 分間前処理しても PGF₂α, GnRHa によるアラキドン酸放出の

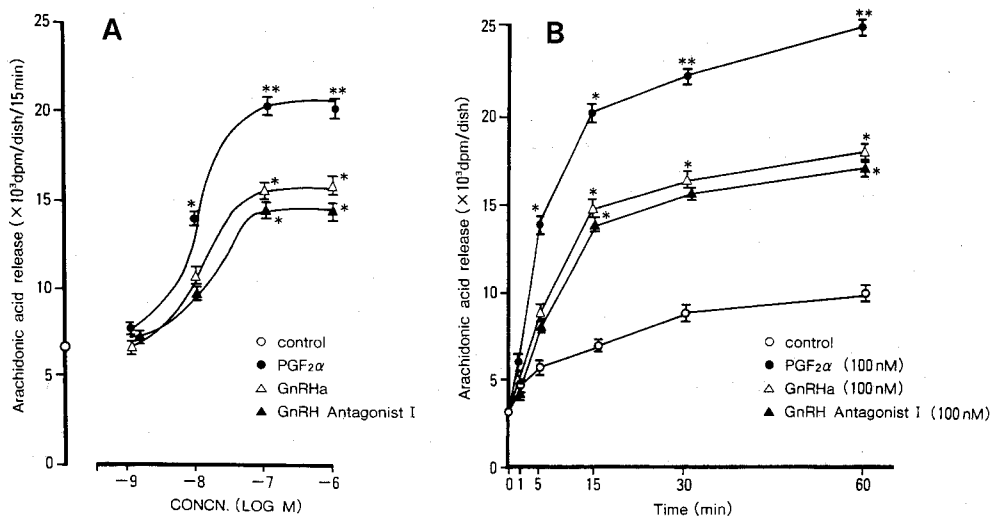


Fig. 2 Effect of the concentration of PGF₂α, GnRHa or GnRH antagonist I (A) and time course (B) on release of [³H] arachidonic acid from cultured rat luteal cells.

A: [³H] arachidonic acid-prelabeled cells were incubated in the absence (○) or presence of increasing concentrations of PGF₂α (●), GnRHa (△) or GnRH antagonist I (100 nM) (▲).

B: Time course of [³H] arachidonic acid release from cultured rat luteal cells induced by stimulation with PGF₂α (100 nM), GnRHa (100 nM) or GnRH antagonist I (100 nM).

The values shown are means ± S. E. M. of triplicates.

* p < 0.01 vs Control ** p < 0.001 vs Control

抑制はみられなかった。しかし, phospholipase A₂ 活性抑制物質として知られる mepacrine (100 μM) で 30 分間前処理した黄体細胞の培養液に, PGF_{2α} (100 nM), GnRHa (100 nM), GnRH antagonists (100 nM) をそれぞれ添加し 15 分間インキュベートするとアラキドン酸の放出は全ての場合で mepacrine 処理により有意に抑制された (Fig. 3)。

3・2・3 [¹⁴C]グリセロール標識黄体細胞の PGF_{2α}, GnRHa 刺激によるリゾ型リン脂質の変化

[¹⁴C]グリセロール標識黄体細胞を培養液のみでインキュベートした時の PC, PE, PI 値をそれぞれ対照として比較した時, PGF_{2α}, GnRHa 刺激で PC, PI は減少し Lys-PC, Lys-PI が増加した (Fig. 4)。この結果から, PGF_{2α} と GnRHa の刺激により phospholipase A₂ が活性化され, 主に PI と PC よりアラキドン酸が遊離されたことが示唆された。

3・3 PGF_{2α} 及び GnRHa の刺激による細胞内遊離 Ca²⁺ の動員

Fig. 5 に示すように 5 日齢黄体では PGF_{2α} (100 nM), GnRHa (100 nM) に反応して明らかに蛍光強度の上昇が認められた (Fig. 5, A, B, C) が, 9 日齢黄体では 5 日齢黄体で見られたこの GnRHa の反応が認められなかった (Fig. 5, D)。しかし, これに A23187 を添加すると, 蛍光強度は著しく上昇した。

3・4 GnRHa, GnRH antagonist の刺激による phospholipase C と phospholipase A₂ 活性化の相違

Table 1 に示すように, 5 日齢黄体細胞を用いた時, イノシトールリン酸の産生とアラキドン酸の放出は, PGF_{2α} (100 nM) あるいは GnRHa (100 nM) の細胞刺激でともに有意に上昇した。しかし, GnRH antagonist I, II の刺激ではイノシトールリン酸の産生とアラキドン酸の放出に異なった反応が認められた。すなわち, 両 antagonist でイノシトールリン酸の産生はともに抑制されたが, アラキドン酸の放出は有意に上昇した。この結果は, phospholipase C の活性化によるイノシトールリン酸の産生が起ころなくとも, phospholipase A₂ が活性化されてアラキドン酸放出が起こることを示している。一方 5 日齢黄体では, イノシトールリン酸の産生とアラキドン酸の放出がともに認められた GnRHa (100 nM) の作用が, 9 日齢黄体ではイノシトールリン酸の産生はないが, アラキドン酸産生は有意に上昇することが認められた。この結果は, 9 日齢黄体細胞の GnRHa 受容体を介する phospholipase A₂ の活性化が phospholipase C と独立して発現していることを示唆し

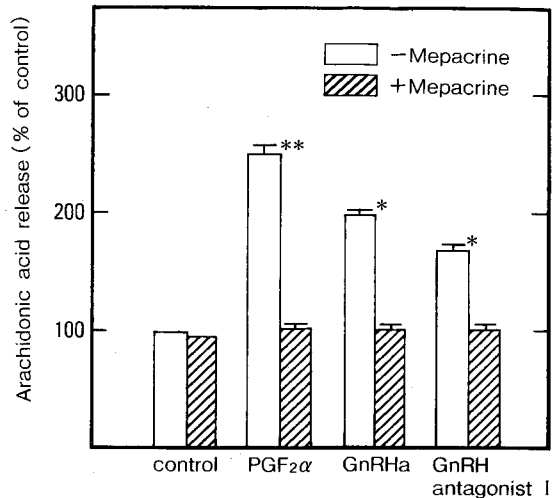


Fig. 3 Effect of mepacrine-pretreatment on arachidonic acid release from cultured rat luteal cells when stimulated by PGF_{2α}, GnRHa or GnRH antagonist I. Luteal cells were preincubated for 15 min in the presence or absence of mepacrine (200 μM) and then incubated for 15 min with PGF_{2α} (100 nM), GnRHa (100 nM) or GnRH antagonist I (100 nM). The value of (%) arachidonic acid release obtained in the absence of mepacrine and any antagonists is taken as a unity (100). The values shown are means ± S. E. M. of triplicates.

* p < 0.01 vs Control

** p < 0.001 vs Control

ている。またこの実験から GnRH 受容体には phospholipase C に情報を伝達しているものと phospholipase A₂ に情報伝達を行うものの少なくとも二種類が存在することも判明した。

3・5 G 蛋白質の関与に関する検討

3・5・1 サポニン処理黄体細胞における GTPγS の作用

サポニン処理黄体細胞を得るためのサポニン至適濃度をまず検討した。サポニン濃度 50 μg/ml の時, medium 中と細胞内のイノシトールリン酸の放射活性はほぼ等しくなり, しかもこの条件で得られた黄体細胞は PGF_{2α} (100 nM), GnRH (100 nM) の刺激に反応しイノシトールリン酸の産生がみられた。 [³H]イノシトールリン酸あるいは [³H]アラキドン酸標識黄体細胞をこの条件でサポニン処理し, 得られた細胞浮遊液に PGF_{2α} (100 nM), GnRHa (100 nM) あるいは GnRH antagonist I 及び II を添加した時と, これにそれぞれ GTPγS (100 μM) を添加した時におけるイノシトールリン酸産生とアラキドン酸放出を比較検討し

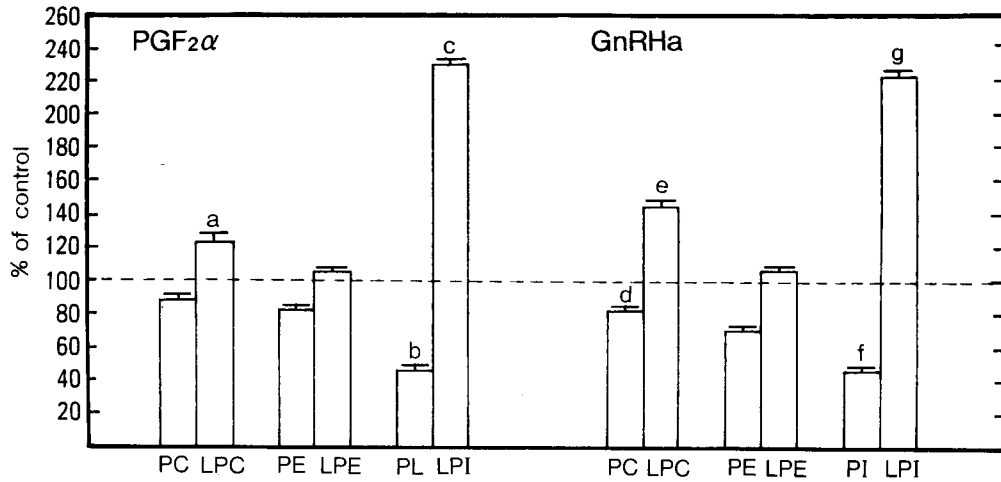


Fig. 4 Changes in radioactivity of individual phospholipids 15 min after stimulation with PGF₂α or GnRHα to rat luteal cells prelabelled with [¹⁴C] glycerol.

The experiment was performed as described in the material and methods section. HEPES-buffered saline (1.5 ml) containing 0.1% fatty acid-free bovine serum albumin was added to confluent cell monolayers, in 35 mm dishes, which had been labelled with [¹⁴C] glycerol for 48h. After preincubation at 37°C for 30 min, PGF₂α, GnRHα or vehicle (control) was added and the cell monolayers were incubated at 37°C for another 15 min. Lipids were extracted and analysed by TLC as described in the material and methods section. Each value is the mean ± S. E. M. of triplicates.

^{a,c,g} Significantly greater ($p < 0.01$) than control.

^e Significantly greater ($p < 0.001$) than control.

^{b,f} Significantly less ($p < 0.001$) than control.

^d Significantly less ($p < 0.01$) than control.

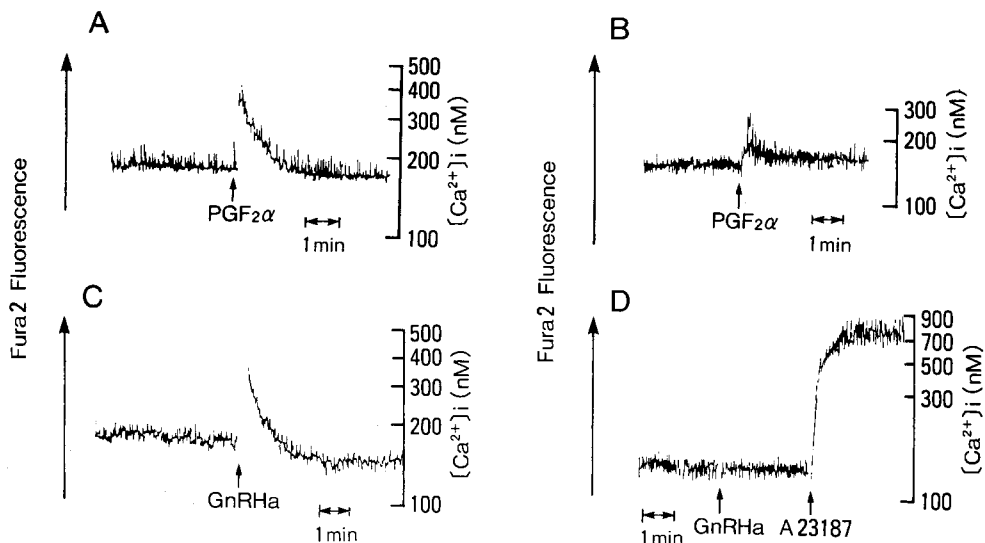


Fig. 5 Effects of PGF₂α or GnRHα on the intracellular free calcium concentration of cultured rat luteal cells. The traces represent the fura 2 fluorescence responses of luteal cell suspension (1.0×10^6 cells/ml) to the addition (indicated by arrows) of PGF₂α (100 nM) or GnRHα (100 nM).

After administration of hCG (25 IU/ml) to PMSG (50 IU/ml)-injected rats, the formation of corpora lutea was observed two days later (1-day-old corpora lutea).

A, C 5-day-old corpora lutea.

B, D 9-day-old corpora lutea.

Table 1 Effect of $PGF_2\alpha$, GnRHa or GnRH antagonists on IP₃ formation and arachidonic acid release in 5-day-old and 9-day-old corpora lutea.

Treatment		Total [³ H] IP ₃ ^a	Arachidonic acid release
		% of control	% of control
5-day-old corpora lutea	PGF ₂ α (100 nM)	342.1±2.3**	249.2±3.2**
	GnRHa (100 nM)	162.9±2.1**	201.5±3.7*
	GnRH antagonist I (100 nM)	79.1±1.5*	171.8±1.1*
	GnRH antagonist II (100 nM)	80.6±1.0*	161.9±4.1*
9-day-old corpora lutea	PGF ₂ α (100 nM)	238.5±1.2**	203.5±8.4*
	GnRHa (100 nM)	82.9±6.8	232.6±1.3**

^a The values were obtained by the summation of [³H] IP₃(IP+IP₂+IP₃) and expressed as a percentage of the control.

Luteal cells were prelabeled with [³H] arachidonic acid for 4h or with [³H] inositol for 48h as described in material and methods. [³H] Arachidonic acid released into the medium was determined after extraction of the medium. [³H] IP₃ formation in the cellular extracts was determined following anion exchange chromatography as described in material and methods. Data are expressed as means±S. E. M. of triplicates.

* p<0.01 vs Control ** p<0.001 vs Control

た (Fig. 6). イノシトールリン酸の産生は PGF₂α, GnRHa のみを添加した時より, これに GTPγS を添加した方が著明に上昇した. また, アラキドン酸の放出は PGF₂α (100 nM), GnRHa (100 nM), GnRH antagonist I 及び II の単独添加よりも, GTPγS を添加した方が有意に高値を示した. この結果から, PGF₂α, GnRH 受容体刺激による黄体細胞のイノシトールリン酸の産生およびアラキドン酸の放出は, GTP 依存性の反応であり, GTP 結合蛋白質の介在が示唆された.

3・5・2 黄体細胞膜 GTP 結合蛋白質の ADP-リボシル化

培養 3 日目の黄体細胞に IAP 50 ng/ml を加えたものと加えないものを作製し, 実験方法の 2・9 に示した方法で [³²P] NAD 存在下に ADP-リボシル化反応を行った後, 細胞を剝離し, 膜画分を分離した. この膜画分蛋白質の SDS-PAGE の autoradiogram を Fig. 7 に示す. IAP 非処理の場合, 分子量 41K 膜蛋白質が, 明らかにラベルされ, IAP で前処理した細胞の膜画分でこのラベルはみられなかった. この分子量 41K 蛋白質は, 他の細胞で報告されている²⁴⁻²⁶⁾ ように GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) の α サブユニットで, 黄体細胞においても G 蛋白質の α サブユニットが ADP-リボシル化されたと考えられる.

4 考 察

ラット黄体細胞に, PGF₂α, GnRH の刺激が加わると, つまりこれらのアゴニストが受容体へ結合すると phospholipase C の活性化が起こり, PIP₂ が分解されて IP₃ の産生が起こることが示された (Fig. 1). IP₃ は小胞体膜から Ca²⁺ を遊離せしめ, 細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇をもたらすといわれている²⁷⁾. 細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は, 単独でカルモジュリン依存性キナーゼを²⁸⁾, またジアシルグリセロール (DG) とともにプロテインキナーゼ C を活性化する^{29,30)}. さらに phospholipase C 活性化による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は, キナーゼ C を活性化すると同時に phospholipase A₂ を活性化することが報告されている³¹⁻³⁴⁾. 山本ら¹⁵⁾ は, ラット培養黄体細胞において, PMA はキナーゼ C を介して phospholipase A₂ を活性化している可能性を示している. しかし一方, phospholipase A₂ の活性化は phospholipase C の活性化と独立に発現し得る例も報告されている³⁵⁾. Neomycin は PI-特異的 phospholipase C 活性を抑制し, エイコノサイド合成に影響を与えず, 選択的に PIP₂ の分解を抑制すると報告されている³⁶⁻³⁸⁾. しかし, ラット黄体細胞において, neomycin は PGF₂α, GnRH による刺激反応に対しイノシトールリン酸の産生を抑制しなかった. この結果は, neomycin が phospholipase C 活性を抑制しなかったとする報告³⁵⁾ で示

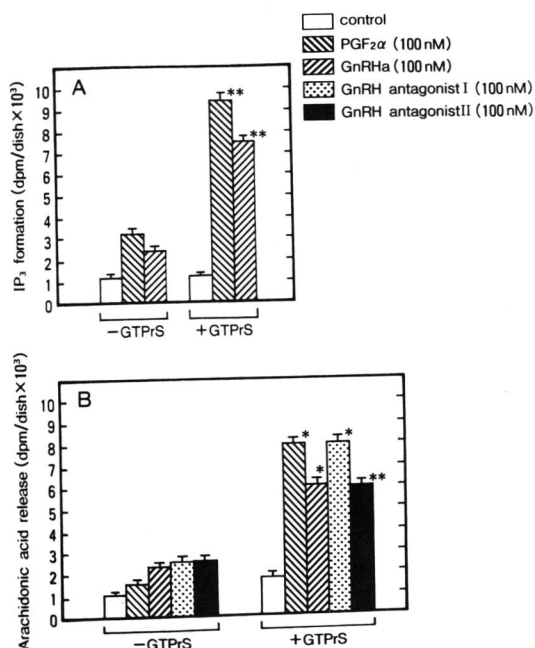


Fig. 6 Effect of GTP γ S on inositol trisphosphate (IP₃) formation (A) and arachidonic acid release (B) from saponin-permeabilized luteal cells when stimulated by PGF₂α, GnRHa or GnRH antagonist I.

Cells were permeabilized with saponin as described under material and methods. Saponin-permeabilized cells were stimulated by PGF₂α, GnRHa or GnRH antagonists for 15 min and GTP γ S (100 μM) was added simultaneously. Values are means ± S.E.M. of triplicates.

The values found in the presence of GTP γ S are significantly greater (*p < 0.01; **p < 0.001) than those found in the absence of GTP γ S.

されたのと同じく、培養黄体細胞ではneomycinが生体膜を通過出来ないためと考えられる。PMAはphospholipase Cに対して抑制的に作用することが報告されている^{39,40}。PMA前処理黄体細胞をPGF₂α, GnRHaで刺激すると、イノシトールリン酸の産生抑制はみられなかった。血管平滑筋細胞において、アンジオテンシンIIによるphospholipase C活性化はPMAで抑制されるが、血小板由来増殖因子(PDGF)によるphospholipase C活性化はPMAで抑制されない⁴¹。したがってキナーゼCによるphospholipase Cへの影響には、抑制的に働く場合と全く抑制しない場合の二つの型があることが、報告されている。ラット黄体細胞の場合には、後者の型に属する反応と考えられる。

ラット黄体におけるアラキドン酸の遊離は、phospholipase A₂の作用によることが山本ら¹⁵により報告

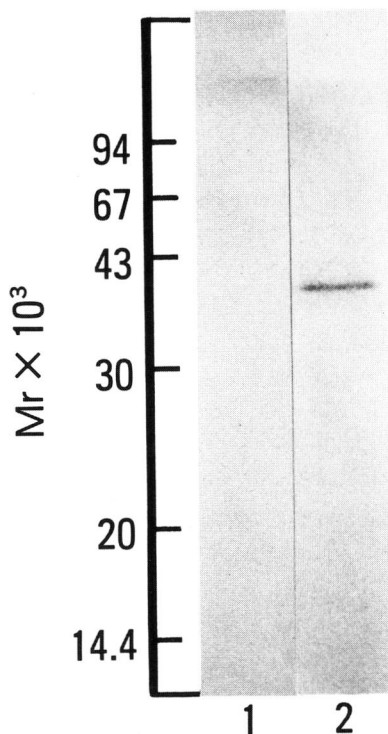


Fig. 7 Autoradiographic analysis of radioactive products resulting from IAP-catalyzed ADP-ribosylation of the membranes of rat luteal cells. Membranes were prepared from rat luteal cells cultured without pertussis toxin (IAP) (lane 2), or from cells cultured with 50 ng/ml IAP for 24h as described under material and methods (lane 1).

IAP-stimulated [³²P] ADP-ribosylation of the membranes was then performed as described under material and methods. An autoradiograph indicating the positions of the molecular weight standards is shown.

されたが、本研究においてもPGF₂α, GnRHa刺激によるアラキドン酸の放出は、phospholipase A₂作用によって、主としてPC, PIからもたらされることが示された(Fig. 4)。Phospholipase A₂の活性化にG蛋白質が関与している可能性は好中球⁴²、マスト細胞⁴³、甲状腺FRTL5細胞⁴⁴で報告されている。そこで我々は、phospholipase A₂とphospholipase Cの活性化における、G蛋白質の関与と両ホスホリパーゼの独立性について検討した。IAPで前処理しないラット黄体培養細胞では、分子量41Kの蛋白質がADP-リボシル化されたが、IAPで前処理した細胞では41K蛋白質のADP-リボシル化はみられなかった(Fig. 7)。従ってIAPで前処理した細胞におけるGi蛋白質は、すでにADP-リ

ボシル化を受けていると考えられた。このような IAP 前処理を施した黄体細胞を $\text{PGF}_2\alpha$, GnRHa で刺激した時、イノシトールリン酸の産生及びアラキドン酸の放出はともに抑制されずに認められた。このことは、ラット黄体細胞における $\text{PGF}_2\alpha$ 及び GnRHa の刺激による phospholipase C と phospholipase A_2 の活性化は、IAP 処理で遮断されないことを示している。一方、サポニン処理した黄体細胞に、GTP の非水解性アナログである $\text{GTP}\gamma\text{S}$ を添加して $\text{PGF}_2\alpha$, GnRHa の刺激効果を検討した結果、両アゴニスト刺激によりイノシトールリン酸の産生とアラキドン酸放出の亢進はともに認められた (Fig. 6)。すなわち、受容体と phospholipase C 及び phospholipase A_2 の間に何らかの G 蛋白質が介在することが示唆された。IAP 処理で両アゴニストによる phospholipase C, phospholipase A_2 の活性化は遮断されていないので、phospholipase C 及び phospholipase A_2 の活性化には IAP の基質以外の G 蛋白質が関与していると考えられる。最近、IAP 基質とはならず phospholipase C 活性化に関与する G 蛋白質の存在が示されている⁴⁵⁾。

本研究では GnRH 受容体を介する phospholipase C と phospholipase A_2 の活性化機構はともに発現せず、ある条件で異なった発現を示すという興味深い結果が得られている。 $\text{PGF}_2\alpha$ 刺激は、5 日齢、9 日齢ラット黄体で、ともに細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇 (Fig. 5) およびイノシトールリン酸産生 (Table 1) を引き起した。しかし、GnRHa 刺激では、5 日齢ラット黄体では同時に反応するが、9 日齢になると細胞内 Ca^{2+} の上昇 (Fig. 5) 及びイノシトールリン酸産生 (Table 1) も引き起こさないという結果が得られた。しかし、GnRHa 刺激によりイノシトールリン酸の産生を引き起こさなくなった 9 日齢黄体においても、アラキドン酸の放出の促進は認められた。つまり、phospholipase A_2 の活性化には、 PIP_2 の分解は必要ではないと思われた。このことは、9 日齢で GnRH 受容体から phospholipase A_2 への情報伝達は維持されるが、phospholipase C への情報伝達は遮断されることを意味している。また、GnRHa 刺激でイノシトールリン酸の産生とアラキドン酸放出の両反応が明らかに起こる 5 日齢黄体細胞において、二種類の GnRH antagonist はいずれもイノシトールリン酸産生促進を抑制した。しかし、この時アラキドン酸放出の促進作用は抑制せずに維持された。この結果から、GnRH 刺激による phospholipase C の活性化と phospholipase A_2 の活性化とは独立に起こる反応であることが強く示唆された。すなわち、本研究の結果は、

GnRH の受容体には phospholipase C を介して情報伝達する経路と phospholipase A_2 を介して情報伝達する経路の少なくとも二種類が存在すること、そしてこの 2 つの情報伝達系は独自に発現し得ることを示していると考えられた。

5 結 論

単層培養ラット黄体細胞の $\text{PGF}_2\alpha$, GnRHa 刺激における細胞代謝応答の機構をイノシトールリン酸の産生、アラキドン酸の放出および細胞内 Ca^{2+} 濃度に着目して検討し次の結果を得た。

1. 5 日齢黄体細胞で $\text{PGF}_2\alpha$, GnRHa 刺激によるイノシトールリン酸の産生 (phospholipase C の活性化) は増加した。また、アラキドン酸の放出 (phospholipase A_2 の活性化) はこれらのアゴニスト刺激で増加した。 ^{14}C グリセロール標識黄体細胞の $\text{PGF}_2\alpha$, GnRHa 刺激で PC, PI 標識の低下と Lys-PC, Lys-PI の上昇が見られたこと、mepacrine 前処理細胞のアゴニスト刺激でアラキドン酸放出は抑制されたことから、アラキドン酸は主に PC と PI から phospholipase A_2 の作用によって遊離することが判明した。

2. 9 日齢黄体細胞における GnRHa 刺激でイノシトールリン酸の産生及び細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加はなかったが、この時アラキドン酸放出の促進は認められた。また 5 日齢黄体において、GnRH antagonist 刺激でイノシトールリン酸産生の増加はなかったが、アラキドン酸放出は抑制せずに増加した。以上の結果は、phospholipase A_2 の活性化に PIP_2 の分解は必要でないこと、そして GnRHa 刺激による phospholipase C と phospholipase A_2 の活性化は独立に起こる反応であることを示唆した。

3. サポニン処理黄体細胞への $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 添加実験で、 $\text{PGF}_2\alpha$, GnRHa 刺激による phospholipase C 及び phospholipase A_2 の活性化に G 蛋白質が関与していることが示された。この G 蛋白質は IAP 処理で影響を受けず G_i 以外の G 蛋白質の関与が示唆された。

本稿を終えるにあたり御指導御校閲下さいました本学産婦人科講座橋本正淑教授、ならびに本学生化学第 1 講座秋野豊明教授に深謝いたします。さらに、御助言、御教示頂いた当教室員の諸先生、本学生化学第 1 講座の諸先生に感謝いたします。

文 献

1. 高木耕一郎：黄体退縮における $\text{PGF}_2\alpha$ の作用機序

- に関する研究. *日内分泌誌* **64**, 1024-1037 (1988).
2. Behrman, H., Yoshinaga, K. and Greep, R.: Extraluteal effects of prostaglandins. *Ann. NY Acad. Sci.* **180**, 426-435 (1971).
 3. Baird, D. T.: Prostaglandin F₂α and ovarian blood flow in sheep. *J. Endocr.* **62**, 413-414 (1974).
 4. Thomas, J. P., Dorflinger, L. J. and Behrman, H. R.: Mechanism of the rapid antigonadotropic action of prostaglandins in cultured luteal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1344-1348 (1978).
 5. Clayton, R. N., Harwood, J. P. and Catt, K. J.: Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* **282**, 90-92 (1979).
 6. Harwood, J. P., Clayton, R. N. and Catt, K. J.: Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. I. Properties and inhibition of luteal cell function. *Endocrinology* **107**, 407-413 (1980).
 7. Behrman, H. R., Preston, S. L. and Hall, A. K.: Cellular mechanism of the antigonadotropic action of luteinizing hormone-releasing hormone in the corpus luteum. *Endocrinology* **107**, 656-664 (1980).
 8. Leung, P. C. K.: Mechanisms of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin action on luteal cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **63**, 249-256 (1985).
 9. Pieper, D. R., Richards, J. S. and Marshall, J. C.: Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: Characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology* **108**, 1148-1155 (1981).
 10. Leung, P. C. K., Minegishi, T., Ma, F., Zhou, F. and Ho-Yuen, B.: Induction of polyphosphoinositide breakdown in rat corpus luteum by prostaglandin F₂α. *Endocrinology* **119**, 12-18 (1986).
 11. Lahav, M., West, L. A. and Davis, J. S.: Effects of Prostaglandin F₂α and a gonadotropin-releasing hormone agonist on inositol phospholipid metabolism in isolated rat corpora lutea of various ages. *Endocrinology* **123**, 1044-1052 (1988).
 12. Minegishi, T. and Leung, P. C. K.: Luteinizing hormone-releasing hormone stimulates arachidonic acid release in rat granulosa cells. *Endocrinology* **117**, 2001-2007 (1985).
 13. Leung, P. C. K., Raymond, V. and Labrie, F.: Stimulation of phosphatidic acid and phosphatidylinositol labeling in luteal cells by luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* **112**, 1138-1140 (1983).
 14. Raymond, V., Leung, P. C. K., Veilleux, R., Lefevre, G. and Labrie, F.: LHRH rapidly stimulates phosphatidylinositol metabolism in enriched gonadotrophs. *Mol. Cell. Endocrinol.* **36**, 157-164 (1984).
 15. 山本 弘, 田中昭一, 林 秀紀: ラット黄体細胞のアラキドン酸遊離におけるホルボールエステルの影響. *札幌医誌* **56**, 755-770 (1987).
 16. Luborsky, J. L. and Behrman, H. R.: Isolation and functional aspects of free luteal cells. In: Birnbaumer, L. and O'Malley, B. W., eds., *Methods in Enzymology* 109, 298-316, Academic Press, New York (1984).
 17. 亀井 清: ヒト月経黄体の単層細胞培養による steroidogenesis の研究. *日産婦誌* **34**, 261-269 (1982).
 18. Fanestil, D. D. and Barrows, C. H.: Aging in the Rotifer. *J. Gerontol.* **20**, 462-469 (1965).
 19. Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y.: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450 (1985).
 20. 長尾正人: 関節軟骨の脂質代謝に関する研究 第3報 関節軟骨におけるプロスタグランジンの産生とその起源. *札幌医誌* **55**, 421-431 (1986).
 21. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **227**, 497-509 (1957).
 22. Sasaki, T. and Hasegawa-Sasaki, H.: Breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in a T-cell leukaemia line stimulated by phytohaemagglutinin is not dependent on Ca²⁺ mobilization. *Biochem. J.* **227**, 971-979 (1985).
 23. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
 24. Nakamura, T. and Ui, M.: Simultaneous inhibitions 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).
 25. Brass, L. F., Laposata, M., Banga, H. S. and Rittenhouse, S. E.: Regulation of the phosphoinositide hydrolysis pathway in thrombin-stimulated platelets by a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 16838-16847 (1986).
 26. Katada, T. and Ui, M.: Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-

- activating protein due to ADP-ribosylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**, 3129-3133 (1982).
27. Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. and Schulz, I.: Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. **Nature** **306**, 67-69 (1983).
 28. Cheung, W. Y.: Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **38**, 533-538 (1970).
 29. Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. **Nature** **308**, 693-697 (1984).
 30. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y.: Unsaturated diacylglycerol as possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **91**, 1218-1224 (1979).
 31. Lambert, T. L., Kent, R. S. and Whorton, A. R.: Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine aortic endothelial cells. **J. Biol. Chem.** **261**, 15288-15293 (1986).
 32. Derian, C. K. and Moskowitz, M. A.: Polyphosphoinositide hydrolysis in endothelial cells and carotid artery segments. **J. Biol. Chem.** **261**, 3831-3837 (1986).
 33. Jaffe, E. A., Grulich, J., Weksler, B. B., Hampel, G. and Watanabe, K.: Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. **J. Biol. Chem.** **262**, 8557-8565 (1987).
 34. Resink, T. J., Grigorian, G. Y., Moldabaeva, A. K., Danilov, S. M. and Buhler, F. R.: Histamine-induced phosphoinositide metabolism in cultured human umbilical vein endothelial cells. Association with thromboxane and prostacyclin release. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **144**, 443-446 (1987).
 35. Kaya, H., Patton, G. M. and Hong, S. L.: Bradykinin-induced activation of phospholipase A_2 is independent of the activation of polyphosphoinositide-hydrolyzing phospholipase C. **J. Biol. Chem.** **264**, 4972-4977 (1989).
 36. Lipsky, J. J. and Lietman, P. S.: Aminoglycoside inhibition of a renal phosphatidylinositol Phospholipase C. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **220**, 287-292 (1982).
 37. Schwartz, D. W., Kreisberg, J. I. and Venkatachalam, M. A.: Effects of Aminoglycosides on proximal tubule brush border membrane phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **231**, 48-55 (1984).
 38. Slivka, S. R. and Insel, P. A.: Phorbol ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis in Madin-Darby canine kidney cells. **J. Biol. Chem.** **262**, 4200-4207 (1987).
 39. De Chaffoy de Courcellers, D., Roevens, P. and Van Belle, H.: 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate stimulates inositol lipid phosphorylation in intact human platelets. **FEBS Lett.** **173**, 389-395 (1984).
 40. Zavoico, G. B., Halenda, S. P., Sha'afi, R. I. and Feinstein, M. B.: Phorbol myristate acetate inhibits thrombin-stimulated Ca^{2+} mobilization and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis in human platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 3859-3862 (1985).
 41. Kawahara, Y., Kariya, K., Araki, S., Fukuzaki, H. and Takai, Y.: Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphoinositides in vascular smooth muscle cells—different sensitivity of PDGF- and angiotensin II-induced phospholipase C reactions to protein kinase C-activating phorbol esters. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **156**, 846-854 (1988).
 42. Negishi, M., Ito, S., Yokohama, H., Hayashi, H., Katada, T., Ui, M. and Hayaishi, O.: Functional reconstitution of prostaglandin E receptor from bovine adrenal medulla with guanine nucleotide binding proteins. **J. Biol. Chem.** **363**, 6893-6900 (1988).
 43. Yamashita, L. and Sweat, F. W.: The stimulation of rat liver adenylate cyclase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **70**, 438-444 (1976).
 44. Murayama, T. and Ui, M.: Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. **J. Biol. Chem.** **258**, 3319-3326 (1983).
 45. Martin, T. F. J., Lucas, D. O., Bajjalieh, S. M. and Kowalchuk, J. A.: Thyrotropin-releasing hormone activates a Ca^{2+} -dependent polyphosphoinositide phosphodiesterase in permeable GH_3 cells. **J. Biol. Chem.** **261**, 2919-2927 (1986).

別刷請求先：

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学産婦人科学講座 渡辺広史