

ラット培養黄体細胞での Phospholipase C および Phospholipase A₂ 活性化における GTP 結合蛋白質の関与に関する検討

札幌医科大学産婦人科学講座

渡辺 広史 山本 弘 遠藤 俊明
田中 昭一 橋本 正淑

A Study on GTP-binding Protein in the Activation of Phospholipase C and Phospholipase A₂ in Cultured Rat Luteal Cells

Hiroshi WATANABE, Hiroshi YAMAMOTO, Toshiaki ENDO,
Shoichi TANAKA and Masayoshi HASHIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical College, Sapporo

概要 ラット培養黄体細胞における phospholipase C や A₂ の活性化に細胞情報のトランスジューサーとしての GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) が関与しているか否か検討し以下の結果を得た。

1. PGF_{2α}, GnRH 受容体刺激によるラット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。
2. IAP 非処理時に 41K 膜蛋白質がラベルされたが, この蛋白質は GTP 結合蛋白質の α -サブユニットで, ラット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た。
3. IAP 前処理を受けた黄体細胞を PGF_{2α}, GnRHa で刺激した時, 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ともに抑制されなかつた。
4. これらは受容体と phospholipase C, A₂ との間に Gi 以外の G 蛋白質が介在することを示唆している。

Synopsis We have studied the possible involvement of the GTP-binding protein (G-protein) in the activation of phospholipases C and A₂ in cultured rat luteal cells as a transducer of cell information.

1. Inositol phosphate production and arachidonic acid release in rat luteal cells by the stimulation of PGF_{2α} and GnRH receptors are dependent on GTP and therefore suggest the involvement of GTP binding protein.
2. When the cells were not treated with IAP, a membrane protein of 41K molecular weight was apparently labeled. The protein, with a molecular weight of 41K, which was obtained from cultured rat luteal cells without prior treatment with IAP is considered to be the α -subunit of GTP binding protein as reported in other cells. While α -subunit of G-protein was ADP-ribosylated in luteal cells too, the 41K protein from the cells pretreated with IAP was not found to be ADP ribosylated.
3. When such IAP pretreated luteal cells were stimulated by PGF_{2α} or GnRHa, the production of inositol phosphate and the release of arachidonic acid were observed with no suppression.
4. The results suggest the existence of some G-protein other than Gi between the receptor and phospholipases C and A₂.

Key words: Rat • Luteal cell • GTP • Phospholipase

緒 言

動物の個体を形成する細胞は, 細胞外からの各種の情報を受け, それに対して応答している。この細胞外刺激物質としてホルモン, 神経伝達物質, オータコイドがあり, これらの刺激物質の多くは細胞の細胞膜に存在する受容体と結合し, 細胞内

のトランスジューサーを介してエフェクターに伝えられる。このトランスジューサーとして GTP と結合する蛋白質 (G 蛋白質) の介在する系がある。イノシトールリン脂質の代謝酵素である phospholipase C や A₂ は G 蛋白質を介して調節されている²⁾。

今回、ラット培養黄体細胞における phospholipase C や A_2 の活性化に細胞情報のトランスジューサーとしての GTP 結合蛋白質が関与しているか否か検討したので報告する。

研究材料および方法

1. 試薬

myo-[2- 3 H]イノシトール(15.8Ci/mmol), [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15- 3 H]アラキドン酸(83.6 Ci/mmol) は New England Nuclear 社より購入した。199培地, Eagle's MEM 培地は日水製薬社製, Ca^{2+} 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)は Sigma 社製を用いた。[D-Ala 6 , Des-Gly 10]-GnRH ethylamide (GnRHa), [D-Phe 2 , Pro 3 , D-Phe 6]-GnRH (GnRH antagonist I), [D-pGlu 1 , D-Phe 2 , 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 $_{2\alpha}$ は小野薬品より, 血清性腺刺激ホルモン(PMSG), human chorionic gonadotropin (hCG 6,450IU/mg) は帝国臓器より提供された。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

2. ラット黄体細胞の分離・培養

26日齢の Sprague-Dawley 系幼若雌ラットに PMSG を 50IU 皮下注射し多数の卵胞を发育させ, 64時間後に hCG を 25IU 皮下注射し過排卵させた。hCG 投与 2 日目には黄体が認められ, この日を黄体 1 日齢とした。hCG 投与後, 2 日目に無菌的に黄体化した卵巣を摘出した。既報⁶⁾¹⁸⁾の方法のごとく, 黄体を細切し, collagenase と dispase 処理を行い細胞を分離した。

分離した細胞で細胞浮遊液を作製し, この細胞浮遊液から黄体細胞を分離するため不連続パーコル密度勾配遠心法⁹⁾を行った。Medium (M) 199 培養液で 3.0×10^5 cells/dish になるように調整し, 35mm culture plates (Corning, Glass Work, NY) に単層培養した。培養条件は 5%CO $_2$ /95% air, 37°C とした。培養液は 48 時間ごとに交換した。

0.5% trypan blue 生体染色による培養細胞の生存率は, 実験期間中つねに 90% 以上であつた。また細胞数は 0.25% トリプシン-0.02% EDTA 溶液で細胞を dish から剥離しカウントした。培養細胞数は培養日数とともに増加し, 培養 4 日目にはほぼ confluent (約 90%) に達し, 7.0×10^5 cells/dish であつた¹⁸⁾。

3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性¹⁾を有する細胞の割合は 70~80% であつた⁶⁾。

3. [3 H] イノシトール, および [3 H] 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 μ Ci/ml の myo-[2- 3 H]イノシトールを含む 10% FBS-M199 培養液で 2 日間標識した。 [3 H]アラキドン酸を 4 時間標識し少量のエタノールに溶解して培養液に添加した。培養液中のエタノール濃度は 0.1% 以下とした。

4. 標識黄体細胞の IAP 処理

myo-[2- 3 H]イノシトール標識黄体細胞は 0.1% BSA および 10 mM LiCl を含む Hepes-buffered saline (HBS) で, また [3 H]アラキドン酸は 0.1% BSA fatty-acid free (FAF) HBS で 3 回洗浄し, 細胞に取り入れていない [3 H] を除去した後に, 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 PGF $_{2\alpha}$, GnRHa をイノシトール代謝実験に, 0.1% BSA (FAF) HBS に溶解した PGF $_{2\alpha}$, GnRHa をアラキドン酸代謝実験に用いた。IAP (100ng/ml) は 10% FBS-M199 培地に加えて 24 時間前処理した。

これら刺激物質溶液 1ml 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後 dish を cold-ice 中で冷却して反応を停止させた。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 Folich 法⁸⁾で抽出した。刺激後蓄積した [3 H]イノシトールリン酸(IP, IP $_2$, IP $_3$ の総合)濃度は Hasegawa-Sasaki et al.の方法¹⁰⁾に準じ, AGI-X8 カラムによるクロマトグラフィーで分離し測定した。

5. 黄体細胞のサポニン処理と GTP γ S の添加

1) イノシトールリン酸の産生

実験液 (pH 7.4) の組成は, 20mM Hepes, 110 mM KCl, 10mM LiCl, 1mM EGTA, 0.5mM CaCl₂, 6mM MgCl₂, 5mM potassium succinate, 5mM potassium pyruvate, 2.5mM ATP, 2mg/ml BSA とし, サポニン (Sigma 社) 濃度は 50 μ 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 μ M GTP γ S を加えたものと加えないもので添加実験した (図 1).

2) アラキドン酸代謝

実験液 (pH 7.4) の組成は, 20mM Hepes, 120 mM KCl, 1mM EGTA, 0.5mM CaCl₂, 6mM MgCl₂, 5mM potassium succinate, 5mM potassium pyruvate, 2.5mM ATP, 2mg/ml BSA とし, サポニンは 50 μ g/ml の濃度を用いた. この後の操作はイノシトールリン酸の処置と同じである (図 2).

Cultured rat luteal cells of the 2nd day
↓
5 μ Ci/ml myo-[2-³H] inositol 48h incubated
↓
Washed with 0.1% BSA-HBS (10mM LiCl) 1.5ml 3 times
↓
Scraping the cells
↓
Incubated with Saponin (50 μ g/ml) 37°C, 5min
↓
Centrifugation 100 $\times$ g, 5min
↓
Cell pellet washed with 0.1% BSA-HBS (10mM LiCl)
↓
Incubation with 20mM Hepes, 110mM KCl, 10mM LiCl, 1mM EGTA, 0.5mM CaCl₂, 6mM MgCl₂, 5mM potassium succinate, 5mM potassium pyruvate, 2.5mM ATP and 2mg/ml BSA
↓
Added with hormone in the absence or presence of 100 μ M GTP γ S
↓
Terminated by chloroform-methanol (1:2 v/v)
↓
Anion exchange chromatography (Dowex AGI-X8 formate column)

図 1 Analysis of inositol phosphates

Cultured rat luteal cells of the 4th day
↓
Incubated with Medium 199 containing 1 μ Ci/ml of [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H] arachidonic acid for 4h
↓
Washed with 0.1% BSA fatty-acid free (FAF) HBS 1.5ml, 3 times
↓
Scraping the cells
↓
Incubated with Saponin (50 μ g/ml) 37°C, 5min
↓
Centrifugation 100 $\times$ g, 5min
↓
Cell pellet washed with 0.1% BSA-FAF HBS
↓
Incubation with 20mM Hepes, 120mM KCl, 1mM EGTA, 0.5mM CaCl₂, 6mM MgCl₂, 5mM potassium succinate, 5mM potassium pyruvate, 2.5mM ATP and 2mg/ml BSA
↓
Added with hormone in the absence or presence of 100 μ M GTP γ S
↓
Terminated by chloroform-methanol (1:2 v/v)
↓
Partitioned into two phases by adding 1ml each of chloroform and water
↓
Determined by liquid scintillation counting (the lower phase)

図 2 Analysis of arachidonic acid release

6. 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)

培養黄体細胞 (7 $\times$ 10⁵ cells/dish) を 10%FBS-M 199 培養液で IAP 50ng/ml を加えたものと加えないものを 24 時間培養した. 細胞を dish より剥離し, 超音波破碎後, 100,000 $\times$ g 遠心し膜分画を回収した. 沈渣を 20mM thymidine (Sigma 社), 5mM MgCl₂, 2mM EDTA, 10 μ M [³²P]-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (26 Ci/mmol) (New England Nuclear 社), 0.2M GTP, 2mM ATP, 4mM DTT を含む 0.2M Tris-HCl (pH 8.0) 溶液 150 μ l に混和し, 3 μ g の IAP を加えて 60 分間インキュベートし ADP リボシル化反応を行つた. ADP リボシル化が行われた試料を SDS-PAGE で分離した. 泳動終了後の乾燥ゲルで autoradiogram を作製した (図 3).

研究成績

1. $\text{PGF}_{2\alpha}$ および GnRHa 刺激によるイノシトールリン酸の産生 (phospholipase C の活性化)
 $[\text{H}]$ 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$, GnRHa の濃度依存性をみると (図 4A), $\text{PGF}_{2\alpha}$,

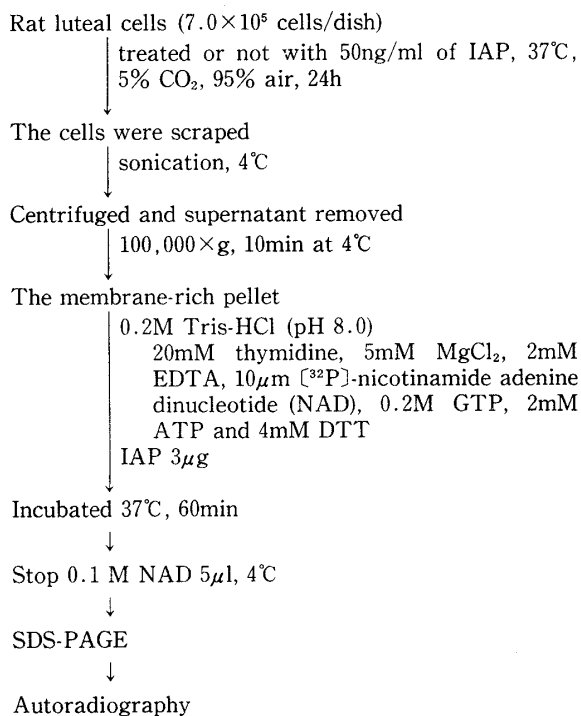


図3 ADP-ribosylation of rat luteal cells

GnRHa 刺激で両者とも 10nM 以上の濃度で有意の全イノシトールリン酸 (IP , IP_2 , IP_3) 放射活性を認めた。さらに $\text{PGF}_{2\alpha}$ (100nM), GnRHa (100nM) で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 分でプラトーに達した (図 4B)。培養黄体細胞に IAP (100 ng/ml) を加えて 24 時間処置した後, $\text{PGF}_{2\alpha}$ (100 nM), GnRHa (100nM) で 15 分間刺激したがイノシトールリン酸の産生は抑制されなかった。

2. $\text{PGF}_{2\alpha}$ および GnRHa 刺激によるアラキドン酸の放出 (phospholipase A_2 の活性化)

$[\text{H}]$ アラキドン酸標識培養黄体細胞からのアラキドン酸放出における $\text{PGF}_{2\alpha}$, GnRHa の濃度依存性は図 5A にあるごとく, アラキドン酸の放出増加は三者とも 10nM でプラトーに達した。次に $\text{PGF}_{2\alpha}$ (100nM), GnRHa (100nM), GnRH antagonist (100nM) で刺激した時に放出されるアラキドン酸は図 5B のごとく刺激時間 15 分で有意に増加し, その後徐々に 60 分まで上昇傾向を示した。

培養黄体細胞に IAP (100ng/ml) を加えて 24 時間処置した後, $\text{PGF}_{2\alpha}$ (100nM), 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。

3. G 蛋白質の関与に関する検討

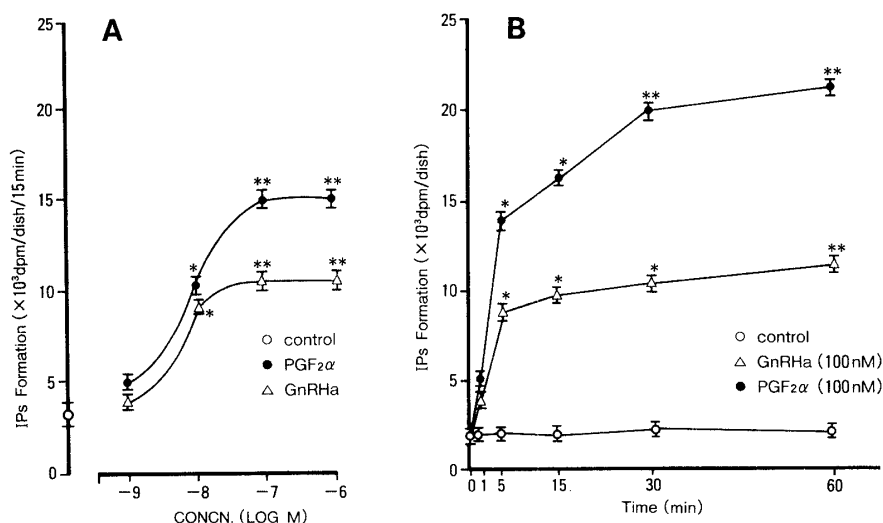


図4 Effect of the concentration of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (A) and time course (B) on the formation of inositol phosphates in cultured rat luteal cells. The values shown are mean $\pm$ S.E.M. of triplicates. * $p < 0.01$ vs Control, ** $p < 0.001$ vs Control

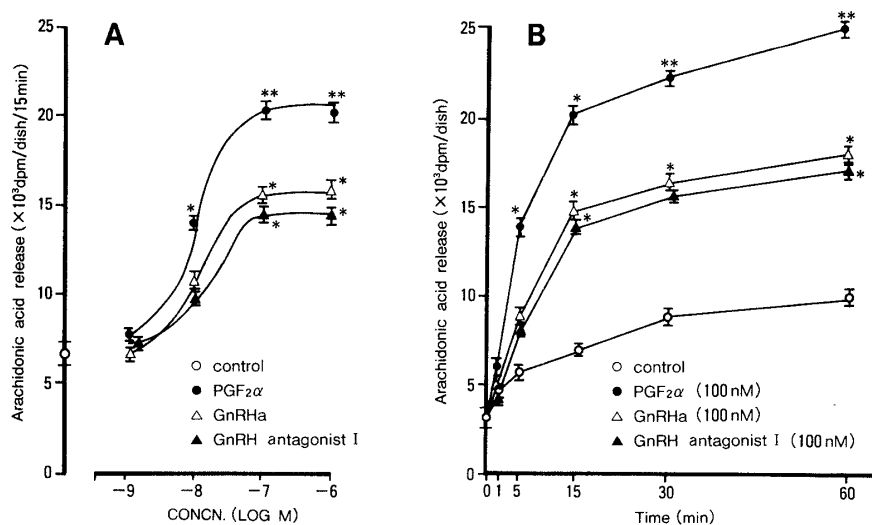


図5 Effect of the concentration of PGF₂α, GnRHa or GnRH antagonist (A) and time course (B) on release of [³H] arachidonic acid from cultured rat luteal cells. The values shown are means ± S.E.M. of triplicate. * p < 0.01 vs Control, ** p < 0.001 vs Control

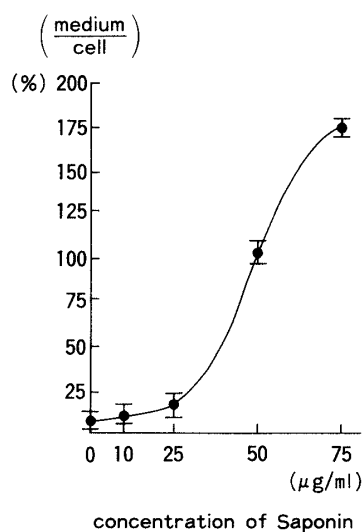


図6 Effect of the concentration of Saponin on the formation of inositol phosphates, stimulated by PGF₂α (100nM) in cultured rat luteal cells.

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 PGF₂α (100nM) の刺激に反応しイノシトールリン酸の産生がみられた (図 6)。

[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 PGF₂α (100nM), GnRHa (100nM) あるいは GnRH antagonist I および 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た (図 7)。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 (100nM), GnRHa (100nM), GnRH antagonist I および 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 GTPγS を添加することにより著明に増加したことより, 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。

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 50ng/ml を加えたものと加えないものを作製し [³²P] NAD 存在下に ADP・リボシル化反応を行つた後, 細胞を剝離し膜分画を分離した。この膜分画蛋白質の

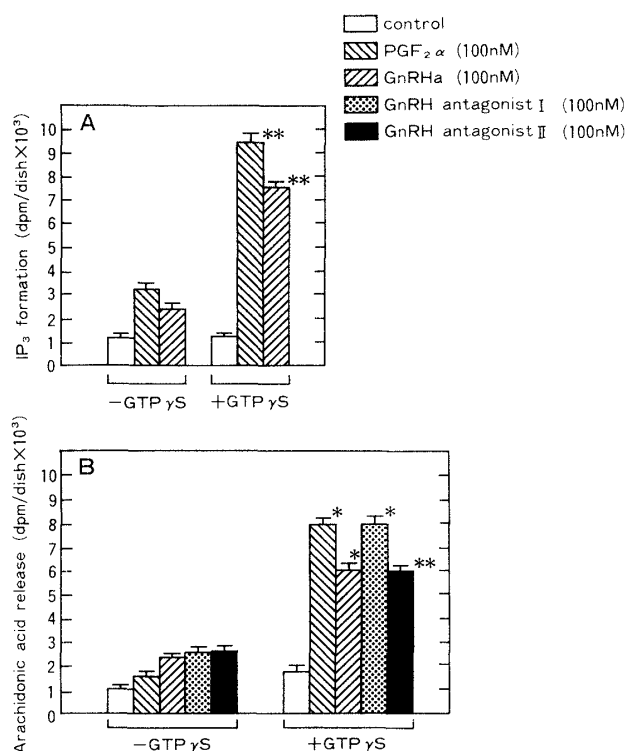


図7 Effect of GTP γ S on inositol phosphates (IP₃) formation (A) and arachidonic acid release (B) from Saponin-permeabilized luteal cells when stimulated by PGF₂ α , GnRHa or GnRH antagonist I. Saponin-permeabilized cells were stimulated by PGF₂ α , GnRHa or GnRH antagonists for 15 min and GTP γ S (100nM) was added simultaneously. Values are means $\pm$ 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.

SDS-PAGE の autoradiogram を図8に示した。

IAP 無処理の場合、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分画でこのラベルは認められなかった。

考 案

1975年に Michell¹³⁾によりイノシトールリン脂質代謝変化がCa²⁺動員性のホルモン作用に共通した初期応答であるという仮説が提出された。その説はイノシトールリン脂質の代謝変化が細胞外Ca²⁺を細胞内へ流入させる引金になるというものである。

このように細胞内Ca²⁺動員物質が同定されてから、イノシトールリン脂質代謝調節の機構の研究は受容体刺激がどのような機構でPIP₂分解反

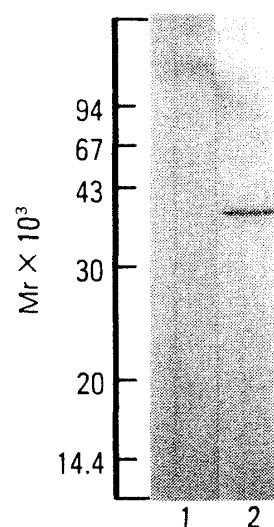


図8 Autoradiographic analysis of radioactive products resulting from IAP-catalyzed ADP-ribosylation of the membranes of rat luteal cells. Membranes were prepared from rat luteal cells cultured without pertussis toxin (IAP) (lane 2), or from cells cultured with 50ng/ml IAP for 24h (lane 1).

応を触媒する phospholipase C を活性化するかの研究に向けられた⁴⁾。

GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) はアデニール酸シクラーゼ活性調節機構の研究から、その存在、機能が明らかにされてきた調節蛋白質である⁵⁾。そして phospholipase C 活性調節においても重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた²⁾⁴⁾⁵⁾。

ラット黄体におけるアラキドン酸の遊離は phospholipase A₂ の作用によることをわれわれはすでに報告している⁶⁾¹⁸⁾。また、PGF₂ α 、GnRHa 刺激によるアラキドン酸の放出は phospholipase A₂ 作用によつて、主として PC、PI からもたらされることも示した¹⁸⁾。phospholipase A₂ 活性化に G 蛋白質が関与している可能性は好中球¹⁶⁾、マスト細胞¹⁹⁾、甲状腺 FRTL 5 細胞¹⁴⁾ で報告されている。そこでわれわれは、ラット培養黄体細胞の phospholipase A₂ と phospholipase C の活性化における G 蛋白質の関与について検討した。Phospholipase C 活性の調節因子として G 蛋白質の役割を調べる時、IAP は有力なプローブと考えられる¹⁷⁾。すなわち IAP は adenylate cyclase 系抑制

G 蛋白質(Gi)を ADP-リボシル化し、その機能を消失させる。その結果、adenylate cyclase に対して抑制的に関係している受容体応答を完全に遮断する¹⁷⁾。

IAP で前処理しないラット黄体培養細胞で得られた、分子量41K の蛋白質(図8)は他の細胞で報告⁷⁾¹¹⁾¹⁵⁾されているように G 蛋白質の α -サブユニットであると考えられる。黄体細胞においても G 蛋白質の α -サブユニットが ADP-リボシル化されたが、IAP で前処理した細胞では41K 蛋白質の ADP-リボシル化は認められなかつた(図8)。したがって 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¹¹⁾。このような IAP 前処理を施した黄体細胞を PGF_{2 α} , GnRHa で刺激した時、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ともに抑制されなかつた。

このことは、ラット黄体細胞における PGF_{2 α} および GnRHa の刺激による phospholipase C と phospholipase A₂ 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 GTP γ S を添加して PGF_{2 α} , GnRHa の刺激効果を検討した結果、PGF_{2 α} , GnRHa 刺激によりイノシトールリン酸の産生とアラキドン酸の放出の亢進はともに認められた(図7)。すなわち、受容体と phospholipase C および phospholipase A₂ の間に何らかの Gi 以外の G 蛋白質が介在することが示唆された。

これらの結果より、IAP 処理で PGF_{2 α} と GnRHa による phospholipase C, phospholipase A₂ の活性化は遮断されていないので、phospholipase C および phospholipase A₂ の活性化には IAP の基質以外の G 蛋白質が関与している可能性が考えられる。

本研究に御助言いただいた本学第1生化学講座、秋野豊明教授、佐々木洋子講師(現札幌医大研究所生化学部門講師)に感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は第42回日本産科婦人科学会学術講演会(1990, 東京)において発表した。

文 献

1. 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, 1982.
2. 堅田利明：GTP 結合蛋白質の特性と機能—新しい GTP 結合蛋白質を含めて—。代謝, 25: 213, 1988.
3. 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, 1986.
4. 岡島史和：GTP 結合蛋白質とイノシトールリン脂質代謝。代謝, 25: 237, 1988.
5. 宇井理生：情報のトランスジューサとしての GTP 結合蛋白質。代謝, 25: 205, 1988.
6. 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, 1987.
7. 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, 1986.
8. 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, 1957.
9. Gore, S.D. and Behrman, H.R.: Alteration of transmembrane sodium and potassium gradients inhibits the action of luteinizing hormone in the luteal cell. Endocrinology, 114: 2020, 1984.
10. Hasegawa-Sasaki, H., Lutz, F. and Sasaki, T.: Pathway of phospholipase C activation initiated with platelet-derived growth is different from that initiated with vasopressin and bombesin. J. Biol. Chem., 263: 12870, 1988.
11. 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. U.S.A., 79: 3129, 1982.
12. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. Nature, 227: 680, 1970.
13. Michell, R.H.: Inositol phospholipids and cell surface receptor function. Biochim. Biophys. Acta, 415: 81, 1975.
14. 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 mem-

- brane. J. Biol. Chem., 258 : 3319, 1983.
15. 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, 1985.
 16. Negishi, M., Ito, S., Yokohama, H., Hayashi, H., Katada, T., Ui, M. and Hayashi, O. : Functional reconstitution of prostaglandin E receptor from bovine adrenal medulla with guanine nucleotide binding protein. J. Biol. Chem., 263 : 6893, 1988.
 17. Ui, M. : Islet-activating protein, pertussis toxin : A probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. Trends pharmacol. Sci., 5 : 277, 1984.
 18. Watanabe, H., Tanaka, S., Akino, T. and Hasegawa-Sasaki, H. : Evidence for coupling of different receptors for gonadotropin-releasing hormone to phospholipase C and A in cultured rat luteal cells. Biochim. Biophys. Res. Commun., 168 : 328, 1990.
 19. Yamashita, L. and Sweat, F.W. : The stimulation of rat liver adenylate cyclase. Biochim. Biophys. Res. Commun., 70 : 438, 1976.
- (No. 6931 平2・12・17受付)
-