

ラット顆粒膜細胞における性ステロイドの産生調節機構 —Phorbol Ester および Forskolin の影響と その蛋白リン酸化反応について—

三重大学医学部産科婦人科学教室

山本 稔彦 野村 浩史 山脇 孝晴
中 淳 西山 真人 杉山 陽一

Effects of Phorbol Ester and Forskolin on Steroidogenesis and Protein Phosphorylation in Cultured Rat Granulosa Cells

Toshihiko YAMAMOTO, Hiroshi NOMURA, Takaharu YAMAWAKI,

Atsushi NAKA, Masato NISHIYAMA and Youichi SUGIYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Mie University School of Medicine, Mie

概要 性ステロイド分泌調節機構における, Ca^{2+} -リン脂質依存性蛋白リン酸化酵素 (Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinase, protein kinase C) の関与について, ラット顆粒膜細胞培養系 (10rats/experiment) を用いて検討した結果, 以下のような知見を得た。

1) Protein kinase C を賦活する phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加すると, estradiol の産生は容量依存性に抑制 ($IC_{50} < 1nM$) されたが, progesterone の産生は増大 ($ED_{50} \doteq 14nM$) した。

2) PMA により惹起されたこの効果は, calcium ionophore A23187 を添加した場合と異なり, 細胞質内に Ca^{2+} を動員しただけでは再現できないことがわかった。

3) Adenylate cyclase を賦活する forskolin の単独添加では, estradiol と progesterone の産生はともに促進 ($ED_{50} \doteq 0.9\mu M, 2\mu M$) されたが, PMA と forskolin を同時添加すると, forskolin による progesterone の産生亢進が PMA により阻害 ($IC_{50} < 1nM$) された。

4) 二次元蛋白電気泳動法に基づく autoradiography により, forskolin 添加では 40kDa の酸性蛋白が, PMA 添加では 78kDa および 32kDa の酸性蛋白がそれぞれリン酸化を受けることがわかった。

以上の検討成績より, ラット顆粒膜細胞における性ステロイド産生は, それぞれ異なる蛋白質のリン酸化反応を介して多重制御を受けている可能性が示唆された。

Synopsis Granulosa cells obtained from immature estradiol-treated SD rats (10 rats/experiment) were employed in elucidating the control mechanism of steroid secretion.

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) inhibited estradiol production by cultured rat granulosa cells with IC_{50} less than 1nM. PMA, however, stimulated small but significant increases in progesterone production in a dose-dependent manner with ED_{50} of 14nM to 3.5-fold above the basal control level. These effects could not be induced by calcium ionophore A23187.

Forskolin-stimulated progesterone production was inhibited by the concomitant addition of PMA with IC_{50} less than 1nM.

The phosphorylation of proteins by [^{32}P] orthophosphate-labelled cells was examined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. Treatment of cells with forskolin altered the intensity of 40kDa acidic phosphoprotein compared to that of the control. On the other hand, treatment of cells with PMA altered the intensity of 78 and 32kDa acidic phosphoproteins.

These results suggest, therefore, that PMA can modulate steroidogenesis in rat granulosa cells, presumably through activation of Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C).

Key words: Granulosa cells • Steroidogenesis • Phorbol ester • Forskolin • Protein kinase C

緒 言

ステロイド産生組織において, 多くの trophic

hormone は, adenosine cyclic 3':5'-monophosphate (cAMP) を介してその生理的作用を発現し

ている⁸⁾¹²⁾。

しかし、 Ca^{2+} をキレートすると、ステロイド産生が阻害されたり⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、ornithine decarboxylaseの誘導¹⁴⁾や proteoglycan の産生⁷⁾が影響を受けることから、 Ca^{2+} もまた、これらの組織において、重要な役割を担っているものと考えられる。

近年発見された protein kinase C は、その活性化に Ca^{2+} およびリン脂質を必要としているが、luteinizing hormone (LH) を含む trophic hormone により、細胞膜リン脂質代謝が賦活化されること²⁾を考えると、この蛋白リン酸化酵素が、卵巣における新たな細胞内伝達機構として作働している可能性が考えられる。

そこで、卵巣の性ステロイド産生における、protein kinase C の働きを明らかにするため、ラット顆粒膜細胞培養系を用いて検討を加えた。

実験材料ならびに方法

1) 顆粒膜細胞培養系の調製

24日齢 Sprague-Dawley 系雌ラットに、6日間 estradiol-17 β (Sigma, MO., U.S.A.) を1mg/day 皮下投与し、卵巣を成熟させた後、頸椎脱臼にて屠殺し、ただちに開腹して無菌的に卵巣を摘出した。通常1回の実験には10匹のラット(卵巣20個)を使用した。

6.8mM ethylene glycol-bis (β -amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, 半井化学薬品) 含有 PC-1無血清培地 (Ventrex Laboratories, Inc., ME., U.S.A) 中で27ゲージ針を用いて卵巣を穿刺し、顆粒膜細胞を培養液中に排出させた。CO₂ incubator 内 (37°C, 5%CO₂, 95%air, 湿度95%) で10分間 incubate した後、排出された顆粒膜細胞と卵巣を、200×g で10分間遠沈し、0.5M sucrose および1.8mM EGTA を含有する PC-1無血清培地に再浮遊させた。上記処理卵巣をさらに40mesh の stainless steel grid にこすりつけ、卵巣中に残っている顆粒膜細胞を排出させ、顆粒膜細胞の回収率の向上に努めた。このようにして得られた顆粒膜細胞を3回洗浄した後、培養液にて2~3×10⁶/ml となるように調製した。なお、顆粒膜細胞の回収率は、3~5×10⁵/ラットで、0.4%trypan blue exclusion method による

生存率はおおむね50~60%であった。

5×10⁵/ml の生存顆粒膜細胞を35×10mm の plastic tissue culture dish (Falcon Plastics, CA., U.S.A.) に分注し、CO₂ incubator 内 (5%CO₂, 95%air, 湿度95%) で単層培養した。

24時間の前培養の後、0.1 μ M androstenedione (半井化学薬品) を含む PC-1無血清培地と交換し、同時に各種薬剤を添加した。

2) 添加薬剤の調製方法

各種添加薬剤の stock solution は以下のごとく調製した。

Forskolin (Behring Diagnostics, CA., U.S.A.) は95%ethanol で1mM となるよう溶解した。phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) は dimethylsulfoxide (DMSO, 半井化学薬品) で0.5mM となるよう溶解し、実験まで-20°C で凍結保存した。calcium ionophore A 23187 (Sigma) は DMSO で10mM となるよう溶解した。

なお、溶媒の培養系への影響についてはあらかじめ検討し、使用した ethanol (最終濃度: 1%) および DMSO (最終濃度: 0.02~0.1%) が細胞生存率に影響を及ぼさないことを確認した。

3) 検体の採取および保存方法

各種薬剤を添加後、CO₂ incubator 内にて培養を継続し、24時間後に培養上清分画を採取した。さらに、3,000×g で5分間遠心分離し有形成分を除去した上清分画をシオノギストックチューブに分注し、測定まで-20°C で凍結保存した。

4) Progesterone および estradiol の測定方法

Progesterone および estradiol は、凍結保存した検体を、室温で溶解した後、radioimmunoassay kit (Sorin Biomedica, Italy) を用いて測定した。

5) 蛋白リン酸化反応に関する検討方法

Feuerstein et al. の方法⁴⁾に準拠し、以下のごとく蛋白リン酸化反応について検討した。まず、PO₄-free RPMI 培養液で顆粒膜細胞を十分に洗浄後、500 μ Ci/ml [³²P] orthophosphate (日本原子力研究所, 東京) 含有 PO₄-free RPMI 培養液を加え、37°C, 5%CO₂, 95%air の環境下で60分間 incubate することにより、細胞を label した。培養液を10mM HEPES 含有 PO₄-free RPMI に交換

し、薬剤を添加後、さらに37°C, 5%CO₂, 95%airの環境下で15分間 incubate した。上清を捨て、10%冷 trichloroacetic acid (TCA) で反応を停止させた後、さらに冷 acetone で細胞を2回洗浄した。乾燥後、isoelectrofocusing lysis solution (9.5M 尿素, 2% Nonidet P-40, 5% 2-mercaptoethanol, 2% ampholytes, pH 3.5~10) で溶解し、遠沈後、上清分画を採取した。これを2% ampholytes (LKB, MD., U.S.A., pH 3.5~10, 一次元) と12% SDS polyacrylamide (Bio-Rad, VA., U.S.A., slab gel, 二次元) を用いた二次元電気泳動にかけ、泳動終了後に固定・染色 (Coomassie brilliant blue R-250, Bio-Rad) ・乾燥し、Kodak XAR-5 film を用いて-70°C にて autoradiography を行つた。

なお、分子量の決定は、lysozyme-14.4kDa, soybean trypsin inhibitor-21.5kDa, carbonic anhydrase-31.5kDa, ovalbumin-45kDa, bovine serum albumin-66.2kDa, phosphorylase B-92.5 kDa (Standards Low Molecular Weight, Bio-Rad) を基準として行つた。

研究成績

1) Forskolin の性ステロイド産生能に及ぼす影響

Forskolin を顆粒膜細胞培養系に添加すると、培養上清中の estradiol および progesterone 濃度は容量依存性に増加した。

最小有効濃度は100nM 以下であり、estradiol 産生における ED₅₀ は約0.9μM, progesterone 産生における ED₅₀ は約2μM であつた (図1)。

2) PMA の性ステロイド産生能に及ぼす影響

PMA を顆粒膜細胞培養系に添加すると、培養上清中の estradiol 濃度は容量依存性に低下し、その IC₅₀ は1nM 以下であつた。一方、progesterone 濃度は容量依存性に増加し、その ED₅₀ は約14 nM であつた (図2)。なお、cell viability については trypan blue exclusion test にて影響のないことを確認した。

3) Forskolin ・PMA 同時添加の性ステロイド産生能に及ぼす影響

20μM forskolin を顆粒膜細胞培養系に添加す

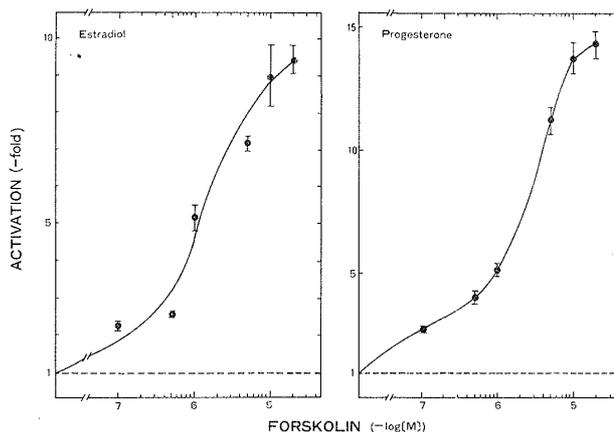


図1 Dose-dependent effect of forskolin on estradiol and progesterone production by cultured rat granulosa cells.

Granulosa cells were incubated in medium alone or 0.1~20μM forskolin for 24h. Estradiol production in medium alone was 447.5±9.0pg/ml (mean±SD) and progesterone production in medium alone was 43.6±2.8ng/ml. Each point represents the mean of quadruplicate cultures (Bars: SD) of one of five representative experiments. 10 rats (20ovaries) were employed for each experiment.

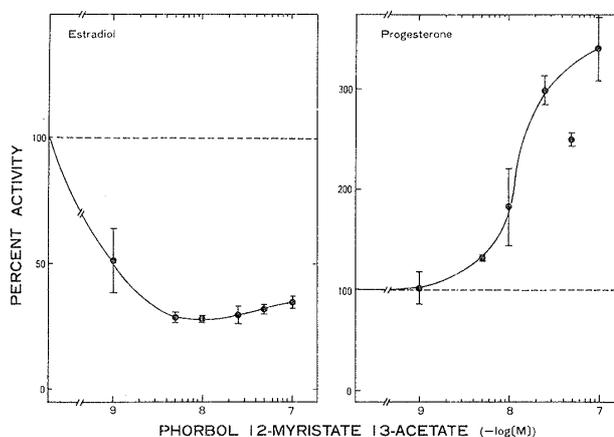


図2 Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on estradiol and progesterone production by cultured rat granulosa cells.

Granulosa cells were incubated in medium alone or 1~100nM PMA for 24h. Estradiol production in medium alone was 638.7±90.6pg/ml (mean±SD) and progesterone production in medium alone was 24.7±2.3ng/ml. Each point represents the mean of quadruplicate cultures (Bars: SD) of one of five representative experiments. 10rats (20ovaries) were employed for each experiment.

ると、培養上清中の estradiol および progesterone 濃度はそれぞれ8.8倍および12.0倍に増加した(図3, ヒストグラム). $20\mu\text{M}$ forskolin とともに、種々の濃度の PMA を添加すると、estradiol 産生に及ぼす影響は少ないものの、progesterone 産生は容量依存性に抑制され、その IC_{50} は 1nM 以下と考えられた.

4) Calcium ionophore A23187の性ステロイド産生能に及ぼす影響

Calcium ionophore A23187を顆粒膜細胞培養系に添加すると、培養上清中の estradiol 濃度は二相性に変化した. すなわち、低濃度域では約60%の増加を認めるものの、高濃度域では減少に転じた(図4, 左). 一方、progesterone 濃度は estradiol の場合のように増加することなく減少の一途を辿った. なお、本実験条件における cell viability は trypan blue exclusion test で見る限り変化はなかった.

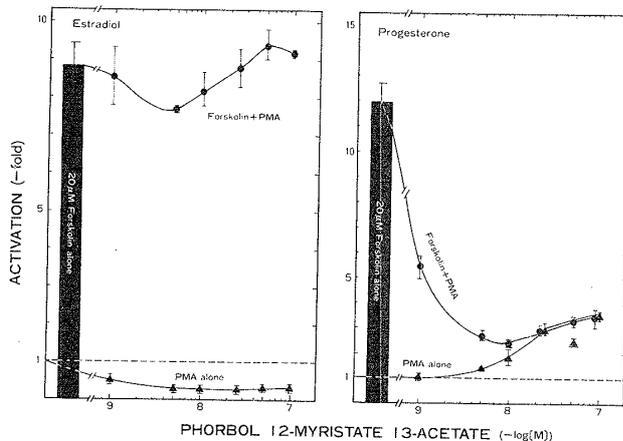


図3 Effect of PMA on forskolin-stimulated production of estradiol and progesterone by cultured rat granulosa cells.

Granulosa cells were incubated in medium alone, $20\mu\text{M}$ forskolin, or $1\sim 100\text{nM}$ PMA + $20\mu\text{M}$ forskolin for 24h. Estradiol production in medium alone = $447.5 \pm 9.0\text{pg/ml}$ (mean \pm SD); forskolin-stimulated estradiol production = $3,958.3 \pm 262.1\text{pg/ml}$; progesterone production in medium alone = $50.7 \pm 1.8\text{ng/ml}$; forskolin-stimulated progesterone production = $606.7 \pm 40.1\text{ng/ml}$. Each point represents the mean of triplicate cultures (Bars: SD) of one of five representative experiments. 10 rats (20 ovaries) were employed for each experiment.

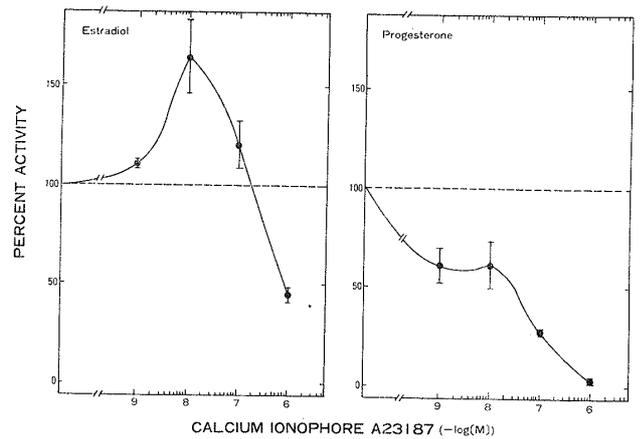


図4 Effect of calcium ionophore A23187 on estradiol and progesterone production by cultured rat granulosa cells.

Granulosa cells were incubated in medium alone or $1\text{nM}\sim 1\mu\text{M}$ A23187 for 24h. Estradiol production in medium alone was $471.4 \pm 32.9\text{pg/ml}$ (mean \pm SD) and progesterone production in medium alone was $120.1 \pm 14.4\text{ng/ml}$. Each point represents the mean of triplicate cultures (Bars: SD) of one of five representative experiments. 10 rats (20 ovaries) were employed for each experiment.

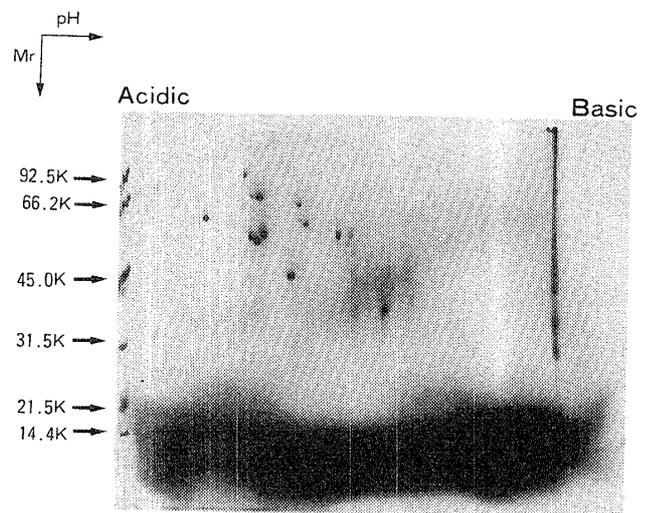
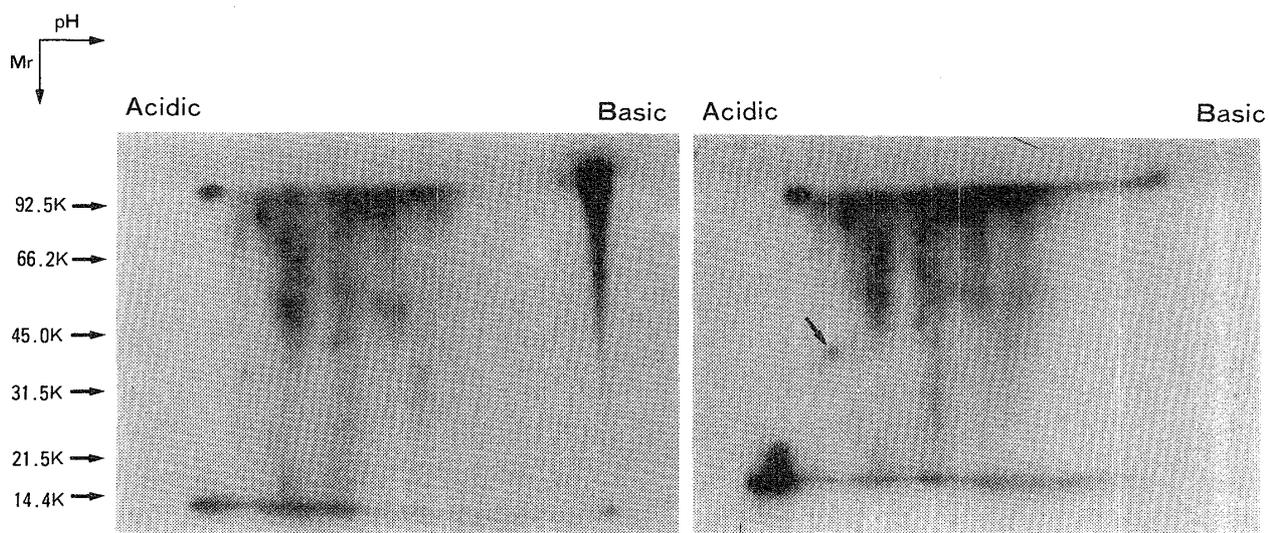


写真1 Coomassie blue staining pattern of the control gel.

Relative positions of mol. wt. standards are indicated: lysozyme (14,400), soybean trypsin inhibitor (21,500), carbonic anhydrase (31,500), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,200) and phosphorylase B (92,500). More acidic proteins lie to the left side of the gel. Mol. wt. increases toward the top of the gel.

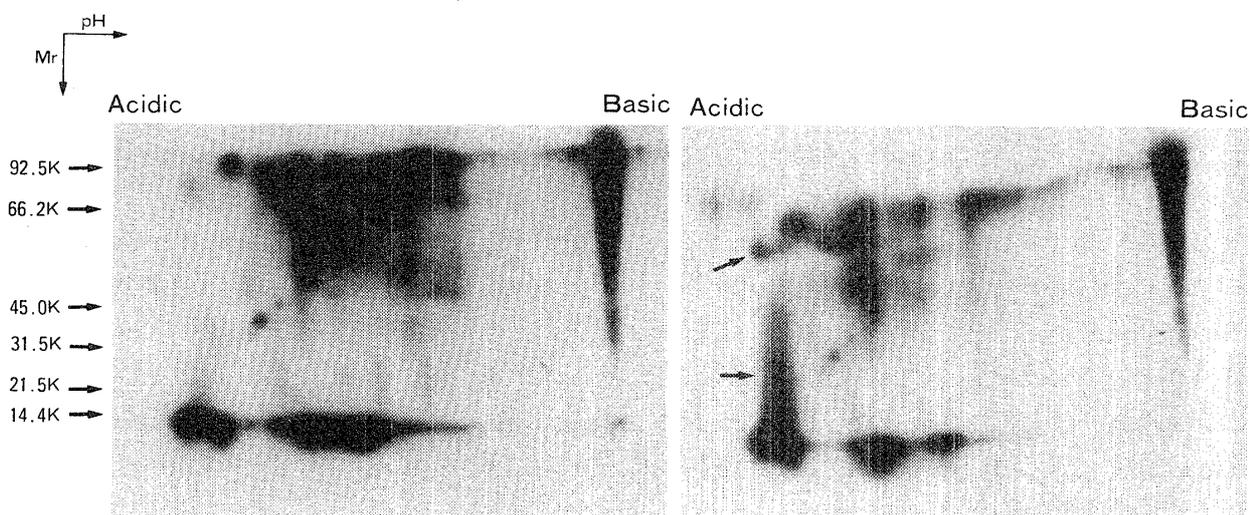


CONTROL

FORSKOLIN

写真2 Autoradiogram of cultured rat granulosa cell proteins after the addition of forskolin.

Left: control culture. Right: forskolin-treated culture. Phosphoprotein that gained labeling intensity is indicated by arrow. Relative positions of mol. wt. standards are indicated (see the legend of picture 1). More acidic proteins lie to the left side of the gel.



CONTROL

PMA

写真3 Autoradiogram of cultured rat granulosa cell proteins after the addition of PMA.

Left: control culture. Right: PMA-treated culture. Phosphoproteins that gained labeling intensity are indicated by arrows. Relative positions of mol. wt. standards are indicated (see the legend of picture 1). More acidic proteins lie to the left side of the gel.

5) 蛋白リン酸化反応に関する検討成績

A) 二次元電気泳動法による蛋白の泳動パターン

写真1はCoomassie brilliant blue 染色による典型的な蛋白泳動パターン(薬剤非添加コントロール)を示しているが, forskolinあるいはPMAを添加しても蛋白の泳動パターンに変化は認められなかった。

B) Forskolin 添加による Autoradiography

薬剤非添加(コントロール)および20 μ M forskolin 添加における蛋白リン酸化反応の相違を autoradiography にて検討した結果, forskolin を添加すると40kDaの酸性蛋白が有意にリン酸化を受けることが明らかとなった(写真2)。

C) PMA 添加による Autoradiography

薬剤非添加(コントロール)および100nM PMA 添加における蛋白リン酸化反応の相違を autoradiography にて検討した結果, PMA を添加すると78kDa および32kDaの酸性蛋白が有意にリン酸化を受けることが明らかとなった(写真3)。

考 案

ホルモンや神経伝達物質などの細胞外シグナルの細胞膜受容伝達機構の研究は, 1957年 Sutherland et al. により cyclic AMP (cAMP) が発見され, いわゆる second messenger の概念が導入されて急速な発展を遂げたが, その後解析が進むにつれて, 種々の細胞外シグナルの中には cAMP のみでは理解できないものが多数見いだされ, その作用機構が問題となった。このような細胞外シグナルの second messenger として cyclic GMP (cGMP) が考えられた時期もあつたが, 1970年頃から Ca²⁺ が種々の細胞外シグナルの second messenger として, 多彩な細胞機能の調節に関与していることが認識されるようになった。

Ca²⁺ は calmodulin などの細胞内 Ca²⁺ 受容タンパク質を介してその作用を遂行する一方⁹⁾, Ca²⁺-リン脂質依存性蛋白リン酸化酵素 (Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent protein kinase, protein kinase C) の活性化を介してもその作用を発現していると考えられる¹³⁾。

一般的に, 細胞膜のリン脂質 phosphoinositide

が代謝回転されると, diacylglycerol と inositol-1, 4, 5, triphosphate (IP₃) が産生され, diacylglycerol は protein kinase C を活性化し, IP₃ は細胞質への Ca²⁺ 動員を惹起することが知られている³⁾¹¹⁾。

本研究で用いた phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は, その受容体が protein kinase C と copurify され, protein kinase C 自体であると考えられること¹⁰⁾, しかも PMA が in vitro で protein kinase C を活性化すること¹¹⁾ から, diacylglycerol の代用品として, protein kinase C の研究にしばしば使用される薬剤である。

今回, 顆粒膜細胞培養系にこの PMA を添加した結果, progesterone の産生は促進 (ED₅₀ = 14 μ M) されるが estradiol の産生は抑制 (IC₅₀ < 1 nM) されること(図2)。したがって, protein kinase C の活性が芳香化酵素に対して抑制的に作用し, forskolin による adenylate cyclase の活性化の場合(図1)と様相を異にすることがわかつた。そしてこの作用は calcium ionophore によつて細胞質内へ Ca²⁺ の動員を図つても惹起することができず(図4), protein kinase C 自体の活性化が必須であると推察された。さらに, forskolin と PMA を同時添加すると, forskolin によつて促進された estradiol 産生はほとんど影響を受けないものの, forskolin によつて促進された progesterone 産生は明らかに抑制 (IC₅₀ < 1nM) を受けた。したがって, protein kinase C の活性化に基づく芳香化酵素の抑制は可逆的であり, 本酵素の調節機構において adenylate cyclase-cAMP 系の方がより優位にあるものと考えられる。一方, adenylate cyclase-cAMP 系の賦活化に基づく progesterone の産生に protein kinase C が抑制作用を発現したことは, 側鎖切断酵素, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, Δ^4 -⁵isomerase, 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase などのステロイド代謝酵素のいずれかが protein kinase C により修飾を受けたためと考えられる。

PMA による progesterone 産生の増大については Kawai et al. の報告⁶⁾もあり, その作用機序として cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素の活性化

が関与していないことを直接酵素活性を測定することにより示している。

今回我々は二次元電気泳動・autoradiographyにより蛋白リン酸化反応の基質に関する検討を加え、基質蛋白が相違することを明らかにすることができた。すなわち、forskolin添加(cAMP依存性蛋白リン酸化酵素の活性化)の場合40kDaの酸性蛋白が有意にリン酸化を受ける(写真2)のに対し、PMA添加(protein kinase Cの活性化)では78kDaおよび32kDaの酸性蛋白が有意にリン酸化を受けること(写真3)が明らかとなった。

したがって、これらの基質蛋白の同定については今後の研究を待たなければならないが、少なくとも本研究により、ラット顆粒膜細胞におけるステロイド産生が、これらのリン酸化反応を介して多重制御を受けている可能性が示唆された。今後in vivoとの兼ね合いにおいて、興味ある課題となるであろう。

稿を終るにあたり、御協力頂いた三重大学医学部第二内科学教室・西川政勝博士に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は12th. World Congress on Fertility and Sterility, Singapore (1986)において報告した。

文 献

1. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257: 7847, 1982.
2. Davis, J.S., Farese, R.V. and Marsh, J.M.: Stimulation of phospholipid labeling and steroidogenesis by luteinizing hormone in isolated bovine luteal cells. *Endocrinology*, 109: 469, 1981.
3. Farese, R.V.: Phosphoinositide metabolism and hormone action. *Endocr. Rev.*, 4: 78, 1983.
4. Feuerstein, N. and Cooper, H.L.: Rapid protein phosphorylation induced by phorbol ester in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 248: 10786, 1983.
5. Janzen, F.H.A., Cooke, B.A., van Driel, M.J.A. and van der Molen, H.J.: The effect of calcium ions on testosterone production in Leydig cells from rat testis. *Biochem. J.*, 160: 433, 1976.

6. Kawai, Y. and Clark, M.R.: Phorbol ester regulation of rat granulosa cell prostaglandin and progesterone accumulation. *Endocrinology*, 116: 2320, 1985.
7. Lenz, R.W., Ax, R.L. and First, N.L.: Proteoglycan production by bovine granulosa cells in vitro is regulated by calmodulin and calcium. *Endocrinology*, 110: 1052, 1982.
8. Marsh, J.M.: The role of cyclic AMP in gonadal function. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 6: 137, 1975.
9. Means, A.R. and Dedman, J.R.: Calmodulin in endocrine cells and its multiple roles in hormone action. *Mol. Cell Endocr.*, 19: 215, 1980.
10. Niedel, J.E., Kuhn, L.J. and Vandenbark, G. R.: Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 36, 1983.
11. Nishizuka, Y.: Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*, 225: 1365, 1984.
12. Richard, J.S., Jonassen, J.A., Rolfes, A.I., Kersey, K. and Reichert, L.E. Jr.: Adenosine 3', 5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: Effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 104: 765, 1979.
13. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y.: Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 254: 3692, 1979.
14. Veldhuis, J.D. and Hammond, J.M.: Role of calcium in the modulation of ornithine decarboxylase activity in isolated pig granulosa cells in vitro. *Biochem. J.*, 196: 795, 1981.
15. Veldhuis, J.D. and Klase, P.A.: Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. *Biochem. J.*, 202: 381, 1982.
16. Veldhuis, J.D. and Klase, P.A.: Mechanisms by which calcium ions regulate the steroidogenic actions of luteinizing hormone in isolated ovarian cells in vitro. *Endocrinology*, 111: 1, 1982.

(No. 6215 昭62・7・7受付)