

Title	ラット耳下腺腺房細胞のアミラーゼ分泌機構におけるカリウムチャネルの関与
Author(s)	村山, 高章
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3155560
DOI	10.11501/3155560
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	むら 村 やま 山 たか 高 ふみ 章
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 0 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 12 月 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	ラット耳下腺腺房細胞のアミラーゼ分泌機構におけるカリウムチャネルの関与
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 浜 田 茂 幸 (副査) 教 授 松 浦 英 夫 助 教 授 森 崎 市 治 郎 講 師 前 田 定 秋

論 文 内 容 の 要 旨

【実験目的】

耳下腺からのアミラーゼ分泌は、アドレナリン作動性神経とコリン作動性神経により調節されており、それぞれサイクリック AMP の上昇とイノシトール三リン酸の産生に伴う細胞内カルシウムの増加を介して、その分泌を促進していることが知られている。一方、耳下腺腺房細胞の基底側細胞膜にカルシウム依存性カリウムチャネル(K_{Ca} チャネル)が存在することが報告されており、ナトリウムイオンや塩素イオン等の無機イオンの輸送に関与していると考えられている。しかしながらアミラーゼ分泌におけるカリウムチャネルの役割については不明である。本研究は、耳下腺からのアミラーゼ分泌におけるカリウムチャネルの関与およびその作用機序を明らかにする目的で、耳下腺腺房細胞を用いて薬理的、生化学的検討を行った。

【実験方法】

(1) 耳下腺腺房細胞の調製

エーテル麻酔下にて断頭屠殺したラットより耳下腺組織を摘出し、細切後、コラゲナーゼ (114単位/ml) とヒアルロニダーゼ (0.25 mg/ml) を含むハンクス液中で37°C, 60分間の処置を行った。ナイロンメッシュを用いて濾過した後、1000 rpm, 5分間遠心分離し、得られた沈渣を0.1%牛血清アルブミン含有ハンクス液で洗浄後、タンパク濃度が45~80 mg/ml になるように同液で懸濁して実験に使用した。

(2) 耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌の測定

細胞懸濁液 1 ml に薬物を添加し、37°Cで30分間インキュベーションを行い、フィルター (Millex, Millipore) 濾過により細胞を除去しアミラーゼ分泌反応を停止した。濾液中のアミラーゼ活性をアミラーゼBテスト (和光純薬) を用いて測定した。アミラーゼの分泌量はコントロール (薬物無処置) の値を100として%で表示した。

(3) 耳下腺腺房細胞のタンパクのリン酸化

耳下腺腺房細胞を黄色ブドウ球菌の産生する α 毒素による処置により低分子物質に透過性にした後、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と薬物を加えて一定時間インキュベーションを行った。細胞を回収して細胞溶解液で処置し、12% SDS ポリアクリル

アミドゲル電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにより解析した。

【実験結果】

(1) 高濃度のカリウムおよびカリウムチャンネルブロッカーによるアミラーゼ分泌

ハンス液中のカリウム濃度を増加させると、濃度に依存してアミラーゼの分泌量が増加し、50 mM の濃度において50%の分泌量の増加がみられた。非選択的なカリウムチャンネルブロッカーのテトラエチルアンモニウム(TEA), K_{Ca} チャンネルブロッカーのアパミンおよびカリブドトキシンによりアミラーゼ分泌の促進がみられた。一方、ATP 依存性カリウムチャンネルブロッカーであるグリベンクラミドは効果を示さなかった。

(2) アミラーゼ分泌に対する TEA およびカリウムイオノフォアの効果

イソプロテレノールは濃度依存的 (10^{-7} M~ 10^{-5} M) に耳下腺腺房細胞からのアミラーゼの分泌を促進し、 10^{-5} M の濃度において対照群の約3倍の分泌を示した。このイソプロテレノールによる分泌促進は、TEA により増強された。一方、カルバコールもアミラーゼ分泌を促進したが、この分泌に対して TEA は効果を示さなかった。また、イソプロテレノールによるアミラーゼの分泌促進はカリウムイオノフォアであるバリノマイシンにより抑制されたが、カルバコールによる分泌促進に対しては影響しなかった。

(3) ソマトスタチンおよびモルヒネの影響

カリウムチャンネルのコンダクタンスを上昇させることが知られているソマトスタチンおよびモルヒネは、イソプロテレノールおよび TEA で促進されるアミラーゼの分泌を抑制した。

(4) 耳下腺腺房細胞のタンパクのリン酸化

[γ - 32 P]ATP を用いて耳下腺腺房細胞のタンパクのリン酸化を測定した結果、57 kDa タンパクへの 32 P の取り込みがイソプロテレノールと TEA により増強された。

(5) プロテインキナーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤の影響

イソプロテレノールによるアミラーゼの分泌は、プロテインキナーゼA阻害剤のH-8により阻害されたが、プロテインキナーゼC阻害剤のスタウロスポリン、あるいはチロシンキナーゼ阻害剤のゲニステインでは影響されなかった。また、ホスファターゼを阻害するオカダ酸、ホスファターゼ2Bを特異的に阻害するシクロスポリンAは、いずれもイソプロテレノールによるアミラーゼの分泌を抑制したが、チロシンホスファターゼを阻害するオルトバナジン酸は効果を示さなかった。

【考察と結論】

イソプロテレノールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌が K_{Ca} チャンネルブロッカーで促進されたこと、また、カリウムイオノフォアのバリノマイシンで阻害されたことから、 β 受容体刺激による耳下腺からのアミラーゼ分泌において、 K_{Ca} チャンネルの開口による分泌の抑制、 K_{Ca} チャンネルの遮断による分泌の促進という調節機構の存在することが明らかになった。イソプロテレノールと TEA によりアミラーゼ分泌の促進と並行して57 kDa タンパクのリン酸化がみられ、プロテインキナーゼAの阻害剤によりアミラーゼ分泌の抑制がみられたことから57 kDa タンパクのリン酸化がアミラーゼ分泌に関与していることが示唆された。また、ホスファターゼ2B阻害剤によりアミラーゼ分泌が抑制されたことから脱リン酸化過程がアミラーゼ分泌において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は耳下腺からのアミラーゼ分泌におけるカリウムチャンネルの関与およびその作用機序を明らかにする目的で、ラット耳下腺腺房細胞を用いて薬理学的、生化学的検討を行ったものである。

その結果、1) β 受容体刺激による耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌において、カルシウム依存性カリウムチャンネルの開口による分泌の抑制と、逆に同チャンネルの遮断による分泌の促進という調節機構が存在すること、2) 57 kDa タンパクのリン酸化が耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に関与していること、およびリン酸化・脱リン酸化の過程が耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

本論文は、アミラーゼの耳下腺からの分泌機構を解明する上で、重要かつ新たな知見を示したものであり、博士(歯学)の学位に値するものと認める。