



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	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155560
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

村 山 高 章

①

【抄録】

耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌は、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促進されることが知られている。一方、耳下腺腺房細胞の基底膜面にあるカルシウム依存性カリウムチャンネル

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ンネルの関与

このカリウムチャンネルの関与については不明な点が多い。本研究は、耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に及ぼすカリウムチャンネルの関与を、その作用機序の一端を明らかにすることを目的として行った。その結果、イソプロterenolによるラット耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌が、K_vプロセッサーにより促進されたこと、またカリウムイオンチャネルのバリニマイシンで抑制されたことから、イオンチャネルによるアミラーゼ分泌において、K_vの関与による分泌抑制、K_vの阻害による分泌促進という調節機構が存在することが示された。さらにイソプロterenolとカリウムチャンネルプロセッサーの作用によるアミラーゼ分泌の促進に伴うPLA₂の活性化、タンパク質のリン酸化が認められ、またプロテインキナーゼAの阻害剤がアミラーゼの分泌抑制効果を示したことから、PLA₂タンパク質のリン酸化が、**村山 高章**に關与していることが示唆された。ホスファターゼ阻害剤によりアミラーゼ分泌が抑制されたことから、リン酸化・脱リン酸化調節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された。

【抄録】

耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌は、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促進されることが知られている。一方、耳下腺腺房細胞の基底側膜にあるカルシウム依存性カリウムチャンネル(K_{Ca})は、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 等のイオン輸送や、水の分泌に関与していると考えられている。しかしながら、アミラーゼ分泌へのカリウムチャンネルの関わりについては不明な点が多い。本研究は、耳下腺腺房細胞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の一端を明らかにすることを目的として行った。その結果、 β 受容体刺激薬イソプロテレノールによるラット耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌が K_{Ca} ブロッカーにより促進されたこと、またカリウムイオノフォアのバリノマイシンで抑制されたことから、 β 受容体刺激によるアミラーゼ分泌において、 K_{Ca} の開口による分泌抑制、 K_{Ca} の遮断による分泌促進という調節機構が存在することが示唆された。さらにイソプロテレノールとカリウムチャンネルブロッカーのTEAによるアミラーゼ分泌の促進に伴い57kDaの腺房細胞タンパクのリン酸化が認められ、またプロテインキナーゼAの阻害薬がアミラーゼの分泌抑制効果を示したことから、57kDaタンパクのリン酸化が本アミラーゼ分泌に関与していることが示唆された。ホスファターゼ2B阻害薬によりアミラーゼ分泌が抑制されたことから、リン酸化・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された。

【緒言】

唾液腺は口腔領域の典型的な外分泌腺であり、唾液分泌による咀嚼、消化、味覚、生体防御などの作用のほか、ホルモンや成長因子の産生の機能も有しており、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。解剖学的に唾液腺は、唾液を口腔へ輸送する導管系と、唾液を産生・放出する細胞集塊である腺房から構成されている。腺房細胞は消化酵素アミラーゼを分泌する漿液細胞、糖タンパクのムチンを分泌する粘液細胞、およびその混合型に分けられる。耳下腺腺房は主として漿液細胞から成り、顎下腺、舌下腺のそれは混合型から成り立っている。唾液分泌は、アドレナリン作動性の交感神経、およびコリン作動性の副交感神経系の二重支配の下に調節されており、ヒトでの総唾液分泌量は750~1500 ml/日に達する。分泌唾液中には電解質（最大0.3 %まで）およびタンパクなど（最大0.4 %まで）が含まれているが、残りの99.3 %以上は水で占められている（吉田, 1996）。

唾液腺からの水および電解質の分泌機構に関しては、次のように考えられている。耳下腺腺房細胞の基底側膜上には、カルシウム依存性カリウムチャネルが細胞1個あたり約80個存在し（Maruyama ら, 1983a ; Maruyama ら, 1983b ; Maruyama ら, 1986 ; 東城と田隈, 1995 ）、ムスカリン受容体あるいは α_1 受容体刺激により産生されたイノシトール1,4,5トリスリン酸（ IP_3 ）がカルシウムストアからカルシウムイオンを放出させ、カルシウム依存性カリウムチャネルに作用してチャネルを開口させる。この開口により大量のカリウムイオンが排出され、細胞の近くでは20 mM 程度まで一過性の濃

度上昇がもたらされる (Poulsen と Bledsoe, 1978) 。その結果、細胞近傍のカリウムイオンによって調律されるナトリウム、カリウム、塩素イオンの共輸送系が働き、これらのイオンが細胞内に流入する。細胞内のナトリウムイオンは、ナトリウム-カリウムポンプにより、細胞外へ排出され、塩素イオンは経上皮塩素イオン輸送により、腺腔側へ排出され、それに伴い水が排出される (Maruyama ら, 1983a ; Petersen と Maruyama, 1984 ; Putney, 1986 ; 丸山と西山, 1986 ; McCann と Welsh, 1990) (図1)。この機構に関しては、塩素イオンが排出された腺腔内の電気的な中和を保つため、ナトリウムイオンが隣接細胞間に存在する密着結合 (タイトジャンクション) を通過する受動的な傍細胞輸送によって基底側から腺腔側に流入し、塩化ナトリウムを形成する結果、腺腔の浸透圧が上昇し、腺腔に水が排出されると考えられている (Petersen と Maruyama, 1984 ; 西山, 1986 ; 川口と山岸, 1995) 。

一方、アミラーゼやムチンなどの唾液タンパク成分の唾液腺からの分泌機構に関しては、これまでに十分な報告が見られず、不明の部分が多い。アミラーゼの分泌について、現在得られている知見は以下の通りである(図1)。アミラーゼの分泌には、ムスカリン受容体および α 受容体の関与する系も存在するが、その程度は弱く、分泌の大部分は β 受容体刺激によるサイクリックAMP依存性のものである (Baum ら, 1981 ; Yoshimura と Nezu, 1992) 。このサイクリックAMP産生から開口分泌によってアミラーゼが分泌される過程に

(Butcher と Putney, 1980 ; Harper, 1988 ; 瀬川, 1991) , プロテインキナーゼによるタンパクのリン酸化が関与していることが示

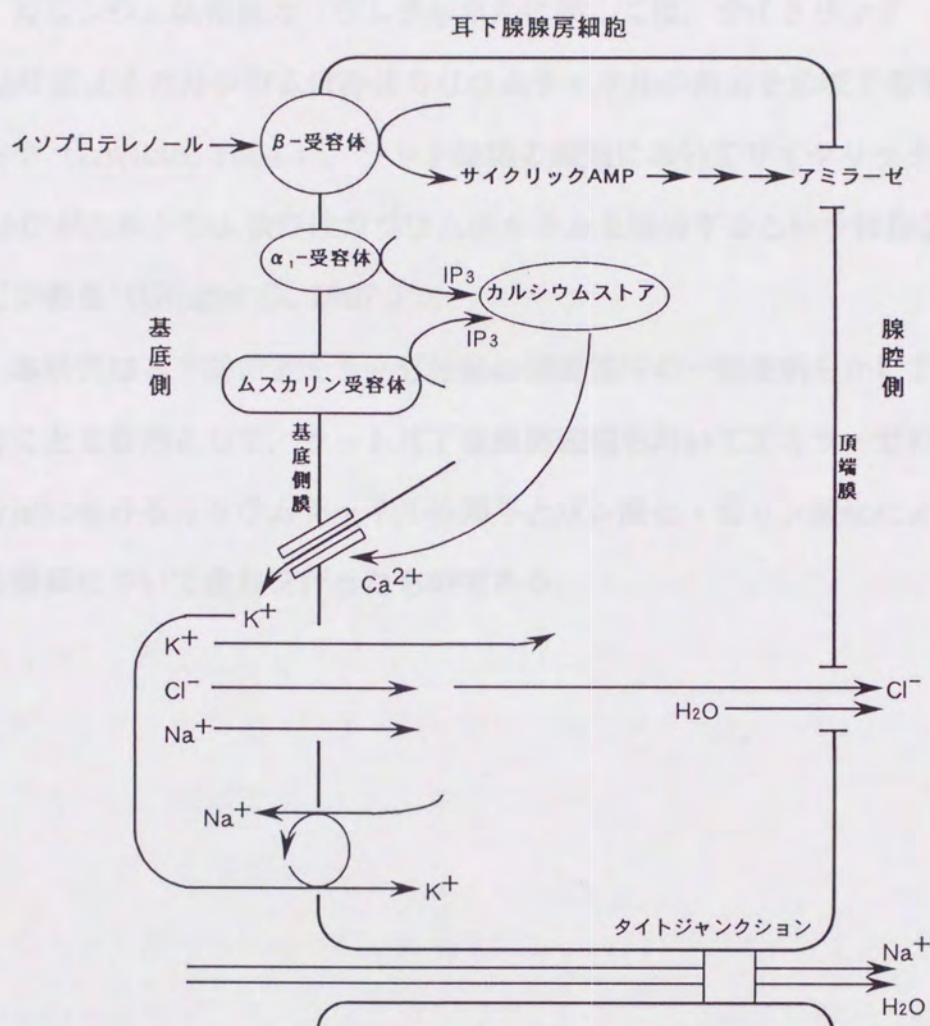


図1 耳下腺腺房細胞における唾液分泌に関する模式図

ムスカリン受容体あるいは α_1 受容体刺激と、それに続くイノシトール1,4,5トリスリン酸 (IP_3) 産生を経て、カルシウムストアから放出された Ca^{2+} が基底側膜上のカルシウム依存性カリウムチャネルを開口させる。排出された大量の K^+ が契機となって、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- の共輸送系が作動し、 Na^+ - K^+ ポンプおよび経上皮塩素イオン輸送が続く。 Cl^- の腺腔側へ排出に伴い水が排出される。一方アミラーゼは、 β 受容体刺激、サイクリックAMP産生を経て、開口分泌によって分泌されるが、その過程の詳細については不明である。

唆されているが、その詳細については不明である（東城と田隈, 1995）。

カルシウム依存性カリウムチャンネルに関しては、サイクリック AMP によるカルシウム依存性カリウムチャンネルの調節を示唆する報告や（Levitan, 1994）、ラット結腸の細胞においてサイクリック AMP がカルシウム依存性カリウムチャンネルを阻害するという報告などがある（Greger ら, 1997）。

本研究は耳下腺のアミラーゼ分泌の調節機序の一端を明らかにすることを目的として、ラット耳下腺腺房細胞を用いてアミラーゼの分泌におけるカリウムチャンネルの関与とリン酸化・脱リン酸化による調節について検討を行ったものである。

【方法】

(1) ラット耳下腺腺房細胞の調製

体重180 gから220 gのSprague-Dawley系雄性ラットより耳下腺を摘出し、氷冷下で細切後、*Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼ（114 単位/ml, Worthington, Lakewood）と牛精巢に由来するヒアルロニダーゼ（0.25 mg/ml, Sigma, St. Louis）を含むハンクス液（組成：NaCl 136 mM, KCl 5.4 mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, MgSO₄ 0.81 mM, NaHCO₃ 4.2 mM, グルコース 5.6 mM, CaCl₂ 1.3 mM, Hepes 20 mM, pH 7.4）6 ml中で、37℃、60分間処置を行った（Tojyo ら, 1987 ; Miwa ら, 1996）。ナイロンメッシュを用いて濾過した後、1000 rpmで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（Sigma）含有のハンクス液で洗浄した。洗浄操作を3回繰り返し、タンパク濃度45～80 mg/mlになるように同液で懸濁し、実験に供した。

(2) アミラーゼ分泌の測定

得られた細胞懸濁液 1 mlに薬物を添加し、37℃で30分間インキュベーションを行った。フィルター（マイレクス, 日本ミリポア, 東京）濾過により細胞を除去することによって、細胞のアミラーゼ分泌反応を停止し、濾液中のアミラーゼの量をアミラーゼBテスト

（和光純薬, 大阪）を用いて測定した。アミラーゼの分泌量は、対照群（薬物無添加）を100 として、パーセントで表示した。

(3) タンパクのリン酸化反応

ラット耳下腺腺房細胞を *Staphylococcus aureus* の産生する α 毒素（Sigma）により処置して低分子透過性とした後、ハンクス液中

で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPと15分間保温後、細胞を回収した。ついで同細胞を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、ゲルをクーマシーブルーで染色した後、ハイパーフィルム (Amersham, Buckinghamshire) でオートラジオグラフィーにより解析した。各薬物は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPと同時に添加を行った。

(4) 統計処理

実験結果は3～5例の平均値 $\pm$ S.D.で表し、Studentのt-テストにより有意差検定を行った。



図2 肝臓細胞からのアミノ酸の分泌に対する細胞外カリウムイオン濃度の影響
肝臓細胞のホリスチンイオン濃度を30mMから、100mM、200mM、300mMに逐次増大させ、アミノ酸の分泌量を測定した。アミノ酸分泌量は、ホリスチンイオン濃度が増加するにつれて増加した。ホリスチンイオン濃度の平均値 $\pm$ S.D.で表した。*

【実験結果】

(1) カリウム平衡電位の耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対する影響

カリウム平衡電位の変化が耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に及ぼす影響について調べる目的で、ハンクス液のNaClの一部をKClに置換することにより、細胞外カリウムイオン濃度を増加させ、アミラーゼの分泌量を測定した。外液のカリウムイオン濃度を16 mM, 26 mMと増加させるに従って、耳下腺腺房細胞からのアミラーゼの分泌が促進され、56 mMの濃度において、分泌は約50%増強された(図2)。

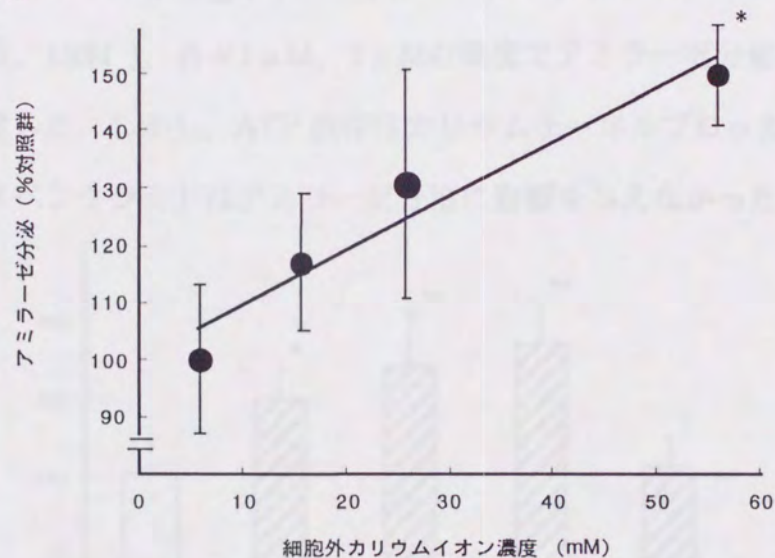


図2 耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対する細胞外カリウムイオン濃度の影響

ハンクス液のカリウムイオン濃度を5.84 mMから、16 mM, 26 mM, 56 mMに変えたときのアミラーゼ分泌量を測定した。アミラーゼ分泌量は、カリウムイオン濃度5.84 mMのときのアミラーゼ分泌量を対照群として%で表示した。各値は4例の平均値±S.D.で表した。* $p < 0.01$: 対照群に対する有意差

(2) カリウムチャネルブロッカーの耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対する影響

カリウムチャネルの遮断が耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に影響するか否かについて、種々のカリウムチャネルブロッカーの作用を調べた。比較的選択性の低いカリウムチャネルブロッカーであるテトラエチルアンモニウム(TEA) 1mMを細胞外液中に添加すると、アミラーゼの分泌は約50%促進された。また、カルシウム依存性カリウムチャネルのうち、低コンダクタンスのカリウムチャネル(SK_{Ca})のブロッカーとして知られるアパミン、高コンダクタンスのカリウムチャネル(BK_{Ca})のブロッカーのカリブドトキシンは(赤須と時政, 1991), 各々 $1\mu M$, $2\mu M$ の濃度でアミラーゼ分泌を有意に促進した。しかし、ATP依存性カリウムチャネルブロッカーであるグリベンクラミドはアミラーゼ分泌に影響を与えなかった(図3)。

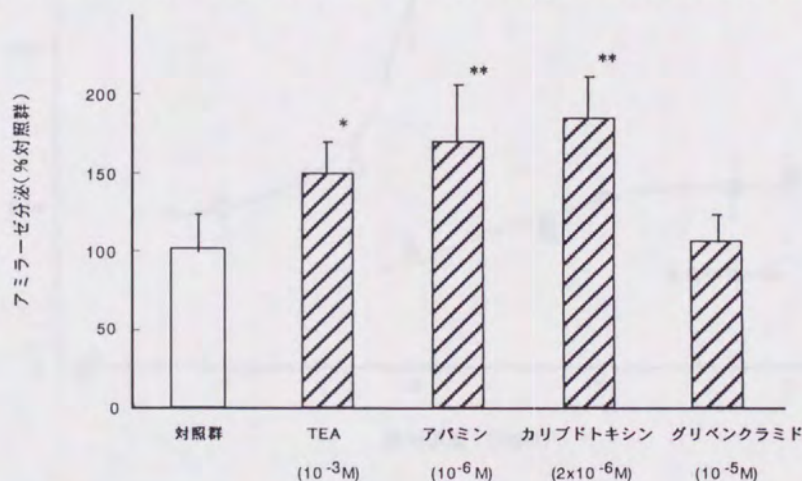


図3 耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するカリウムチャネルブロッカーの影響

各薬物をインキュベーション開始と同時にハンクス液中に添加し、30分後にアミラーゼ分泌量を測定した。各値は4例の平均値 $\pm$ S.D.で表した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: 対照群に対する有意差

(3) β 受容体刺激薬およびムスカリン受容体刺激薬による耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するカリウムチャンネルブロッカーの影響

β 受容体刺激薬のイソプロテレノール, およびムスカリン受容体刺激薬のカルバコールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌について調べた. イソプロテレノールは濃度依存性にアミラーゼ分泌を著明に促進し, 10^{-5} Mにおいては対照群の約6倍の分泌を示した. 一方, カルバコールも同様にアミラーゼの分泌を誘発したが, イソプロテレノールに比べてその作用は弱く, 10^{-4} Mにおいても約2倍の分泌量であった(図4).

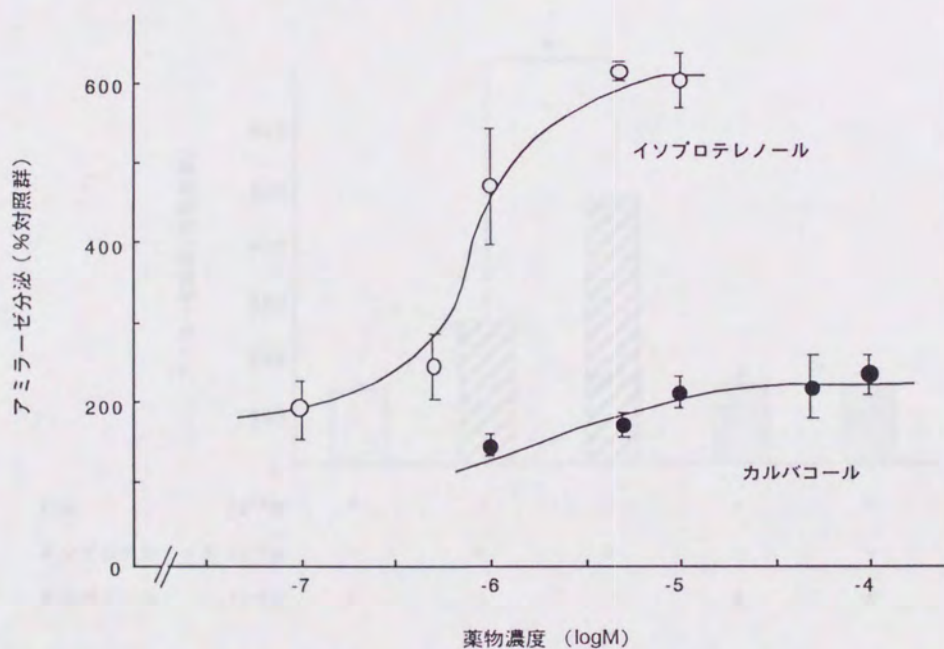


図4 イソプロテレノール (○) およびカルバコール (●) による耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対する影響
各値は3~5例の平均値 $\pm$ S.D.で表した.

以上の実験結果に基づいて, 以下の実験ではイソプロテレノールは

10^{-7} Mあるいは 10^{-6} M, カルバコールは 10^{-6} Mあるいは 10^{-5} Mの濃度を用いて刺激を行った。

カリウムチャンネルブロッカーであるTEAを用いて, イソプロテレノールおよびカルバコール刺激による耳下腺腺房細胞からのアミラーゼの分泌に対する影響を調べた。 10^{-3} MのTEAは単独で対照群の $134 \pm 9\%$ のアミラーゼ分泌を示し, また 10^{-7} Mのイソプロテレノールは $254 \pm 83\%$ のアミラーゼ分泌を示した。この両者を用いて刺激すると, アミラーゼ分泌は $471 \pm 137\%$ となり, 相乗効果がみられた(図5)。一方, カルバコールによるアミラーゼ分泌は, TEA による増強作用を全く受けなかった。

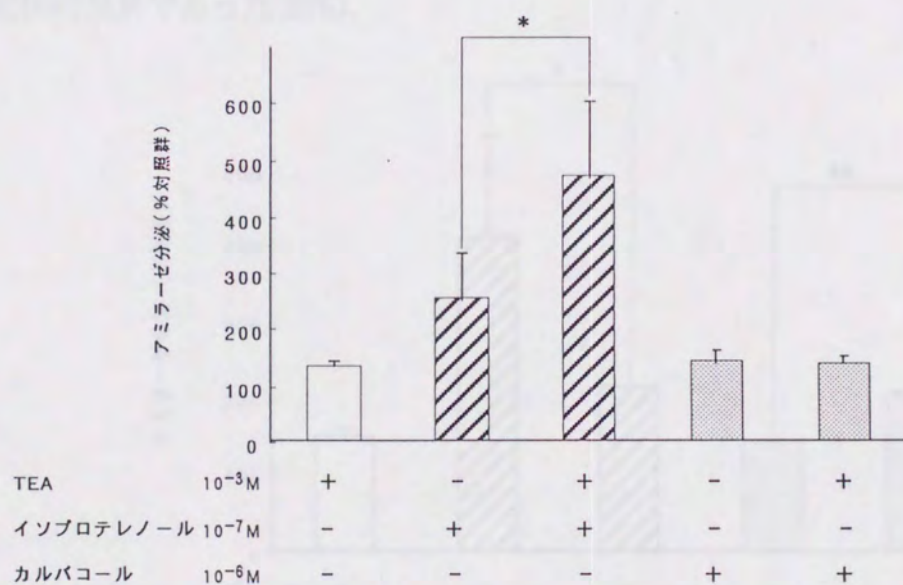


図5 イソプロテレノールおよびカルバコールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するTEAの影響

各値は5例の平均値 $\pm$ S.D.で表した。* $p < 0.05$

(4) イソプロテレノールおよびカルバコールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するカリウムイオノフォアの影響

カリウムイオノフォアであるバリノマイシンを用いて、イソプロテレノールおよびカルバコール刺激による耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌作用に対する影響を調べた。バリノマイシン単独で対照群の約150%のアミラーゼ分泌がみられたが、 10^{-6} Mのイソプロテレノールによる分泌に対してバリノマイシンは抑制効果を示した。しかし、カルバコールによるアミラーゼ分泌に対してバリノマイシンは影響を与えず、両者を用いて刺激したときのアミラーゼ分泌は相加的効果であった(図6)。

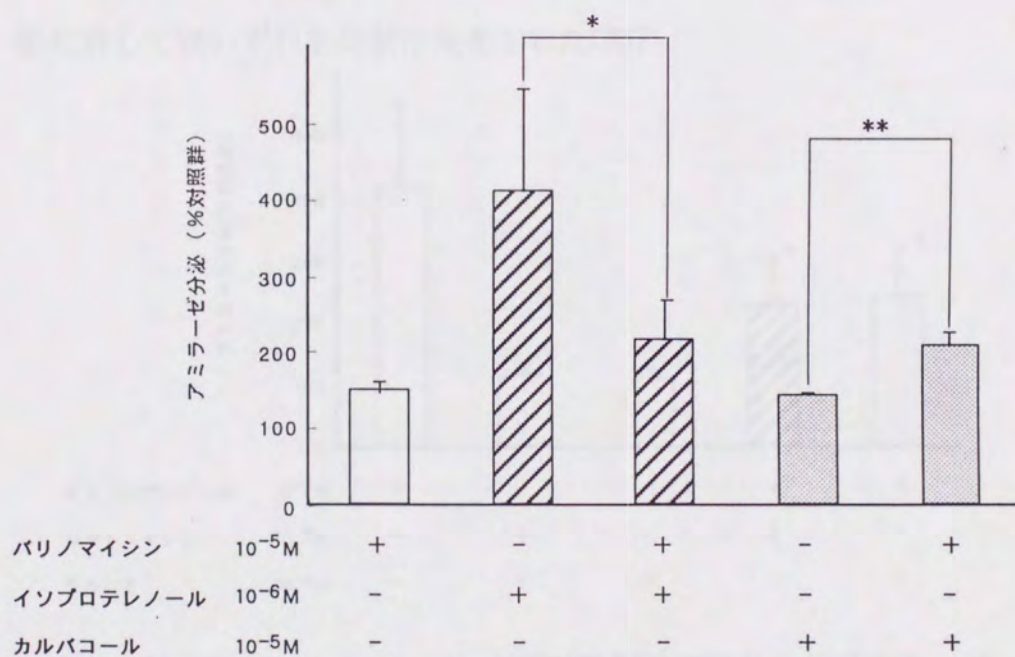


図6 イソプロテレノールおよびカルバコールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するバリノマイシンの影響

各値は4~5例の平均値 $\pm$ S.D.で表した。 ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

(5) 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に対する ソマトスタチンとモルヒネの影響

神経系においてソマトスタチンおよびモルヒネはカリウムチャネルのイオンコンダクタンスを上昇させることが報告されており

(North ら, 1987 ; 斎藤, 1990 ; 斎藤, 1991 ; White ら, 1991) , 耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌作用にカリウムチャネルが関与するならば, ソマトスタチンおよびモルヒネはアミラーゼ分泌にも影響を与える可能性があると考えられる. そこでイソプロテレノールによるアミラーゼ分泌作用に対するソマトスタチンとモルヒネの影響を調べた. 両薬物とも単独ではアミラーゼの分泌に影響を与えなかったが, 10^{-6} Mのイソプロテレノール刺激によるアミラーゼ分泌に対してはいずれも抑制作用を示した(図7).

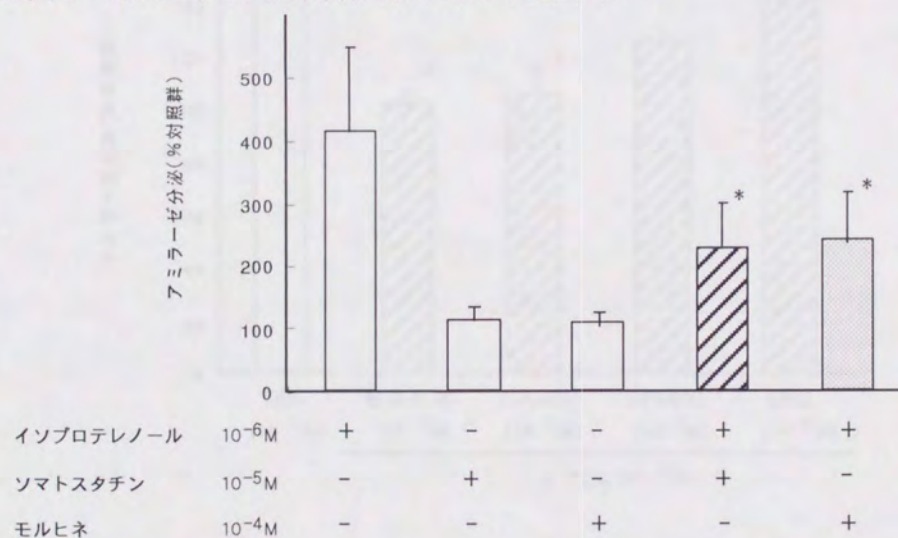


図7 イソプロテレノールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するソマトスタチンとモルヒネの影響

各値は4~5例の平均値 $\pm$ S.D.で表した. * $p < 0.05$: イソプロテレノール単独処置群に対する有意差

モルヒネによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌の抑制がカリウムチャンネルを介したものであるかどうかを確かめる目的で、カリウムチャンネルブロッカーのTEAによるアミラーゼ分泌に対するモルヒネをはじめとするオピオイド受容体の選択的アゴニストの影響を検討した。TEAによるアミラーゼ分泌は、モルヒネと同様にオピオイド μ 受容体アゴニストのDAGO (Try-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol) によっても有意に抑制された(図8)。しかし、オピオイド δ 受容体アゴニストのDPDPE (D-Pen-D-Pen-Enkephalin), オピオイド κ 受容体アゴニストのエチルケトサイクラゾシン (EKC) は影響を与えなかった。

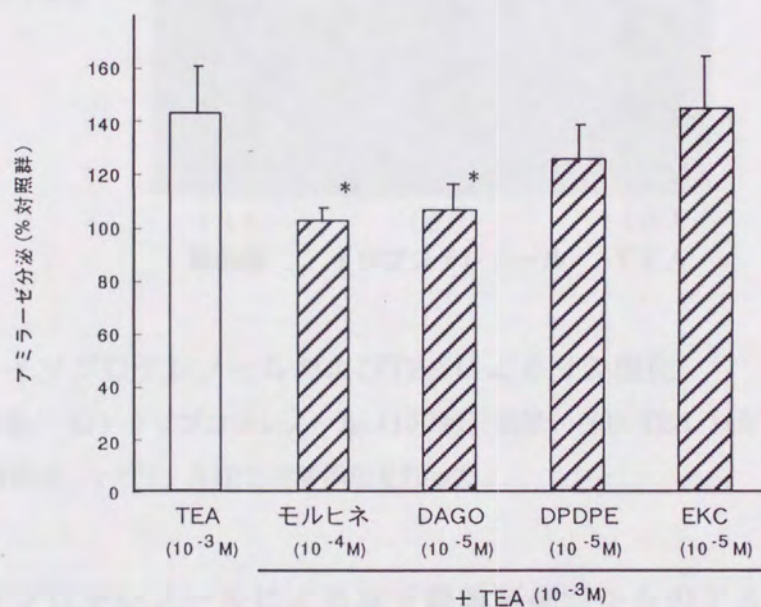


図8 TEAによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対する各種オピオイド受容体アゴニストの影響

各値は4~5例の平均値 $\pm$ S.D.で表した。EKCはエチルケトサイクラゾシン。

* $p < 0.01$: TEA処置群に対する有意差

(6) イソプロテレノールおよびTEAによるリン酸化

耳下腺腺房細胞のリン酸化に対するイソプロテレノールおよびTEAの作用について検討した。10⁻⁶Mのイソプロテレノールおよび10⁻³MのTEAの処置により、57kDaの分子量のタンパクへの³²Pの結合の増加がみられた(図9)。

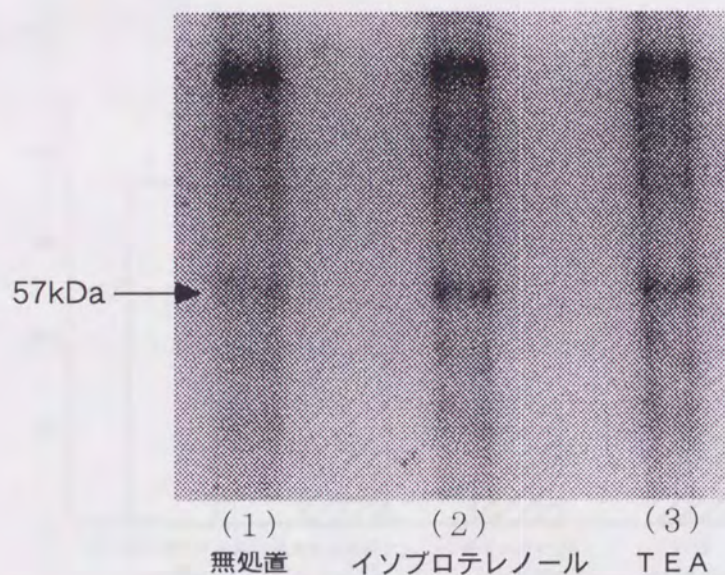


図9 イソプロテレノールおよびTEAによるリン酸化

(1) 無処置, (2) イソプロテレノール (10⁻⁶M) 処置, (3) TEA (10⁻³M) 処置. 各薬物は [γ -³²P] ATPと同時添加を行った。

(7) 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に対するプロテインキナーゼ阻害薬の影響

耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌におけるリン酸化の関与について検討する目的で、プロテインキナーゼC阻害薬のスタウロsporin, チロシンキナーゼ阻害薬のゲニステイン, プロテインキナーゼA阻害薬のH-8を用いて、イソプロテレノールによるアミラーゼ

分泌に対する影響を調べた。各薬物は単独では耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に影響を与えなかった。イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌に対して、H-8は有意な抑制作用を示したが、スタウロsporinおよびゲニステインはまったく影響を及ぼさなかった(図10)。このことからイソプロテレノールによるアミラーゼ分泌に、プロテインキナーゼAによるリン酸化が関与していることが示唆された。

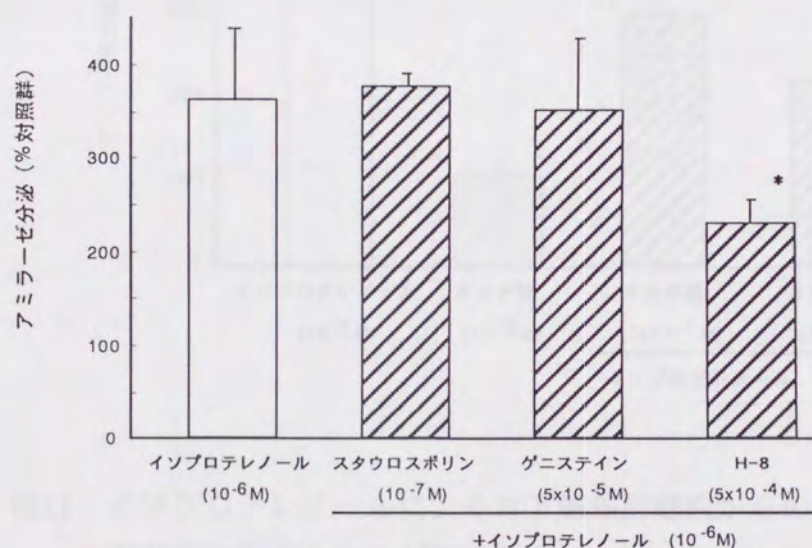


図10 イソプロテレノールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するプロテインキナーゼ阻害薬の影響

リン酸化阻害薬は、イソプロテレノールと同時に添加を行った。結果は3~5例の平均値 $\pm$ S.D.で表した。* p < 0.05 : イソプロテレノール単独処置群に対する有意差

(8) 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に対するプロテインホスファターゼ阻害薬の影響

セリン/スレオニンホスファターゼの特異的阻害薬であるオカダ酸を用いて、イソプロテレノールによる耳下腺腺房細胞からのアミ

ラーゼ分泌に対する影響を調べた。オカダ酸単独では耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に影響しなかった。イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌に対して、オカダ酸は $5 \times 10^{-7} \text{M}$ の濃度で弱い抑制作用を、また 10^{-6}M の濃度で著明な抑制作用を示した(図11)。

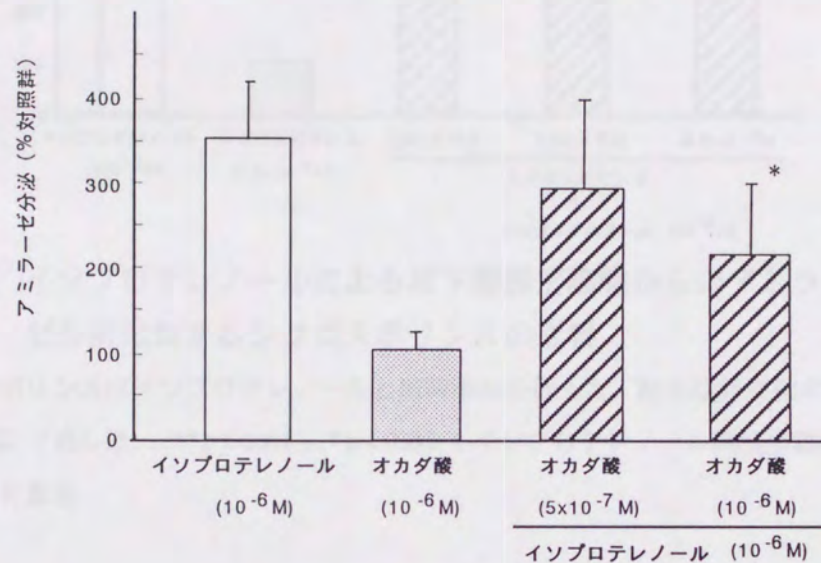


図11 イソプロテレノールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するオカダ酸の影響

オカダ酸はイソプロテレノールと同時添加を行った。結果は4~5例の平均値 $\pm$ S.D.で表した。* $p < 0.05$: イソプロテレノール単独処置群に対する有意差

ホスファターゼ2Bの特異的阻害薬であるシクロスポリンAを用いて、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に対する影響を調べた。シクロスポリンAは $0.6 \times 10^{-6} \text{M}$ および $1.5 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度において抑制作用を示したが、 $6.0 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度では増強作用を示し、二相性の作用を示した(図12)。

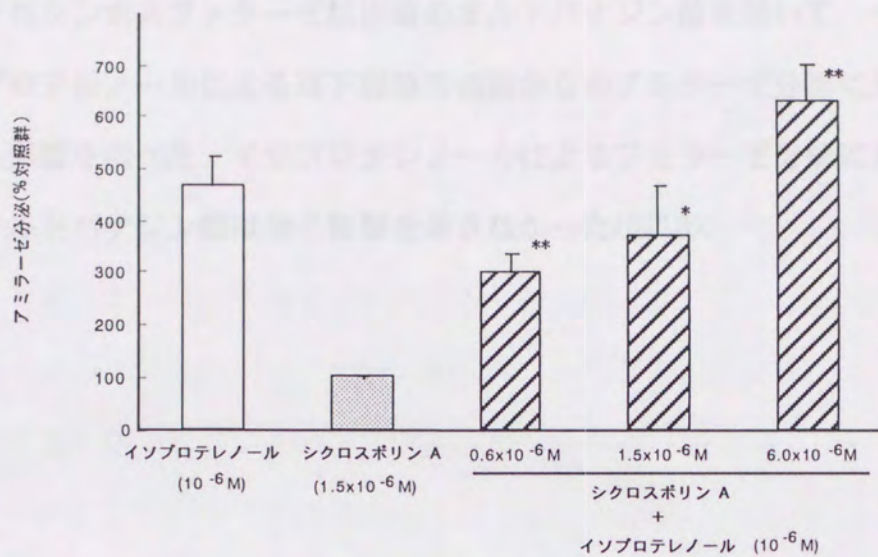


図12 イソプロテレノールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するシクロスポリンAの影響

シクロスポリンAはイソプロテレノールと同時添加を行った。結果は3~7例の平均値 $\pm$ S.D.で表した。 ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$: イソプロテレノール単独処置群に対する有意差

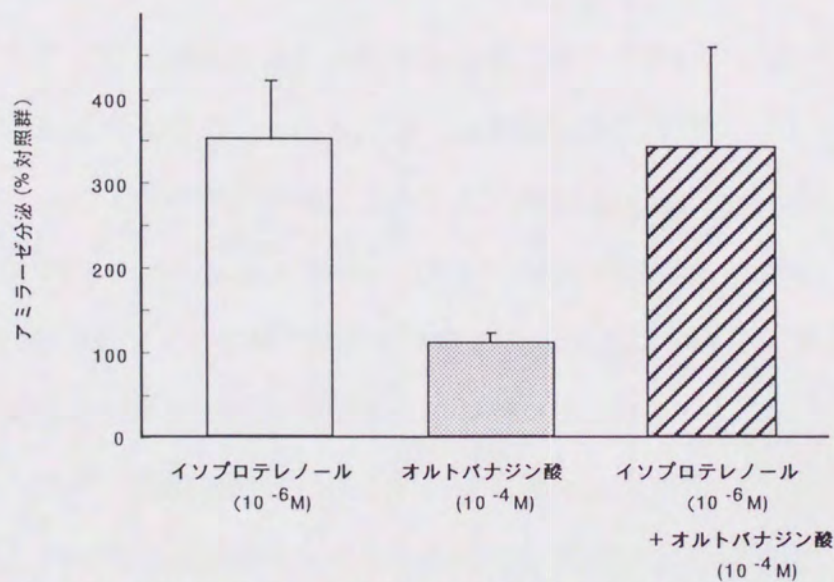


図13 イソプロテレノールによる耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に対するオルトバナジン酸の影響

オルトバナジン酸はイソプロテレノールと同時添加を行った。結果は4~5例の平均値 $\pm$ S.D.で表した。

チロシンホスファターゼ阻害薬のオルトバナジン酸を用いて、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に対する影響を調べた。イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌に対し、オルトバナジン酸は全く影響を示さなかった(図13)。

【考察】

耳下腺腺房細胞からのアミラーゼの分泌が、細胞外カリウムイオン濃度の上昇や比較的選択性の低いカリウムチャネルブロッカーであるTEAにより促進されたことから(図2, 3), アミラーゼの分泌調節においてカリウムチャネルの関与していることが示された。種々のカリウムチャネルブロッカーの作用について検討した結果, カルシウム依存性カリウムチャネルブロッカーのアパミンとカリブドトキシンが, アミラーゼ分泌を促進したことから(図3), カルシウム依存性カリウムチャネルの遮断により, アミラーゼ分泌が促進されることが明らかになった。カルシウム依存性カリウムチャネルには, コンダクタンスが小さい値 (5~20 pS) を示す低コンダクタンスのカリウムチャネル (SK_{Ca}), コンダクタンスが大きい値 (100~250 pS) を示す高コンダクタンスのカリウムチャネル (BK_{Ca}), その他もの, の3種類が考えられているが (Sah, 1996), 高コンダクタンスのカリウムチャネルが耳下腺腺房細胞基底側膜上に存在することがパッチクランプ法により示されている (Maruyama ら, 1983a; Maruyama ら, 1983b; Maruyama ら, 1986; 東城と田隈, 1995)。低コンダクタンスのカリウムチャネルはアパミンで遮断され, 高コンダクタンスのカリウムチャネルはカリブドトキシンの両者が同様に作用したことから(図3), 低コンダクタンスのカリウムチャネルと高コンダクタンスのカリウムチャネルの両方のカルシウム依存性カリウムチャネルが耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に関与することが示唆された。一方, 膵臓の β 細胞では,

インスリン分泌にはATP 依存性カリウムチャネルが関与していると報告されているが (Garrino ら, 1989), 耳下腺腺房細胞においてはATP 依存性カリウムチャネルブロッカーのグリベンクラミド

(Quast と Cook, 1989) がアミラーゼ分泌に影響しなかったことから(図3), アミラーゼ分泌にATP 依存性カリウムチャネルは関与していないと考えられた.

イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌に対して, カリウムチャネルブロッカーのTEAが促進的に, カリウムイオノフォアのバリノマイシンが抑制的に作用したことから(図5, 6), カリウムチャネルはアミラーゼ分泌に対して抑制的に機能していることが示唆された. すなわち, カリウムチャネルの遮断によるアミラーゼ分泌促進, 開口によるアミラーゼ分泌抑制という機構が示唆された. 一方, カルバコールによるアミラーゼ分泌に対する結果から(図5, 6), ムスカリン受容体刺激によるアミラーゼ分泌にはカリウムチャネルの関与は認められなかった.

神経系において, ソマトスタチンおよびモルヒネはカリウムチャネルを開口し, そのコンダクタンスを上昇させることが報告されている (North ら, 1987; 斎藤, 1990; 斎藤, 1991; White ら, 1991). 本研究でみられた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に対するソマトスタチンとモルヒネの抑制作用は(図7), カリウムチャネルの開口を介していると考えられ, この結果からもアミラーゼ分泌に対するカリウムチャネルによる調節機構のあることが示唆された. 下垂体腫瘍細胞において, ソマトスタチンのアミラーゼ分泌抑制効果に関与するカリウムチャネルはカ

ルシウム依存性カリウムチャネルであることが示唆されており (White ら, 1991), 耳下腺腺房細胞のアミラーゼの分泌調節にカルシウム依存性カリウムチャネルが関与しているという今回の結果と一致するものである。一方, 中枢神経系に対するモルヒネの効果に関係するカリウムチャネルは, ATP 依存性カリウムチャネルも考えられているが (Welch と Dunlow, 1993 ; Uchida ら, 1993), グリベンクラミドがアミラーゼ分泌に影響しなかったことから(図3), 耳下腺腺房細胞にはATP 依存性カリウムチャネルは存在しないことが示唆された。また, TEAによるアミラーゼ分泌に対して, オピオイド μ 受容体選択的アゴニストのDAGOが抑制作用を示したことから(図8), モルヒネはオピオイド μ 受容体を介してカリウムチャネルに作用していると考えられ, オピオイド μ 受容体を介したアミラーゼ分泌の調節機構の存在が示唆された。

耳下腺腺房細胞において, イソプロテレノールおよびTEAにより57kDaタンパクへの ^{32}P の結合の増加がみられたことより(図9), これら両薬物による57kDaタンパクのリン酸化の促進が明らかとなった。カリウムチャネルのサブユニットの一つに57kDaの分子量のものがあるという報告から (McCann と Welsh, 1990), 本実験においてリン酸化された57kDaタンパクがカリウムチャネルである可能性が考えられる。

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は, プロテインキナーゼA阻害薬であるH-8により有意に抑制されたが, プロテインキナーゼC阻害薬のスタウロスポリン, およびチロシンキナーゼ阻害薬のゲニステインでは影響がなかったことから

(図10), イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌に, プロテインキナーゼAによるリン酸化が関与していることが示唆された.

オカダ酸は, 1A, 2A, 2Bの3種類のセリン/スレオニンホスファターゼを阻害することが知られているが (Cohen ら, 1990), 各々のセリン/スレオニンホスファターゼに対する阻害強度が大きく異なっており, 使用する濃度を選択することによりいずれの型かを識別することが可能である. ラットの膵臓においてはホスファターゼ2B (カルシニューリン) を阻害する濃度のオカダ酸がタンパク成分の生成分泌を阻害するという報告があるが (Waschulewski ら, 1996), 本研究においても, オカダ酸が 10^{-6} Mの高濃度においてのみイソプロテレノールによるアミラーゼ分泌に対して抑制作用を示したことから(図11), この作用はホスファターゼ2Bの抑制によるものと考えられた.

シクロスポリンAは近年の臓器移植医療の進歩を支える免疫抑制薬として知られているが, イムノフィリン複合体を形成してホスファターゼ2Bの活性を抑制することが知られている (Liu ら, 1991). モルモットの胃の主細胞において, シクロスポリンAと同じくホスファターゼ2Bの活性を抑制する免疫抑制薬タクロリムス (FK-506) が, サイクリックAMPのレベルを低下させ, カルバコールによるペプシノーゲン分泌を抑制するという報告や (Raufman ら, 1996), ラット膵臓の腺房細胞においてシクロスポリンAがホスファターゼ2Bを阻害し, カルバコールおよびコレシストキニンによるアミラーゼの分泌を抑制するという報告がある (Groblewski ら, 1994). 本研究において, シクロスポリンAはイソプロテレノール

によるアミラーゼ分泌に対して抑制作用を示したが(図12), これはホスファターゼ2Bの抑制によるものであると考えられた. シクロスポリンAが 6.0×10^{-6} Mの高濃度において, 増強作用を示した原因としては, ホスファターゼ阻害薬は細胞骨格のサイトケラチンを強くリン酸化し, 細胞膜に水泡状の突起を形成するなど細胞構造に影響を与えるという報告があることから(東城と田隈, 1995), 高濃度のシクロスポリンAにより細胞膜が障害をうけ, アミラーゼが漏出した可能性も考えられるが, 詳細は不明である.

チロシンホスファターゼ阻害薬のオルトバナジン酸は, イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌に対して影響を示さなかったことから(図13), チロシンホスファターゼの耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌への関与はないと考えられる.

【総括】

- (1) カルシウム依存性カリウムチャンネルブロッカーは, 耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌を誘発した.
- (2) イソプロテレノール刺激による耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌は, カリウムチャンネルブロッカーにより促進され, カリウムイオノフォアにより抑制された.
- (3) 耳下腺腺房細胞にイソプロテレノールあるいはカリウムチャンネルブロッカーを作用させると, アミラーゼ分泌と並行して57kDaタンパクのリン酸化がみられた.
- (4) 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は, プロテインキナーゼA阻害薬およびプロテインホスファターゼ2B阻害薬により抑制された.

【結論】

本研究より、 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ネルの開口による分泌の抑制、および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。また、57kDa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、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可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えて戴き、実験の立案および実施に御指導を賜りました大阪大学歯学部歯科薬物学講座故齋藤喜八教授、ならびに御懇篤なる御鞭撻と御校閲を賜りました大阪大学歯学部口腔細菌学講座浜田茂幸教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、多大な御協力と御援助を戴きました大阪大学歯学部附属病院障害者歯科治療部森崎市治郎助教授、ならびに研究の細部に至るまでひとかたならぬ御指導を戴きました大阪大学歯学部歯科薬物学講座前田定秋講師に深謝いたします。あわせて、実験に関して暖かな御助言を戴きました大阪大学歯学部附属病院薬剤部三輪芳弘博士に厚く御礼申し上げます。そして、研究の円滑な進展のために御配慮と御協力を戴きました障害者歯科治療部の天野敦雄講師をはじめとする医局員の皆様、同じく御配慮と御協力を戴きました歯科薬物学講座の教室員の皆様に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 赤須 崇, 時政孝行 (1991). K-チャネル. *生体の科学* 42 : 420-423.
- Baum BJ, Freiberg JM, Ito H, Roth GS, Filburn CR (1981). β -Adrenergic regulation of protein phosphorylation and its relationship to exocrine secretion in dispersed rat parotid gland acinar cells. *J Biol Chem* 256 : 9731-9736.
- Butcher FR, Putney JW Jr (1980). Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 13 : 215-249.
- Cohen P, Holmes CFB, Tsukitani Y (1990). Okadaic acid : a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15 : 98-102.
- Garrino MG, Plant TD, Henquin JC (1989). Effects of putative activators of K^+ channels in mouse pancreatic β -cells. *Br J Pharmacol* 98 : 957-965.
- Greger R, Bleich M, Warth R (1997). New type of K^+ channels in the colon. *Wien Klin Wochenschr* 109 : 497-498.
- Groblewski GE, Wagner ACC, Williams JA (1994). Cyclosporin A inhibits Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase and secretion in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 269 : 15111-15117.
- Harper JF (1988). Stimulus-secretion coupling : second

- messenger-regulated exocytosis. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 22: 193-318.
- 川口 充, 山岸久子 (1995). 唾液線細胞の薬物受容機構. *日薬理誌* 105 : 295-303.
- Levitan IB (1994). Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu Rev Physiol* 56 : 193-212.
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBD-FK506 complexes. *Cell* 66 : 807-815.
- Maruyama Y, Gallacher DV, Petersen OH (1983a). Voltage and calcium-activated K^+ channel in basolateral acinar cell membranes of mammalian salivary glands. *Nature* 302 : 827-829.
- 丸山芳夫, 西山明德 (1986). 外分泌細胞におけるイオン液分泌機構. *日本臨牀* 44 : 1500-1503.
- Maruyama Y, Nishiyama A, Izumi T, Hoshimiya N, Petersen OH (1986). Ensemble noise and current relaxation analysis of K^+ current in single isolated salivary acinar cells from rat. *Pflugers Archiv* 406 : 69-72.
- Maruyama Y, Petersen OH, Flanagan P, Pearson GT (1983b). Quantification of Ca^{2+} -activated K^+ channels under hormonal control in pig pancreas acinar cells.

Nature 305 : 228-232.

McCann JD , Welsh MJ (1990). Basolateral membrane potassium channels in secretory epithelia, in : *Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential*, ed. N.S.Cook (Ellis Horwood, Englewood Cliffs, NJ) p. 326.

Miwa Y, Saeki M, Yamaji A, Maeda S, Saito K(1996). Effect of morphine on secretion of amylase from isolated parotid acini. *Life Sci* 59 : 1809-1819.

西山明德 (1986). 外分泌細胞の生理学. *日本臨牀* 44 : 1498-1499.

North RA, Williams T, Surprenant A, Christie MJ (1987). μ and δ receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 5487-5491.

Petersen OH, Maruyama Y(1984). Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 307 : 693-696.

Poulsen JH, Bledsoe SW (1978). Salivary gland K^+ transport : in vivo studies with K^+ -specific microelectrodes. *Am J Physiol* 234 : E79-E83.

Putney JW Jr (1986). Identification of cellular activation mechanisms associated with salivary secretion. *Annu Rev Physiol* 48 : 75-88.

- Quast U, Cook NS (1989). Moving together : K^+ channel openers and ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Pharmacol Sci* 10 : 431-435.
- Raufman J-P, Lin J, Raffaniello RD (1996). Calcineurin mediates calcium-induced potentiation of adenylyl cyclase activity in dispersed chief cells from guinea pig stomach. *J Biol Chem* 271 : 19877-19882.
- Sah P(1996). Ca^{2+} -activated K^+ currents in neurons; type, physiological roles and modulation. *Trends Pharmacol Sci* 19 : 150-154.
- 斎藤喜八 (1990). オピオイドの薬理・生理. *ブレインサイエンス* 1 : 317-324.
- 斎藤喜八 (1991). ニューロモジュレーターとオピオイド類との関係. *Clin Neurosci* 9 : 610-612.
- 瀬川彰久 (1991). 開口分泌の共焦点レーザー顕微鏡観察. *生体の科学* 42 : 255-259.
- 東城庸介, 田隈泰信 (1995). 唾液腺-耳下腺腺房細胞における分泌機能と情報伝達. *生体の科学* 46 : 278-285.
- Tojyo Y, Uchida M, Matsumoto Y (1987). Inhibitory effects of calmodulin antagonists on isoproterenol- and dibutyryl cyclic AMP-stimulated amylase release from rat parotid acinar cells. *Jpn J Pharmacol* 45 : 487-491.
- Uchida Y, Saito K, Ohnishi T, Maeda S, Matsuya T, Inoki R

- (1993). Antagonism by glibenclamide of the effect of morphine in hippocampal preparations. *Neurosci Lett* 162 : 114-116.
- Waschulewski IH, Kruse M-L, Agricola B, Kern HF, Schmidt WE (1996). Okadaic acid disrupts Golgi structure and secretion in the rat pancreas. *Am J Physiol* 270 : G939-G947.
- Welch SP, Dunlow LD (1993). Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists : a common mechanism of action?. *J Pharmacol Exp Ther* 267 : 390-399.
- White RE, Schonbrunn A, Armstrong DL (1991). Somatostatin stimulates Ca^{2+} -activated K^{+} channels through protein dephosphorylation. *Nature* 351 : 570-573.
- 吉田 洋 (1996) . 唾液の性状と機能. *日本歯科医学会雑誌* 15 : 68-73.
- Yoshimura K, Nezu E (1992). Interaction between the calcium and cyclic AMP messenger systems in perfused rat parotid acinar cells. *Biochem Pharmacol* 43 : 1031-1041.

