

Title	抗利尿ホルモンの作用機構に関する研究：とくに微小管の関与について
Author(s)	湯浅, 繁一
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32264
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	湯 浅 繁 一
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4408 号
学位授与の日付	昭和53年10月3日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	抗利尿ホルモンの作用機構に関する研究 —とくに微小管の関与について—
論文審査委員	(主査) 教授 阿部 裕 (副査) 教授 中馬 一郎 教授 和田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

周知のように抗利尿ホルモン (ADH) は, cyclic AMPを細胞内 messengerとして腎遠位尿管, 集合管の水再吸収を促進させるが, 細胞内cyclic AMP濃度上昇後, いかにして管腔側膜の水透過性が亢進するかは現在も明らかでない。最近, このADHの水透過性促進作用に細胞質内微小管が関与することを示唆するデータが報告され, 注目を集めている。

そこで本研究では, ADH作用における微小管の関与を明らかにする目的で, 哺乳類遠位部尿管膜の機能上のアナログであるヒキガエル膀胱膜を用い, 微小管蛋白と結合し, 微小管の生成を阻害するコルヒチンが, 生体膜を介した水転送にどのような影響を与えるかを検討すると共に, 膀胱膜上皮細胞からの微小管蛋白の分離を試み, その生化学的特性についても検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕

1. ヒキガエル膀胱膜水透過性に対するコルヒチンの影響

Bentleyの方法に準じ, *Bufo bufo japonicus*の膀胱を中空のガラス棒にsac様に固定, 内側(粘膜側)に1/5 Ringer液3mlを注入, 外側(漿膜側)を20ml Ringer液中に浸し, 20分毎に膀胱重量を測定, 浸透圧勾配に従った粘膜側より漿膜側への水の移動量を求めた。

1) 漿膜側に添加した 10^{-5} ~ 10^{-4} Mコルヒチン単独では, ヒキガエル膀胱膜水透過性に有意の変化を認めなかったが, 5 mU/ml vasopressinの水透過性促進作用は 10^{-5} Mコルヒチン漿膜側添加4時間後に有意に抑制された。 10^{-4} Mコルヒチンでは, 漿膜側添加1時間後に vasopressinの反応性が抑制され, 4時間後ではさらに強い抑制作用がみられた。

- 2) また 2 mM cyclic AMP の水透過性促進作用も vasopressin と同様に抑制されることから、コルヒチンは細胞内 cyclic AMP 濃度上昇以後の過程で、vasopressin の作用を抑制することが示唆された。
- 3) 360 mM 尿素の粘膜側添加, 360 mM マニトールの漿膜側添加, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B の粘膜側添加によるヒキガエル膀胱膜水透過性促進作用は, 10^{-4}M コルヒチン漿膜側添加 4 時間後も何ら有意の影響をうけなかった。
- 4) 漿膜側 Ca^{++} 濃度を通常の Ringer 液濃度の 1 mM から 8 mM に上昇させると, 10^{-4}M コルヒチン漿膜側添加 4 時間後も, 2 mM cyclic AMP の水透過性促進作用は何ら影響を受けなかった。すなわち漿膜側 Ca^{++} 濃度の上昇により, コルヒチンの cyclic AMP 反応性抑制効果は完全に消失した。

2. ヒキガエル膀胱膜上皮細胞からの微小管蛋白の分離

ヒキガエル膀胱膜上皮細胞からの微小管蛋白の分離は, Weisenberg らの方法に従った。20~30 匹分の膀胱膜からスライドガラス端により上皮細胞をかき集め, homogenate の上清で DEAE-Sephadex chromatography による fractionation を行ない, 各分画について colchicine-binding assay, disc gel 電気泳動を行なった。colchicine-binding activity は各分画を ^3H -colchicine と 37°C , 1 時間 incubate 後, DEAE-Sephadex column にて unbound colchicine を分離し, proteinbound radioactivity を計測することによって求めた。

- 1) DEAE-Sephadex chromatography による colchicine-binding activity の回収率は 85% で, 脳からの微小管蛋白の分離で報告されている如く, その大部分が 0.8 M KCl で溶出させた分画にみられた。
- 2) この分画にみられた colchicine-binding protein を確認する目的で, SDS-urea, urea gel 電気泳動を行なったところ, 牛脳から分離した微小管蛋白に相当する bands が容易に認められた。
- 3) ヒキガエル膀胱膜上皮細胞から得られた上記分画と牛脳から分離した微小管蛋白を用い, incubation medium 中に 1 mM 及び 8 mM CaCl_2 を加え, 微小管蛋白とコルヒチンとの結合に対する Ca^{++} の影響を検討したところ, 8 mM Ca^{++} でいずれの微小管蛋白との結合も有意に阻害され, ヒキガエル膀胱膜上皮細胞中にみられた微小管蛋白は牛脳から分離した微小管蛋白と同様の結合性を有していた。

〔総括〕

ADH 作用における微小管の関与を明らかにする目的で, ヒキガエル膀胱膜を用い, 生理学的ならびに生化学的検討を行ない, 次の如き結論を得た。

- 1) コルヒチンは細胞内 cyclic AMP 濃度上昇後, 管腔側細胞膜の水透過性亢進までの過程に働いて, vasopressin の作用を抑制すると推定された。
- 2) ヒキガエル膀胱膜上皮細胞内に微小管蛋白の含まれることを, colchicine-binding assay, disc gel 電気泳動により確認し得た。

以上の成績から, ヒキガエル膀胱膜上皮細胞内の微小管は ADH 作用に重要な役割を果たしており, cyclic AMP 濃度上昇後, 管腔側細胞膜の透過性亢進までの過程に関与していると推定された。

論文の審査結果の要旨

本論文は胃遠位部尿細管膜のアナログであるヒキ蛙膀胱膜を用い、抗利尿ホルモン作用における微小管の関与を明らかにしたものである。特に膀胱膜上皮細胞から微小管蛋白の分離を試み、その存在を生化学的に始めて明らかにした点は注目に値する。さらに本研究により、微小管が細胞内cyclic AMP濃度上昇後、管腔側細胞膜の水透過性充進までの過程に関与すると推定されたことは、抗利尿ホルモン作用における微小管の役割を考える上で興味深い。