



Title	単離糸球体におけるangiotensin IIの細胞内情報伝達機構に関する研究：糸球体リン脂質代謝に与えるangiotensin IIの効果
Author(s)	越智, 聰
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34673
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	越 智 聰
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6804 号
学位授与の日付	昭和60年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	単離糸球体におけるangiotensin IIの細胞内情報伝達機構に関する研究 —糸球体リン脂質代謝に与えるangiotensin IIの効果—
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 垂井清一郎 教授 岸本 進

論文内容の要旨

(目的)

Angiotensin II (A II) は糸球体に対する直接的作用により、糸球体濾過過程の調節に重要な役割を果たしている。この糸球体における A II の生理的作用を解明するために、従来より、単離糸球体を用いた A II 受容体や A II 作用時の収縮に関する研究が行なわれ、それらの確認がなされてきたが、A II 受容体以後の細胞内情報伝達機構に関しては adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) の上昇がおこらないこと以外不明である。近年、cAMP に依存しないホルモンの細胞内機構として、細胞膜 phosphoinositides 代謝の亢進が重要とされている。本研究では、単離糸球体リン脂質代謝に与える A II の効果を検討することにより、糸球体における A II の細胞内情報伝達機構の解明を試みた。

(方法)

1. 糸球体単離

体重 200~250 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを断頭屠殺後、腎を剥出し、外側皮質のミンチを作成した。これを、径 120 μm の stainless sieve, 径 133 μm , 90 μm の nylon sieve に順に通し、最後の 90 μm sieve 上に残った単離糸球体を集め、Hanks 液に懸濁した。低速遠心 (500 rpm, 1 分) による洗浄を 3 回施行後、以下の実験に供した。得られた単離糸球体には、輸入、輸出細動脈の付着なく、Bowman 囊は除去され、尿細管断片の混在は 5 % 以下であった。

2. ^{32}P 標識実験

単離糸球体をリン酸を加えずに作成した Hepes 緩衝 Hanks 液に懸濁し (^{32}P) orthophosphate と 37 °Cで 60 分間 incubate した後、A II を添加、37 °Cで incubation 後、chloroform, methanol 混液の添

加により反応を停止した。

3. ^3H 標識実験

単離糸球体を Hepes 緩衝 Hanks 液に懸濁し, [$1, 2, 3 - ^3\text{H}$] glycerol と 37°C で 60 分間 incubate した。Hepes 緩衝 Hanks 液で 3 回洗浄後, A II を添加, 37°C で incubate し, 上記と同様の方法にて反応を停止した。

4. 脂質の抽出と分離

脂質抽出は, polyphosphoinositides (PPI) 代謝検討の場合に Downes らの方法を用いた以外は, Lapetina and Michell の方法に従った。Thin layer chromatography により各脂質成分を分離し, ヨウ素発色により脂質の spot を検出した。

5. 放射活性の測定

各脂質成分の spot をかきとり, liquid scintillation spectrometry により放射活性を測定した。

(成績)

1. A II 添加による ^{32}P 標識リン脂質の変化

10^{-6} M A II 添加により phosphatidic acid (PA), phosphatidyl inositol (PI) の ^{32}P 放射活性はそれぞれ 15 秒および 2 分より増加したが, phosphatidyl choline (PC), phosphatidylethanolamine (PE) の ^{32}P 放射活性には A II の著明な影響は認められなかった。A II による PA, PI の ^{32}P 放射活性增加は $10^{-12} \sim 10^{-6}\text{ M}$ の範囲の A II 濃度に依存し, 10^{-7} M A II 添加による PA の ^{32}P 放射活性增加は 10^{-5} M saralasin の添加により完全に抑制された。さらに PPI のひとつである phosphatidyl inositol 4, 5-bisphosphate (TPI) の ^{32}P 放射活性は 10^{-6} M A II 添加後 15 秒で著明に減少し, 5 分まで対照に比し低値を示した。TPI の ^{32}P 放射活性減少も A II 濃度依存性であった。一方, もうひとつの PPI である phosphatidyl inositol 4-monophosphate (DPI) の ^{32}P 放射活性は, A II 添加後 15 秒で減少したが, TPI とは異なり 1 分には対照と差を認めなくなった。

2. A II 添加による ^3H 標識脂質の変化

10^{-6} M A II 添加により, diacylglycerol (DG) の ^3H 放射活性は 15 秒以後増加した。TPI の ^3H 放射活性は 15 秒より減少したが, PI の ^3H 放射活性は 15 秒では減少しなかった。

(総括)

- ラット腎糸球体を単離して, そのリン脂質代謝に与える A II の効果を検討した。
- A II は PC, PE の ^{32}P 放射活性に影響することなく, PA, PI の ^{32}P 放射活性を増加させた。A II により DG の ^3H 放射活性が増加したが, PI の ^3H 放射活性減少はこれよりも遅く, 一方, DG の増加と一致して TPI の ^{32}P 放射活性減少がみられた。
- したがって, A II は単離糸球体 A II 受容体に結合後, まず phospholipase C による TPI の DG への分解をおこした後, PA, PI を経て TPI が再合成される一連の phosphoinositides 代謝を促進することが強く示唆され, A II の細胞内情報伝達機構にこの系の関与が考えられた。

論文の審査結果の要旨

これまで angiotensin II は糸球体に作用して、糸球体濾過過程の調節に重要な役割を果たしており、その際 cyclic AMP の上昇はおこさず、 Ca^{2+} 依存性であることが報告されていた。本論文では Ca^{2+} 依存性のホルモンの細胞内情報伝達機構として重要視されているイノシトールリン脂質代謝の亢進、特に phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate の分解がラット単離糸球体において angiotensin II により生じることを明らかとし、angiotensin II と糸球体受容体結合後の情報伝達機構にその関与の可能性を示した。本研究は angiotensin II が糸球体に作用する際の細胞内機構を初めて明らかにしたとともに、糸球体機能の調節機構解明に関する今後の研究にも重要な示唆を与えるものであり、学位に値するものと考えられる。