



Title	ウシ副腎髄質細胞からのcatecholamine分泌ならびにCa ⁺⁺ influxにおよぼすprotease inhibitor, proteaseの合成基質およびcalmodulin inhibitorの阻害効果とその阻害機序
Author(s)	西部, 俊三
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35115
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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）	にし 西	べ 部	しゅん 俊	ぞう 三
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6973	号	
学位授与の要件	昭和60年8月2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	ウシ副腎髄質細胞からのcatecholamine分泌ならびにCa ⁺ influx におよぼすprotease inhibitor, protease の合成基質およびcalmodulin inhibitorの阻害効果とその阻害機序			
論文審査委員	(主査)			
	教授 森 武貞			
	(副査)			
	教授 坂本 幸哉 教授 吉田 博			

論文の審査結果の要旨

(目 的)

刺激に対して細胞が反応を示す際、刺激—受容体結合に続いてその情報が細胞内へ伝達される必要がある。この情報伝達機構に関してはCa⁺, cyclic nucleotide, 細胞膜リン脂質の代謝回転に伴う生理活性物質が重要な役割を果たしていることが知られている。また多くの細胞系で、Ca⁺の細胞内外への移動が、刺激情報伝達機構の初期相における重要なステップであると考えられている。しかしその詳細については不明の点が多い。

本研究では、まずウシ副腎髄質単離細胞系におけるcatecholamine (CA) 分泌反応とprotease inhibitor, proteaseの合成基質, calmodulin inhibitor による分泌反応阻害効果を明らかにした。そしてこれらの阻害剤とCa⁺流入機構との関係を検討し、分泌反応阻害機序を明らかにしようと試みた。

(方法ならびに成績)

1. ウシ副腎髄質単離細胞からのCA分泌

ウシ副腎髄質をコラゲナーゼ処理により単離細胞系とした。2～3×10⁵個の単離細胞を2.2 mMのCa⁺を含む緩衝液中にて37°C、一定時間、各種刺激物質と共にincubateし、上清中に放出されたCA量を測定した。

Acetylcholine (ACh) による刺激においては、放出されるCA量はAChの濃度依存性に増大し、10⁻⁴ Mの濃度ではほぼ最大分泌量に達した。またその分泌反応は迅速で、分泌量は反応開始後1分で対照に比して有意な上昇を示し、20分で最大となった。放出されたCA量は細胞内総CA量の11.5%であった。過剰のK⁺は細胞膜の脱分極を促し、副腎髄質細胞からのCA分泌を引き起こした。56mMK⁺存在下で副

腎髄質細胞はその総CA量の9.7%を分泌した。また細胞膜のCa⁺透過性を高めるcalcium ionophoreによってもCA分泌が生じた(A-23187: 10⁻⁵ M, 7.5%)。これらの分泌反応にはCa⁺が必須であり、EGTAによりCa⁺をキレートする事によってCA分泌は抑制された。一方、細胞外液中のCa⁺濃度を上げる事によりCA分泌量は増大した。

2. Protease inhibitor, proteaseの合成基質, calmodulin inhibitorによるCA分泌阻害作用

AChによるCA分泌反応に対し、protease inhibitorであるgabexate mesilate, phenylmethylsulphonyl fluoride(PMSF), N_α-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK)はその分泌反応を抑制した。一方、soybean trypsin inhibitor(SBTI), aprotinin, chymostatinは抑制作用を示さなかった。Proteaseの合成基質であるp-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride(TAME)はCA分泌を抑制したが、N_α-acetyl tyrosine ethyl ester(ATEE)は阻害作用を示さなかった。Calmodulin inhibitorであるW-7, trifluoperazine(TFP), chlorpromazine(CPZ), promethazine(PMZ)はAChによるCA分泌を阻害した。Protease inhibitor, proteaseの合成基質は56mMK⁺によるCA分泌を阻害しなかった。TEP, CPZ, PMZは56mMK⁺によるCA分泌を抑制したが、その抑制に必要な濃度はAChによるCA分泌を抑制する濃度よりはるかに高かった。Calcium ionophoreによるCA分泌に対してはこれらの阻害剤は全く効果がなかった。

3. ウシ副腎髄質細胞におけるCa⁺流入と, Protease inhibitor, proteaseの合成基質, calmodulin inhibitorの作用。

2~3 × 10⁵個の単離細胞を⁴⁵Ca⁺を含む緩衝液中で各種刺激物質, 阻害剤と共に37°C一定時間incubateし、細胞内へ取り込まれた⁴⁵Ca⁺の放射活性を測定することにより細胞内に流入したCa⁺量を求めた。10⁻⁴ MのAChにより、1 mg cell proteinあたり3分間に21.2 nmolesのCa⁺が細胞内へ流入した。Protease inhibitorであるgabexate mesilate, TLCK, proteaseの合成基質であるTAMEはこのCa⁺の流入を阻害した。また阻害に必要な濃度は、ほぼCA分泌抑制を示す濃度と一致した。Calmodulin inhibitorであるW-7やTFPもCA分泌を抑制する濃度でCa⁺流入を阻害した。

4. Protease inhibitor, calmodulin inhibitorの阻害様式とCa⁺ channelに対する作用。

W-7およびgabexate mesilateの作用は、ACh受容体に対して非拮抗的であった。また、W-7, TFP, gabexate mesilateはCa⁺ channel blockerとしての作用は示さなかった。

(総括)

1. Protease inhibitor, proteaseの合成基質, calmodulin inhibitorは副腎髄質細胞の生理的刺激であるacetylcholineによるcatecholamine分泌反応を阻害した。
2. Protease inhibitor, proteaseの合成基質, calmodulin inhibitorであるW-7の作用部位は刺激-受容体結合から細胞膜の脱分極までの反応であった。
3. Calmodulin inhibitorのうちTFP, PMZ, CPZの作用点は、低濃度では刺激-受容体結合からの細胞膜の脱分極までの間であり、高濃度ではそれ以後の部分であると考えられた。
4. これらの阻害剤の作用は、acetylcholine受容体に対して非拮抗的であり、またCa⁺ channel blockerとしての作用は認められなかった。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ウシ副腎髄質細胞をモデルとして、細胞内情報伝達機構の初期相を検討したものである。Protease inhibitor, protease の合成基質, calmodulin inhibitorがアセチルコリンによるカテコラミン分泌反応に対して抑制作用を有することを見出し、これらの作用点が刺激受容体結合から細胞膜の脱分極までの間に在ることを明らかにした。ウシ副腎髄質細胞における刺激情報伝達機構を解明する上で、価値ある研究と認める。