



Title	EFFECT OF MORPHINE ON SECRETION OF AMYLASE FROM ISOLATED PAROTID ACINI
Author(s)	三輪, 芳弘
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41254">https://hdl.handle.net/11094/41254</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	三 輪 芳 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 3 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 4 月 23 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	EFFECT OF MORPHINE ON SECRETION OF AMYLASE FROM ISOLATED PAROTID ACINI (唾液腺腺房細胞におけるアミラーゼ分泌へのモルヒネの効果)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 三木 直正 (副査) 教 授 倉智 嘉久 教 授 黒川 信夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

最近の分泌機構に関する研究で、低分子量の GTP 結合蛋白質である Rab ファミリーの関与が注目される一方で、3 量体 GTP 結合蛋白質の関与も報告されている。本研究では、耳下腺腺房細胞を用いてアミラーゼ分泌に関する 3 量体 GTP 結合蛋白質の存在、およびその同定を試みた。さらにモルヒネの作用について検討を加えた。

#### 〔方 法〕

腺房細胞はラットの耳下腺を、コラゲナーゼとヒアルロニダーゼを含むハンクス液中で消化することにより調製した。腺房細胞からのアミラーゼの分泌は、アミラーゼ測定キットを用いて行った。GTPase 活性の測定は Koski らの方法に従った。

$[^{32}\text{P}]$  4-azidoanilido-GTP は carbodiimide を用いて、 $[^{32}\text{P}]$  GTP と 4-azidoanilido を架橋して合成した。フォトアフィニティーラベルは、腺房細胞を  $\alpha$  毒素処置後、 $[^{32}\text{P}]$  4-azidoanilido-GTP と反応させた後、フォトアフィニティーラベリングを行い、12.5% SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーを行なった。イムノプロット解析は蛋白をニトロセルロース膜に転写し、抗  $\text{G}\alpha_s$  抗体又は抗  $\text{G}\alpha_i$  抗体を用いて化学蛍光検出法により検出した。

#### 〔成 績〕

- 1)  $\text{AlCl}_3$  ( $30 \mu\text{M}$ ) 単独ではアミラーゼ分泌効果はなく、 $\text{NaF}$  ( $10 \text{ mM}$ ) 単独で弱いアミラーゼ分泌効果がみられた。 $\text{AlCl}_3/\text{NaF}$  は濃度依存的にアミラーゼの分泌を促進し、 $\text{AlCl}_3/\text{NaF}$  の濃度が  $30 \mu\text{M}/10 \text{ mM}$  の時の濃度でのアミラーゼ分泌量は  $10^{-5} \text{ M}$  のカルバコールによる分泌に相当した。
- 2) GTPase 活性は、 $\text{AlCl}_3$  ( $30 \mu\text{M}$ ) により影響をうけなかつたが、 $\text{NaF}$  ( $10 \text{ mM}$ ) により 54% の阻害がみられた。また、 $\text{AlCl}_3/\text{NaF}$  により、GTPase 活性は 22% に減少した。以上のことから、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{NaF}$ 、 $\text{AlCl}_3/\text{NaF}$  のアミラーゼ分泌に影響を及ぼす。

ゼ分泌作用と GTPase 活性抑制に作用相関関係があることが示された。

3) cyclicAMP (cAMP) はアミラーゼ分泌を促進させなかつたが、細胞の  $\alpha$  毒素による処置後はアミラーゼ分泌促進効果を示した。また細胞膜透過性の db-cAMP はアミラーゼ分泌を促進させた。

4) GTP および GTP- $\gamma$ -S は、無処置腺房細胞からのアミラーゼの分泌には影響を及ぼさなかつたが、 $\alpha$  毒素処置後は、GTP と GTP- $\gamma$ -S は共に  $10^{-4}$  M の濃度でアミラーゼの分泌を促進した。

5) モルヒネ ( $10^{-4}$  M) は GTPase 活性を促進し、この作用はナロキソン ( $10^{-4}$  M) により拮抗された。AlCl<sub>3</sub>/NaF で促進されたアミラーゼの分泌は、モルヒネによって部分的に抑制された。 $\alpha$  毒素処置腺房細胞においてモルヒネは GTP- $\gamma$ -S によるアミラーゼの分泌促進に対しては影響を示さなかつたが、GTP によるアミラーゼの分泌に対しては抑制を示した。この効果はナロキソンにより抑制された。

6) GTP 結合蛋白質のフォトアフィニティーラベルによる解析の結果は、 $\alpha$  毒素処置により 43 kDa と 31 kDa の蛋白質が濃くラベルされ、このラベリングは AlCl<sub>3</sub>/NaF により増強された。モルヒネは  $\alpha$  毒素の存在で 43 kDa と 31 kDa の蛋白質のバンドのラベリングを抑制した。イムノプロット解析より、[<sup>32</sup>P] 4-azidoanilido-GTP の取り込みが増加した 43 kDa 蛋白は、Gs 蛋白のバンドと一致した。

7) 細胞をコレラ毒素で処置すると、アミラーゼ分泌は促進された。コレラ毒素処理後はイソプロテレノールと AlCl<sub>3</sub>/NaF はアミラーゼ分泌を促進しなかつた。

#### 〔総括〕

1) AlCl<sub>3</sub> ( $30 \mu\text{M}$ ) と NaF ( $10 \text{ mM}$ ) を共存させるとアミラーゼ分泌の促進がみられ、アミラーゼ分泌と GTPase 活性阻害に相関がみられた。また、コレラ毒素で腺房細胞を処置するとアミラーゼの分泌促進がみられ、コレラ毒素処理後はイソプロテレノール、AlCl<sub>3</sub>/NaF によるアミラーゼ放出効果は失われたので、イソプロテレノール、AlCl<sub>3</sub>/NaF で活性化される G 蛋白質は三量体 G 蛋白質で Gs であることが示唆された。

2) [<sup>32</sup>P] 4-azidoanilido-GTP を用いたフォトアフィニティーラベルとイムノプロットの結果より、アミラーゼの分泌に関与し、モルヒネと AlCl<sub>3</sub>/NaF の影響を受ける 43 KDa 蛋白質は Gs である可能性が高いことが示され、このことはイソプロテレノールで促進されるアミラーゼ分泌に対するコレラ毒素処置による抑制からさらに強く支持される。

3) モルヒネは GTPase 活性の促進と Gs への GTP の取り込みを減少させることによってアミラーゼ分泌を減少させることが考えられた。アミラーゼ分泌および GTPase 活性にモルヒネが影響を与え、ナロキソン拮抗を示したことから、耳下腺にオピエート受容体が存在することが明らかになった。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では、耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に関与する 3 量体 GTP 結合蛋白質について、その存在と同定、さらにモルヒネのアミラーゼ分泌に対する作用について検討した。その結果、3 量体 GTP 結合蛋白質を活性化するフッ化アルミニウムおよび GTP により、耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌が起こり、その分泌はモルヒネにより抑制された。またイソプロテレノールによるアミラーゼ分泌は、GDP- $\beta$ -S とコレラ毒素によって抑制された。フォトアフィニティーにより、GTP との結合能を有する分子量 43 kDa の蛋白が Gs であることが示され、この Gs への GTP の結合はフッ化アルミニウムにより増強され、モルヒネにより抑制された。

本研究により耳下腺からのアミラーゼ分泌に 3 量体 GTP 結合蛋白質、特に Gs が深く関与していることが明らかにされた。また、モルヒネがオピオイド受容体を介して 3 量体 GTP 結合蛋白質の機能に影響を与え、アミラーゼ分泌を抑制することが示唆された。

以上、本論文は唾液腺の薬物受容機構を解明していく上で重要であり、学位の授与に値すると認める。