

学位論文題名

Ca²⁺ シグナルと分泌に対する VIP と PACAP の作用

— モルモット膵腺房細胞と牛副腎髄質細胞を用いた解析 —

学位論文内容の要旨

vasoactive intestinal polypeptide (VIP) と pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) とは、アミノ酸構成において互いに類似性が高く、セクレチン、グルカゴンなどとも類似しており、神経ペプチドの一群を構成している。VIP と PACAP が標的細胞に作用して多様な反応を引き起こす際の共通の細胞内シグナルは、cyclic AMP (cAMP) 上昇であろうと考えられてきた。これらペプチドの作用機構の研究が進むにつれて、PACAP が引き起こす標的細胞の反応には、cAMP 上昇以外に細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇が関与していることを示す研究結果が発表されてきた。VIP と PACAP が引き起こす標的細胞の細胞内シグナル伝達機構を調べるため、モルモット膵腺房標本と牛副腎髄質細胞とを用いて本研究を進めた。

(1) モルモット膵腺房標本を 100 pM コレシストキニン (CCK) で持続的に刺激すると、振動性 [Ca²⁺]_i 上昇と持続性アミラーゼ分泌が記録された。この CCK 刺激に 10 nM VIP を重ねて刺激すると、CCK 刺激時の振動性 [Ca²⁺]_i 上昇の頻度と振幅は抑制されるにもかかわらず、アミラーゼ分泌反応は有意に増強された。アデニル酸シクラーゼを活性化することにより細胞内 cAMP 濃度を上昇させるフォルスコリン (10 μM) を CCK 刺激に重ねて投与しても、VIP と同様の分泌反応の増強が認められた。これらの結果は、CCK 刺激による分泌反応を VIP が増強する機構は cAMP が関与する機構であるが、Ca²⁺ シグナルの促進を介する機構ではないことを示している。したがって、CCK 刺激による分泌反応を VIP が増強する機構は、[Ca²⁺]_i 上昇以降の段階か、あるいは、[Ca²⁺]_i に関与しない系のどちらかであると推測される。腺房標本を 10 nM VIP 単独で刺激した時には、アミラーゼ分泌を引き起こすが、[Ca²⁺]_i には影響を与えなかった。この結果からは、VIP の分泌効果には Ca²⁺ シグナルが関与していないという可能性を否定できない。VIP の分泌効果への Ca²⁺ シグナルの関与の有無をさらに検討するため、次の実験を行った。細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位の Ca²⁺ ポンプ阻害薬であるサプシガルギン (10 μM) で [Ca²⁺]_i 上昇を引き起こし、VIP 刺激を重ねると、VIP 単独刺激に

よるアミラーゼ分泌反応より有意に大きい反応が得られた。これに対して、 Ca^{2+} キレート剤であるBAPTAを細胞内に取り込ませたうえに細胞外 Ca^{2+} も除去し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を約70 nMまで低下させたときには、VIPによる分泌はほぼ完全に消失した。これらの結果は、VIP刺激によるアミラーゼ分泌反応の出現には70 nM以上の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が必要であり、 Ca^{2+} シグナル以後の過程をVIPが促進することを示している。

以上の結果から、CCK刺激による分泌反応をVIPが増強する機構は、 Ca^{2+} シグナルの促進を介した機構ではなく、 Ca^{2+} シグナルから酵素原顆粒の開口放出に至る過程の促進機構であると推論される。

(2) 牛副腎髄質細胞を100 nM PACAPで持続的に刺激すると、刺激直後急速な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は続いて緩やかに下降しながらも十数分間持続した後、刺激前のレベルに戻った。同様の条件でカテコールアミン分泌を測定すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇経過に対応した時間経過で分泌反応が記録できた。細胞外 Ca^{2+} を除去すると、PACAP刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と分泌反応のいずれも、刺激直後の一過性の上昇反応（初期相）のみが数分間残存し、緩やかに下降する反応相（持続相）は消失した。初期相は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出によって形成され、持続相は細胞外からの持続的な Ca^{2+} 流入によって形成されると推定される。

PACAP持続刺激時の Ca^{2+} 流入経路を解明するため、ホールセルパッチクランプ法を用いて、PACAPによる膜電位と膜電流の変化を記録した。200 nM PACAPは、数分間持続する内向き電流と脱分極を引き起こした。細胞外 Na^+ 除去によってこの内向き電流の約90%が抑制されるという結果から、内向き電流の主成分は Na^+ 流入であり、この Na^+ 流入によって引き起こされる細胞膜の脱分極が電位依存性 Ca^{2+} チャネルを開くと考えられる。PACAP刺激による Ca^{2+} 流入は、L型 Ca^{2+} チャネルの阻害薬であるニカルジピン（10 μM ）によって抑制されたが、N型、P型、およびQ型 Ca^{2+} チャネルの阻害薬によっては影響を受けなかった。さらに、PACAP刺激による Ca^{2+} 流入は、protein kinase C (PKC) の阻害薬であるスタウロスポリン（1 μM ）によって抑制された。

Ca^{2+} 放出に関連する細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位の種類を判別するため、サブシガルギンと、カフェイン感受性チャネルを開口状態に保持することによってカフェイン感受性 Ca^{2+} 放出を阻害するライアナジン、および、 IP_3 感受性チャネルの阻害薬であるシナリジンの3種の薬物を用いた。シナリジン（50 μM ）はヒスタミン（10 μM ）による Ca^{2+} 放出をほぼ完全に抑制したが、PACAP（100 nM）とカフェイン（10mM）による Ca^{2+} 放出を抑制しなかった。一方、サブシガルギン（10 μM ）とライアナジン（10 μM ）は、PACAPによる Ca^{2+} 放出を強く抑制した。

以上の結果から、PACAP持続刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇機構は次の二成分から成り立っ

ていると推定される。1) カフェイン感受性 Ca^{2+} 貯蔵部位から細胞質へ Ca^{2+} が放出される。2) PKC活性化を介する Na^+ 流入に依存して膜が脱分極し、これによって活性化されるL型電位依存性 Ca^{2+} チャネルを経て細胞外から Ca^{2+} が流入する。

モルモット膵腺房標本と牛副腎髄質細胞とを用いて行った上述の研究結果を基礎にこれまでの研究報告を参考にしながら、VIPとPACAPが引き起こす標的細胞の細胞内シグナル伝達機構について考察し、次のような結論を得た。

膵腺房細胞では、VIPは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こさず、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇以後の分泌過程を増強することによって分泌反応を引き起こす。このVIPの分泌機構は次のような段階をたどるものと推定される。これまで報告されているII型PACAP受容体（VIP受容体に相当）にVIPが結合し、続いてcAMPが上昇し、 Ca^{2+} シグナルから酵素原顆粒開口放出までの過程を促進して酵素分泌反応を引き起こす。CCK刺激による刺激-放出連関をVIPが促進する効果の機構も、上述の諸段階をたどるものと推定される。副腎髄質細胞では、PACAP自身が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし、刺激-放出連関を進行させる。この反応は次のような段階を経て進行すると考えられる。I型PACAP受容体にPACAPが結合し、カフェイン感受性 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出と、PKC活性化を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入との二つの機構によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し、カテコールアミン分泌を引き起こす。

学位論文審査の要旨

主査	教授	菅野	富夫
副査	教授	中里	幸和
副査	教授	斉藤	昌之
副査	助教授	葉原	芳昭

学位論文題名

Ca²⁺ シグナルと分泌に対する VIP と PACAP の作用

— モルモット膵腺房細胞と牛副腎髄質細胞を用いた解析 —

vasoactive intestinal peptide (VIP) と pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は類似性の高いアミノ酸構成を有するペプチドである。VIP と PACAP が引き起こす標的細胞の細胞内シグナル伝達機構を解析するため、申請者は、モルモット膵腺房標本と牛副腎髄質細胞とを用いて本研究を進め、75頁の本論文にまとめ、学位論文として提出し、参考文献3編を付している。

モルモット膵腺房標本を100 pM コレシストキニン(CCK)で持続的に刺激すると、振動性[Ca²⁺]_i上昇が記録され持続性アミラーゼ分泌が確かめられた。このCCK刺激に10 nM VIPを重ねて刺激すると、CCK刺激時の振動性[Ca²⁺]_i上昇の頻度と振幅は抑制されるにもかかわらず、アミラーゼ分泌反応は有意に増強された。牛副腎髄質細胞を100 nM PACAPで持続的に刺激すると、刺激直後急速な[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした。この[Ca²⁺]_i上昇は続いて緩やかに下降しながらも十数分間持続した後、刺激前のレベルに戻った。同様の条件でカテコールアミン分泌を測定すると、[Ca²⁺]_i上昇経過に対応した時間経過で分泌反応が記録できた。細胞外Ca²⁺を除去すると、PACAP刺激による[Ca²⁺]_i上昇と分泌反応のいずれも、刺激直後の一過性の上昇反応(初期相)のみが数分間残存し、緩やかに下降する反応相(持続相)は消失した。初期相は細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺放出によって形成され、持続相は細胞外からの持続的なCa²⁺流入によって形成されると推定される。ホールセルパッチクランプ法を用いて、PACAPによる膜電位と膜電流の変化を記録した実験の結果から、PACAP持続刺激時の[Ca²⁺]_i上昇機構は二成分から成り立っていると推定した。

申請者は、VIP と PACAP が引き起こす標的細胞の細胞内シグナル伝達機構について考察

し、次のような結論を得た。膵腺房細胞では、これまで報告されているII型PACAP受容体（VIP受容体に相当）にVIPが結合し、続いてcAMPが上昇し、Ca²⁺シグナルから酵素原顆粒開口放出までの過程を促進して酵素分泌反応を引き起こす。副腎髄質細胞では、I型PACAP受容体にPACAPが結合し、カフェイン感受性Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺放出と、PKC活性化を介した細胞外からのCa²⁺流入との二つの機構によって[Ca²⁺]_iが上昇し、カテコールアミン分泌を引き起こす。

この研究は、I型とII型PACAP受容体の細胞内シグナルと分泌との関係を解析し、新しい知見を提供するものであり、これらペプチドの生理的役割の解明にも寄与するものと思われる。よって審査員一同は田中敬子氏が博士（獣医学）を受ける資格があるものと認めた。