

学位論文題名

唾液腺腺房細胞に機能発現する
Kチャンネル蛋白の唾液分泌への寄与

学位論文内容の要旨

1. 唾液は口腔および歯の衛生維持、正常な消化に重要であるだけでなく、動物種に特化した様々な生理的役割をもつ。唾液は神経刺激やホルモンを介して刺激性に唾液腺から分泌されるが、例外的に反芻動物の耳下腺では刺激性唾液分泌に加え、自発性の唾液分泌がある。唾液分泌の本態は唾液腺腺房細胞における一方性の経上皮電解質輸送に伴う水の浸透流であり、その分泌メカニズムにおいて腺房細胞基底外側膜に存在する K^+ コンダクタンスが重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子基盤については詳細な検討がなされていない。
2. 本研究では自発性および刺激性唾液分泌にそれぞれ重要な役割を果たしている可能性がある K^+ チャンネルを電気生理学的ならび分子生物学的手法により同定し、その調節機構と生理学的役割について調べた。
3. まず、自発性分泌の存在が知られているウシ耳下腺の内向き整流性 K^+ チャンネル (Kir) の同定を試み、そして Kir が静止膜電位の維持に役割を果たすか否か検討した。
4. ウシ耳下腺腺房細胞新鮮分離標本に whole-cell パッチクランプ法を適用し、強い内向き整流性を示す K^+ 電流が存在することを確認した。cell-attach パッチクランプ法により観察できた 27pS の K^+ チャンネルコンダクタンスの生物物理学的性質および薬理的性質は whole-cell Kir 電流の性質と一致した。
5. Kir 阻害薬の Ba^{2+} の細胞外液への添加により、ウシ耳下腺腺房細胞の静止膜電位は脱分極側へシフトした。
6. reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いてウシ耳下腺細胞における Kir2.1 transcripts の発現を確認した後、ウシ Kir2.1 (bKir2.1) 分子をクローニングした。HEK293 細胞に強制発現させた bKir2.1 の whole-cell 電流および単一チャンネル電流の電気生理学的性質および薬理的性質はウシ耳下腺腺房細胞に機能発現する Kir の性質と一致した。
7. これらの結果はウシ耳下腺腺房細胞には Kir2.1 が機能発現し、自発性唾液分

泌時の膜電位維持に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。また、ウシ耳下腺 Kir の電気生理学的性質が、これまで報告されているヒツジ耳下腺 Kir の性質と類似していたことから、Kir2.1 が反芻動物耳下腺で共通に機能発現する可能性を示唆する。

8. 刺激性唾液分泌に Ca^{2+} 依存性 K^+ コンダクタンス (K_{Ca}) を担う K^+ チャネルが重要な役割を果たすことが多くの研究により示唆されている。最近の研究により、唾液腺腺房細胞に SK4/IK1 チャネルが存在することが示されたが、その制御機構と生理的機能については明らかにされていない。そこでラット顎下腺腺房細胞に機能発現する SK4/IK1 様 K_{Ca} の細胞内 ATP による調節機構について調べた。
9. 腺房細胞基底外側膜から得た outside-out マクロパッチ膜に存在する tetraethylammonium 非感受性 K_{Ca} の電気生理学的性質および薬理的性質は報告されている SK4/IK1 チャネルの性質と類似していた。さらに、RT-PCR 法によりラット顎下腺細胞に SK4/IK1 transcripts の発現を確認した。
10. outside-out マクロパッチ膜に存在した SK4/IK1 様 K_{Ca} 活性は、細胞質側溶液に ATP または Mg^{2+} が存在しないと経時的な低下を示した。また、細胞質側溶液の ATP を非加水分解性 ATP アナログの adenosine 5'-(β , γ -imido)triphosphate で置換しても SK4/IK1 様 K_{Ca} 活性を維持できなかった。
11. 細胞質側溶液内に ATP と Mg^{2+} とともに cAMP を添加すると SK4/IK1 様 K_{Ca} 活性は上昇したが、cAMP 依存性蛋白キナーゼ (PKA) の阻害薬である adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioate-Rp 添加は逆に K_{Ca} 活性を抑制した。アデニル酸シクラーゼの活性化薬である forskolin は SK4/IK1 様 K_{Ca} 活性を上昇させた。
12. 細胞質側 ATP による K_{Ca} 活性維持機構には Ca^{2+} 感受性の変化と Ca^{2+} によるチャネル活性の最大値の増加という 2 つの機序が関与していた。
13. これらの結果は、ラット顎下腺腺房細胞において細胞内 ATP 依存性 SK4/IK1 様 K_{Ca} 活性維持には少なくとも内因性の PKA を介する機構が関与することを示唆する。さらに、SK4/IK1 様チャネルが細胞内 cAMP 上昇による Ca^{2+} 依存性唾液分泌増強作用に寄与する可能性を示唆する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 助 教 授 石 川 透

学 位 論 文 題 名

唾液腺腺房細胞に機能発現する Kチャンネル蛋白の唾液分泌への寄与

1. 唾液は口腔および歯の衛生維持、正常な消化に重要であるだけでなく、動物種に特化した様々な生理的役割をもつ。唾液は神経刺激やホルモンを介して刺激性に唾液腺から分泌されるが、例外的に反芻動物の耳下腺では刺激性唾液分泌に加え、自発性の唾液分泌がある。唾液分泌の本態は唾液腺腺房細胞における一方向性の経上皮の電解質輸送に伴う水の浸透流であり、その分泌メカニズムにおいて腺房細胞血管側膜に存在する K⁺コンダクタンスが重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子基盤については詳細な検討がなされていない。
2. 本研究では自発性および刺激性唾液分泌にそれぞれ重要な役割を果たしている可能性がある K⁺チャンネルを電気生理学的ならび分子生物学的手法により同定し、その調節機構と生理学的役割について調べた。
3. まず、自発性分泌の存在が知られているウシ耳下腺の内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir) の同定を試み、そして Kir が静止膜電位の維持に役割を果たすか否かを検討した。
4. ウシ耳下腺腺房細胞新鮮分離標本に whole-cell パッチクランプ法を適用し、強い内向き整流性を示す K⁺電流が存在することを確認した。cell-attach パッチクランプ法により観察できた 27pS の K⁺チャンネルコンダクタンスの生物物理学的性質および薬理的性質は whole-cell Kir 電流の性質と一致した。
5. Kir を抑制する細胞外 Ba²⁺投与はウシ耳下腺腺房細胞の静止膜電位を脱分極側へシフトさせた。
6. RT-PCR 法を用いてウシ耳下腺細胞における Kir2.1 transcripts の発現を確認した後、ウシ Kir2.1 (bKir2.1) 分子をクローニングした。HEK293 細胞に強制発現させた bKir2.1 の whole-cell 電流および単一チャンネル電流の電気生理学的性質および薬理的性質はウシ耳下腺腺房細胞に機能発現する Kir の性質と一致した。
7. これらの結果はウシ耳下腺腺房細胞には Kir2.1 が機能発現し、自発性唾液分泌時の膜電位維持に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。また、ウシ耳下腺 Kir の電気生理学的性質が、これまで報告されているヒツジ耳下腺 Kir の性質と類似していたことから、Kir2.1 が反芻動物耳下腺共通に

機能発現する可能性を提唱する。

8. 刺激性唾液分泌に腺房細胞に存在する Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル (K_{Ca}) が重要な役割を果たすことが多くの研究により示唆されている。最近の研究により、唾液腺腺房細胞に SK4/IK1 チャンネルが存在することが示されたが、その制御機構と生理的機能については明らかにされていない。そこでラット顎下腺腺房細胞に機能発現する K_{Ca} 電流の細胞内 ATP による調節機構について調べた。
9. ラット顎下腺腺房細胞基底外側膜から得た outside-out マクロパッチ膜に存在する K_{Ca} 電流の電気生理学的性質および薬理的性質は報告されている SK4/IK1 チャンネル性質と類似していた。さらに、RT-PCR 法によりラット顎下腺細胞に SK4/IK1 transcripts の発現を確認した。
10. outside-out マクロパッチ膜に存在した SK4/IK1 様チャンネル活性は、細胞質側溶液に ATP または Mg^{2+} が存在しないと経時的な低下を示した。また、細胞質側溶液の ATP を非加水分解性 ATP アナログの AMP-PNP で置換しても SK4/IK1 様チャンネル活性を維持できなかった。
11. 細胞質側溶液内に ATP と Mg^{2+} とともに cAMP を添加すると SK4/IK1 様チャンネル活性は上昇したが、cAMP 依存性蛋白キナーゼの阻害薬である Rp-cAMPS 添加は逆にチャンネル活性を抑制した。アデニル酸シクラーゼのアクチベーターである forskolin は SK4/IK1 様チャンネル活性を上昇させた。
12. 細胞内 ATP によるチャンネル活性維持機構には Ca^{2+} 感受性の変化と Ca^{2+} によるチャンネル活性の最大値の増加という最低 2 つの機序が関与していた。
13. これらの結果は、ラット顎下腺腺房細胞において細胞内 ATP 依存性 SK4/IK1 様チャンネル活性維持には少なくとも内因性の cAMP 依存性蛋白キナーゼを介する機構が関与することを示唆する。さらに、SK4/IK1 様チャンネルが細胞内 cAMP 上昇による Ca^{2+} 依存性唾液分泌増強作用に寄与する可能性を提唱する。

これらの研究成果は獣医生理学の発展に寄与するものである。よって審査委員一同は、上記博士論文提出者林美樹夫氏が、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定により、博士（獣医学）の学位を授与される資格を有するものと判定した。