

題 目 培養ラット耳下腺での唾液分泌促進剤による
オルニチン脱炭酸酵素活性の調節に関する研究

著 者 徳島大学大学院歯学研究科 口腔生化学講座 三好 圭子

内容要旨

種々の唾液分泌促進剤は耳下腺での唾液分泌促進に加え、細胞増殖促進作用がある。ラット耳下腺explantの培養系を用いて、これまでに β -adrenergic agonistのisoproterenol (IPR) やcholinergic agonistのcarbachol (CC)が、増殖に必要なポリアミンの合成律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)の活性を上昇させ、DNA合成を促進することが報告されている。一方、ODCはこれらアゴニストのみならず低浸透圧下でも著明な誘導を受けることが知られている。この低張による誘導はIPRとは相乗効果を示すのに反し、CCによって強く抑制された。また、CCはIPRによる誘導をも抑制した。そこで本研究では、このCCの抑制作用を中心に唾液腺でのODC調節機構について検討した。

[方法]

199培地上に浮かべたシリコナイズしたレンズペーパー上でラット耳下腺explant (1~2mg)を培養した。低張培地にはNaCl濃度のみを半減した浸透圧が約40%低い199培地を用いた。分泌能はアゴニスト添加2時間後の培地中のアミラーゼ活性で測定し、ODC活性は4-6時間後に測定した。ODCのmRNAとタンパク質の定量はそれぞれNorthern blot法とWestern blot法で行った。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$)はトリプシンとコラゲナーゼを用いて調製したラット耳下腺腺房細胞に、Fura 2-AMをとりこませ、ARGUS 50 (浜松ホトニクス)にて測定した。cAMPレベルは、cAMP kit 「ヤマサ」(ヤマサ醤油)にて測定した。

[結果]

- 1) ODC活性は等張培地でIPRによって約29倍上昇するが、この上昇はCCで70%も抑制された。この時、CCはIPRによるcAMPレベルの上昇には影響を及ぼさなかった。また低張培地でODC活性は6時間後に約100倍の最大活性に達し、IPRはこれを3倍に増強したのに反し、CCは1/3に抑制した。
- 2) アゴニストや低張によるODC誘導では活性とmRNAおよび蛋白質量はほぼ比例した。ただ、例外として低張でのCCのODC活性の抑制ではmRNAの低下は見られなかった。
- 3) IPRや低張によるODC誘導でのCCの抑制はODC蛋白質の半減期の短縮によるものではない。
- 4) 小胞体の Ca^{2+} 依存性ATPaseを抑制するthapsigarginは、CCと同様にODC活性低下作用を示すが、 $[Ca^{2+}]_i$ を低下させるBAPTA-AMはCCのODC活性抑制作用を弱めた。
- 5) 耳下腺腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ はCCとthapsigarginでそれぞれ周期的および一過性の上昇を示した。
- 6) 腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は低張培地で持続的上昇を示した。
- 7) ODC誘導と異なりアミラーゼ分泌は低張や $[Ca^{2+}]_i$ の影響を受けなかった。

[結論]

耳下腺での唾液分泌促進とODC誘導は異なる機構によって制御されていることが示唆された。ODCの誘導は、その誘導因子の種類に関係なく $[Ca^{2+}]_i$ と関連し、その上昇はODC誘導を翻訳レベルで抑制すると考えられる。

②

Studies on the regulation mechanism of ornithine decarboxylase activity
in atropine-stimulated rat parotid explant

Keiko MIYOSHI

Department of Biochemistry, School of Dentistry, The University of Tokushima

培養ラット耳下腺での唾液分泌促進剤による
オルニチン脱炭酸酵素活性の調節に関する研究

Abstract:

Ornithine decarboxylase (ODC) which catalyzes the formation of putrescine from ornithine, is rat parotid explants cultured on electrical grid paper floating on 199 medium. The activity was increased when the explants were cultured in hypertonic medium. In this study, I investigated the effects of CC and modulation of cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) on IPR- and hypertonicity-induced ODC activity and obtained the following results.

著者：三好 圭子

1) CC, IPR and hypertonicity alone showed a 2-3 fold increase in enzyme protein and mRNA of ODC but CC depressed IPR- and hypertonicity-dependent ODC induction without decreases in mRNA level and half-life of ODC, suggesting translational depression of ODC by CC.

所属：徳島大学大学院歯学研究科

2) Thapsigargin also showed the depression of ODC activity in hypertonicity, and both thapsigargin and CC caused a periodic increase in $[Ca^{2+}]_i$.
口腔生化学講座
(主任：井上 秀夫教授)

3) CC-induced decrease in ODC activity was recovered by BAPTA-AM, which abolished CC-induced elevation of $[Ca^{2+}]_i$. This Ca^{2+} chelator also increased CC-dependent increase in ODC activity.

キーワード：培養耳下腺、唾液分泌促進剤、

4) Hypertonicity caused a gradual increase in $[Ca^{2+}]_i$ in parotid explants.
These results suggest that increase in $[Ca^{2+}]_i$ is involved in ODC activity and putrescine participates in regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in rat parotid gland.

オルニチン脱炭酸酵素、

細胞内カルシウムレベル

②

Studies on the regulation mechanism of ornithine decarboxylase activity
in histamine-stimulated rat parotid explant

Kaori MIYASHITA

Department of Biochemistry, School of Dentistry, The University of Tokushima

培養ラット耳下腺での唾液分泌促進剤による

オルニチン脱炭酸酵素活性の調節に関する研究

Abstract: Ornithine decarboxylase (ODC) which catalyzes the formation of putrescine from ornithine, is an essential enzyme cultured rat parotid explant floating on 199 medium. The activity also decreases when the explants were cultured in hypertonic medium. In this study, I investigated the effect of CC and modulation of intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) on IPR-induced histamine-stimulated ODC activity and obtained the following results.

著者：三好 圭子

所属：徳島大学大学院歯学研究科

口腔生化学講座

(主任：井上 秀夫教授)

キーワード：培養耳下腺、唾液分泌促進剤、

オルニチン脱炭酸酵素、

細胞内カルシウムレベル

**Studies on the regulation mechanism of ornithine decarboxylase activity
in sialagogue-stimulated rat parotid explant**

Keiko MIYOSHI

Department of Biochemistry, School of Dentistry, The University of Tokushima

Abstract: Sialagogues, β -adrenergic isoproterenol (IPR) and cholinergic carbachol (CC), induced ornithine decarboxylase (ODC) which catalyzes the formation of putrescine from ornithine, in rat parotid explants cultured on siliconized lens paper floating on 199 medium. The activity also increased when the explants were cultured in hypotonic medium. In this study, I investigated the effects of CC and modulators of intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) on IPR- and hypotonicity-elevated ODC activity and obtained the following results.

- 1) CC, IPR and hypotonicity alone elevated ODC activity with increases in enzyme protein and mRNA of ODC but CC depressed IPR- and hypotonicity-dependent ODC induction without decreases in mRNA level and half-life of ODC, suggesting translational depression of ODC by CC.
- 2) Thapsigargin also showed the depression of ODC induction by IPR and hypotonicity, and both thapsigargin and CC caused a periodic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of parotid acinar cells.
- 3) CC-induced decrease in ODC activity was recovered by BAPTA-AM, which abolished CC-induced elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. This Ca^{2+} chelator also increased CC-dependent increase in ODC activity.
- 4) Hypotonicity caused a gradual increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in parotid acinar cells.

These results suggest that increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ result in decrease of ODC activity and putrescine participates in regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat parotid gland.

緒言

最も強力な唾液分泌促進剤である β -adrenergic agonistのイソプロテレノール (isoproterenol, IPR) は、唾液分泌のみならず細胞増殖をも促進することが明らかにされている¹⁻³⁾。Selyeら¹⁾は体重130~140 gのラットに50 mgのIPRを1日2回17日間、腹腔内へ投与すると細胞増殖と肥大により唾液腺重量が約5倍に増加すると報告している。IPRによる唾液腺増殖では耳下腺が最も顕著で、顎下腺がこれに次ぐが、舌下腺はほとんど増殖応答を示さない。また、この耳下腺及び顎下腺の増殖はIPRの1回投与によっても惹起されることが見いだされている⁴⁻⁶⁾。このようなIPRによる唾液腺増殖期の生化学的変化について、Inoueら⁶⁻⁸⁾は複製前期でのポリアミン合成の促進が増殖に必須であることを明らかにした。

ポリアミンは原核細胞、真核細胞を問わず全ての細胞内に存在し、細胞増殖に必須な生体アミンであると考えられている⁹⁻¹⁰⁾。特に哺乳動物のポリアミンであるプトレッシン、スペルミジン、スペルミンは、肺¹¹⁾、再生肝^{11,12)}、腫瘍組織¹³⁾など、増殖の盛んな組織でその細胞内レベルが顕著に上昇することが知られている。これらポリアミンの合成を触媒する酵素のうち、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) は、増殖刺激を受けた細胞や組織では、例外なくその複製前期に著明に活性が上昇することから、ポリアミン合成の律速酵素であり、増殖の指標酵素でもある^{9,10)}。IPRを投与したマウスの耳下腺では投与24時間後

にピークを示す一過性のDNA合成の促進が起こるが、ODC活性は投与6~8時間後に著明な最大活性を示す。この活性に比例して、耳下腺のプトレッシンとスペルミジンのレベルも上昇する⁶⁾。これらの上昇をODCの活性阻害剤を投与して抑制すると、DNA合成の促進も強く阻害され、この阻害はプトレッシンの投与で消失されることから、IPRによる耳下腺増殖でもポリアミン合成の促進が不可欠であることが示された⁷⁾。

また、Kikuchiら¹⁴⁾はIPR以外の唾液分泌促進剤である、muscarinic-cholinergic agonistのカルバコール (carbachol, CC)¹⁵⁻¹⁸⁾、 α -adrenergic agonistのメトキサミンも培養ラット耳下腺 explantのODC活性とDNA合成を、オータコイドのセロトニン¹⁵⁾やサブスタンスP¹⁹⁻²¹⁾などもODC活性を上昇させることを見いだした。さらに、CCをマウスに反復投与すると *in vivo*でもODCとDNA合成が誘導されることを示した。これらの結果は、唾液分泌促進剤は全て耳下腺の増殖をおこすことを示唆すると共に、この増殖を *in vitro*の培養系で観察し得ることを示している。

一方、唾液分泌促進剤によるODC誘導の機構に関しても耳下腺 explantの培養系を用いて検討されている^{14,22-25)}。すなわち、唾液分泌促進剤を培地に加えると、耳下腺のODC mRNAは30分後より上昇し始め、2時間後に最高レベルに達するが、この上昇に先行して増殖関連プロトオンコジーン (fos, jun, myc, src) のmRNAレベルが上昇すると共に、複数の耳下腺タンパク質のセリン(またはスレオニン)並びにチロシン残基のリン酸化が促進される^{23,24)}。種々の阻害剤を用いた実験から、これらの生化学的応答は唾液(アミラーゼ)

分泌促進とは相関せず、ODC誘導のみに関与すると考えられるが、その詳細な機構は明らかではない。また、耳下腺のcAMPレベルはIPRで著明に上昇し、cAMPレベルを上昇するジブチリルcAMP (DBcAMP) やコレラ毒などが、IPRの作用を模倣すること²⁴⁾からcAMPがIPRの2つの作用のセカンドメッセンジャーであると考えられる。これに反し、CCは耳下腺のホスホリパーゼCを活性化し、イノシトール-1, 4, 5-三リン酸とジアシルグリセロールの産生を促進すると報告されている²⁶⁻²⁸⁾が、これらとCCのODC誘導作用との関連は明らかではない。

上記のようにODC誘導は細胞増殖に必須であるが、本酵素のもう1つの特徴は低張条件下でも強い誘導を受けることである²⁹⁻³⁴⁾。その生理的意義は現在のところ不明であるが、細胞や組織の種類を問わず普遍的で、培養耳下腺でも見られる。CCのODC誘導機構解明の過程で、CCが低張のみならず、IPRによるODC誘導に対して抑制的に作用することを見いだした。本研究は、このCCのODC抑制作用を中心に、唾液腺での唾液分泌促進剤の刺激伝達機構の解明をめざすものである。

実験材料及び方法

1. 試薬

L-[1-¹⁴C]ornithine (2.04 GBq/mmol) および [α -³²P] デオキシシチジン-5'-三リン酸 (dCTP, 111 TBq/mmol) はICN Pharmaceuticals, Inc. (Irvine, U.S.A.) より購入した。CC、IPR、DBcAMP、トリプシン (type III)、トリプシンインヒビター (type II-S)、コラゲナーゼ (type II) はSigma (St.Louis, U.S.A)より、O, O'-Bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM) はMolecular Probes (Eugene, U.S.A.)、タプシガルギンは和光純薬工業 (大阪) より入手した。Fura 2-AMは同仁化学研究所 (熊本) より、Cell-TakはCollaborative Biomedical (Bedford, U.S.A.) より、Bovine Serum Albumin (BSA-fraction V) はIntergen (New York, U.S.A.) より購入した。ODC cDNAの一部を含むpOD48プラスミド³⁵⁾はカリフォルニア大学サンフランシスコ校のPhilip Coffino博士、ウサギ抗マウスODCポリクローナル抗体³⁶⁾、抗ラットODCモノクローナル抗体 (HO-101)³⁷⁾は東京慈恵会医科大学の村上安子博士のご好意により分与された。horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ウサギIgG抗体はCappel (Durham, U.S.A.) より購入した。cAMP定量kitはヤマサ醤油 (千葉) 製を用いた。その他試薬は既報²¹⁻²⁵⁾のごとく入手した。

2. 耳下腺培養法

耳下腺explantの培養は、Inoueら³⁸⁾の方法により行った。すなわち、雄性Wistar系ラット(体重250-300 g)より摘出した耳下腺を培養培地 [10 mM Hepes (pH 7.4), penicilin (20 mg/ml), streptomycin (100 mg/ml)を含む199培地] 中で約1 mgのexplantを調製し、これを培地に浮かべたシリコン処理したレンズペーパー³⁹⁾上で37℃に加温した気相が空気のインキュベーター内で培養した。なお、低張培地にはNaCl濃度のみを減少して浸透圧を正常の62%に低下させた培地を用いた。また阻害剤を用いる実験では、阻害剤を加えた等張培地で耳下腺を30分~1時間培養して前処理を行い、以後も阻害剤の存在下で培養した。

3. ODC酵素活性の測定法

ODC活性はオルニチンのカルボキシル基を¹⁴Cでラベルした基質から生成される¹⁴CO₂を測定して行った³⁸⁾。すなわち、約15 mgの耳下腺explantを0.2 mlのODC緩衝液 [7 mMジチオスレイトール、0.2 mMピリドキサルリン酸、0.1 mM EDTAを含む氷冷した0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) 緩衝液] 中でポリトロン型ホモゲナイザー (日音医理科製) を用いてホモゲナイズし、4℃、15,000×gで20分間遠心して、その上清を酵素液とした。基質溶液はL-[1-¹⁴C]オルニチン (0.15 MBq/ml) を含む0.8 mM L-オルニチンを用いた。反応は酵素液0.15 mlに基質溶液0.05 mlを加えて開始後、37℃で1時間インキュベートし、生成した¹⁴CO₂を0.1 mlの1 N NaOHにトラップし、放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。また、タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準として、RossとSchatzの方法⁴⁰⁾で

行った。

4. α -アミラーゼ活性の測定

培地中に分泌された α -アミラーゼの活性は、可溶性デンプンを基質として生成された還元糖を3,5-ジニトロサリチル酸で比色定量するBernfeldの方法⁴¹⁾により測定した。ただし、反応は37°Cで5分間とし、1分間に1 μ molのマルトースを生成する活性を1 unitとし、活性は耳下腺explantの湿重量あたりのunit数 (U/mg T.W.) で表した。

5. ODCmRNA量の定量

mRNA量はKawanoら²³⁾の方法に準じ、Northern blot法にて測定した。すなわち、Sambrookら⁴²⁾の方法に従い、グアニジンチオシアネート/塩化セシウム法によって耳下腺explantから全RNAを抽出した。その一部 (5 μ g) を6%ホルムアルデヒドを含む1.0%アガロース (宝酒造、京都) ゲルを用いて電気泳動後、分離したRNAをHybond-N+フィルター (Amersham, England, UK) にトランスファーした。次いで、フィルターを0.05 M NaOHでアルカリ固定した後、³²P] 標識ODC cDNAプローブ (比活性 $1-1.5 \times 10^6$ cpm/ml, $1-5 \times 10^9$ cpm/mg) と10%の硫酸デキストランを含むハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識は [α -³²P] dCTPとランダムプライマー-DNAラベリングキット (宝酒造) を用いて行っ

た。プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド、5×SSPE、5×Denhardts¹、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、200 mg/mlサケ精子DNAを含む42°Cの溶液中で、それぞれ6時間、12時間行った。その後、フィルターを42°Cの2×SSPE-0.1% SDSで4回、1×SSPE-0.1% SDSで1回洗浄後、放射能活性の測定はオートラジオグラフィーまたはFujix Bioimaging Analyzer BAS 2000 II (フジ写真フィルム、東京)で行った。

6. ODCタンパク質の定量

ODCタンパク質量はWestern blot法により測定した。すなわち、耳下腺explantを種々のprotease inhibitor (1% aprotinin, 0.1 mM 4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride hydrochloride, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A) を含むODC緩衝液中でダウンス型ホモゲナイザーを用いてホモゲナイズし、4°C、100,000×gで1時間遠心してcytosol画分を調製した。この中のODCを、抗ODCモノクローナル抗体 (HO-101) を結合させたAffi-Gel 10 (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) カラムにより精製した⁴³⁾。すなわち、0.1 ml のHO-101-Affi-Gel 10をつめたカラムにタンパク質量2 mg相当のcytosol画分を添加し、カラムの2倍量の緩衝液 [1 mM DTT, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)] で洗浄した。さらに2 ml の1 M NaCl を含む同緩衝液で洗浄した後、0.6 mlの3 M MgCl₂でODCを溶出した。これに0.6 mlの蒸留水、125 µlの0.2%デオキシコレートと125 µlの68%トリクロロ酢酸 (TCA) を添加し、10分間氷中で静置後15,000

rpmで10分遠心した。沈殿物を20 μ lのLaemmliのサンプル用緩衝液 [0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール, 0.001% BPB] 中で煮沸変性した後、Laemmliの方法⁴⁴⁾に従い10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。次いでゲルをblotting用緩衝液 (6.91 g/l グリシン、3.03 g/l Tris) 中に5分間浸した後、バイオカラフト社製タンク式バッファートランスファー装置を用いて、イモビロン膜 (Millipore社製, Bedford, U.S.A.) に6 V/cmで3時間blottingを行った。その後、膜をblocking溶液 [3% BSA-0.01 M Tris-HCl (pH 7.4)-0.15 M NaCl (TBS)-0.02% NaN_3] 中で、4°Cで一晩blockingした。一次抗体 (ウサギ抗マウスODCポリクローナル抗体) を5000倍希釈して、室温で1時間反応させた。洗浄液 (TBS-0.05% Tween 20) にて洗浄後、2次抗体 (HRP 標識ヤギ抗ウサギIgG 抗体) を1500倍希釈して4°Cで1.5時間反応させた。洗浄後、ECLウエスタンブロットティング検出システム (Amersham) を用いて検出した。

7. ラット耳下腺腺房細胞の調製

耳下腺腺房細胞の調製は、Tojyoらの方法⁴⁵⁾により行った。すなわち、雄性Wistar系ラット (体重約300 g) より摘出した耳下腺 (約460 mg) を細切し、酸素を通気したトリプシン (0.5 mg/ml) を含むHBSS (20 mM Na-Hepes (pH 7.4)-0.1% BSA を添加したHanks' balanced salt solution緩衝液) 5 ml中で13分間、37°Cで振とう (振幅 3.5 cm ; 速度 100往復/分) した。EGTAを含む Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まないHBSSで洗浄後、トリプシンインヒビター (0.5 mg/ml)

を含む4 mlのCa²⁺, Mg²⁺ を含まないHBSS中で5分間振とうし、さらに10 ml のCa²⁺, Mg²⁺を含まないHBSSで10分間振とうした後、HBSSで洗浄した。次いで、酸素を通気したコラゲナーゼ (130 unit/ml) を含む10 ml のHBSSで13分間振とうし、ナイロンメッシュで濾過後HBSSで洗浄し、Cell-Takでコート(3.5 μg/cm²)した直径13 mmの丸型カバーガラス (松浪硝子、大阪) 上に接着させた。

8. 細胞内遊離カルシウムイオン濃度の測定

カバーガラスに接着した耳下腺腺房細胞を、5 μM Fura 2-AM (カルシウム蛍光試薬) を含むHBSS中で37°C、30分間培養して蛍光試薬を取り込ませた後、細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ([Ca²⁺]_i)の測定に用いた。測定にはARGUS 50 (浜松ホトニクス) を用い、2つの励起波長 (340nm /380nm) で得られる蛍光強度 (500nm) の比より[Ca²⁺]_iを換算した⁴⁶⁾。なお、細胞の薬剤処理は測定開始5分後に薬剤を含む37°CのHBSSを灌流 (流速 5 ml/min.) して行った。測定は3回以上行い、図には代表的な結果のみを示した。

9. cAMPの定量

耳下腺explantを0.5 ml の氷冷した6% TCA 中でホモジネートし、14,000 rpm で4°C、10分間遠心し、沈殿をDNAの、上清をcAMPレベルの定量に用いた。上清を2.5 mlの水飽和ジエチルエーテルで4回抽出してTCAを除去し、サンプルを調製した。cAMP量をcAMP定

量kit (ヤマサ醤油) を用いて添付のプロトコールに従い、radioimmunoassayにより測定した。

10. DNAの定量

cAMP定量用サンプル調製時に得られた沈殿を、1 mlの氷冷した2% 過塩素酸で洗浄した後、1 mlの同じ酸で95°Cで30分間加熱して、DNAを可溶化した。その遠心上清を、仔牛胸腺のDNAを標準としてGilesとMyersの方法⁴⁷⁾で定量した。

結果

1. ラット耳下腺explantのODC活性とアミラーゼ分泌に及ぼす唾液分泌促進剤の併用効果

唾液分泌促進剤であるIPRとCCは培養ラット耳下腺explantで、ともにODC活性を誘導し、アミラーゼ分泌を促進することが明らかとなっている^{14,22-24})。そこで、両agonistの併用効果について検討した。図1(A)に示すように、CCやIPRによるODC活性の上昇は濃度に依存するが、併用するといずれの濃度でもIPR単独より活性が低下し、10 μ M IPRで29倍に上昇したODC活性は10 μ M CCによりその1/3に抑制された。一方、アミラーゼ分泌の促進作用も図1(B)に示すように、併用により相乗効果を示すという多数の報告⁴⁸⁻⁵⁶)に反し、ODC活性と同じくIPRによる促進はCCで抑制され、10 μ M IPRで9.5倍に促進した分泌能を10 μ M CCはその2/3に抑制した。このアミラーゼ分泌でのCCの抑制効果はAskingら⁵⁷)のウサギ耳下腺やTakemuraら⁵⁸)のラット耳下腺細胞での報告と一致する。従って、本研究の条件下では単独では促進効果を示すCCが、IPRのODC活性とアミラーゼ分泌の上昇作用をともに低下させるといえる。

また、IPRは耳下腺のcAMPレベルを著明に上昇させるが、cAMPレベルを上昇させるDBcAMPやコレラ毒なども、IPRと同様にODC活性を上昇し、アミラーゼ分泌を促進することから、cAMPがIPRの2つの作用のセカンドメッセンジャーであると考えられている

²⁴)。そこで次に、DBcAMPの作用に及ぼすCCの影響を検討した。図2(A)に示すように、

IPRと同様にDBcAMPによるODC活性の上昇も、CCによりその1/3に抑制された。この時、アミラーゼ分泌の促進もCCで抑制された(データ不呈示)。このCCの抑制作用は、cAMPレベル上昇の抑制に起因する可能性があることから、IPRによるcAMPレベル上昇に及ぼすCCの影響を検討した。その結果、IPRによるcAMPレベルの上昇はCCにより抑制されなかった(図2, B)。従って本研究の条件下でCCがIPRの効果を抑制するのは、cAMP以後のシグナル伝達経路であることが示唆された。

2. ODC活性及びアミラーゼ分泌に及ぼす低張培養での唾液分泌促進剤の効果

ODC活性は低浸透圧によっても急激な上昇が誘導されることがすでに報告されている²⁹⁻³⁴)。そこで耳下腺explantを低張培地で培養(低張培養)したときの、唾液分泌促進剤の作用について検討した(図3, AとB)。199培地のNaCl濃度のみを低下し、浸透圧が正常の62%の低張培地では、ODC活性は6時間後に最大活性を示し、等張培養の約100倍に達する著明な上昇を示した。IPRは低張培養と相乗効果を示し、この活性上昇を3倍に増強した。これに反し、CCは低張培養での活性を約1/3に抑制した。一方、アミラーゼ分泌は等張培養と低張培養で有意な差はなく(図3, CとD)、低張の影響をほとんど受けなかった。

3. 低張培養でのODCタンパク質量の変化

唾液分泌促進剤による耳下腺ODC活性の上昇は酵素タンパク質量の増加によること

が、すでにKawanoら²³⁾により報告されている。そこで、低張培養でのODC活性の上昇もODCタンパク質量の増加に依存するか否かを検討した。その結果、分子量51 kDaのODCタンパク質量³¹⁾は低張やIPRで増加し、CCで減少し、活性と一致した増減が認められた(図4)。これは、低張培養でのODC活性の変動もタンパク質量の増減に起因することを示している。

4. ODC mRNAレベルに及ぼす唾液分泌促進剤の影響

ODCタンパク質量の変動の原因を探るため、ODC mRNA量を測定した。図5(A)のオートラジオグラムから明らかなように、ラット耳下腺のODC mRNAは、2.2 kbと2.6 kbの2本のバンドとして検出された。この結果はWenら⁵⁹⁾とKawanoら²³⁾の報告と一致する。これらのmRNA量をBio imaging analyzer Fujix BAS 2000 IIで定量すると、等張培養ではCCやIPRによるODCのmRNAレベルと活性は、ほぼ一致して上昇した(図5, B)。また、低張培養でも低張のみで上昇したレベルがIPRにより活性(図3, B)と同じくさらに上昇した。しかし、低張で上昇したODC活性はCCで著明に低下した(図3, B)にも拘わらず、mRNAレベルはCCで低下されなかった(図5, B)。すなわち、CCによるODC活性の抑制ではmRNAレベルの低下を伴わないことが判明した。

5. ODC活性の半減期に及ぼすCCの影響

低張培地で上昇したODC活性は培地を等張にすると急速に低下する。そこで、explantを3.5時間、低張培養してODC活性を十分上昇させた後、蛋白合成阻害剤のシクロヘキシミド存在下で培地を等張にした時の活性低下に及ぼすCCの影響を検討した。この活性の低下はCCの影響を受けず、半減期はCC存在下で54分、非存在下で49分であり有意差はなかった(図6)。

6. 耳下腺腺房細胞での細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に及ぼす唾液分泌促進剤とカルシウムモジュレーターの影響

CCの細胞内の情報伝達機構として、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と、プロテインキナーゼC (protein kinase C, PKC) の活性化の2つが考えられている²⁶⁻²⁸)。そこで、CCによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とODC活性の低下との関連について検討した。なお、explantでは $[Ca^{2+}]_i$ を計測できないので、この実験ではラット耳下腺より調製した腺房細胞を用いた。また、CC以外の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる薬剤として小胞体 Ca^{2+} -ATPase阻害剤であるタプシガルギン⁶⁰)を、低下させる薬剤に細胞内で Ca^{2+} キレート剤として働くBAPTA-AM^{61,62})を用いた。腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ はCCによって著明な周期的上昇を示し、その上昇は低張培養 (550 nM) が等張培養 (220 nM) より大きい。BAPTA-AMで前処理した細胞では、上昇が完全に消失した(図7, AとC)。一方、タプシガルギンも両培地で周期的上昇(図7, BとD)を起こすが、IPRは無効で

ある(図7, B)。また、低張のみでも $[Ca^{2+}]_i$ の持続的上昇が見られ、15分後では等張の約4倍に達する(図7, D)。なお、耳下腺腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ がCCやタプシガルギンで周期的上昇を示すことはFoskettら^{63,64}も報告している。

7. ラット耳下腺explantでのODC活性とアミラーゼ分泌に及ぼすカルシウムモジュレーターの影響

次に、 $[Ca^{2+}]_i$ とODC活性およびアミラーゼ分泌との関連を追求した。 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させるタプシガルギンは、低張によるODC活性の上昇を濃度依存的に抑制し(図8, A)、 $[Ca^{2+}]_i$ を低下させるBAPTA-AMは、低張でのCCのODC活性低下作用を濃度依存的に軽減した(図8, B)。また、等張培養でもBAPTA-AMはCCによるODC活性の上昇を増強し、タプシガルギンはIPRのODC活性上昇を著明に抑制した(図9, A)。これに反し、アミラーゼ分泌促進能に対して両カルシウムモジュレーターは、全く影響を与えなかった(図9, B)。

考察

耳下腺の機能やその調節機構の *in vitro* での研究では、耳下腺のスライスや酵素処理により調製した腺房細胞を培養する方法が広く用いられている。しかし、これらの系では長期の培養は不可能で、短時間 (1時間未満) の実験でも、一致しない結果が得られることが多い。例えば、IPRによるcAMPレベルの上昇に対してCCが増強する⁶⁵⁻⁶⁷⁾、逆に低下する⁶⁸⁻⁷⁰⁾、さらには影響がない^{52,71)}との報告がある。このような多様性の理由は明らかではないが、実験条件の相違に加えて、酵素の供給不足や細胞間基質の欠落などが原因と考えられる。これに対して、本研究で用いたexplantの培養系では、IPRやCCで刺激後6時間で最大となるODC活性の変動や、24時間後に最大値を示すDNA合成の促進を観察できるが、これらの経時変化は *in vivo* と全く同じである。また本研究で採用した浸透圧が正常の62%の低張培地では、ODCは6時間後に等張の約100倍の活性上昇を示し、等張に戻すと急速に活性が低下する。活性がほとんど認められなくなった時点で二度目の低張処理を行うと、最初の低張処理時と同じ速度でODC活性が上昇する (データ不呈示)。これらの結果は培養耳下腺explantがホルモンや低張に対する応答性を長期に保持していることを示している。

唾液分泌促進剤によるODC誘導とアミラーゼ分泌促進の機構の相違点については Kawanoら²³⁾やKinoshitaら²⁴⁾によって種々の阻害剤を利用して検討されてきたが、本研究の結果からも次の相違点が指摘できる。すなわち、IPRの両作用はCCで抑制された (図 1,

A) が、両抑制ともcAMPレベルの低下によるものではなく(図2, B)、ODC誘導の抑制は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に起因すると考えられる(後記)のに反し、アミラーゼ分泌能の抑制はタブシガルギンで再現されない(図9, B)ので、CCによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によるものではない。このことは、CCのアミラーゼ分泌促進能がBAPTA-AMで $[Ca^{2+}]_i$ を低下(図7, A)させても影響を受けない(図9, B)ことから明らかである。

本研究ではODC誘導機構の解明のため低張培養も採用した。低張培養でもODC活性は著明に上昇するが、この上昇はIPRやCCとは全く異なり、細胞の種類を問わない上、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素活性の上昇や、DNA合成の促進も伴わない¹⁰⁾。従って、低張でのODC誘導は唾液分泌促進剤によるそれとは誘導機構が異なると考えられる。なお、酵母では細胞外高浸透圧のセンサーとして細胞膜貫通型タンパク質とその下流のタンパク質が対で機能するtwo-component systemと呼ばれる機構が働き、さらにその下流にMAPキナーゼが介在し、酵母の有機浸透圧物質であるグリセロールの蓄積を制御していると考えられている^{72,73)}。また、同様な高浸透圧に反応するMAPキナーゼがイヌ尿細管上皮細胞に存在すると報告されている^{74,75)}が、低浸透圧に対する応答との関連は不明である。この低張培養により上昇するODC活性もCCは抑制した。

IPRの耳下腺でのODC誘導とアミラーゼ分泌促進作用がDBcAMPで代替されることから、cAMPがIPRの両作用のセカンドメッセンジャーであると考えられる。これに対し、CCのセカンドメッセンジャーの作用と考えられているプロテインキナーゼC(PKC)の活

性化(ジアシルグリセロール)と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇(イノシトール-1,4,5-三リン酸)の耳下腺におけるODC誘導とアミラーゼ分泌促進の発現での役割は不明であった。そこで本研究では、まずPKCを直接活性化する 4α -ホルボール12,13-ジデカノエイトや12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテートを種々の濃度で検討したが、いずれも無効でODC誘導もアミラーゼ分泌の促進も見られなかった(データ不呈示)。この結果はCCの作用にPKCが関与しないことを示唆している。

一方、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は以下の結果からODC活性を著明に低下させることが明らかとなった。1) 耳下腺腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を周期的に上昇するCCとタプシガルギン(図7)は共にIPRやDBcAMP(図1, A; 図2, A; 図3, A; 図9, A)および低張(図3, B; 図8, A)によるODC活性の上昇を抑制する。2) CCの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を消滅するBAPTA-AM(図7, AとC)は低張培養でのCCのODC誘導を有意に上昇する(図9, A)。このCCによるODC活性の低下は酵素タンパク質量の減少(図4)を伴うが、mRNAは減少せず(図5)、ODC活性の半減期の短縮も見られない(図6)ので、翻訳レベルでの抑制であると考えられる。これに対して、等張培養でのCCによるODC活性の上昇ではIPRと同様に酵素タンパク質量²³⁾とmRNA量(図5)が共に増加するので転写レベルでの促進であるといえる。すなわち、CCは耳下腺のODCを誘導する作用と抑制する作用を有するが、その作用機構は異なる。

低張によるODC活性の上昇も酵素タンパク質量(図4)とmRNA量(図5)の増加を伴う転写レベルでの酵素誘導であるが、その生理的意義については次のような報告がある。マウ

ス乳腺explantを本研究で用いた方法で低張培養すると、ODC活性とプトレッシン (Put) レベルが著明に上昇し、インスリンによるDNA合成の促進が等張培養と同様に見られるが、ODC活性阻害剤でPutレベルの上昇を抑制するとDNA合成の促進も抑制される。しかし、Putを培地に添加するとPutレベルが上昇し、DNA合成の促進も完全に回復する。この結果から、ODC活性上昇によるPutレベルの上昇が低張での組織の正常な機能維持に必要であると推定されている⁷⁶⁾。高転移能と高Putレベルを示す腹水肝癌細胞が肺動脈由来内皮細胞層を通過浸潤する際、内皮細胞に付着した癌細胞の $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、形態変化を起こして浸潤が可能となる。この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は小胞体のサイクリックADPリボースをリガンドとするカルシウムチャネル由来の Ca^{2+} によるもので、この小胞体からの Ca^{2+} の遊離にPutが必須であると報告されている⁷⁷⁾。これらの報告や、耳下腺腺房細胞でも低張培養すると $[Ca^{2+}]_i$ が約4倍に上昇する(図7, D)ことから、耳下腺explantを低張培養したときのODC活性の上昇と、この上昇をCCが抑制する意義を次のように推察することができる。低張培養によるODCの著明な誘導によってPutレベルが上昇し、これが小胞体からの Ca^{2+} の遊離を可能にして $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する。次いで $[Ca^{2+}]_i$ がカルモジュリンの活性化、あるいは $[Ca^{2+}]_i$ に応答するアクチノゲリンやゲルズリンなどのアクチン結合タンパク質⁷⁸⁾を介する細胞骨格の構築などによって、低張での正常な細胞機能の保持に寄与する。ところがCCやタブシガルギンで $[Ca^{2+}]_i$ が上昇すると、もはやPutに依存した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の必要が

なくなり、ODC活性がフィードバック的に抑制される。なお、低張でのODC誘導は細胞の種類を問わず起こることから、このPutと $[Ca^{2+}]_i$ との関連は普遍的に見られる現象であると考えられる。

以下に、ラット耳下腺細胞でのカルニチン製剤(ODC)の誘導機構について、以下の結論を得た。

① 耳下腺でのカルニチン製剤(ODC)の誘導は、カルボラーゼ(CC)やイソプロテリノール(IPA)および内臓神経により増強されるが、mRNAレベルの上昇を伴って上昇する。しかし、CC阻害剤によるODC活性の上昇を抑制するが、mRNAレベルは低下せず、半減期も短縮しなかったため、CCによるODC活性の抑制は翻訳レベルであることが示唆された。

② オプシゲルギンもIPKや内臓神経によるODC活性の上昇を抑制する。また、タブシガネンとCCは耳下腺細胞の細胞内遊離カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)の周期的な上昇を引き起こす。

③ 耳下腺でのCCによるODC活性の抑制はBAPTA-AMにより減弱する。この時CCによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を完全に抑制する。また、BAPTA-AMは耳下腺でのCCによるODC活性の上昇を増強する。

④ 低張刺激は耳下腺細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を持続的に上昇させる。

これらの結果は、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がODC活性の抑制を誘導し、プロレチンがラット耳下腺での $[Ca^{2+}]_i$ の調節に関与していることを示唆している。

結論

唾液分泌促進剤によるラット耳下腺explantでのオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の調節機構について、以下の結論を得た。

- 1) 耳下腺でのオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の活性は、カルバコール (CC) やイソプロテレノール (IPR) および低張培養により酵素タンパク量とmRNAレベルの増加を伴って上昇する。しかし、CCはIPRや低張培養によるODC活性の上昇を抑制するが、mRNAレベルは減少せず、半減期も短縮しなかったため、CCによるODC活性の抑制は翻訳レベルであることが示唆された。
- 2) タプシガルギンもIPRや低張培養によるODC活性の上昇を抑制する。また、タプシガルギンとCCは耳下腺腺房細胞の細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の周期的な上昇を引き起こす。
- 3) 低張培養でのCCによるODC活性の抑制はBAPTA-AMにより減弱する。この時CCによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を完全に抑制する。また、BAPTA-AMは等張培養でのCCによるODC活性の上昇を増強する。
- 4) 低張培養は耳下腺腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を持続的に上昇させる。

これらの結果は、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がODC活性の抑制を誘導し、プロレッシンがラット耳下腺での $[Ca^{2+}]_i$ の調節に関与していることを示唆している。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました口腔生化学講座井上秀夫教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御校閲を頂いた口腔生理学講座細井和雄教授、口腔細菌学講座三宅洋一郎教授に深謝申し上げます。また、本研究の実施に際し、御指導、御助言を頂いた口腔生化学講座の上野明道助教授、三輪佳宏助手に厚く御礼申し上げますとともに、種々の御教示とご援助を下さった口腔生化学講座および、歯学部、医学部の総合研究室の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Selye H, Veilleux R and Cantin M : Excessive stimulation of salivary gland growth by Isoproterenol. *Science* 133, 44-45 (1961)
- 2) Brown-Grant K : Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. *Nature* 191 (4793), 1076-1078 (1961)
- 3) Barka T : Induced cell proliferation. The effect of isoproterenol. *Exp Cell Res* 37 (3), 662-679 (1965)
- 4) Barka T : Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in the salivary gland. *Exp Cell Res* 39(2), 355-364 (1965)
- 5) Baserga R : Inhibition of stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in submandibular glands of mice. *Life Sci* 5 (22), 2033-2039 (1966)
- 6) Inoue H, Tanioka H, Shiba K, Asada A, Kato Y and Takeda Y : Effect of isoproterenol on polyamine metabolism in mouse salivary glands. *J Biochem* 75 (4), 679-687 (1974)
- 7) Inoue H, Kato Y, Takigawa M, Adachi K and Takeda Y : Effect of DL- α -hydrazino- δ -aminovaleric acid, an inhibitor of ornithine decarboxylase on polyamine metabolism in isoproterenol-stimulated mouse parotid glands. *J Biochem* 77 (4), 879-893 (1975)
- 8) Inoue H, Asada A, Kato Y and Takeda Y : Inter conversion of aliphatic polyamines in isoproterenol-stimulated mouse parotid glands. *J Biochem* 84 (3), 719-725 (1978)
- 9) 井上秀夫, 竹田義朗 : ポリアミンの代謝と生理作用. *生化学*. 49 (6), 411-428 (1977)
- 10) 井上秀夫, 竹田義朗 : ポリアミンの生合成. *蛋白質 核酸 酵素*. 26 (9), 1462-1470 (1981)
- 11) Russel D H and Snyder S H : Amine synthesis in rapidly growing tissues : Ornithine decarboxylase in regenerating rat liver, chick embryo and various tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 60, 1420-1427 (1968)
- 12) Hannonen P, Raina A and Janne J : Polyamine synthesis in the regenerating rat liver : Stimulation of S-adenosylmethionine decarboxylase, and spermidine spermine synthetases after

- partial hepatectomy. *Biochem Biophys Acta* 273, 84-90 (1972)
- 13) Heby O and Russel D H : Depression of polyamine synthesis in L1210 leukemic mice during treatment with a potent antileukemic agent, 5-azacitizine. *Cancer Res* 33, 159-165 (1973)
 - 14) Kikuchi K, Nishino M and Inoue H : Effects of sialagogues on the syntheses of polyamines and DNA in murine parotid gland. *Biochem Biophys Res Commun* 144 (3), 1161-1166 (1987)
 - 15) Babad H, Ben-Zvi R, Bodolah A and Schramm M : The mechanism of enzyme secretion by the cell. 4. Effects of inducers, substrates and inhibitors on amylase secretion by rat parotid slices. *Eur J Biochem* 1 (1), 96-101 (1967)
 - 16) Kanagasuntheram P and Randle P J : Calcium metabolism and amylase release in rat parotid acinar cells. *Biochem J* 160 (3), 547-564 (1976)
 - 17) Butcher F R and Putney J W Jr : Regulation of Parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 13, 215-249 (1980)
 - 18) Oshika H, Takemura H, Endo J, Hatta S and Tanaka M : Stimulating effect of α -adrenoreceptor agonists on isoproterenol-induced amylase release in rat parotid tissue. *Jpn J Pharmacol* 31 (6), 1021-1027 (1981)
 - 19) Yu J H, Burns S M and Schneyer C A : Salivary secretion induced by substance P. *Proc Soc Exp Biol Med* 173 (3), 467-470 (1983)
 - 20) Gallacher D V : Substance P is a functional neurotransmitter in the rat parotid gland. *J Physiol* 342, 483-498 (1933)
 - 21) Guillemain I, Rollandy I, Imhoff V and Rossignol B : The NK-1 receptor and a calcium phospholipid pathway: Inositol triphosphate production and calcium movements induced by selective agonists of neurokinin receptors in rat parotid glands. *J Neurochem* 58, 2321-2325 (1992)
 - 22) Ueno A, Kikuchi K, Nishino M, Kawano M, Matsumoto N and Inoue H : sialagogues-stimulated protein phosphorylation related to ornithine decarboxylase induction in cultured rat parotid explants. *Arch Oral Biol* 36 (6), 415-423 (1991)

- 23) Kawano M, Ueno A, Ashida Y, Matsumoto N and Inoue H : Effects of sialagogues on ornithine decarboxylase induction and proto-oncogene expression in murine parotid gland. *J Dent Res* 71, 1885-1890 (1992)
- 24) Kinoshita F, Ueno A, Miwa Y, Nishino M and Inoue H : Protein tyrosine kinase inhibitors promote amylase secretion and inhibit ornithine decarboxylase induction in sialagogue-stimulated rat parotid explants: *Biochem Biophys Res Commun* 223, 170-174 (1996)
- 25) Ueno A, Kawano M, Ashida Y, Kinoshita F and Inoue H : Induction of ornithine decarboxylase by sialagogues in human parotid gland adenocarcinoma cell line. *Biochem Int* 24 (1), 137-145 (1991)
- 26) Berridge M J : Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 220, 345-365 (1984)
- 27) Trimble E R, Bruzzone R, Meehan C J and Biden T J : Rapid increases in inositol 1, 4, 5-triphosphate, inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate and cytosolic free Ca^{2+} in agonist-stimulated pancreatic acini of a rat : effect of carbachol, caerulein and secretin. *Biochem J* 242, 289-
- 28) Nishizuka Y: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614
- 29) Munro G F, Miller R A, Bell C A and Verderber E L : Effects of external osmolality on polyamine metabolism in Hela cells. *Biochim Biophys Acta* 411, 263-281 (1975)
- 30) Perry J W and Oka T : Regulation of ornithine decarboxylase in cultured mouse mammary gland by the osmolarity in the cellular environment. *Biochim Biophys Acta* 629, 24-35 (1980)
- 31) Poulin R and Pegg A E : Regulation of ornithine decarboxylase expression by anisotonic shock in α -difluoromethylornithine-resistant L1210 cells. *J Biol Chem* 265, 4025-4032 (1990)
- 32) Tohyama Y, Kameji T and Hayashi S : Mechanisms of dramatic fluctuations of ornithine decarboxylase activity upon tonicity changes in primary cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 202, 1327-1331 (1991)
- 33) Lundgren D W : Effect of hypotonic stress on ornithine decarboxylase mRNA expression in

- cultured cells. *J Biol Chem* 267 (10), 6841-6847 (1992)
- 34) Murakami Y, Tanahashi N, Tanaka K, Omura S and Hayashi S : Proteasome pathway operates for the degradation of ornithine decarboxylase in intact cells. *Biochem J* 317, 77-80 (1996)
- 35) McConlogue L, Gupta M, Wu L and Coffino P : Molecular cloning and expression of the mouse ornithine decarboxylase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(2), 540-544 (1984)
- 36) Nishiyama M, Matsufuji S, Kanamoto R, Takano M, Murakami Y and Hayashi S : Two-step purification of mouse kidney ornithine decarboxylase. *Prep Biochem* 18 (2), 227-238 (1988)
- 37) Matsufuji S, Fujita K, Kameji T, Kanamoto R, Murakami Y and Hayashi S : A monoclonal antibody to rat liver ornithine decarboxylase. *J Biochem* 96, 1525-1530 (1984)
- 38) 井上秀夫, 小西洋太郎, 滝川啓子, 上野明道, 竹田義朗 : 培養ラット耳下腺のホルモン応答性に関する研究. *歯基礎誌* 24 (2), 370-378 (1982)
- 39) Topper Y J, Oka T and Vonderhaar B K : Techniques for studying development of normal mammary epithelial cells in organ culture. *Methods Enzymol* 39, 443-454 (1975)
- 40) Ross E and Schatz G : Assay of protein in the presence of high concentration of sulfhydryl compounds. *Anal Biochem* 54, 304-306 (1973)
- 41) Bernfeld P : Amylase, α and β . *Methods Enzymol* 1, 149-158 (1955)
- 42) Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T : Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. in : *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition. pp.7.3-7.78, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 43) Suzuki T, He Y, Kashiwagi K, Murakami Y, Hayashi S and Igarashi K : Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8930-8934 (1994)
- 44) Laemmli U K : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680-685 (1970)
- 45) Tojyo Y, Matsui S, Tanimura A and Matsumoto Y : Relationship between cytosolic Ca^{2+} concentration and amylase release in rat parotid acinar cells following muscarinic stimulation.

- Biochim Biophys Acta 1134, 278-284 (1992)
- 46) Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien R Y : A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260 (6), 3440-3450 (1985)
 - 47) Giles K W and Myers A : An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206 (4979), 93 (1965)
 - 48) Watson E L, Williams J A and Siegel I A : *Am J Physiol* 236 (5), C233-C237 (1979)
 - 49) Butcher F R, McBride P A and Rudich L : Cholinergic regulation of cyclic nucleotide levels, amylase release, and K^+ efflux from rat parotid glands. *Mol Cell Endocrinol* 5 (3-4), 243-254 (1976)
 - 50) Wojcik J D, Grand R J and Kimberg D V : Amylase secretion by rabbit parotid gland. Role of cyclic AMP and cyclic GMP. *Biochim Biophys Acta* 411 (2), 250-262 (1975)
 - 51) McKinney J S, Desole M S and Rubin R P : Convergence of cAMP and phosphoinositide pathways during rat parotid secretion. *Am J Physiol* 257 (4 Pt 1), C651-C657 (1989)
 - 52) Mckinney J S and Rubin R P : Enhancement of cyclic AMP modulated salivary amylase secretion by protein kinase C activators. *Biochem Pharmacol* 37 (23), 4433-4438 (1988)
 - 53) Watson E L, Singh J C and Jacobson K L : Augumentation of cholinergic-mediated amylase release by forskolin in mouse parotid gland. *Life Sci* 37 (26), 2531-2537 (1985)
 - 54) Takemura H : Potentiation of amylase release from isolated rat parotid cells--studies on the combination of isoproterenol and a low dose of carbachol. *Jpn J Pharmacol* 36 (1), 107-109 (1984)
 - 55) Moller K, Benz D, Perrin D and Soling H D : The role of protein kinase C in carbachol-induced and of cAMP-dependent protein kinase in isoproterenol-induced secretion in primary cultured guinea pig parotid acinar cells. *Biochem J* 314 (1), 181-187 (1996)
 - 56) Yoshimura K and Nezu E : Interaction between the calcium and cyclic AMP messenger systems in perfused rat parotid acinar cells. Possible mechanism for potentiation of amylase secretion. *Biochem Pharmacol* 43 (5), 1031-1041 (1992)

- 57) Asking B and Gjorstrup P : Effects of carbachol on isoprenaline evoked amylase release from the rabbit parotid gland in vitro. *Acta Physiol Scand* 109 (4), 415-420 (1980)
- 58) Takemura H : Inhibitory effect of carbachol on Isoproterenol-induced amylase release from isolated rat parotid cells. *Jpn J Pharmacol* 35 (1), 9-17 (1984)
- 59) Wen L, Huang J-K and Blackshear P J : Rat ornithine decarboxylase gene. Nucleotide sequence, potential regulatory elements, and comparison to the mouse gene. *J Biol Chem* 264 (15), 9016-9021 (1989)
- 60) Thastrup O, Cullen P J, Drøbak B K, Hanley M R and Dawson A P : Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 2466-2470 (1990)
- 61) Tsien R Y : New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and proteins : Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396-2404 (1980)
- 62) Tsien R Y : A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290, 527-528 (1981)
- 63) Foskett J K, Roifman C M and Wong D : Activation of calcium oscillation by Thapsigargin in parotid acinar cells. *J Biol Chem* 266 (5), 2778-2782 (1991)
- 64) Foskett J K and Wong D C P : $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} influx underlies agonist- and Thapsigargin-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in salivary acinar cells. *J Biol Chem* 269 (50), 31525-31532 (1994)
- 65) Watson E L, Singh J C, McPhee C, Beavo J and Jacobson K L : Regulation of cAMP metabolism in mouse parotid gland by cGMP and calcium. *Mol Pharmacol* 38 (4), 547-553 (1990)
- 66) Watson E L, Jacobson K L, DiJulio D H and Dowd F J : Biphasic effects of carbachol on stimulated cAMP accumulation in mouse parotid acini. *Am J Physiol* 265 (4 Pt 1), C1061-1068 (1993)

- 67) Watson E L, Abel P W, DiJulio D, Zeng W, Makoid M, Jacobson K L, Potter L T and Dowd F J : Identification of muscarinic receptor subtypes in mouse parotid gland. *Am J Physiol* 271 (3 Pt 1), C905-C913 (1996)
- 68) Dai Y, Ambudkar I S, Horn V J, Yeh C, Kousvelari E E, Wall S J, Li M, Yasuda R P, Wolfe B B and Baum B J : Evidence that M3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *Am J Physiol* 261, C1063-C1073 (1991)
- 69) Wei J W, Yeh S R and Wang E K : Evidence for the coupling of muscarinic M3 receptor to cyclic AMP formation and poly-phosphatidylinositol turnover in rat salivary glands. *Chin J Physiol* 34(3), 303-315 (1991) [published erratum appears in *Chin J Physiol* 34 (4), 464 (1991)]
- 70) Yoshimura K, Nezu E and Yoneyama T : Augmentation of isoproterenol-stimulated tissue cyclicAMP level by cholinergic agonists in rat parotid gland. *Jpn J Physiol* 35 (5), 765-781 (1985)
- 71) Dreux C, Imhoff V, Huleux C, Busson S and Rossignol B : Forskolin, a tool for rat parotid secretion studies : ⁴⁵Ca efflux is not related to cAMP. *Am J Physiol* 251 (5 Pt 1), C754-762 (1986)
- 72) Mager W M and Varela J C S : Osmostress response of the yeast *Saccharomyces* . *Mol Microbiol* 10 (2), 253-258 (1993)
- 73) Maeda T, Wurgler-Murphy S M and Saito H : A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242-245 (1994)
- 74) Ito T, Yamauchi A, Miyai A, Yokoyama K, Kamada T, Ueda N and Fujiwara Y : Mitogen-activated protein kinase and its activator are regulated by hypertonic stress in Madin-Darby canine kidney cells. *J Clin Invest* 93, 2387-2392 (1994)
- 75) Takenaka M, Preston A S, Kwon H M and Handler J S : The tonicity-sensitive element that mediates increased transcription of the betaine transporter gene in response to hypertonic stress. *J Biol Chem* 269 (47), 29379-29381 (1994)
- 76) Inoue H and Oka T : The effect of inhibitors of ornithine decarboxylase on DNA synthesis in

mouse mammary gland in culture. J Biol Chem 255 (8), 3308-3312 (1980)

77) Ashida Y, Ueno A, Miwa Y, Miyoshi K and Inoue H : Putrescine-stimulated intracellular Ca^{2+} release for invasiveness of rat ascites hepatoma cells. to be published in Jpn J Cancer Res 89 (1) (1998)

78) Schliwa M : Proteins associated with cytoplasmic actin. Cell 25, 587-590 (1981)

図の説明

図1 ラット耳下腺explantでのIPRによるODC活性とアミラーゼ分泌の上昇に及ぼすCCの抑制効果

ラット耳下腺explantを等張培地で培養(等張培養)し、6時間後の耳下腺ODC活性(A)と2時間後の培地中のアミラーゼ活性(B)を測定した。横軸にagonistの濃度、縦軸に対照値(agonist無添加)に対する増加の倍数を示す。対照値; ODC活性, (2.4 nmol/g T.W.); アミラーゼ活性, (1.03 U/mg T.W.)。△, CC; □, IPR; ○, CC+IPR。

図2 IPRとDBcAMPのODC活性上昇作用およびcAMP levelに及ぼすCCの影響

耳下腺explantをagonist無添加(None)、10 μ M CC、10 μ M IPR、または500 μ M DBcAMPを含む培地で培養し、6時間後のODC活性(A)および1時間後のcAMPレベル(B)を測定した。

図3 等張および低張培養でのIPRとCCによるODC活性上昇とアミラーゼ分泌促進の経時変化

耳下腺explantを等張(A, C)または低張(B, D)培養し、経時的にODC活性(A, B)と培地中のアミラーゼ活性(C, D)を測定した。○, ●, agonist無添加; △, ▲, 10 μ M CC; □, ■, 10 μ M IPR。

図4 低張培養でのODCタンパク質量に及ぼす唾液分泌促進剤の影響

耳下腺explantを4時間低張培養し、実験方法の記載に準じてODCタンパク質を定量した。1, 培養前 (Time 0); 2, agonist無添加; 3, 10 μ M CC; 4, 10 μ M IPR。左端は分子量マーカー (kDa:キログルトン)。

図5 ラット耳下腺ODC mRNA levelに及ぼす唾液分泌促進剤の影響

耳下腺explantを4時間、等張 (2-4) または低張 (5-7) で培養し、実験方法の記載に準じてODC mRNAを定量した。A, オートラジオグラム; B, Bio imaging analyzerによる定量値 (1に対する倍数)。1, 培養前 (Time 0); 2と5, agonist無添加; 3と6, 10 μ M CC; 4と7, 10 μ M IPR。

図6 ODC活性の半減期に及ぼすCCの影響

耳下腺explantを3.5時間低張培養し、50 μ M シクロヘキシミドを添加してさらに0.5時間培養後、NaClと10 μ M CCを添加 (0h) して等張に戻し、経時的にODC活性を測定した。横軸, CC添加後の培養時間; 縦軸, CC添加直前のODC活性 (150.1 nmol/g T.W.)を100%とした値。○, CC無添加; ●, 10 μ M CC。

図7 ラット耳下腺腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼすCCとカルシウムモジュレーターの影響

耳下腺腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を実験方法の記載に準じて等張(A, B)または低張(C, D)で測定

した。A; ○, 無添加; ▲, 10 μ M CC; ●, 50 μ M BAPTA-AM (30分間前処理) + 10 μ M CC;

□, 10 μ M CC+10 μ M IPR。B; ■, 10 μ M IPR; △, 10 μ M タブシガルギン; ●, 10 μ M IPR +

10 μ M タブシガルギン (10 μ M IPR添加 5分後)。C; ▲, 10 μ M CC; ●, 50 μ M BAPTA-AM

(30分間前処理) + 10 μ M CC。D; ○, 無添加; ●, 10 μ M タブシガルギン。

図8 低張培養でのODC活性に及ぼすカルシウムモジュレーターの影響

耳下腺explantを低張培養し、4時間後のODC活性を測定した。A, タブシガルギンを0時間
間に添加。B, BAPTA-AMを10 μ M CC添加(0時間)の30分前に添加し前処理した。

図9 唾液分泌促進剤によるODC活性の上昇とアミラーゼ分泌促進に及ぼすカル シウムモジュレーターの影響

耳下腺explantを等張培養し、6時間後のODC活性(A)と2時間後の培地中のアミラーゼ活性
(B)を測定した。10 μ M CC、10 μ M IPR、および10 μ M タブシガルギンは0時間に培地に加
えた。また、50 μ M BAPTA-AMはagonistを加える30分前に添加して前処理した。

图 1

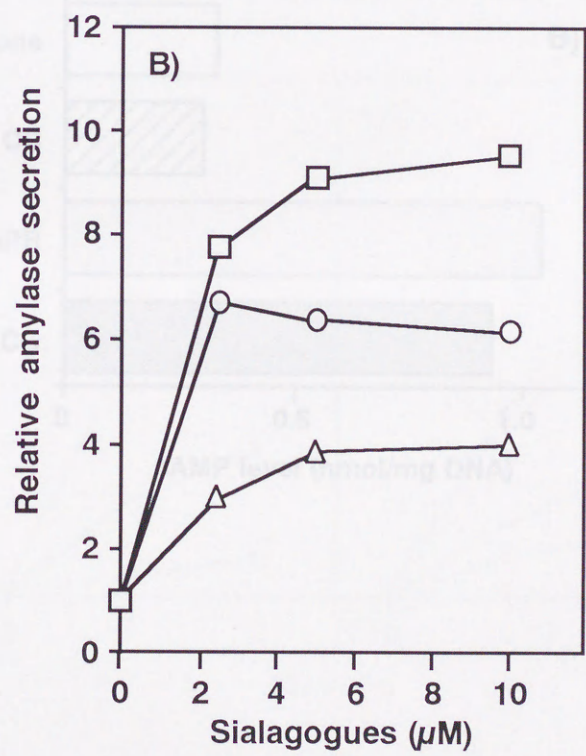
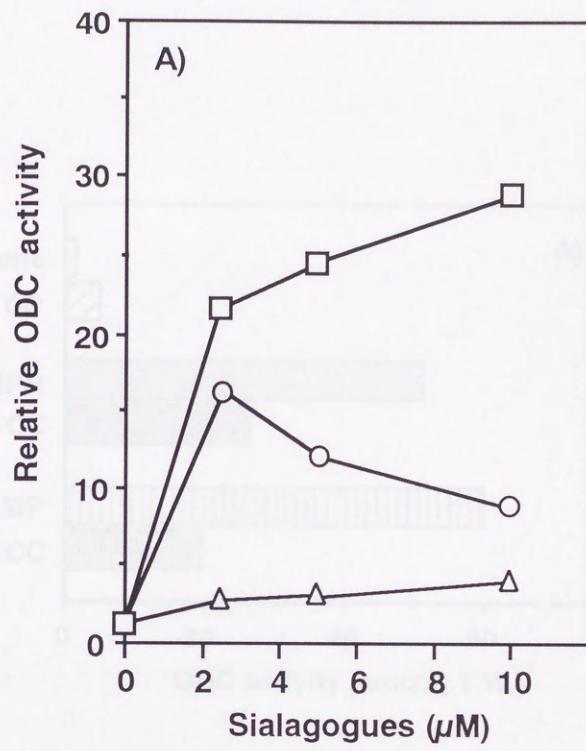
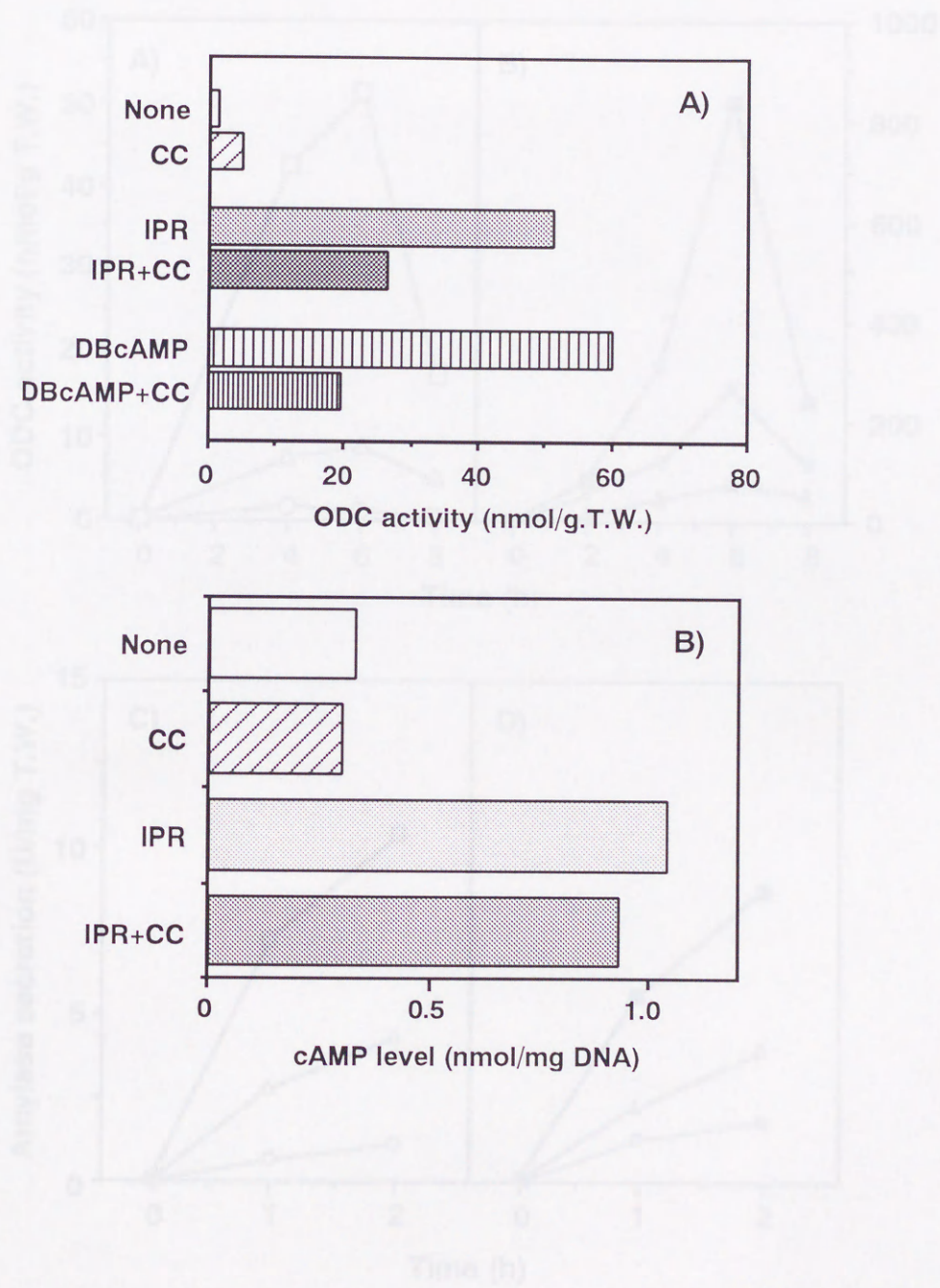


图 2



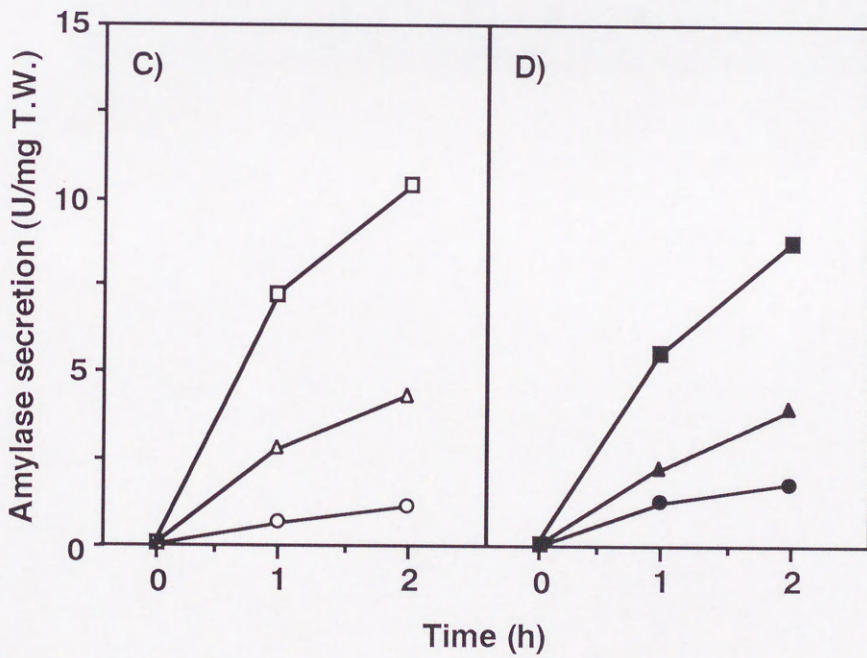
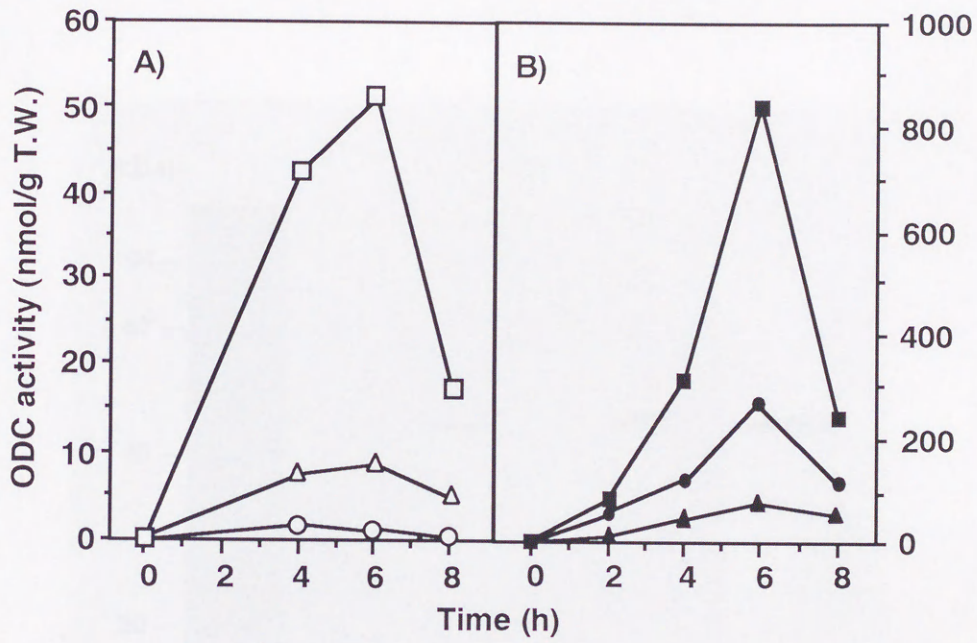


图 4

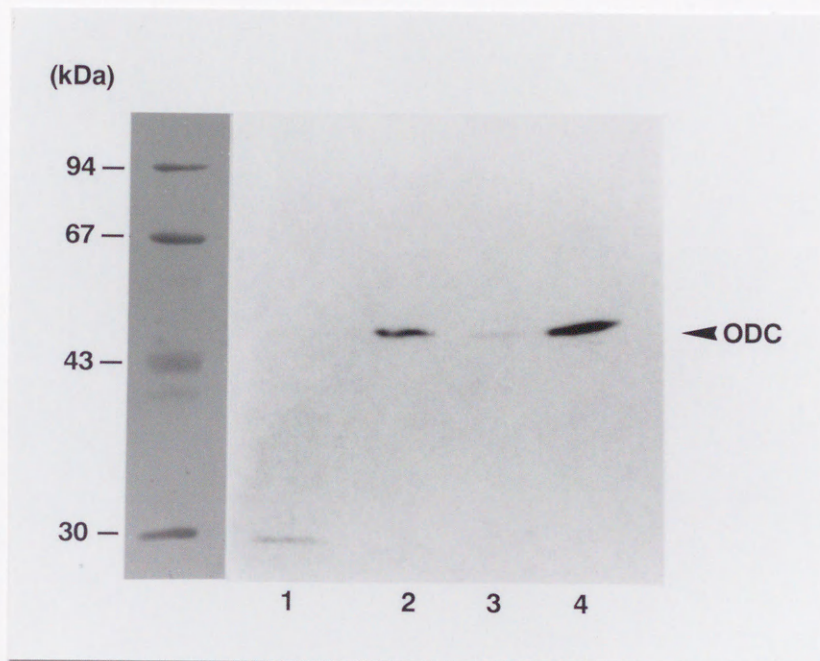
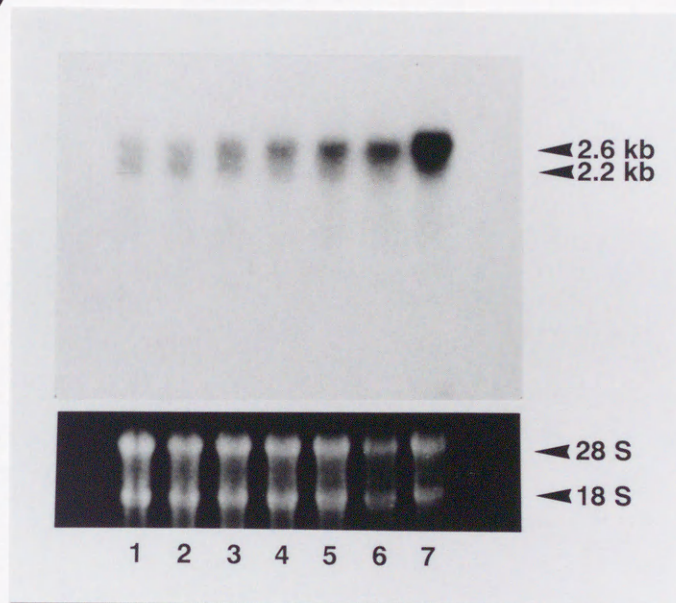
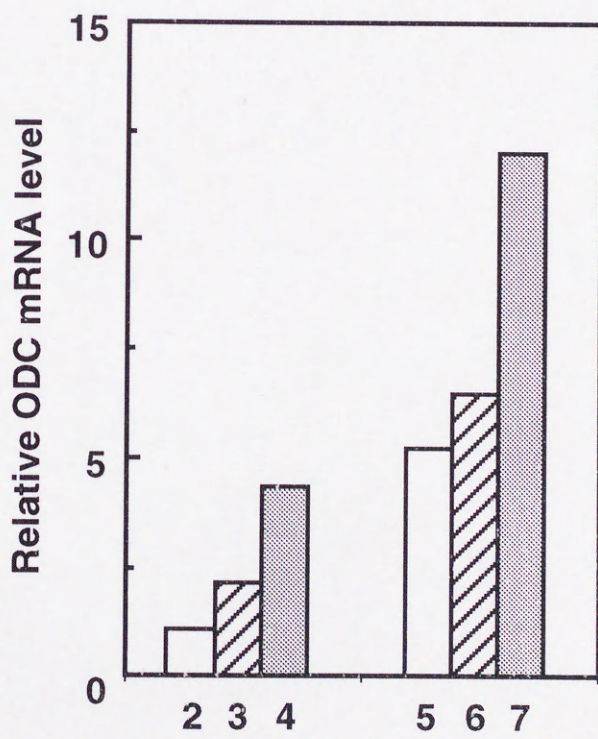


图 5

A)



B)



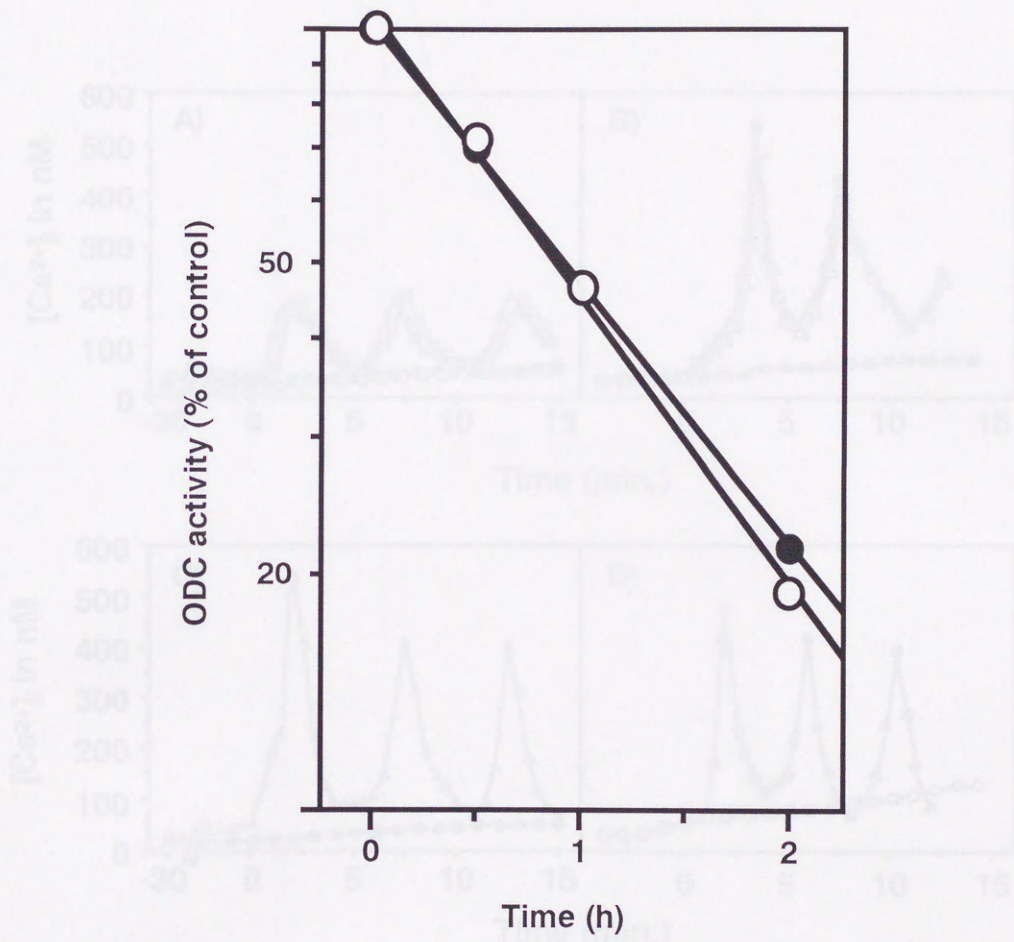
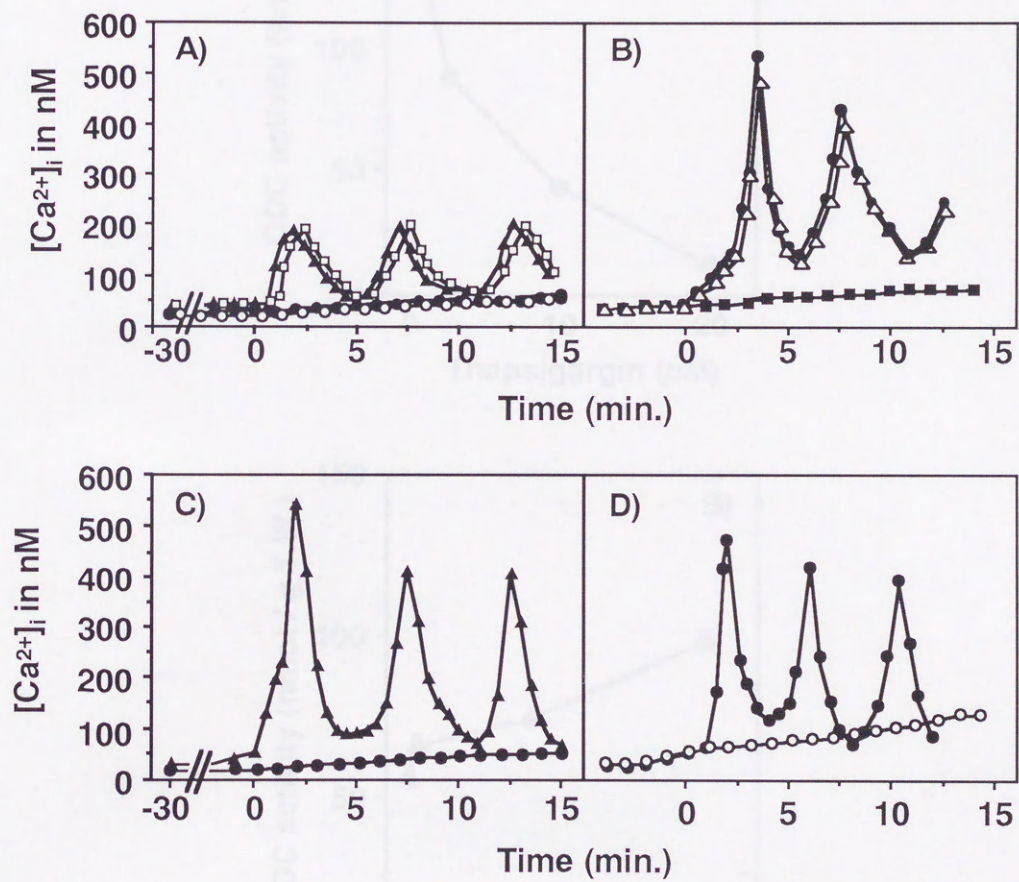
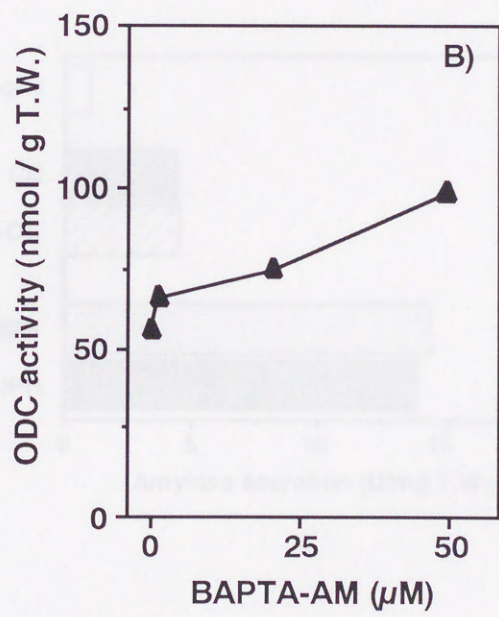
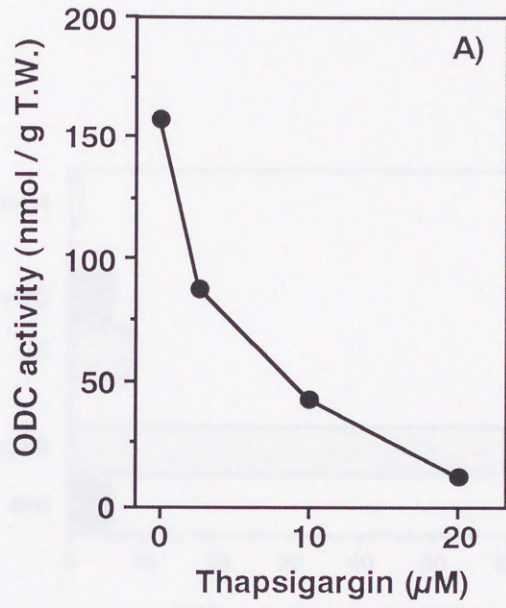
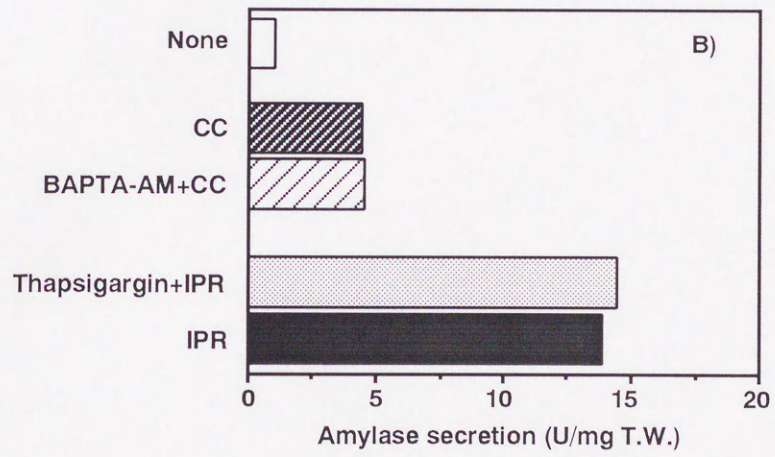
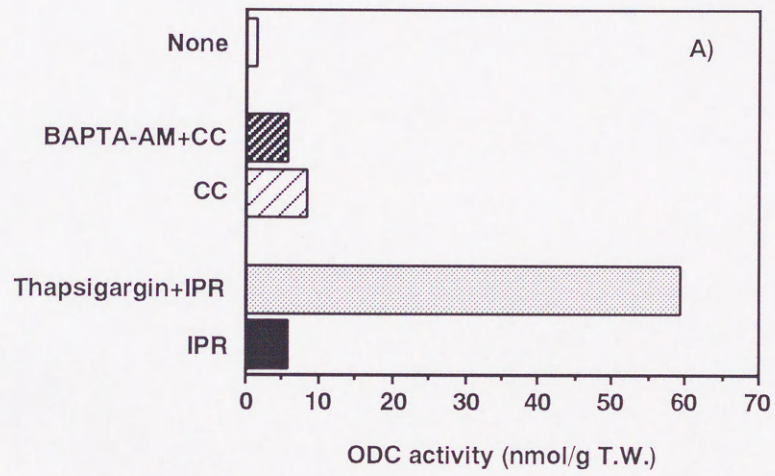
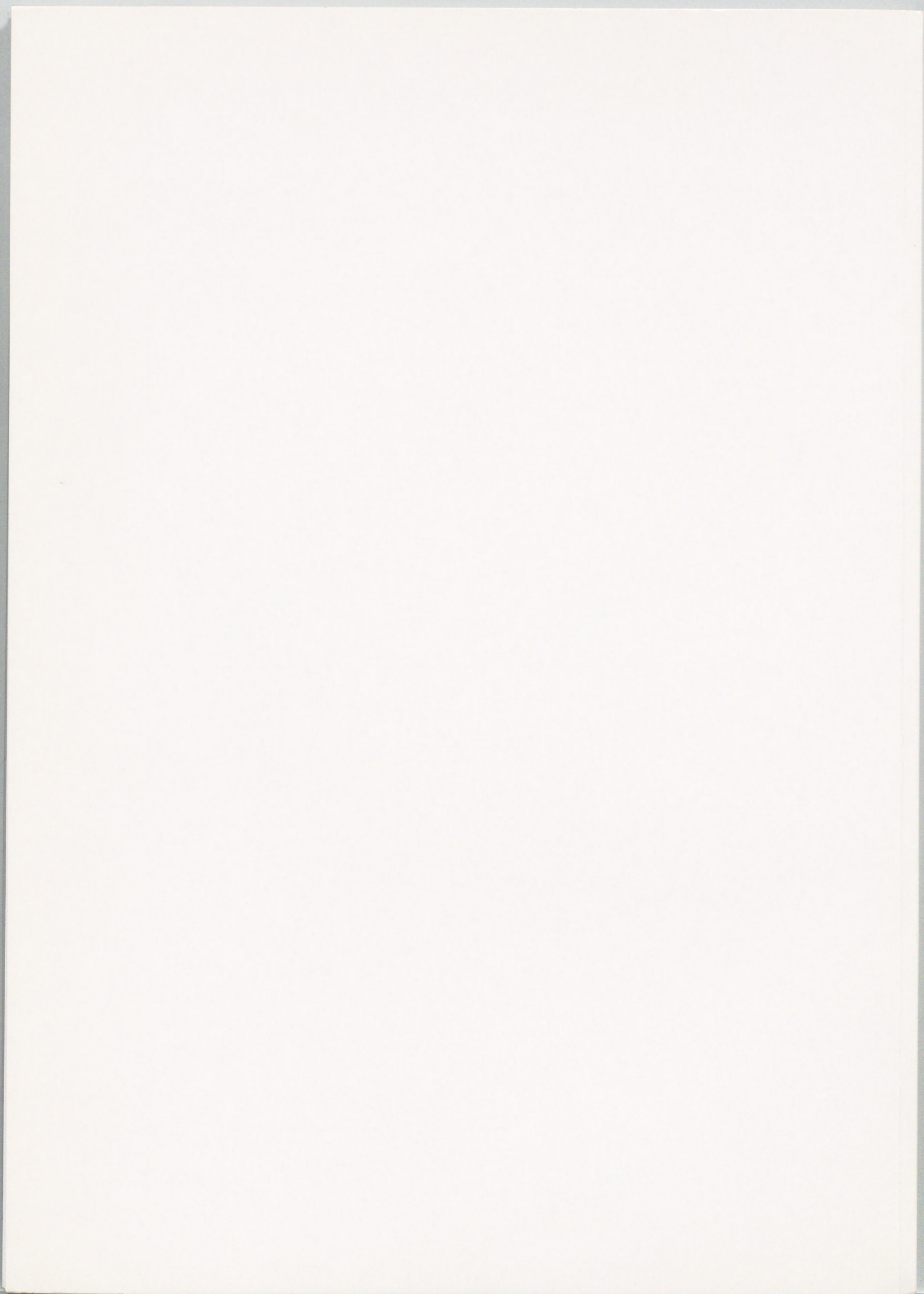


Figure 7












様式 6

論文審査の結果の要旨

報告番号	① 乙	歯第 120 号	氏名	三好 圭子
審査委員		主査	井上 秀夫	
		副査	細井 和雄	
		副査	三宅 洋一郎	

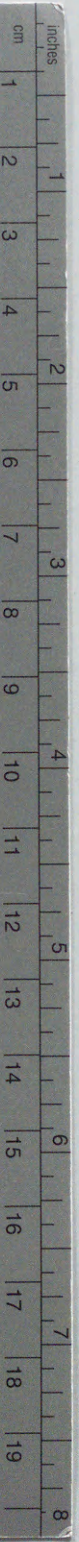
題目

培養ラット耳下腺での唾液分泌促進剤による
オルニチン脱炭酸酵素活性の調節に関する研究

要旨

唾液分泌促進剤である isoproterenol (IPR) や carbachol (CC) は唾液分泌促進のみならず細胞増殖促進作用をも有する。これら2つの生理作用の分子レベルでの関連は未だ不明で、その解明は唾液腺機能の理解に極めて重要である。本研究は、ホルモンや低張に対する耳下腺の応答性を長期に保持している培養耳下腺 explant を用いて、唾液分泌促進剤によるアミラーゼ分泌促進機構と、増殖に必須なポリアミン合成の律速酵素であり増殖の指標酵素でもあるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の活性調節機構について検討し、次の結果を得た。1) 耳下腺での ODC 活性は IPR や CC、および低張培養により酵素タンパク量と mRNA 量の増加を伴い上昇する。しかし、CC は IPR および低張培養による ODC 活性の上昇を抑制するが mRNA レベルは減少せず、半減期も短縮しなかった。2) この CC による ODC 活性の抑制は細胞内遊離カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇による。また、CC は耳下腺腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の周期的な上昇を引き起こす。3) 低張培養は耳下腺腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を持続的に上昇させる。4) アミラーゼ分泌は IPR や CC 単独で促進されるが、低張培養や $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の影響を受けない。

以上の結果は、ラット耳下腺での唾液分泌促進と ODC 誘導は異なる機構によって制御されており、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が ODC 活性の抑制を誘導すること、またプトレッシン (Put) の $[Ca^{2+}]_i$ 調節への関与を示唆している。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が翻訳レベルで ODC 活性を抑制することを明らかにしたのは本研究が最初であり、今までよく知られていなかった Put の生理的な役割を示唆する極めて興味深いものである。本研究の成果は高齢化社会で増加する唾液腺機能障害の予防と治療に寄与するものであり、歯科医学の発展に貢献するところが極めて大であると考えられることから、本論文は博士(歯学)の学位授与に値すると判定した。



Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

