

〔原 著〕

ラット耳下腺細胞のアミラーゼ分泌反応と  
サイクリック AMP 生成に対する  
Ca<sup>2+</sup>および EGTA の効果

相良りか子, 松井 聡子, 東城 庸介, 松本 仁人

東日本学園大学歯学部歯科薬理学講座

(主任: 松本 仁人教授)

Effect of Ca<sup>2+</sup> and EGTA on amylase secretion and  
cyclic AMP accumulation in rat parotid cells

Rikako SAGARA, Satoko MATSUI, Yosuke TOJYO,  
and Yoshito MATSUMOTO

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry,  
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Prof. Yoshito MATSUMOTO)

**Abstract**

The effects of Ca<sup>2+</sup> and EGTA on rat parotid amylase secretion and cyclic AMP accumulation were investigated in vitro using a dispersed acinar cell preparation. Amylase secretion induced by isoproterenol and dibutyryl cyclic AMP was significantly enhanced by pre-treatment (30min) with more than 50μM Ca<sup>2+</sup>. Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> by pre-treatment with 2mM EGTA reduced the amylase secretion, although the pre-treatment was unable to completely block the secretion. The pre-treatment with Ca<sup>2+</sup> and EGTA did not alter the rise in cellular cyclic AMP induced by isoproterenol. These results suggest that intracellular Ca<sup>2+</sup> is necessary to elicit the maximum amylase secretion and that Ca<sup>2+</sup> may be involved in the exocytosis of parotid amylase at steps distal from the cyclic AMP metabolism.

**Key words:** parotid glands, amylase, Ca, EGTA, cyclic AMP

## 緒 言

耳下腺からのアミラーゼ開口分泌やイオン分泌は交感・副交感の自律神経調節を受けている。イオン分泌はムスカリン様受容体や $\alpha$ -アドレナリン受容体を介して促進され, その際の細胞内セカンドメッセンジャーはCa<sup>2+</sup>であると考えられている。Ca<sup>2+</sup>は細胞内外から動員されるが, その動員機構は現在, 唾液腺研究の主要テーマの1つとなっている。一方, アミラーゼ開口分泌は主に $\beta$ -アドレナリン受容体を介して促進される。 $\beta$ -受容体を刺激すると, アミラーゼ分泌に先立って細胞内サイクリックAMP(cAMP)量が著しく上昇すること, また, cAMPやその誘導体を作用させると,  $\beta$ -受容体刺激に匹敵するアミラーゼ分泌が促進されることなどから,  $\beta$ -受容体を介する耳下腺アミラーゼ分泌のセカンドメッセンジャーはcAMPであることが広く受け入れられてきた。以上の耳下腺の分泌調節機構についてはすでに多くの優れた総説が発表されている<sup>1)-5)</sup>。

ところで,  $\beta$ -受容体を介するアミラーゼ分泌は細胞外Ca<sup>2+</sup>を除去してもすぐには抑制されないので, この分泌反応は細胞外Ca<sup>2+</sup>を必ずしも必要としないと考えられている。しかし, 組織や細胞をCa-free液中で長時間インキュベートし, 細胞内Ca<sup>2+</sup>を枯渇させるとアミラーゼ分泌反応は有意に低下することが知られており<sup>6)-8)</sup>,  $\beta$ -受容体を介するアミラーゼ分泌にはcAMPの他に細胞内Ca<sup>2+</sup>も重要な役割を担っていると考える研究者も多い。今回, 我々は耳下腺アミラーゼ分泌におけるCa<sup>2+</sup>の重要性を確認する目的で, ラット耳下腺の遊離細胞を用い, アミラーゼ分泌とcAMP生成に対するCa<sup>2+</sup>とCaキレート剤EGTAの効果調べた。

## 材料と方法

### 1. 試薬類

イソプロテレノール(Iso), ジブチリル・サイクリックAMP(DBcAMP), 牛の精巣ヒアルロニダーゼ(Type 1-S), 牛の血清アルブミンはSigma社製を使用し, コラゲナーゼ(CLS II)はCooper Biomedical社, ハンクス液はGibco社, cAMP測定キットはヤマサ醤油から購入した。EGTAは生化学工業, 他の試薬は和光純薬社製を使用した。

### 2. 耳下腺細胞の調製

ウイスター系雄性ラット(体重約300g)をエーテル麻酔下で放血により殺し, Takumara<sup>9)</sup>の方法に従って耳下腺細胞の調製を行った。まず, 摘出した耳下腺を眼科ハサミで細切し, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>の気相下で114units/mlコラゲナーゼと0.25mg/mlヒアルロニダーゼを含む20mMヘペスーNaOH(pH7.4)で緩衝化したCa<sup>2+</sup>添加ハンクス液でインキュベートした。20分間隔でピペッティングを行い細胞を分散させた。60分後, ガーゼで濾過し, 濾液を遠心分離して細胞を集め, 0.1%牛血清アルブミンを含むCa<sup>2+</sup>無添加ハンクス液(pH7.4)で2回洗浄の後, 同じ液に細胞を分散させ, アミラーゼ分泌測定とcAMP測定に用いた。

### 3. アミラーゼ活性の測定

0.98mlの耳下腺細胞suspensionにEGTA, CaCl<sub>2</sub>あるいは蒸留水を10 $\mu$ l添加し, 30分間37°Cで前処置した。直ちにIsoあるいはDBcAMPを最終濃度が, それぞれ1 $\mu$ Mあるいは1mMになるように加え, 30分間分泌刺激した。インキュベーション後, 氷冷下で濾紙(Toyo濾紙)を用いて濾過し濾液を得た。細胞中に含まれる全アミラーゼ活性を測定するため, 同じ量の耳下腺細胞をポッター型ガラスホモジナイザーでホモジナイズした。以上のサンプルを0.9% NaClで希釈し, アミラーゼ活性を

Bernfeld<sup>10)</sup>の方法に従い測定した。そしてインキュベーション中に遊離されたアミラーゼ量を全アミラーゼ活性量の%として表した。

#### 4. cyclic AMP 含量の測定

0.98ml の耳下腺細胞 suspension に EGTA, CaCl<sub>2</sub>あるいは蒸留水を10 $\mu$ l 加え, 30分間37°C で前処置した。EGTA の最終濃度は2mM, CaCl<sub>2</sub>は1mM とした。次に Iso を最終濃度が1 $\mu$ M になるように添加し, 5分間分泌刺激した後, 直ちに沸とう水浴中で2分間 boil して細胞中の cAMP を抽出した。氷冷後, 3,000rpm で10分間遠心分離し, その上清中の cAMP 量を cAMP 測定キットを用い, ラジオイムノアッセイ法により測定した。各サンプルの cAMP 量は細胞蛋白質あたりに換算して表した。蛋白量の測定は Lowry ら<sup>11)</sup>の方法に従って行った。

## 結 果

### 1. 耳下腺細胞からのアミラーゼ分泌に対する

#### Ca<sup>2+</sup>と EGTA の効果

分泌刺激薬として pure な  $\beta$  作動薬である 1 $\mu$ M のイソプロテレノール (Iso) を用いた場合の実験結果を Figure 1 に示す。Ca 無添加ハンクス液中で30分間前処置した細胞を Iso で分泌刺激すると約20%のアミラーゼ分泌がみられた。0.5mM あるいは 1mM Ca<sup>2+</sup>を含むハンクス液中で30分間前処置し, Iso で分泌刺激するとアミラーゼ分泌が約28%に上昇した。0.5mM と 1mM Ca<sup>2+</sup>とはその分泌促進効果に差はなかった。2mM EGTA を含むハンクス液中で前処置した細胞では約16%に分泌が低下した。

今回の実験では, Iso で分泌刺激をしない場合でも10%前後の自発的なアミラーゼ分泌がみられた。Ca<sup>2+</sup>や EGTA はこの自発的分泌に対しても少なからぬ影響を与えた (Fig. 1, open columns)。すなわち EGTA 処置細胞では自発的分泌の低下傾向がみられたのに対し, Ca<sup>2+</sup>は濃度依存的にその分泌の上昇を起こした。Fig.

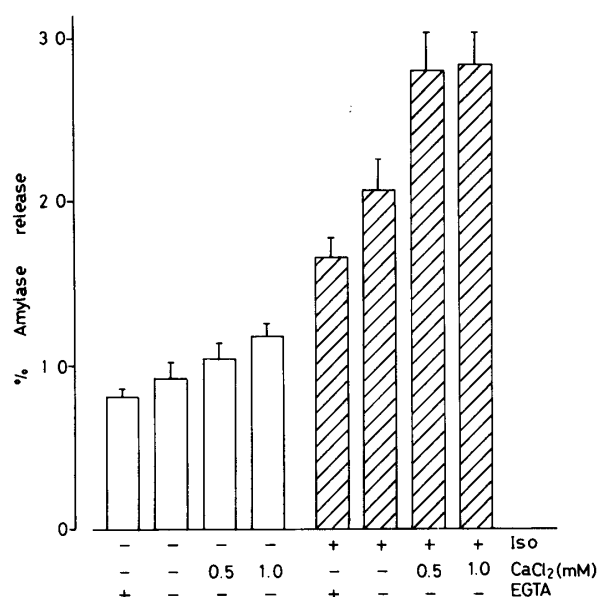


Fig. 1. Effect of Ca<sup>2+</sup> and EGTA on Iso-stimulated amylase secretion. Parotid cells were pre-incubated with or without Ca<sup>2+</sup> or EGTA (2mM) for 30min and then stimulated with 1 $\mu$ M Iso for 30min. The released amylase is expressed as per cent of the total amylase activity of the cells. Each value represents the mean  $\pm$  S. E. of five experiments.

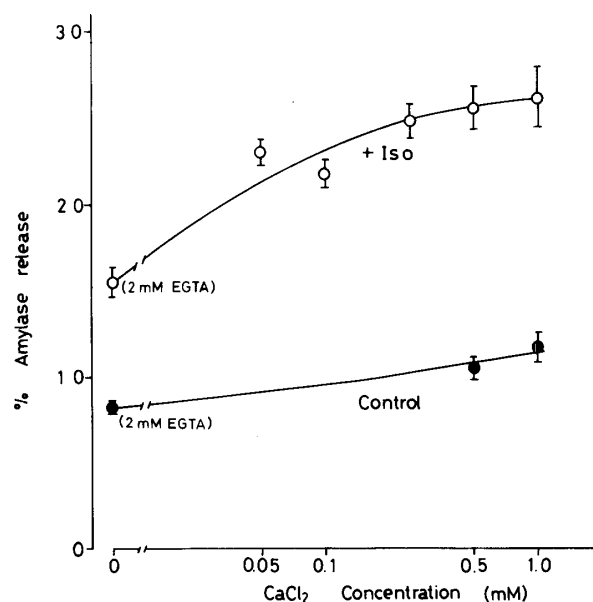


Fig. 2. Effect of pre-treatment with various Ca<sup>2+</sup> concentrations on Iso-stimulated amylase secretion. Parotid cells were pre-incubated with various Ca<sup>2+</sup> concentrations for 30 min and then stimulated with 1 $\mu$ M Iso for 30min. The released amylase is expressed as per cent of the total amylase activity of the cells. Each value represents the mean  $\pm$  S. E. of four experiments.

ure には示していないが、2mM Ca<sup>2+</sup>を含むハンクス液中では自発的分泌がさらに増加し、約13%を示した。

次に、Iso によるアミラーゼ分泌と添加したCa<sup>2+</sup>量との関係を調べるため、細胞を種々の濃度のCa<sup>2+</sup>中で30分間前処置した後、1μM Iso で刺激した (Fig. 2)。わずかに50μM Ca<sup>2+</sup>で分泌は有意に上昇し、0.25mM Ca<sup>2+</sup>でほぼ最大値に達した。

アデニルシクラーゼやホスホジエステラーゼなどのcAMP代謝酵素の活性はCa<sup>2+</sup>により様々な影響を受けることが知られている<sup>12)</sup>ので、アミラーゼ分泌に対するCa<sup>2+</sup>やEGTAの効果はcAMP代謝系の変化を介して生じた可能性がある。それで、IsoのかわりにcAMPの誘導体であるDBcAMPを分泌刺激薬として用い、その分泌に対するCa<sup>2+</sup>とEGTAの効果調べた。DBcAMPの濃度は1mMで行った。その結果はIsoを分泌刺激薬として用いた場合と基本的に同じであった (Fig. 3)。すなわち、Ca<sup>2+</sup>無添加ハンクス液で前処置した時、約17%のアミラーゼ分泌であったのに対し、0.5mMと1mM Ca<sup>2+</sup>を含むハンクス液中で前処置すると約23%と25%にそれぞれ上昇した。2mM EGTAで前処置した場合は約13%に減少した。

## 2. cAMP 生成に対する Ca<sup>2+</sup> と EGTA の効果

1μM Iso は cAMP 量の著しい上昇を引き起こした (Table 1)。Ca<sup>2+</sup>無添加ハンクス液中で前処置した細胞の cAMP 量は Iso 刺激により約200倍に上昇した。Ca<sup>2+</sup>やEGTAで前処置した細胞でも170-200倍の上昇がみられ、cAMP生成はCa<sup>2+</sup>やEGTA処置により大きな影響を受けなかった。

## 考 察

Selinger ら<sup>6)</sup>の報告以来、耳下腺のアミラーゼ開口分泌におけるCa<sup>2+</sup>の役割については数多くの研究が行われてきた。現在、β-受容体を

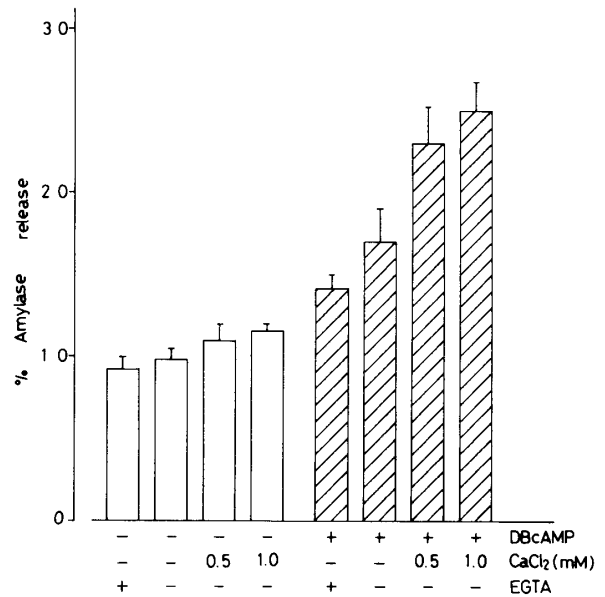


Fig. 3. Effect of Ca<sup>2+</sup> and EGTA on DBcAMP-stimulated amylase secretion. Parotid cells were pre-incubated with or without Ca<sup>2+</sup> or EGTA (2mM) for 30min and then stimulated with 1mM DBcAMP for 30min. The released amylase is expressed as per cent of the total amylase activity of the cells. Each value represents the mean ± S. E. of five experiments.

Additions	cAMP (pmol/mg protein)	
	Basal	+Iso (1μM)
Control	2.0 ± 0.2	435.0 ± 61.5
EGTA (2mM)	1.9 ± 0.2	328.2 ± 29.7
Ca <sup>2+</sup> (1mM)	2.2 ± 0.4	486.7 ± 44.2

Table 1. Effect of Ca<sup>2+</sup> and EGTA on cAMP accumulation by Iso. Parotid cells were pre-incubated with or without Ca<sup>2+</sup> (1mM) or EGTA (2mM) for 30min and then stimulated with 1μM Iso for 5min. Each value represents the mean ± S. E. of five experiments.

介するアミラーゼ分泌反応は細胞外Ca<sup>2+</sup>を必ずしも必要としないと考えられているが、細胞内Ca<sup>2+</sup>の意義については種々の議論があり、まだ、一致した見解は得られていない。Putneyら<sup>7)</sup>は、β-受容体刺激がcAMP量の上昇を介して細胞内Ca<sup>2+</sup>プールからのCa<sup>2+</sup>の動員を誘導し、最終的なメッセンジャーとしてCa<sup>2+</sup>が耳下腺アミラーゼの分泌を引き起こすという仮説

を提唱した。事実、その後も、 $\beta$ -受容体刺激は耳下腺組織や細胞からの $^{45}\text{Ca}$  efflux を促進させることが複数の研究者により報告されてきた<sup>13)-16)</sup>。しかし、一方、 $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光色素 quin-2あるいは fura-2を用いて細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ を測定した場合、 $1\mu\text{M}$ 程度の Iso 刺激では細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は見られないという<sup>17-19)</sup>。さらに、Takumaらはサポニン処理耳下腺細胞をcAMPで刺激しても $^{45}\text{Ca}$ の動員を起こさないこと<sup>9)</sup>、サポニン処理細胞からのアミラーゼ分泌はEGTA存在下でも完全には消失しないこと<sup>20)</sup>を報告している。これらの結果は細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ がアミラーゼ分泌の最終的メッセンジャーであるという仮説に疑問を投げかけるものである。

今回の実験では、EGTA前処置によりアミラーゼ分泌反応が低下し、 $\text{Ca}^{2+}$ による前処置は分泌反応を増大させた。耳下腺細胞の無刺激時の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は細胞外液の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存して変動することが報告されており<sup>21)</sup>、アミラーゼ分泌反応の変化は細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変動を反映したものであると思われる。さらに、最近、我々は、細胞膜透過性のCaキレート剤であるBAPTA-AMを耳下腺細胞内に取り込ませると、アミラーゼ分泌反応の著しい抑制が起こることを見出した<sup>22)</sup>。アミラーゼ分泌はキレート剤処理により完全には消失しなかったため、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ が分泌にとって必須であるか否かを結論づけることはできない。しかし、少なくとも、正常な分泌反応を維持する上で細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ がcAMPとともにきわめて重要な役割を担っていることは確かなようである。

EGTAや $\text{Ca}^{2+}$ 前処置による分泌反応の変化はDBcAMPを分泌刺激薬として用いた場合にも見られ、また、cAMP生成はEGTAや $\text{Ca}^{2+}$ 前処置により強い影響を受けなかった。それゆえ、アミラーゼ分泌反応の変化がcAMP代謝系の変化を介して起きたとは考えにくい。多分、

EGTAや $\text{Ca}^{2+}$ 前処置はcAMP代謝系以降の分泌ステップに影響を与えたものと思われる。

$\text{Ca}^{2+}$ による細胞機能の調節はカルモジュリンなどのCa結合蛋白質を介して行われると一般に考えられている。耳下腺<sup>23,24)</sup>や顎下腺<sup>25)</sup>がカルモジュリンを含んでいることはすでによく知られている。我々は、 $\beta$ -受容体を介する耳下腺アミラーゼ分泌に、 $\text{Ca}^{2+}$ -カルモジュリン系がcAMP代謝調節以降のステップで関与している可能性を示唆した<sup>26)</sup>。それゆえ、今回の実験で観察されたEGTAや $\text{Ca}^{2+}$ によるアミラーゼ分泌反応の変化は $\text{Ca}^{2+}$ -カルモジュリン機能の変化を介して生じたのかも知れない。

## 結 論

ラット耳下腺遊離細胞を用い、アミラーゼ分泌とcAMP生成に対する $\text{Ca}^{2+}$ およびEGTAの効果を調べた。

1. Iso刺激によるアミラーゼ分泌は細胞を2 mM EGTAで前処置(30分間)すると有意に低下し、 $50\mu\text{M}$ 以上の $\text{Ca}^{2+}$ で前処置すると分泌反応は増大した。 $\text{Ca}^{2+}$ による増大効果は0.25mMでほぼ最大に達した。
2. IsoのかわりにDBcAMPを分泌刺激薬として用いた場合も同様の結果が得られた。
3. Iso刺激による細胞内cAMP量の上昇は、EGTAや $\text{Ca}^{2+}$ の前処置で強い影響を受けなかった。

以上の結果から、 $\beta$ -受容体を介する耳下腺のアミラーゼ分泌反応の維持に、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ は重要であると考えられる。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ はcAMP代謝調節とは異なるステップで分泌反応に関与している可能性が強い。

## 文 献

1. Butcher, F. R. and Putney, Jr., J. W.: Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 13: 215-249, 1980.

2. 倉橋昌司: 耳下腺におけるアミラーゼ分泌の調節機序。東日本歯誌, 4: 1-10, 1985.
3. 田隈泰信: 唾液の分泌機構。臨床病理, 34: 248-253, 1986.
4. Putney, Jr., J. W.: Identification of cellular activation mechanisms associated with salivary secretion. *Ann. Rev. Physiol.*, 48: 75-88, 1986.
5. Baum, B. J.: Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.*, 66: 628-632, 1987.
6. Selinger, Z. and Naim, E.: The effect of calcium on amylase secretion by rat parotid slices. *Biochim. Biophys. Acta*, 203: 335-337, 1970.
7. Putney, Jr., J. W., Weiss, S. J., Leslie, B. A. and Marier, S. H.: Is calcium the final mediator of exocytosis in the rat parotid gland? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 203: 144-155, 1977.
8. Quissell, D. O., Lafferty, J. L. and Barzen, K. A.: Dispersed rat parotid cells: Role of calcium and cAMP in the regulation of amylase secretion. *J. Dent. Res.*, 62: 131-134, 1983.
9. Takuma, T. and Ichida, T.: Does cyclic AMP mobilize Ca<sup>2+</sup> for amylase secretion from rat parotid cells? *Biochim. Biophys. Acta*, 887: 113-117, 1986.
10. Bernfeld, P.: Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods Enzymol.*, 1: 149-158, 1955.
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
12. Brostrom, M. A. and Brostrom, C. O.: Calcium control of cyclic AMP metabolism in glial and pituitary tumor cells. *Calcium Cell Function*, 5: 165-208, 1984.
13. Butcher, F. R.: Regulation of calcium efflux from isolated rat parotid cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 630: 254-260, 1980.
14. Argent, B. E. and Arkle, S.: Mechanism of action of extracellular calcium on isoprenaline-evoked amylase secretion from isolated rat parotid glands. *J. Physiol.*, 369: 337-353, 1985.
15. Takemura, H. and Ohshika, H.: Contribution of extracellular and intracellular calcium to the enhanced effect of an  $\alpha$ -adrenergic agonist on amylase release from dispersed rat parotid cells. *J. Dent. Res.*, 64: 881-885, 1985.
16. Dreux, C., Imhoff, V., Huleux, C., Busson, S. and Rossignol, B.: Forskolin, a tool for rat parotid secretion studies: <sup>45</sup>Ca efflux is not related to cAMP. *Am. J. Physiol.*, 251: C754-C762, 1986.
17. Takemura, H.: Changes in cytosolic free calcium concentration in isolated rat parotid cells by cholinergic and  $\beta$ -adrenergic agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 1048-1055, 1985.
18. Aub, D. L. and Putney, Jr., J. W.: Mobilization of intracellular calcium by methacholine and inositol 1, 4, 5-trisphosphate in rat parotid acinar cells. *J. Dent. Res.*, 66: 547-551, 1987.
19. Horn, V. J., Baum, B. J. and Ambudkar, I. S.:  $\beta$ -Adrenergic receptor stimulation induces inositol trisphosphate production and Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.*, 263: 12454-12460, 1988.
20. Takuma, T. and Ichida, T.: Amylase secretion from saponin-permeabilized parotid cells evoked by cyclic AMP. *J. Biochem.*, 103: 95-98, 1988.
21. Nauntofte, B. and Dissing, S.: Stimulation-induced changes in cytosolic calcium in rat parotid acini. *Am. J. Physiol.*, 253: G290-G297, 1987.
22. 東城庸介, 松本仁人: ラット耳下腺細胞からのアミラーゼ遊離に対する細胞内Caキレート剤BAPTA-AMの影響。第39回薬理学会北部会口演要旨集: p39, 1988.
23. Yokoyama, N., Murota, Y., Saito, M., Kon, S. and Furuyama, S.: Purification of calmodulin from bovine parotid gland. *Biochem. Int.*, 6: 257-265, 1983.
24. Tojyo, Y., Matsumoto, Y., Saida, K. and Suzuki, A.: Electrophoretic identification of calmodulin in rat parotid gland. *Arch. Oral. Biol.*, 31: 489-490, 1986.
25. 東城庸介, 内田雅巳, 相良りか子, 松井聡子, 松本仁人: ラット顎下腺カルモジュリンの電気泳動法による検出。歯基礎誌, 29: 58-62, 1987.
26. Tojyo, Y., Uchida, M. and Matsumoto, Y.: Inhibitory effects of calmodulin antagonists on isoproterenol- and dibutyryl cyclic AMP-stimulated amylase release from rat parotid acinar cells. *Japan. J. Pharmacol.*, 45: 487-491, 1987.