

〔総 説〕

耳下腺のアミラーゼ分泌機構  
—“穴あき細胞”の利用—

田隈 泰信

東日本学園大学歯学部口腔生化学講座

Permeabilized Parotid Acini  
: A New Approach to Amylase Exocytosis

Taishin TAKUMA

Department Oral Biochemistry, School of Dentistry,  
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

**Abstract**

Permeabilized cells enabled us to gain access to the intracellular milieu required for exocytosis. Various permeabilization techniques have been applied to many secretory cells including pancreatic acini, however, studies with permeabilized salivary cells were very few. Therefore, I first detailed the preparation method of saponin-permeabilized parotid acini that were highly responsive to exogenous cAMP. Saponin-permeabilized parotid acini prepared in this manner were incubated with a wide variety of cAMP analogs, including site-selective cAMP analogs and the cAMP antagonist. The results suggest that the dissociation of cAMP-dependent protein kinase into its catalytic and regulatory subunits was essential for amylase exocytosis evoked by cAMP. Nevertheless, studies using protein kinase inhibitors and protein phosphatase inhibitors have shown that cAMP-dependent protein phosphorylation mediated by the catalytic subunit was not obligatory for exocytosis. The role of the regulatory subunit in amylase exocytosis remains to be elucidated.

In this article, I also review recent studies concerning the effects of  $\text{Ca}^{2+}$ , C-kinase, and GTP-binding proteins on amylase exocytosis.

**Key words** : Amylase exocytosis, cAMP-dependent protein Kinase, saponin-permeabilized parotid acini.

## はじめに

神経伝達物質などの分泌刺激が細胞膜上の特異的リセプターに結合したのち、分泌顆粒の内容物が細胞外に放出されるまで、開口分泌(exocytosis)の全過程は細胞というブラックボックスの中で生起する<sup>1)</sup>。無数に存在する細胞成分のなかから開口分泌に関与する因子を明らかにするには、無細胞(cell-free)の再構成実験系を用いるのが望ましいが、今のところ開口分泌の無細胞系には適当なものがない。1980年代に入り、無細胞系と無傷細胞の中間、すなわち、細胞膜に穴をあけ物質透過性にした“穴あき細胞”が開口分泌の研究に広く用いられるようになった。Ge(開口分泌を直接コントロールするGTP結合蛋白質；後述)の提唱者Gomper-  
tsは、1990年の総説<sup>2)</sup>に「開口分泌における最近の進歩の大部分は、細胞内環境を精密にコントロールできる透過性細胞(Permeabilized cell)の利用によってもたらされたものである」と書いている。

著者らは、1986年以来<sup>3)</sup>、サポニン処理ラット耳下腺細胞を用い、サイクリックAMP(cAMP)によるアミラーゼ分泌機構を研究してきた。本総説では、この分野の最近の研究を概観し、透過性細胞を使用する際の問題点や今後解明さるべき課題を明らかにしたい。

## 1. 透過性細胞

細胞膜を物質透過性にすること自体は、決して新しい発想ではない<sup>4)</sup>。以前から、骨格筋の研究ではグリセリンが、鞭毛運動の研究では非イオン性の界面活性剤であるTritonが、そして細胞骨格の形態学的研究には高濃度のサポニンが、細胞膜を透過性にする目的で、すでに広く用いられていた。開口分泌に応用された方法は、これらをよりマイルドに、細胞膜や分泌顆粒膜に対するダメージを最小限にとどめたものである。著者らは、以前、イノシトール3リン酸(IP<sub>3</sub>)による細胞内カルシウムストアからのカルシウムイオン(Ca)放出を研究する際、50 µg/mlのサポニンで0°C、10分間処理した耳下腺細胞を用いたが<sup>5)</sup>、この程度の処理でも、アミラーゼの大部分が残っているにもかかわらず、分泌機能は完全に失われていた<sup>1)</sup>。

Table 1に、外分泌細胞への応用例を示す。穿孔には、細胞膜の構成成分であるコレステロールとミセルを形成するサポニンとジギトニン、溶血性の細菌毒素であるストレプトリジナーO、そして遺伝子の細胞内導入にも使用される高圧放電が用いられている。

以下に、著者らのサポニンを用いた方法をやや詳しく述べる。というのも、やってみたがうまくいかない、という苦情をときどき耳にするからである。サポニンは、100 mg/mlのストッ

Table 1. Methods of cell permeabilization

Cell	Technique	Mediator	Reference
Parotid cells	Digitonin	Ca <sup>2+</sup> , cAMP	Dowd et al. 1987 <sup>6)</sup>
	Saponin	cAMP	Takuma & Ichida 1988 <sup>1)</sup>
Pancreatic cells	High voltage discharge	Ca <sup>2+</sup> , cAMP, PMA	Knight & Koh 1984 <sup>7)</sup>
	Digitonin	cAMP, PMA	Schulz et al. 1986 <sup>8)</sup>
	Streptolysin-O	Ca <sup>2+</sup> , PMA, GTP	Williams et al. 1990 <sup>9)</sup>
	Saponin	Ca <sup>2+</sup> , DG	Rubin et al. 1990 <sup>10)</sup>
Gastric cells	Digitonin	Ca <sup>2+</sup>	Norris & Hersey 1985 <sup>11)</sup>

ク液を作り、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存する(1年間使用可能)。使用時50~100倍希釈したサポニン溶液を10  $\mu\text{l}$  試験管にとり、これにコラゲナーゼ消化によって調製した耳下腺細胞浮遊液を1 ml 加え、最終濃度10~20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で実験を行う (Figure 1)。5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下や25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上ではcAMPによる分泌効率が著しく低下する。著者らはメルク社製のサポニンを用いているが、市販のサポニンは純粋な化合物ではないから、メーカーやロットによって至適濃度に違いがあるかもしれない。

サポニンによる穿孔は5分以内に完了するといわれており、穿孔後サポニンを含まない液で洗い、実験を行うことも考えられるが、再現性のある結果は得られない。同様に、メディウムを頻繁に動かすのもよくない。CaやATP, GTPを添加しても分泌能の回復が見られないので、おそらく細胞内の蛋白性因子が漏出するためと思われる。したがって、サポニンとcAMPを前もって加えてある試験管に1 mlの細胞浮遊液をピペットマンで勢よく加え、3~5分後1度ミキサーで1秒間攪拌した後は液を動かさずに15~20分間インキュベートする。タイムコース実験の場合は、測定したい数だけ別々の試験管を用意する必要がある。同じ試験管から時間毎に攪拌・分取する方法は適当でない。

サポニンは、細胞膜のコレステロールと結合し、中央に直径約10 nmの穴をもった円形のミセルを形成するといわれているが、分泌実験で使用する5~25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ という低濃度では、穴の大きさや数が濃度によって変わるようである。cAMPのdose-response curveをサポニン濃度を変えて比べると、細胞内へのcAMPの拡散が、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ では10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ より3倍速いという結果が得られた<sup>12)</sup>。

ジギトニンもサポニンと同様の方法で使用可能と思われるが、濃度はサポニンより低めに設定するほうがよいかも知れない。Dowdら<sup>9)</sup>の結

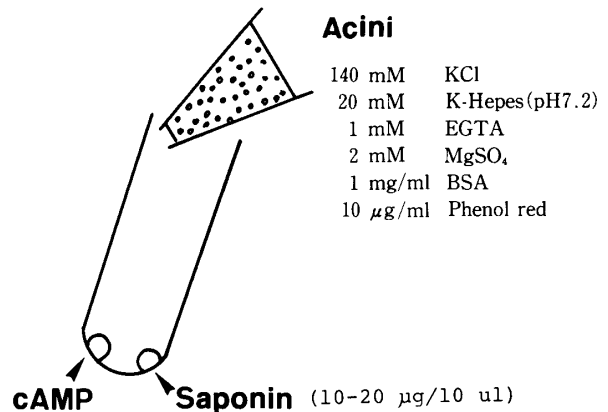


Figure 1. Assay of amylase release from saponin-permeabilized acini.

果があまりきれいではない原因として、分泌能の低いsingle cellを用いたこと、メディウムからClイオンを除いたこと、分泌刺激としてCaと低濃度のcAMPを選んだことなどが考えられる。

ストレプトリジン-Oは直径15 nm以上のサポニンよりかなり大きな穴を細胞膜にあけるといわれているが、そのせいか、膵外分泌細胞に应用された例では、アミラーゼ分泌は10分以内に停止した<sup>9)</sup>。それにしても、高分子物質を細胞内に導入できるかもしれないという可能性は試してみる価値がある。

高圧放電法の魅力は、穿孔後に化学物質をメディウム中に残さない点である<sup>7)</sup>。膵外分泌細胞に使えて耳下腺細胞に使えないはずはないが、まだ応用例はない。

## 2. イオンとATP

サポニン処理細胞を用いることによって、アミラーゼ分泌に必要もしくは不必要なイオンや低分子物質の情報が得られた。まず第1に、cAMPによるアミラーゼ分泌が1 mM EGTA (Caキレート剤)を含むCa無添加メディウムでも、生理濃度のCa存在下と変りないことから、Caは分泌に必要ないと思われる。高濃度のEGTAは分泌を低下させるが、タイトジャンク

ションや細胞構造へのダメージも考慮に入れる必要があるだろう。第2に、ATPの添加が必要ないことから、開口分泌自体のエネルギー消費はきわめて低いと思われる。ATPの要求性は、細胞の種類や前処理の仕方で異なるが、膵外分泌細胞でも同様の結果が報告されている<sup>8,9)</sup>。1 mMのATPを添加しても分泌能に変化はみられなかった。第3に、Naイオンも不要である。以前、無傷細胞を用いた実験で、Naの必要性に関しWatsonと論争になったことがある<sup>13)</sup>が、サポニン処理細胞を用いることでこの問題は完全に解決した。Naイオノフォアの効果については、最近、竹村らの詳細な研究<sup>14)</sup>が報告された。この他、リン酸イオンや重炭酸イオンも不要と思われる。

一方、必要なものとしてはKイオンとClイオンがある。KをNaに置換すると、分泌は半減する。細胞内のCl濃度は低い、KClをK-glutamateに変えると分泌は著しく低下し、さらに等張のマニトール中では分泌はほとんど停

止する<sup>15)</sup>。膵外分泌腺や耳下腺の分泌顆粒膜には、これらのイオンチャンネルが存在し分泌に関与しているという説がある<sup>16-19)</sup>。たしかに、KやClのイオンチャンネルブロッカーは透過性細胞で無傷細胞より強い効果を示すが<sup>15)</sup>、この仮説の当否は、現在、著者らも検討中である。

### 3. ホスホジエステラーゼ(PDE)の影響

上述のように、cAMPはサポニン処理耳下腺細胞からアミラーゼ分泌を促進するが、最大分泌にはミリモル濃度のcAMPが必要であった。ホスホジエステラーゼ(PDE)抵抗性のcAMPアナログでは、この濃度が10分の1から100分の1程度に低下することから、PDEの妨害が予想された(Figure 2)<sup>12)</sup>。しかし、PDE阻害剤のIBMXは単独でアミラーゼ分泌を最高レベルまで促進するため、充分量のIBMX存在下でcAMPの濃度作用曲線をえがくことはできなかった<sup>1)</sup>。

ところで、IBMXはPDEの非選択的な阻害剤

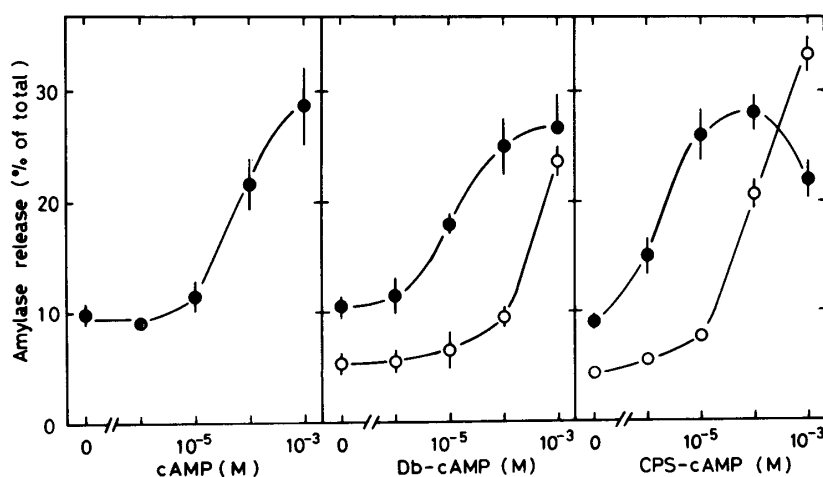


Figure 2. Effects of cAMP, dibutyryl-cAMP, and 8-chlorophenylthio-cAMP on amylase release from intact or saponin-permeabilized parotid cells.

Cells were incubated at 37°C for 15 min with various concentrations of cAMP analogues in either normal Hanks' medium (intact cells, ○), or in calcium-free medium containing 20 μg/ml saponin (permeabilized cells, ●). Data shown are means ± SD (n=6). Db-cAMP, dibutyryl-cAMP; CPS-cAMP, 8-chlorophenylthio-cAMP.

であるが、2種類のlow Km-PDEをそれぞれ特異的に阻害するシロスタミドとRO20-1724には、分泌促進効果はほとんど見られなかった(未発表)。アミラーゼ分泌を妨害しているのは、おそらく他の低親和性-PDEであろう。

その後、 $\beta$ ブロッカーのプロプラノロールがIBMXによる分泌を強く抑制することがわかり、IBMXとプロプラノロールの共存下でcAMPの濃度作用曲線をえがいたところ、アミラーゼ分泌は1  $\mu$ Mから認められ、10  $\mu$ Mでほぼ最大となった<sup>20)</sup>。

一方、Dormerらは低浸透圧法によって顎下腺細胞にPDEを導入し、イソプロテレンール刺激によるムチン分泌がcAMPの上昇なしにおこることを示した<sup>21)</sup>。これが事実とすればcAMPの開口分泌への関与が否定されることになる。ただし、高分子物質であるPDEの導入に用いられた低浸透圧法の有効性についてはコメントができない。いずれにせよ、cAMPが分泌のメディエーターであるという説には、まだ反対者がいるのである。

#### 4. Aキナーゼの役割

現在、口腔生化学の教科書には、耳下腺のアミラーゼ分泌機構として、

神経伝達物質→ $\beta$ リセプター→cAMPレベルの上昇→cAMP依存蛋白質リン酸化酵素(Aキナーゼ)の活性化→特異的な蛋白質のリン酸化→分泌顆粒膜と細胞膜の融合→アミラーゼの放出

という図式が一般的に採用されている。この図式を注意深く検討すると、神経伝達物質から特異的蛋白質のリン酸化までの連鎖は完全に証明されているが、リン酸化と膜の融合の間の矢印は、証拠のない想像線であることに気が付く。

そこで、何とかこれを証明する方法を考えた。最も確実な証明は、Aキナーゼの触媒サブユニットを細胞内に導入し、アミラーゼ分泌を誘

導することであるが、残念ながらこの試みは成功していない。高濃度のサポニンで処理した細胞では、抗体などの高分子物質を導入することも可能だが、低濃度のサポニンで処理した細胞に高分子物質を導入するのはきわめて困難と思われる。かわりに低分子物質であるAキナーゼ阻害剤(H-8およびWalshの熱安定阻害ペプチドの活性中心断片)を導入することにした。これらの阻害剤によって蛋白質リン酸化が実際に阻害されるかどうかを調べたところ、H-8とPKI5-24はcAMP存在性の21K, 26K蛋白質のリン酸化を強く阻害することが確認された(Figure 3)<sup>22)</sup>。しかし、予想に反し、cAMPによるアミラーゼ分泌は、これらの阻害剤を加えてもほとんど低下しなかった(Table 2)<sup>22)</sup>。この結

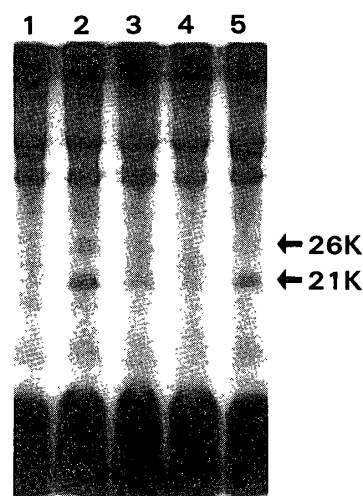


Figure 3. Effects of PKI-(5-24)-peptide, PKI-(14-24)-amide and H-8 on protein phosphorylation in saponin-permeabilized parotid cells stimulated by cyclic AMP

Cells were preincubated for 5 min with saponin (20  $\mu$ g/ml), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (0.4 mCi/ml) and either 10  $\mu$ M PKI-(5-24)-peptide, 40  $\mu$ M PKI-(14-24)-amide or 200  $\mu$ M H-8, and further incubated for 10 min after addition of 1 mM cyclic AMP. Lane 1, control; lane 2, cyclic AMP alone; lane 3, PKI-(5-24)-peptide plus cyclic AMP; lane 4, H-8 plus cyclic AMP; lane 5, PKI-(14-24)-amide plus cyclic AMP.

**Table 2. Effects of PKI-(5-24)-peptide, PKI-(14-24)-amide and H-8 on cyclic AMP-dependent amylase release from saponin-permeabilized parotid cells**

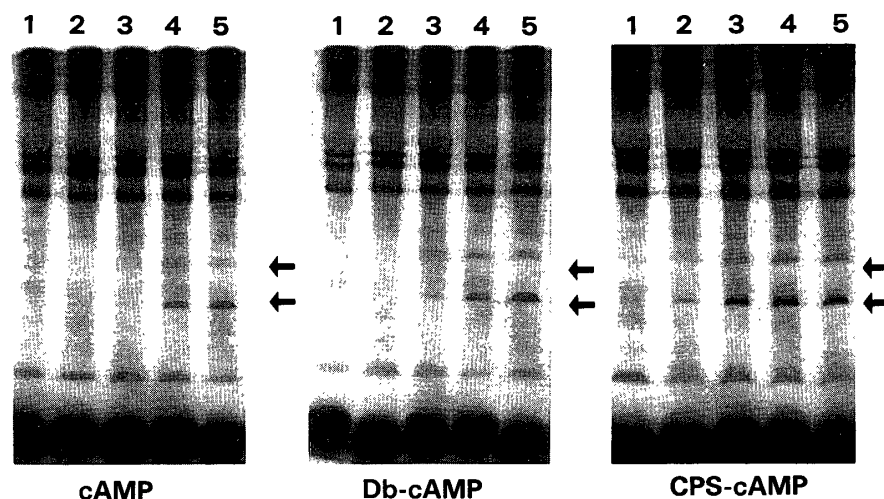
Cells were preincubated with 20  $\mu$ g of saponin/ml and each inhibitor in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium at 37°C for 5 min and further incubated for 15 min after the addition of 1 mM cyclic AMP. Data shown are means  $\pm$  S.D. (n=8).

Treatment	Amylase release (% of total/20min)
Control	13.2 $\pm$ 1.8
Cyclic AMP (1 mM)	25.5 $\pm$ 1.8
+ PKI-(5-24)-peptide (10 $\mu$ M)	24.3 $\pm$ 1.6
+ PKI-(14-24)-amide (40 $\mu$ M)	25.6 $\pm$ 2.8
+ H-8 (200 $\mu$ M)	23.8 $\pm$ 2.2

果は、アミラーゼ分泌にAキナーゼによる蛋白質リン酸化が関与している可能性を強く否定するものである。

しかし、その後、アミラーゼ分泌とAキナーゼの密接な関係を示唆する知見がいくつか得られた。1) サポニン処理細胞に、1~1000  $\mu$ M

のcAMPとその誘導体を加え、アミラーゼ分泌と蛋白質リン酸化の関係を調べたところ、両者は大変よく相関した (Figure 2 & 4)<sup>12)</sup>。2) Aキナーゼの調節サブユニットには2箇所のcAMP結合部位があり、既に600種類以上も合成されたcAMP誘導体の中には各結合部位に選択的高親和性を示すものが知られている。そこで、そのようなcAMPアナログをペアで、しかもそれぞれの最低有効濃度で、サポニン処理細胞に加えたところ、それぞれ単独で加えた場合の和よりも大きな分泌促進効果 (相乗効果) が認められた (Figure 5)<sup>12)</sup>。3) cAMPのリン酸基の酸素をイオウで置換したcAMPSにはSp-cAMPS, Rp-cAMPSという2種類の異性体がある。このうちRp-cAMPSは、Aキナーゼの調節サブユニットに結合するが触媒サブユニットを遊離しないため、cAMPによるAキナーゼの活性化を競合的に阻害し、cAMPアンタゴニストと呼ばれている。サポニン処理細胞にRp-cAMPSを加えたところ、アミラーゼ分泌の促



**Figure 4. Effect of cAMP, dibutyl-cAMP, and 8-chlorophenylthio-cAMP on protein phosphorylation in saponin-permeabilized cells.**

Cells were preincubated at 37°C for 5 min with 20  $\mu$ g/ml saponin and  $\sim 0.2$  mCi of [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP in calcium-free medium and further incubated for 10 min after addition of cAMP or its analogues. Lanes 1, 2, 3, 4, and 5 are 0,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ , and  $10^{-3}$  M cAMP or its analogue, respectively.

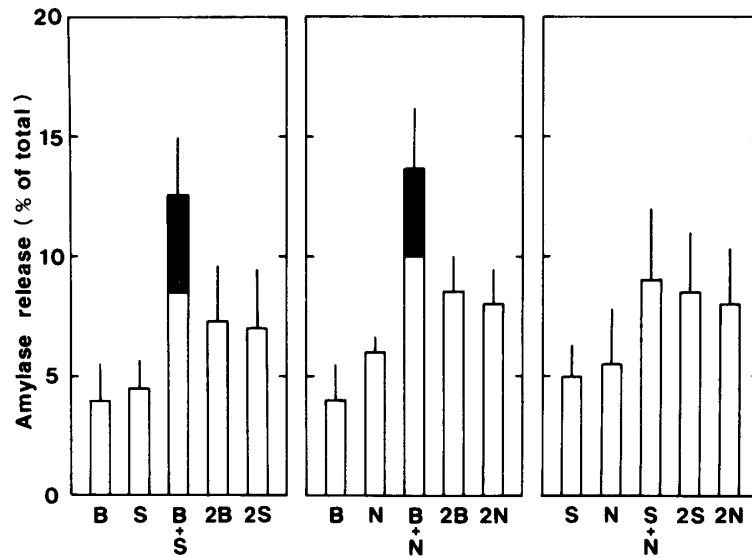


Figure 5. Effects of various site-selective cAMP analogues alone or in combination on amylase release from saponin-permeabilized parotid cells.

Cells were incubated at 37°C for 15 min with N<sup>6</sup>-benzoyl-cAMP (B and 2B indicate 1 and 2 μM, respectively), 8-thiomethyl-cAMP (S and 2S, 1 and 2 μM, respectively), and 8-amino-cAMP (N and 2N, 3 and 6 μM, respectively) alone or in combination in Ca-free KCl medium containing 20 μg/ml saponin. Basal release of amylase (13.9±1.9, 13.1±0.6, and 12.3±2.7% for left, middle, and right experiments, respectively) was subtracted from each value. The solid portion of the bar indicates the extent of synergism. Data shown are means±SD (n=8).

進はみられず、しかも、Sp-cAMPSやイソプロテレノールによる分泌が阻害された (Figure 6)<sup>23)</sup>。

以上1～3)の結果は、cAMPによるAキナーゼの調節・触媒、両サブユニットの解離とアミラーゼ分泌が密接に関連していることを示唆している。しかし、解離後の各サブユニットの機能は明らかでない。既に述べたように、触媒サブユニットによる蛋白質リン酸化については否定的な結果が得られたが、調節サブユニットについては、今のところ肯定・否定いずれの証拠も存在しない。

ところで、これらの実験では、透過性細胞の特性がよく生かされた。まず、無傷細胞ではcAMPアナログの細胞内濃度を想像しにくいですが、サポニン処理細胞ではある程度想像できる

こと。つぎに、サポニン処理細胞では、数μMのcAMPアナログでアミラーゼ分泌が起こるので、非生理的なミリモル濃度での組合せをしないでよいこと。最後に、耳下腺細胞はRp-cAMPSに対する透過性が低く、cAMPの100倍以上のRp-cAMPS濃度を必要とする阻害実験は、無傷細胞では不可能に近いことである。その後、ヨーロッパのある研究者から、Rp-cAMPSが無傷細胞では効果がなかったという話をきいた。

## 5. オカダ酸の効果

おそらくすべての分泌刺激は、多かれ少なかれ蛋白質リン酸化を促進するであろう。にもかかわらず、開口分泌への蛋白質リン酸化の関与はいまだに確立していない。この原因は、分泌

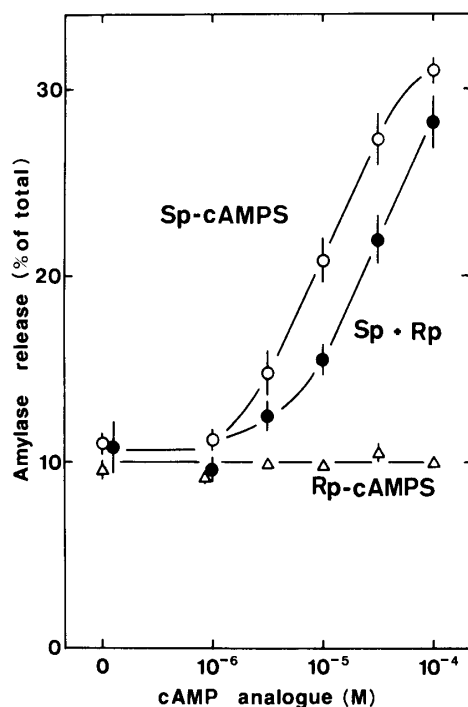


Figure 6. Dose-response curves of Rp- and Sp-cAMPS for amylase release from saponin-permeabilized parotid acinar cells.

The acini were incubated for 15 min with various concentrations of Rp- and Sp-cAMPS alone or in combination in Ca-free medium containing 20  $\mu$ g/ml saponin. Data shown are means  $\pm$  SE (n=4).

刺激の多くが分泌以外の細胞機能にも影響を与えるため、リン酸化が分泌を調節しているとは限らないこと、また、分泌にともなってリン酸化される蛋白質は多数知られているが、そのなかに分泌と関係のあるものがほとんどないことである。耳下腺でも、cAMPレベルの上昇にともないAキナーゼが不可避免的に活性化され、いくつかの蛋白質がリン酸化されるが、それらはリボソームのS6蛋白質や小胞体膜の疎水性蛋白質で、分泌と関連あるものはまだみつかっていない<sup>24)</sup>。

現在、分泌との関係で最も研究の進んだリン蛋白質は神経細胞のシナプシンであろう<sup>25)</sup>。リン酸化されていないシナプシンは、シナプス小胞と細胞骨格を連結し開口分泌を抑制している

が、リン酸化によってこの連結が切れ、小胞が分泌可能な遊離状態となる。しかし、シナプシンのリン酸化反応は、シナプス小胞と細胞膜の融合というきわめて速い反応を媒介するには遅すぎると考えられている<sup>25)</sup>。

前節で述べたように、Aキナーゼ阻害剤は蛋白質リン酸化を阻害したが、cAMPによるアミラーゼ分泌は阻害されなかった。しかし、この実験では阻害剤で阻害しきれなかった残余のリン酸化が分泌促進に充分であった可能性と、この実験方法では検出できないリン酸化があり、これが阻害剤の影響をまぬがれていた可能性を否定しきれない。

細胞の蛋白質リン酸化レベルは、リン酸化酵素と脱リン酸化酵素の活性のバランスで決まる。したがって、リン酸化レベルの高進はリン酸化酵素の活性上昇ばかりでなく、脱リン酸化酵素の活性低下によっても起こる。最近、下痢性貝毒の原因物質であるオカダ酸が、蛋白質脱リン酸化酵素のタイプ1とタイプ2Aを強力に阻害し、蛋白質リン酸化レベルを高めることが明らかになった。その結果、オカダ酸は蛋白質リン酸化酵素を活性化したのと同様の効果をもたらし、蛋白質リン酸化の生理的意義を解明するための有力な武器となることが確認された。

そこで、アミラーゼ分泌に対するオカダ酸の効果が調べられた<sup>26)</sup>。1  $\mu$ Mのオカダ酸は、単独でわずかにアミラーゼ分泌を促進したが、half-maximum doseのcAMPやイソプロテレノールによる分泌を増強することはなく、逆にmaximum doseによる分泌を強く阻害した (Figure 7)<sup>26)</sup>。さらに蛋白質リン酸化に対する効果を調べたところ、オカダ酸はcAMPによってはリン酸化されない蛋白質をいくつかリン酸化し、cAMPによる21K、26K蛋白質のリン酸化を増強した。同様の効果は、オカダ酸に引き続いて発見された脱リン酸化酵素阻害剤のカリクリンAにも認められた。オカダ酸とカリクリンAの



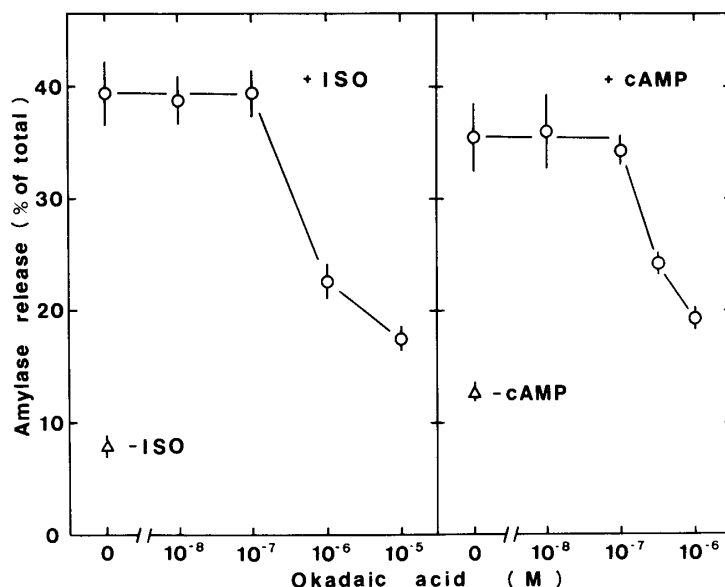


Figure 7. Effect of okadaic acid on amylase release from intact or saponin-permeabilized parotid cells. The cells were incubated for 15 min with various concentrations of okadaic acid in either normal Hanks' medium (left; intact cells,  $\pm 1 \mu\text{M}$  isoproterenol) or in Ca-free medium containing  $20 \mu\text{g/ml}$  saponin (right;  $\pm 1 \text{ mM}$  cAMP). Data shown are means  $\pm$  SD ( $n=4$ ).

化学構造には類似性がないことから、これらの効果は両化合物の非特異的な副作用ではなく、共通する生物活性に起因するものと思われる。すなわち、脱リン酸化酵素活性が阻害され、耳下腺細胞内の蛋白質リン酸化レベルが上昇したためと考えられる。これらの結果は、蛋白質リン酸化の高進が必ずしもアミラーゼ分泌の促進につながるとは限らず、逆に、分泌の低下を招く場合もあることを示している。

アミラーゼ分泌と蛋白質リン酸化の乖離は、最近、井上らによっても確認された<sup>27)</sup>。

## 6. Caの役割

カルシウムは開口分泌の分野ではcAMP以上に重要なメディエーターである。しかし、ラット耳下腺ではCaはおもに水やイオンの分泌に関与していると考えられている。ところで、サポニン処理耳下腺細胞を用いた著者らの最初の論文のなかに、Caの添加によってcAMPと同程

度にアミラーゼ分泌が促進されることを示す一枚の図が含まれている<sup>1)</sup>。ただし、分泌に必要なCa濃度はミリモルレベルと著しく高かった。この結果は、無傷細胞の実験結果とは相容れないものである。なぜなら、Caイオノフォアによるアミラーゼ分泌はきわめて軽微なものであり、カルバコールでさえイソプロテレノールによる分泌のせいぜい3分の1程度だからである。

その後、このCaによる分泌がNaClメディウムではほとんど見られず、また、KClメディウム中でもプロプラノロール存在下では全く認められないことがわかった(未発表)。これらの結果は、Caによる分泌が、実際は、耳下腺腺房細胞に付着した交感神経終末から、高カリウムとCaによってノルアドレナリンが放出したために起こった可能性を強く示唆している。このことは、KClメディウムを用いて分泌を調べる場合、EGTAまたは $\beta$ ブロッカーの添加が不可欠であることを示している。

cAMPによるアミラーゼ分泌にCaが必要なことは既に述べたが、このことは無傷細胞を用いた研究でも確認された。最近の研究によると、EGTAや細胞膜透過性のEGTAアナログで前処理した耳下腺細胞ではイソプロテレノールに対する応答能が低下するが、これは細胞内Caが除去されたためというより、ATPレベルの低下など、Ca以外の影響と考えられている<sup>28)</sup>。

一般に、耳下腺のアミラーゼ分泌は、cAMPをセカンドメッセンジャーとする $\beta$ 刺激によるものが主で、 $\alpha$ やムスカリン刺激による分泌は従と考えられている。しかし、最近、perifusion法を用いて、各分泌刺激に対するアミラーゼ分泌の初期応答を比べたところ、カルバコールはイソプロテレノールの2倍の分泌能を示した<sup>29)</sup>。ただし、この高い反応性は長続きせず、急速に減衰した。また、アミラーゼ分泌のピークとfura-2で測定した細胞内Ca濃度のピークは一致していた。もしこの脱感作による減衰さえ妨げれば、カルバコールのほうがずっと強い分泌刺激たりうるという主張は大変興味深い。

一方、膵臓のアミラーゼ分泌については、これとは全く異なったメカニズムが提唱されている<sup>30)</sup>。膵臓ではカルバコールによる分泌はピークをつくらず、耳下腺の場合のイソプロテレノールによる分泌と似ている。刺激開始直後のCaのピークとアミラーゼ分泌は関係がなく、刺激が続くかぎり細胞外液から持続的に流入するCaが重要な役割をはたしているという。

最近、Caによる開口分泌を直接調節する蛋白質としてCaとリン脂質の両方に親和性をもつアネキシン（リポコルチン）群の蛋白質、中でもカルパクチンが注目を集めている<sup>31)</sup>。しかし、これを否定する報告もある<sup>32)</sup>。

## 7. Cキナーゼの役割

Cキナーゼを直接活性化する作用をもつフォルボールエステル（PMA）が、膵臓や耳下腺か

らアミラーゼ分泌を促進することは繰り返し確認されている<sup>33,34)</sup>。Cキナーゼがアミラーゼ分泌に関与している根拠としては、カルバコールやコレシストキニン（CCK）による刺激で、Cキナーゼが細胞質から細胞膜へ移動すること、Cキナーゼ阻害剤のスタウロスポリンが、カルバコール等による分泌を阻害すること<sup>35)</sup>、PMAの前処理によってCキナーゼ活性の大部分が細胞から失われる（ダウンレギュレーション）が、その結果カルバコール等による分泌も低下すること<sup>36)</sup>、などがある。

これらの現象の多くは耳下腺細胞でも確認されているが<sup>37,38)</sup>、アミラーゼ分泌とCキナーゼの連関に疑問を抱かせる事実もないわけではない。Cキナーゼの膜転移の生理的な意味が明らかでないこと、同じくCキナーゼ阻害剤として広く用いられているH-7の効果がスタウロスポリンの結果と一致しないこと<sup>39)</sup>、CキナーゼをダウンレギュレーションしてもCキナーゼの膜転移を促進する作用をもつ生理的な分泌刺激の効果に変化が見られない例もあること<sup>40)</sup>、そしてcAMPの場合と同じく、分泌に関与するリン酸化蛋白質が同定されていないこと、などである。

サポニン処理膵外分泌細胞をジアシルグリセロール（DG）で刺激した実験からは、Cキナーゼ単独の分泌促進効果はあまり大きくないという結論が導かれた<sup>10)</sup>。

## 8. GTP結合蛋白質（Ge）

Gompertsは、ATPに非依存性（蛋白質リン酸化が関与していないという解釈）で、GTPによって促進される分泌に注目し、開口分泌を直接コントロールするGTP結合蛋白質Ge（eはexocytosisを意味する）の存在を示唆した<sup>2)</sup>。Geは、まだその実体は不明であるが、酵母ではヒトの低分子量GTP結合蛋白質とホモロジーのあるいくつかのG蛋白質が分泌過程に関与して

いる証拠がある。

GTPは膵臓や耳下腺細胞でも、わずかながらアミラーゼ分泌を高めることが知られている。これがGeの要件を満たしているかどうか、また、細胞膜の情報伝達系を介してcAMP系やCa・DG系を刺激していないかどうか、十分な検討はなされていない。

他方、膵臓の分泌顆粒には低分子量GTP結合蛋白質を含む各種のG蛋白質の存在が確認されている<sup>41,42)</sup>。Schulzらは、KC1メディウム中でバリノマイシンによる分泌顆粒の融解を測定し、GTPが融解を促進すると報告した<sup>18)</sup>。GTPが顆粒膜にあるC1チャンネルの透過性を高めるという解釈で、これがGeの正体ではないかと考えている。しかし、Hopferらも、同様の方法で分泌顆粒と各種のヌクレオチドをインキュベートしているが、Schulzらが報告したような明快な結論には到達していない<sup>43)</sup>。

耳下腺の分泌顆粒にもG蛋白質が存在するといわれている<sup>44)</sup>。まだ予備実験の段階であるが、Schulzらと同様の方法で耳下腺分泌顆粒に対するGTPの効果を調べたが、融解促進効果は認められなかった。Geの有無およびその正体の解明にはさらに研究が必要である。

### おわりに

開口分泌は、受精卵から神経細胞まで、ほとんど全ての細胞に見られる非常に重要な細胞機能であるが、その核心部分である分泌顆粒膜と細胞膜の融合のメカニズムは解明されていない。本総説では、このなぞに挑む新しいアプローチのひとつとして“穴あき細胞”を紹介し、方法の詳細とこれまでに得られた成果をまとめた。残念なことに、耳下腺を含め、唾液腺にこの研究法が応用された例は、これまでのところきわめて限られている。唾液腺は、cAMP, Ca, DG, IP<sub>3</sub>など、多くのセカンドメッセンジャーが何らかの形で分泌にかかわっており、多彩な研

究が可能である<sup>45)</sup>。今後、新しいアイデアと工夫をもった若い研究者が多数この分野に参加されることを期待したい。

### 謝 辞

研究を遂行するにあたり、東日本学園大学歯科薬理学教室の東城庸介助教授、口腔生理学教室の倉橋昌司助教授をはじめとする唾液腺研究会のメンバーとのディスカッションから多くの有益な示唆を受けたこと、また、口腔生化学講座の市田篤郎教授から温かい励ましを受けたことを記し、深く感謝の意を表します。また、執筆の機会を与えてくださった本誌編集委員各位に心から感謝いたします。研究経費の一部は、文部省科学研究費補助金、課題番号61771465, 62771484, 63771499 (以上奨励研究A, 昭和61~63年度), 01571024 (一般研究C, 平成元~2年度) によってまかなわれました。

### 文 献

1. Takuma, T. and Ichida, T.: Amylase secretion from saponin-permeabilized parotid cells evoked by cyclic AMP, *J. Biochem.* 103: 95-98, 1988.
2. Gomperts, B. D.: A GTP-binding protein mediating exocytosis, *Annu. Rev. Physiol.* 52: 591-606, 1990.
3. 田隈泰信, 市田篤郎: cAMPによるサポニン処理ラット耳下腺細胞からのアミラーゼ分泌, *生化学* 58(8): 1074, 1986.
4. 後藤秀樹, 竹中敏文: サポニンモデルと細胞内運動機序, *生体の科学* 35(3): 232-239, 1984.
5. 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.
6. Baldys-Waligorska, A., Pour, A., Moriarthy, C. M. and Dowd, F.: The effect of calcium and cyclic AMP on amylase release in digitonin-permeabilized parotid gland cells, *Biochim. Biophys. Acta* 929: 190-196, 1987.
7. Knight, D. E. and Koh, E.: Ca<sup>2+</sup> and cyclic

- nucleotide dependence of amylase release from isolated rat pancreatic acinar cells rendered permeable by intense electric fields, *Cell Calcium* 5: 401-418, 1984.
8. Kimura, T., Imamura, K., Eckhardt, L., and Schulz, I.:  $\text{Ca}^{2+}$ -, phorbol ester-, and cAMP-stimulated enzyme secretion from permeabilized rat pancreatic acini, *Am. J. Physiol.* 250: G698-G708, 1986.
  9. Kitagawa, M., Williams, J. A. and De Lisle, R. C.: Amylase release from streptolysin O-permeabilized pancreatic acini, *Am. J. Physiol.* 259: G157-G164, 1990.
  10. Komabayashi, T., McKinney, J. S. and Rubin, R. P.: Regulation by diacylglycerol of calcium-evoked amylase secretion from intact and permeabilized pancreatic acinar cells, *Cell Calcium* 11: 501-506, 1990.
  11. Norris, S. H. and Hersey, S. J.: Stimulation of pepsinogen secretion in permeable isolated gastric glands, *Am. J. Physiol.* 249: G408-G415, 1985.
  12. Takuma, T.: Evidence for the involvement of cAMP-dependent protein kinase in the exocytosis of amylase from parotid acinar cells, *J. Biochem.* 108: 99-102, 1990.
  13. Takuma, T. and Ichida, T.: Effects of sodium ions and monensin on amylase secretion from rat parotid cells, *Biochim. Biophys. Acta* 929: 14-17, 1987.
  14. 季智, 竹村晴夫: 耳下腺腺房細胞のアミラーゼ放出能に対するNaイオンフォア, モネンシンの効果, *札幌医学雑誌* 60(1): 93-101, 1991.
  15. Takuma, T. and Ichida, T.: Roles of potassium and chloride ions in cAMP-mediated amylase exocytosis from rat parotid acini, *Cell Struct. Funct.* 16: 405-409, 1991.
  16. Fuller, C. M., Eckhardt, L. and Schulz, I.: Ionic and osmotic dependence of secretion from permeabilized acini of the rat pancreas, *Pflügers Arch.* 413: 385-394, 1989.
  17. Fuller, C. M., Deetjen, H. H., Piiper, A. and Schulz, I.: Secretagogue and second messenger-activated  $\text{Cl}^-$  permeabilities in isolated pancreatic zymogen granules, *Pflügers Arch.* 415: 29-36, 1989.
  18. Piiper, A., Plusczyk, T., Eckhardt, L. and Schulz, I.: Effects of cholecystokinin, cholecystokinin JMV-180 and GTP analogs on enzyme secretion from permeabilized acini and chloride conductance in isolated zymogen granules of the rat pancreas, *Eur. J. Biochem.* 197: 391-398, 1991.
  19. Gasser, K. W., DiDomenico, J. and Hoffer, U.: Secretagogues activate Chloride transport pathways in pancreatic zymogen granules, *Am. J. Physiol.* 254: G93-G99, 1988.
  20. Takuma, T.: Propranolol inhibits cyclic AMP accumulation and amylase secretion in parotid acinar cells stimulated by isobutylmethylxanthine and forskolin, *Biochim. Biophys. Acta* 1052: 461-466, 1990.
  21. Bradbury, N. A., Dormer, R. L. and McPherson, M. A.: Introduction of cyclic AMP phosphodiesterase into rat submandibular acini prevents isoproterenol-stimulated cyclic AMP rise without affecting mucin secretion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 661-671, 1989.
  22. Takuma, T.: Evidence against direct involvement of cyclic AMP-dependent protein phosphorylation in the exocytosis of amylase, *Biochem. J.* 256: 867-871, 1988.
  23. Takuma, T. and Ichida, T.: Cyclic AMP antagonist Rp-cAMPS inhibits amylase exocytosis from saponin-permeabilized parotid acini, *J. Biochem.* 110: 292-294, 1991.
  24. Kanamori, T. and Hayakawa, T.: Ion-exchange chromatography of ionic detergent-solubilized proteins: application to purification of rat parotid gland phosphoproteins including ribosomal protein S6, *Anal. Biochem.* 167: 372-380, 1987.
  25. De Camilli, P., Benfenati, F., Valtorta, F. and Greengard, P.: The synapsins, *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 433-460, 1990.
  26. Takuma, T. and Ichida, T.: Okadaic acid inhibits amylase exocytosis from parotid acini stimulated by cyclic AMP, *FEBS Letters* 285: 124-126, 1991.
  27. Ueno, A., Kikuchi, K., Nishino, M., Kawano, M., Matsunmoto, N. and Inoue,

- H.: Sialagogue-stimulated protein phosphorylation related to ornithine decarboxylase induction in cultured rat parotid explants, *Archs. Oral Biol.* 36: 415-423, 1991.
28. Tojyo, Y. and Matsumoto, Y.: Inhibitory effects of loading with the calcium-chelator BAPTA on amylase release and cellular ATP level in rat parotid cells, *Biochem. Pharmacol.* 39: 1775-1779, 1990.
29. Yoshimura, K. and Nezu, E.: Dynamic changes in the rate of amylase release induced by various secretagogues examined in isolated rat parotid cells by using column perfusion, *Jpn. J. Physiol.* 41: 443-459, 1991.
30. Tsunoda, Y., Stuenkel, E. L. and Williams, J. A.: Characterization of sustained  $[Ca^{2+}]_i$  increase in pancreatic acinar cells and its relation to amylase secretion, *Am. J. Physiol.* 259: G792-G801, 1990.
31. Burgoyne, R. D.: Secretory vesicle-associated proteins and their role in exocytosis, *Annu. Rev. Physiol.* 52: 647-659, 1990.
32. Wu, Y. N. and Wagner, P. D.: Calpactin-depleted cytosolic proteins restore  $Ca^{2+}$ -dependent secretion to digitonin-permeabilized bovine chromaffin cells, *FEBS Letters* 282: 197-199, 1991.
33. Takuma, T. and Ichida, T.: Phorbol ester stimulates amylase secretion from rat parotid cells, *FEBS Letters* 199: 53-56, 1986.
34. Shimomura, H., Terada, A., Hashimoto, Y. and Soderling, T. R.: The role of protein kinase C on amylase secretion from rat parotid gland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150: 1309-1314, 1988.
35. Verme, T. B., Velarde, R. T., Cunningham, R. M. and Hootman, S. R.: Effects of staurosporine on protein kinase C and amylase secretion from pancreatic acini, *Am. J. Physiol.* 257: G548-G553, 1989.
36. Sung, C. K., Hootman, S. R., Stuenkel, E. L., Kuroiwa, C. and Williams, J. A.: Downregulation of protein kinase C in guinea pig pancreatic acini: effects on secretion, *Am. J. Physiol.* 254: G242-G248, 1988.
37. Machado-De Domenech, E. and Söling, H. D.: Effects of stimulation of muscarinic and of  $\beta$ -catecholamine receptors on the intracellular distribution of protein kinase C in guinea pig exocrine glands, *Biochem. J.* 242: 749-754, 1987.
38. 奥村一彦, 金沢正昭: ラット唾液腺における Protein kinase C-isozymeの検索, *歯基礎誌* 32(補冊): 181, 1990.
39. Pandol, S. J. and Schoeffield, M. S.: 1, 2-Diacylglycerol, protein kinase C, and pancreatic enzyme secretion, *J. Biol. Chem.* 261: 4438-4444, 1986.
40. Van der Merwe, P. A., Millar, R. P. and Davidson, J. S.: Calcium stimulates luteinizing-hormone exocytosis by a mechanism independent of protein kinase C, *Biochem. J.* 268: 493-498, 1990.
41. Lambert, M., Bui, N-D. and Christophe, J.: Novel GTP-binding proteins in plasma membranes and zymogen granule membranes from rat pancreas and in pancreatic AR 4-2J cell membranes, *FEBS Letters* 271: 19-22, 1990.
42. Padfield, P. J. and Jamieson, J. D.: Low molecular weight GTP-binding proteins associated with zymogen granule membranes from rat pancreas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 600-605, 1991.
43. Thevenod, F., Gasser, K. W. and Hopfer, U.: Dual modulation of chloride conductance by nucleotides in pancreatic and parotid zymogen granules, *Biochem. J.* 272: 119-126, 1990.
44. 石川康子, 天野伊知郎, 石田甫: 耳下腺における GTP結合蛋白質の諸性質とその役割, *歯基礎誌* 32(補冊): 180, 1990.
45. Harper, J. F.: Stimulus-secretion coupling: second messenger-regulated exocytosis, *Adv. 2nd Messenger Phosphoprotein Res.* 22: 193-318, 1988.