

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570073

研究課題名 (和文) 副甲状腺 Ca 感知における DAG リパーゼからリポキシゲナーゼへの情報伝達

研究課題名 (英文) DAG lipase-lipoxygenase pathway in Ca sensing of parathyroid cells

研究代表者

岡田 幸雄 (OKADA YUKIO)

長崎大学・大学院医歯薬学研究科・准教授

研究者番号： 60136687

研究成果の概要 (和文)：

副甲状腺 (上皮小体) 細胞の細胞膜には  $\text{Ca}^{2+}$  受容体 (CaR) が発現しており血漿  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を直接検出している。ウシガエル副甲状腺を摘出し、酵素処理により単離副甲状腺細胞を得た。細胞外液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を静止時の 1.8 mM からそれ以上に増加させると、副甲状腺細胞は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存した内向き電流を示した。この電流は、脱分極性ステップパルスにより時間に依存してゆっくりと活性化し、強い外向き整流性を示し、再分極により顕著なテール電流を発生し、 $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  電流であることを示唆する。この細胞外高  $\text{Ca}^{2+}$  誘発電流及び細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  灌流誘発電流は共に Niflumic acid で強く抑制され、その逆転電位は  $\text{Cl}^-$  の平衡電位と一致した。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  誘発電流は、U73122 (phospholipase C の抑制剤)、tetrahydrolipstatin (DAG lipase の抑制剤)、MAFP (MAG lipase の抑制剤) 及び baicalein (lipoxygenase の抑制剤) によって有意に抑制された。IP<sub>3</sub> の細胞内灌流は何の応答も誘発しなかったが、2-AG、アラキドン酸及び 12(S)-HPETE の細胞内灌流は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  誘発電流と同様な電流応答を誘発した。以上の結果より、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  は、phospholipase C から DAG lipase を介して lipoxygenase により 12(S)-HPETE を産生させて副甲状腺細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させ  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  電流を誘発すると結論される。

研究成果の概要 (英文)：

Elevation of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induces intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in parathyroid cells. We report the electrophysiological property associated with intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in frog parathyroid cells and show that  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels are activated by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase through inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)-independent pathway. High extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  induced an outwardly-rectifying conductance in a dose-dependent manner. The conductance was composed of an instantaneous time-independent component and a slowly activating time-dependent component and displayed deactivating inward tail current. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -induced and  $\text{Ca}^{2+}$  dialysis-induced currents reversed at the equilibrium potential of  $\text{Cl}^-$  and were inhibited by niflumic acid. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -induced currents displayed a moderate dependency on guanosine triphosphate (GTP). All blockers for phospholipase C, DAG lipase, MAG lipase and lipoxygenase inhibited extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -induced current. IP<sub>3</sub> dialysis failed to induce conductance increase, but 2-AG, arachidonic acid and 12(S)-HPETE dialysis increased the conductance identical to extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -induced conductance. These results

indicate high extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  raises intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration through DAG lipase/lipoxygenase pathway, resulting in the activation of  $\text{Cl}^-$  conductance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	710,000	4,410,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：動物生理化学, 細胞シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

細胞外液の遊離  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、副甲状腺(上皮小体)ホルモン(PTH), カルシトニン(CT)および活性型ビタミン  $\text{D}_3$  の3つのホルモンで調節されている。PTH を分泌する副甲状腺と CT を分泌する甲状腺C細胞(カエルでは鰓後体)の細胞膜には  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性受容体(CaR)が発現しており、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を直接検出している。

米国ハーバード大学の Brown のグループは、1993年ウシ副甲状腺に発現する CaR をクローニングし(Nature 366, 575-580, 1993)、ツメガエル卵での機能発現すなわち細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度増加による  $\text{IP}_3$ - $\text{Ca}^{2+}$ カスケードの活性化を確認した。その後、腎臓尿細管、破骨細胞(Yoshida N, Sato T, Kobayashi K and Okada Y, Bone 22 (5), 495-501, 1998)および骨芽細胞などの  $\text{Ca}^{2+}$ 代謝に直接関与する細胞において CaR の存在が見出された。さらに  $\text{Ca}^{2+}$ 代謝に直接関与しないカエル味覚器も  $\text{Ca}^{2+}$ イオンや CaR のアゴニストに強く応答する(Okada Y et al., Cell Mol Neurobiol 27 (6), 771-781, 2007)。

現在、哺乳類の副甲状腺 CaR の細胞内情報伝達機序については以下のように提案されている。CaR は G タンパクの Gi と Gq/11 と

共役する。Gi 活性化に伴いアデニル酸シクラーゼ(AC)が抑制され、細胞内の cAMP 濃度が低下する。また Gq/11 を介してホスホリパーゼC(PLC)を活性化しイノシトール1,4,5-三リン酸( $\text{IP}_3$ )が増加し細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位から  $\text{Ca}^{2+}$ が放出され細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇する。一方、Gq/11-PLC カスケードにより  $\text{PIP}_2$ は  $\text{IP}_3$ とジアシルグリセロール(DAG)に解離する。DAG はプロテインキナーゼ C(PKC)を活性化する。同時に Gi を介してチロシンキナーゼ(TK)も活性化される。PKC と TK は mitogen-activated protein kinase (MAPK)カスケードを活性化し、その下流にあるホスホリパーゼ  $\text{A}_2$ (cPLA<sub>2</sub>)をリン酸化しアラキドン酸(AA)カスケードが亢進し、その代謝産物であるヒドロペルオキシ酸(HPETE)やヒドロキシ酸(HETE)を介して PTH 分泌を調節すると想定されている。

### 2. 研究の目的

一般的には細胞内においてアラキドン酸(AA)産生を促す酵素は細胞質型ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$ (cPLA<sub>2</sub>)と考えられている。cPLA<sub>2</sub>の活性には  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性があり、PKC(またはTK)-MAPK カスケードによりリン酸化を受

けて活性化されるとの報告がある。ところが、カエル副甲状腺細胞は PKC 活性化剤によって何の応答も誘発されず (Okada Y et al., J Exp Biol. 208, 4747-4756, 2005), PKC に依存しないリパーゼによって AA が産生されると考えられる。一方, AA は DAG リパーゼ - MAG リパーゼカスケードでも産生される。DAG リパーゼは最近クローニングされ (Bisogno T et al., J Cell Biol. 163, 463-468, 2003), DAG から内因性カンナビノイドの 1 つである 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) を産生する。次いで, MAG リパーゼは 2-AG から AA を産生する。本研究では, これらの酵素の特異的阻害剤の細胞外  $Ca^{2+}$  誘発電流応答に対する作用を解析し, 細胞外  $Ca^{2+}$  感知における関与を決定する。AA は不安定な物資であり, シクロオキシゲナーゼ (COX), リポキシゲナーゼ (LO) またはエポキシゲナーゼ (EPO) などの酸素添加酵素により中間代謝を受けて最終産物となる。ところで, AA 自体に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加作用があるのかその代謝産物にあるのかは不明である。COX 系の中間代謝産物にはプログタグランジン ( $PGE_2$ ) などがあり, 細胞外に分泌されてリガンドとなる。LO 系と EPO 系の中間代謝産物は, 細胞内情報伝達物質としてイオンチャネルを直接活性化したり逆に抑制したりすることが報告されている。そこで, LO 系と EPO 系の酵素阻害剤の細胞外  $Ca^{2+}$  誘発電流応答に対する作用も解析する。また, 2-AG などの中間代謝産物の可能性がある物質を電極内から細胞内に灌流し副甲状腺細胞が応答するかどうかを確認する。本研究では, パッチクランプ法を用いた電気生理学的により細胞膜または細胞内に存在する機能タンパク質の活性をリアルタイムで測定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞の単離

実験にはウシガエルを用いる。動物の脳と脊髄を破壊し, 頸動脈付近に存在する左右 2 個ずつの副甲状腺を摘出する。組織を  $Ca^{2+}$  欠如リンガー液中に 10 分間放置し, さらに 10 U/ml パパインを含む  $Ca^{2+}$  欠如リンガー液を 10-12 分間作用させる。細胞外液を正常リンガー液に置換して, 先端を滑らかにしたパストゥールパイペットを用いたパイペッティング処理により単離副甲状腺細胞を得る。単離細胞は  $4^{\circ}C$  で保持する。

#### (2) パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析

全細胞固定により単離細胞の電位固定を行う。パッチ電極は中芯入りのパイレックスガラスキャピラリーを 2 段引きのプーラー (現有) で引き伸ばして作製する。電極の先端はマイクロフォーシ (現有) を用いて滑らかにする。パッチ電極を電極内液で満たす。マイクロマニピュレータを操作しながら電極内圧を少し陰圧にして単離細胞を吸引し 5~20 G $\Omega$  のシール抵抗を達成する。電極の内側にさらに強い陰圧を加えて膜を破り容量性電流の急激な増大により通常的全細胞固定の状態になったことを確認する。または, 電極内液に amphotericin B (150  $\mu g/ml$ ) または gramicidin (100  $\mu g/ml$ ) を加え G $\Omega$  シールを達成する。するとしだいに容量性電流が増大し穿孔全細胞固定の状態になったことを確認する。単離細胞は, 倒立顕微鏡 (現有) のステージ上に固定したチャンバーの底に静置する。電流シグナルは, パッチクランプ用増幅器を用いて 5 kHz 以上の高周波成分を除去し, インターフェイスを介して 125 kHz でデジタル化し, ソフトウェアを用いて 0.25~5 kHz のサンプリング速度で取得する。このデジタルデータはパソコン内のハードディスクに保存する。pCLAMP は, 電位プロトコールを作成するデジタル-アナログコンバータを制御するためにも使用する。細胞外液と電極内液の間で発生する液間電位は全て補正する。

容量電流と直列抵抗も適切に補正する。

#### 4. 研究成果

##### (1) $\text{Ca}^{2+}$ 受容体アゴニストと細胞外高 $\text{Ca}^{2+}$ に対する細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化

NPS-R467 と細胞外 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ はカエル副甲状腺細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を大きく上昇させたが、NPS-S467 はほとんど効果がなかった。このようにカエル副甲状腺細胞も  $\text{Ca}^{2+}$ 受容体アゴニストの光学異性体を区別した(図 1)。

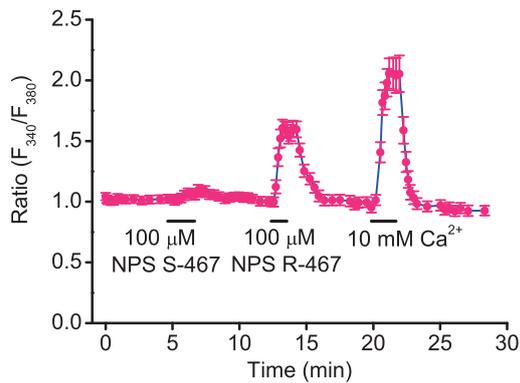


図 1

##### (2) 細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 誘発電流の特性

細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を静止時の 1.8 mM からそれ以上に増加させると、カエル副甲状腺細胞は  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存した外向き整流性の電流応答を示した。高  $\text{Ca}^{2+}$ で刺激中にステップパルスによって誘発した電流は時間に依存せず立ち上がりが遅い成分と立ち上がりが遅い成分から構成されており、再分極により大きなテール電流が見られた(図 2)。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 灌流も電流応答を誘発した。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 誘発電流及び細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 灌流誘発電流は共に niflumic acid で強く抑制され、 $\text{Cl}^-$ の平衡電位で逆転した。Gramicidin 穿孔全細胞記録法を用いて細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 誘発電流を記録すると、その逆転電位は最初の -25 mV から -58 mV にシフトした(図 3)。

##### (3) Phospholipase C 関連薬剤の細胞内灌流の効果

細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 緩衝剤を 1mM EGTA から 10

mM BAPTA に変えると細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 誘発電流は大きく減少した。細胞内 10  $\mu\text{M}$  U73122 (phospholipase C の阻害剤)も電流応答を対照値の 3 分の 1 に低下させた。細胞内に  $\text{IP}_3$  を灌流しても何の応答も誘発しなかったが、2-AG の細胞内灌流は時間経過の遅い電流応答を誘発した(図 4)。

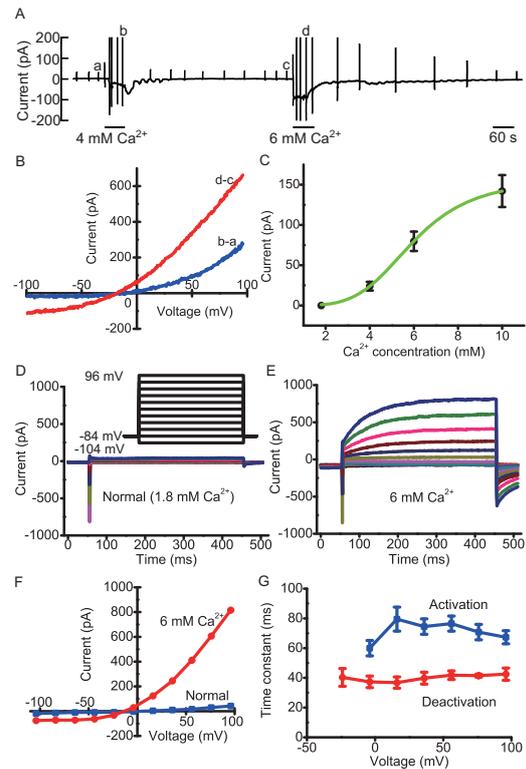


図 2

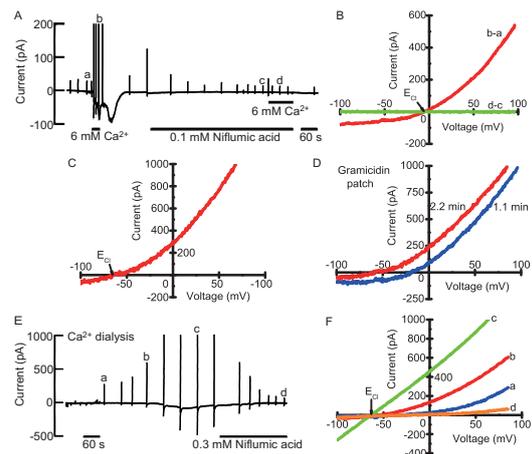


図 3

##### (4) 細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 誘発電流に対するアラキドン酸カスケード関連薬剤の効果

細胞外から U73122, tetrahydrolipstatin (DAG

lipase の阻害剤)及び MAFP (MAG lipase の阻害剤)を投与すると、これらの薬剤は全て細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  誘発電流を有意に抑制した(図 5)。ETYA または baicalein (共に lipoxygenase の阻害剤)の細胞外投与も  $\text{Ca}^{2+}$  誘発電流を抑制した(図 6)。

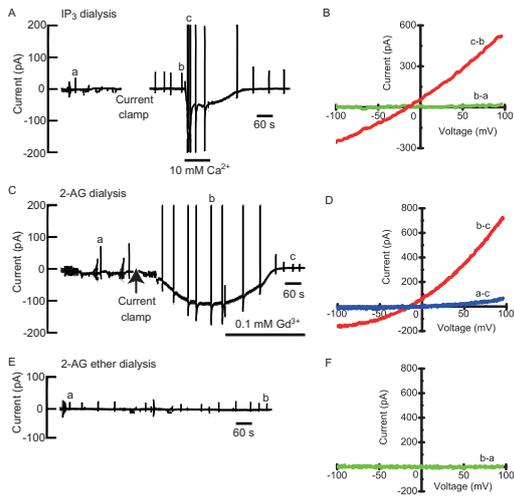


図 4

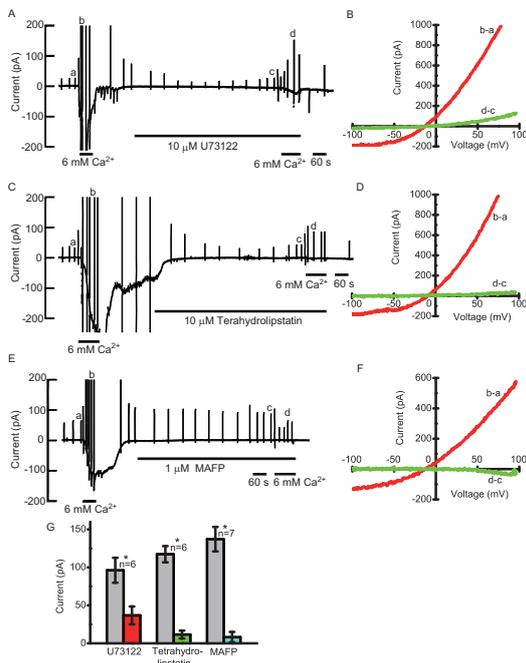


図 5

(5) アラキドン酸及び 12(S)-HPETE の細胞内灌流

電極内液にアラキドン酸や 12(S)-HPETE を加えて細胞内に灌流すると、副甲状腺細胞は細

胞外  $\text{Ca}^{2+}$  誘発電流とよく似た時間経過の遅い外向き整流性の電流応答を示した(図 7)。

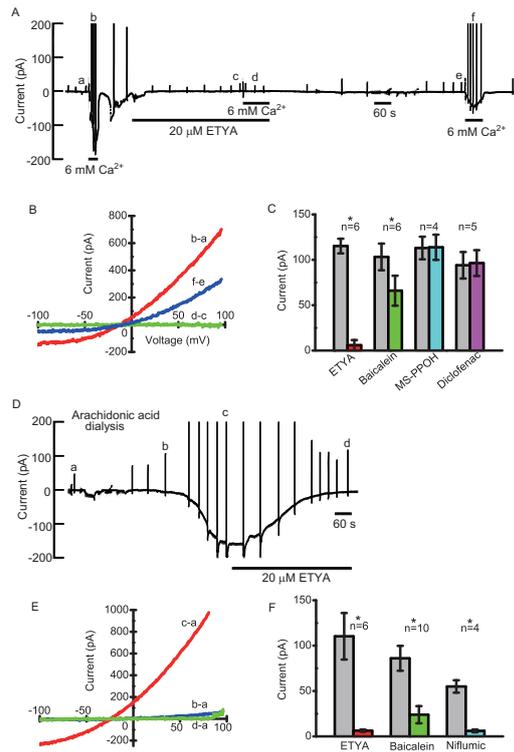


図 6

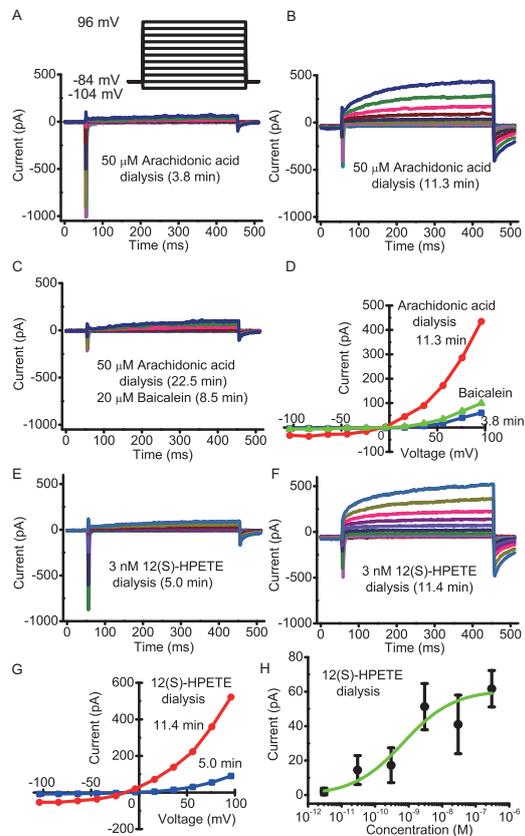


図 7

以上の結果より、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  は、phospholipase C から DAG lipase を介して lipoxygenase により 12(S)-HPETE を産生させて副甲状腺細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させ  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  電流を誘発すると結論される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K: Electrical properties and gustatory responses of various taste disk cells of frog fungiform papillae. *Chem Senses* 33 (4):371-378 (2008)
- 2) Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K: Interaction between gustatory depolarizing receptor potential and efferent-induced slow depolarizing synaptic potential in frog taste cell. *Cell Mol Neurobiol* 29 (2): 243-252 (2009)
- 3) Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K: Effect of gap junction blocker beta-glycyrrhetic acid on taste disk cells in frog. *Cell Mol Neurobiol* 29 (4): 503-512 (2009)
- 4) Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K: The receptor potential of frog taste cells in response to cold and water stimuli. *Chem Senses* 35 (6): 491-499 (2010)
- 5) Fujiyama R, Ishitobi S, Honda K, Okada Y, Oi K, Toda K: Ice cube stimulation helps to improve dysgusia. *Odontology* 98 (1): 82-84 (2010)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 岡田幸雄, 宮崎敏博, 佛坂斉社, 藤山理恵, ゼレド JL, 戸田一雄: カエル副甲状腺の細胞外 Ca 感知におけるアラキドン酸代謝産物の関与, 第 85 回日本生理学会大会, 東京, 3 月
- 2) 岡田幸雄, 宮崎敏博, 佛坂斉社, 藤山理恵, ゼレド JL, 戸田一雄: カエル副甲状腺の細胞外 Ca 感知におけるリポキシゲナーゼの関与, 第 79 回日本動物学会大会, 福岡, 9 月
- 3) 藤山理恵, 石飛進吾, 本多啓子, 前田香代子, 濱口盛子, 岡田幸雄, 大井久美子, 戸田一雄: 味覚障害におけるアイスキューブ刺激の効果, 第 14 回 日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会, 千葉, 9 月
- 4) Okada Y, Miyazaki T, Hotokezaka H, Fujiyama R, Toda K: Involvement of

PTK-MAPK cascade in extracellular calcium-sensing of frog parathyroid cells, 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, Japan, July 27-August 1, 2009

- 5) 藤山理恵, 岡田幸雄, 戸田一雄: 冷刺激による味覚感受性の修飾, 第 51 回 歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 9 月
- 6) 岡田幸雄, 宮崎敏博, 佛坂斉社, 藤山理恵, 戸田一雄: カエル副甲状腺のアラキドン酸誘発電流, 第 81 回日本動物学会大会, 東京, 9 月
- 7) 岡田幸雄, 宮崎敏博, 佛坂斉社, 藤山理恵, 戸田一雄: カエル味蕾ウイング型(Ib)細胞の不飽和脂肪酸誘発電流の特性, 第 61 回西日本生理学会, 長崎, 10 月
- 8) 藤山理恵, 岡田幸雄, 戸田一雄: 冷刺激による味覚感受性の修飾, 第 52 回 歯科基礎医学会学術大会, 東京, 9 月

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡田 幸雄 (OKADA YUKIO)

長崎大学・大学院医歯薬学研究科・准教授  
研究者番号: 60136687

##### (2) 研究分担者

藤山 理恵 (FUJIYAMA RIE)

長崎大学・大学院医歯薬学研究科・助教  
研究者番号: 10274664

佛坂 斉社 (HOTKEZAKA HITOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学研究科・講師  
研究者番号: 90199513