

氏名	Busik, Julia V.
学位（専攻分野）	博士（学術）
学位記番号	総研大甲第150号
学位授与の日付	平成7年3月23日
学位授与の要件	生命科学研究科 生理科学専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Relative contributions of extracellular Ca^{2+} entry and intracellular Ca^{2+} release to stimulus-secretion coupling in rat pancreatic acinar and rat adrenal chromaffin cells.
論文審査委員	主査教授 山岸俊一 教授 小幡邦彦 教授 岡田泰伸 教授 亘 弘 教授 菅野富夫（北海道大学）

論文内容の要旨

Ca^{2+} is well known to be an essential factor in signal transduction in various types of cells. In exocrine cells such as pancreatic acinar cells and endocrine cells such as adrenal chromaffin cells it is generally considered that secretory responses to physiological stimuli are exerted through an increase in the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), although the precise mechanism of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ elevation still remains to be elucidated. Four main sources of Ca^{2+} were shown to exist: two intracellular Ca^{2+} stores, namely IP_3 -sensitive store and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release store; and two Ca^{2+} entry pathways, namely voltage-dependent and receptor-mediated Ca^{2+} entry. One approach to understanding of the mechanism of Ca^{2+} signalling would be a definition of relative contributions of different Ca^{2+} sources to the final $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dynamics. Recently a new compound, SK&F 96365 has been found to selectively block receptor-mediated and voltage-dependent Ca^{2+} entry compared with intracellular Ca^{2+} release in various types of cells. In the present study we used SK&F 96365 and Ca^{2+} deprivation and Mn quenching techniques to define relative contributions of intracellular Ca^{2+} release and Ca^{2+} entry to the stimulus-secretion coupling in rat pancreatic acinar and rat adrenal chromaffin cells. $[\text{Ca}^{2+}]_c$ was measured using fluorescent Ca^{2+} indicator Fura-2. The results of the present study showed that:

1. SK&F 96365 inhibits some steps of signal trasduction process after G-protein activation rather than specific binding of secretagogues to receptors.
2. At concentrations lower than 100 μM SK&F 96365 selectively prevents receptor-mediated Ca^{2+} entry induced by 100 pM CCK-8 in pancreatic acinar cells and high K^+ or nicotine-induced Ca^{2+} entry in adrenal chromaffin cells, but cause little, if any, changes in intracellular Ca^{2+} release.
3. In rat pancreatic acinar cells:
 - i. In the pancreatic acinar cells CCK-8 at 5 pM induced oscillatory $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dynamics and sustained amylase release. SK&F 96365 at 30 μM reduced the frequency of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ oscillations; and SK&F 96365 at 100 μM transformed the oscillatory $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dynamics to a transient increase followed by a gradual decay and caused a significant inhibition of the sustained amylase release. These results indicate (1) that Ca^{2+} entry may be not only a simple sustaining factor but also an important regulatory factor for $[\text{Ca}^{2+}]_c$ oscillations induced by 5 pM CCK-8, and (2) that sustained secretory response to 5 pM CCK-8 is dependent on receptor-mediated Ca^{2+} entry.
 - ii. CCK-8 at 100 pM induced a two-phase $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dynamics: the initial transient followed by sustained plateau. The time course of the amylase release induced by 100 pM CCK-8 in pancreatic acinar cells was closely correlated with $[\text{Ca}^{2+}]_c$

dynamics. SK&F 96365 at 30 μM partly and at 100 μM completely inhibited the second sustained plateau phase of the amylase release induced by 100 pM CCK-8, while the drug caused little, if any, changes in the initial transient phase. These results are compatible with a view that the initial secretory response to 100 pM CCK-8 is due to an intracellular Ca^{2+} release, whereas the sustained secretion is due to receptor-mediated Ca^{2+} entry.

4. In adrenal chromaffin cell:

i. Two-phase $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dynamics, an initial transient followed by a sustained plateau, was observed in 200 μM methacholine-stimulated adrenal chromaffin cells. Delayed applications of methacholine after block of Ca^{2+} entry by 50 μM SK&F 96365 led to a progressive decline of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ response with substantial difference in the susceptibility to SK&F 96365 of the initial and the sustained phases. These results indicate that methacholine-induced $[\text{Ca}^{2+}]_c$ response may consist of two components: initial Ca^{2+} release from intracellular store followed by Ca^{2+} entry.

ii. Most rat adrenal chromaffin cells (74%) exhibited spontaneous Ca^{2+} oscillations in the absence of any stimuli. The spontaneous oscillations were completely abolished by 50 μM SK&F 96365. The spontaneous oscillations coincided with step-wise quenching of Fura-2 fluorescence excited at the isosbestic wavelength in the presence of 1 mM Mn^{2+} . The step-wise quenching was arrested by 50 μM SK&F 96365. These results indicate that Ca^{2+} entry is an important factor for the spontaneous Ca^{2+} oscillations, whereas the possibility that intracellular Ca^{2+} release could also be involved in the mechanism of the oscillations still remains.

審査結果の要旨

申請者、Busik Julia は、ラットの膵腺房細胞と副腎髄質細胞を研究対象にして、刺激-分泌関連における Ca^{2+} シグナルの役割を分析した。それぞれの分泌細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_c$) の変化をfura-2を用いた顕微画像解析法によって動的に測定し、細胞毎および同一細胞内の数点における $[Ca^{2+}]_c$ 変化と $[Ca^{2+}]_c$ 顕微画像とを示すと同時に、 $[Ca^{2+}]_c$ 顕微画像変化をビデオを用いて動的に示した。細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入を抑える薬物として新しく開発されたSK&F 96365、細胞外の Ca^{2+} 除去およびMn消光法を用いて分析した。この研究によって得られた主な結果は次の通りである。

1. SK&F 96365は、それぞれの分泌細胞にたいする分泌刺激とその受容体との特異的結合に作用するのではなくて、G蛋白活性化以後のシグナル伝達過程を抑制した。

2. 100 μ M以下のSK&F 96365は、膵腺房細胞では100 pMコレシストキン・オクタペプチド (cck-8) 刺激後の受容体介在性 Ca^{2+} 流入を抑制し、副腎髄質細胞では高濃度 K^+ やニコチンによって引き起こされた Ca^{2+} 流入を抑制したが、細胞内Ca貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離には影響しなかった。

3. 膵腺房細胞では、5pM CCK-8によって持続的に刺激すると $[Ca^{2+}]_c$ 振動と持続的なアミラーゼ分泌反応が記録された。30 μ M SK&F 96365はこの $[Ca^{2+}]_c$ 振動の頻度を低下させ、100 μ M SK&F 96365はこの $[Ca^{2+}]_c$ 振動を一過性 $[Ca^{2+}]_c$ 上昇に変え分泌反応を有為に抑制した。この結果は、受容体介在性 Ca^{2+} 流入が $[Ca^{2+}]_c$ 振動機構にも関与し、その持続的流入と共に持続的分泌反応を調節していることを示している。

100 μ M CCK-8によって持続的に刺激すると $[Ca^{2+}]_c$ 上昇と分泌反応共に、初期一過性上昇相とそれに続く持続的上昇相の2相性変動を示し、SK&F 96365を30 μ M投与すると両反応の持続的上昇相が部分的に、100 μ Mを投与すると完全に抑制されたが、初期相は、影響を受けなかった。この結果は、分泌反応が細胞内 Ca^{2+} 遊離に基づく初期分泌相と受容体介在性 Ca^{2+} 流入に基づく持続分泌相との2相から構成されているという考えに一致する。

副腎髄質細胞では、200 μ Mメサコリンで持続的に刺激すると $[Ca^{2+}]_c$ 上昇は初期一過性上昇相とそれに続く持続的上昇相の2相性変動を示し、SK&F 96365を50 μ M投与すると両反応の持続的上昇相が抑制されたが、初期相は影響を受けなかった。この結果は、メサコリンによって引き起こされる $[Ca^{2+}]_c$ 上昇は細胞内 Ca^{2+} 遊離に基づく初期一過性上昇相とそれに続く持続的 Ca^{2+} 流入相の2相性成分から構成されていることを示している。ラットの副腎髄質細胞の大部分は、自発性の $[Ca^{2+}]_c$ 振動を示し、この振動は50 μ M SK&F 96365によって完全に抑制された。Mn消光法を用いた実験結果も Ca^{2+} 流入が自発性の $[Ca^{2+}]_c$ 振動の発現機構の重要因子であることを示している。

この研究は、分泌細胞の $[Ca^{2+}]_c$ 顕微画像解析法による動的測定などの方法を駆使して、刺激-分泌関連における Ca^{2+} シグナルの役割を解析したものであり、分泌機構の解析に重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は Busik Julia 氏が博士 (学術) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。

また、審査委員会は Busik Julia 氏の提出論文の内容および医学生物学一般の知識について試問を行った。

発表内容は明快であり、かつ高い水準のものであった。質問に対しては的確な回答を行い、研究内容および研究技術などの関連事項についてもよく把握しており、理解力が優れていることを示した。

背景となる研究分野の質問に対しても満足な回答が得られ、十分学識も有すると判断された。

博士論文の英語も適正であり、またすでに3編の発表論文があり、語学力も充分と判断された。

以上により、審査委員会は Busik Julia 氏の論文内容、学識、語学力ともに博士（学術）を授与するに値すると判定した。