

ラット唾液腺膜リン脂質の構造と機能

亀 山 泰 永 八 代 耕 児 神 谷 真 子
藤 田 厚

Form and Function of Phospholipids in Rat Salivary Glands

KAMEYAMA YASUNAGA, YASHIRO KOJI, MIZUNO-KAMIYA MASAKO
and FUJITA ATSUSHI

生物の基本単位である細胞は、脂質二重層とタンパク質からなる形質膜によって外界との隔壁をつくっている。さらに真核細胞では、種々の細胞内小器官も同様に生体膜によって構築されている。唾液分泌に代表される開口分泌は、形質膜と小器官の1つである分泌顆粒の膜との融合によって顆粒内容物を細胞外へ放出する現象であり、近年、細胞間情報伝達の観点からも分泌の分子メカニズムの解明が注目されている。膜融合の進行には膜の物理化学的性質が重要な役割を果たしている。さらに、膜の主要構成成分であるリン脂質の組成と構造が膜物性に大きな影響を与えている。我々はラット唾液腺細胞をモデル細胞とし、唾液分泌の分子機構を解明する目的で一連の研究を行っているが、本稿では、これまでに解析してきた膜リン脂質の構造、物性、生合成、唾液分泌との機能相関について概説する。

キーワード：唾液腺、膜リン脂質、膜物性、生合成、膜融合

The plasma membranes, which consist of the membrane lipid bilayer and proteins, construct cells that are minimum functional and biological units. Furthermore, in eukaryotes, the biological membranes also form various organelles in the cell. Exocytosis is the phenomenon of membrane fusion between the plasma membranes and the secretory granular membranes, resulting in the components of granules being secreted. Recently, the molecular mechanisms of exocytosis have been studied to clarify the interactions and organizations of cells. The membrane physical properties, which are mainly affected by the membrane phospholipids, play a very important role in the process of membrane fusion. We researched the mechanisms of saliva secretion as a model cell for exocytosis. In this review, the structures of phospholipids and their physical properties, the biosynthesis processes, and the relationships between the forms and functions of phospholipids in saliva secretion in rat salivary glands are reported.

Key words: Salivary glands, Membrane phospholipids, Membrane physical property, Biosynthesis, Membrane fusion

1. はじめに

唾液腺は口腔粘膜をその起源とする独立した外分泌腺である。なかでも3大唾液腺の耳下腺、顎下腺、舌下腺は、唾液分泌刺激に呼応してそれぞれ特有の唾液を分泌する。唾液成分のなかでもタンパク質をはじめ

とする高分子有機化合物は、唾液腺細胞内の貯蔵器官である分泌顆粒中に存在する。唾液腺は分泌刺激を受け、分泌顆粒と形質膜とが融合し、唾液が細胞外へと開口分泌される。近年、分泌の分子制御機構の解明が注目され、膜融合をともなう開口分泌の惹起に特定の膜タンパク質の関与が指摘されている¹⁾。一方、膜融合は生体膜のダイナミックな状態変化であり、リン脂質を主要構成成分とする膜の物理化学的性質が融合の開始とその進行時に重要な役割を果たしている。

ところで、膜物性は構成リン脂質の組成と構造に大きく影響される。なかでも膜物性の一つの指標である

朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔生化学分野
501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

Department of Oral Biochemistry, Division of Oral Structure, Function and Development

Asahi University School of Dentistry

Hozumi 1851, Mizuho, Gifu, 501-0296, Japan

膜流動性は膜機能の発現と調節に密接に関係しており、リン脂質の両親媒性に基づく親水性(塩基性)部分の構造と、疎水性部分の長鎖炭化水素(アシル型, アルキル型, アルケニル型)の構造とで複雑に制御されている。また生体膜リン脂質は、エイコサノイドの前駆体であるアラキドン酸のプールであるとともに、微量リン脂質の一つであるイノシトールリン脂質の分解産物はそれ自体が細胞内セカンドメッセンジャーとして機能することが知られている。さらに、リン脂質組成は細胞内オルガネラ間にも特徴がある。最近、生体膜にはラフト、カベオラと言われる局所的に脂質組成が異なる機能ドメインが存在することも明らかになってきている。これらのことは、リン脂質の構造、物性、生合成および生理的機能を系統的に探索することが重要な課題であることを示している。

以上の観点から、本稿では、筆者らがラット唾液腺細胞をモデル細胞とし、その膜リン脂質の構造と機能に関して行ってきた一連の研究結果について紹介し、リン脂質と唾液分泌機能との相関について議論したい。

2. 膜リン脂質組成

3大唾液腺は、唾液分泌刺激に対する応答性、唾液の組成がそれぞれ異なっている。各唾液腺特有の脂質組成が存在するかどうかを知るために、唾液腺細胞の膜リン脂質組成、およびそれらに結合した脂肪酸に代表される長鎖炭化水素を比較検討した。

(1) リン脂質組成とその構成脂肪酸

a. リン脂質組成

i) 主要構成成分

唾液腺細胞のリン脂質組成は、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンを主要構成成分として全体の60~70%以上を占め、ついでスフィンゴミエリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸の順であった(Table 1)²⁾。高等動物の場合、各臓器、組織、さらに細胞内オルガ

ネラに特徴的なリン脂質組成が存在する。唾液腺細胞のリン脂質組成比は、肝臓の組成比と大きくは変わらず、さらに3大唾液腺間でもほとんど相違がなかった。この結果は、雌雄間でも同様であった^{3,4)}。唾液腺は、生後成熟とともに唾液分泌機能が完成してくることが知られている。幼弱(3週齢)と成熟(9週齢)のラット唾液腺のリン脂質組成を比較すると、成長に従ってホスファチジルコリンの増加が認められたが細胞あたりのリン脂質の量にはほとんど変化がなかった(Table 1)。

唾液を開口分泌させる時、分泌顆粒膜と形質膜との融合が起こる。また、ミトコンドリア、リソソーム、ペルオキシソームにはそれぞれのオルガネラに特徴的なリン脂質組成比が存在する。そこで、密度勾配遠心分離法を用いて耳下腺細胞から分泌顆粒を分画し、そのリン脂質組成を全細胞およびミクロソームのそれと比較してみた(Table 2)⁵⁾。分泌顆粒膜の特徴を決定付けるような大きな差は無いものの、ホスファチジルエタノールアミン量が僅かながら多いこととリゾリン脂質含量が多い傾向が観察された^{5,6)}。両者とも物理化学的性質として膜融合を亢進させる作用があり、分泌促進に影響していると考えられる。

ii) 微量構成成分

ホスファチジルイノシトールは生体膜の構成成分の一つとして膜構造の維持に作用している。このリン脂質はさらに段階的リン酸化を受けてホスファチジルイノシトール4-リン酸(PIP)、ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP₂)になる。なかでもPIP₂は機能リン脂質とも呼ばれ、膜受容体を介する細胞刺激の活性化にともない、Gタンパク質、ホスホリパーゼCを介してPIP₂の分解が亢進する。分解代謝産物の1,2-ジアシルグリセロール(1,2-DG)、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP₃)はそれぞれ細胞内セカンドメッセンジャーとして重要な生理機能を発揮する。これら一連の情報伝達機構は耳下腺の唾液分泌刺激時にも確認されている。Table 3に3大唾液腺のPIP₂組成を示す⁷⁾。各腺ともに総リン脂質の0.1%以下であった。このことは、極

Table 1 Phospholipid composition (%) in 3- and 9-week (W)-old rat salivary glands (means ± SE)

	Parotid gland		Submandibular gland		Sublingual gland	
	3W (3-9) ^a	9W (7)	3W (3-9)	9W (7)	3W (3-9)	9W (7)
Total phospholipids (μmol/g of wet tissue wt)	17.6 ± 3.8	17.0 ± 1.9	18.7 ± 1.4	20.2 ± 2.5	22.6 ± 1.4	22.1 ± 1.5
Each phospholipid (%)						
Phosphatidylcholine	39.0 ± 1.4	45.9 ± 4.0	37.9 ± 2.8	44.4 ± 1.3	35.3 ± 2.9	45.3 ± 1.2
Phosphatidylethanolamine	27.2 ± 2.4	27.3 ± 1.8	24.0 ± 1.2	25.9 ± 1.6	22.9 ± 0.8	24.7 ± 0.9
Sphingomyelin	8.2 ± 0.7	7.1 ± 1.4	7.6 ± 0.9	7.6 ± 0.7	7.3 ± 0.6	7.7 ± 1.6
Phosphatidylinositol	3.9 ± 1.0	3.4 ± 0.7	5.4 ± 0.8	3.4 ± 0.5	5.7 ± 0.4	4.9 ± 1.4
Phosphatidylserine	3.4 ± 0.7	3.6 ± 0.9	5.4 ± 1.1	3.9 ± 1.0	5.5 ± 0.8	4.5 ± 1.8
Phosphatidic acid	2.1 ± 0.7	1.7 ± 0.3	3.2 ± 0.7	2.2 ± 0.9	3.3 ± 0.7	2.0 ± 0.8
Others	16.2	11.0	16.5	12.6	20.0	10.9

^aValues in the parentheses show the number of experiments.

微量であるが細胞内で限局し、機能を発揮していることが推測できる。

b. リン脂質脂肪酸組成

膜リン脂質の疎水性部分には脂肪酸に代表される長鎖炭化水素が結合している。この長鎖炭化水素はリン脂質グリセロール骨格への結合様式によってアシル型(エステル結合)、アルキル型(エーテル結合)、アルケ

ニル型(ビニルエーテル結合)の3種類に分類されている。また長鎖炭化水素の構造の特徴が、直接、生体膜の物理化学的性質に反映してくる。

i) アシル型リン脂質の脂肪酸組成

3大唾液腺のホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールの脂肪酸組成をそれぞれ順にTables 4, 5, 6に示す²⁾。

Table 2 Lipid composition of subfraction from rat parotid gland

	Homogenate (3)	Microsomes (4)	Secretory granules (3)
Each phospholipid (%)			
Phosphatidylcholine (PC)	46.5±3.6	51.1±1.2	40.3±0.7**
Phosphatidylethanolamine (PE)	25.7±1.2	24.8±0.8	30.5±1.0*
Sphingomyelin	7.3±0.1	7.8±0.3	7.0±0.2*
Phosphatidylinositol	6.5±0.9	5.1±0.8	3.6±0.4
Phosphatidylserine	4.8±0.8	4.2±0.3	2.4±0.1**
Cardiolipin	1.9±0.4	0.3±0.1	3.9±0.2**
Phosphatidic acid	1.1±0.6	0.2±0.1	0.5±0.3
Lysophospholipids	3.1±0.6	3.1±0.5	8.3±0.8**
Others	3.1	3.4	3.5
PC/PE ratio	1.8±0.1	2.1±0.1	1.4±0.0

Values are means±S.E. of independent experiments shown in parentheses.

* p<0.05, ** p<0.01; Significance of difference between secretory granular fraction and microsomal fraction judged by Student's *t*-test.

Table 3 Phosphatidylinositol and polyphosphoinositides compositions in total phospholipids from rat salivary glands

Phospholipids(%)	Parotid	Submandibular	Sublingual
Phosphatidylinositol (PI)	6.7(100)	6.0(100)	3.6(100)
Phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP)	0.04(0.6)	0.05(0.8)	0.03(0.8)
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP ₂)	0.06(0.9)	0.04(0.6)	0.07(1.9)
Other phospholipids	93.2	93.9	96.3

Table 4 Fatty acid composition (%) of phosphatidylcholine from 3- and 9-week (W)-old rat salivary glands (means ± SE)

Fatty acid (%)	Parotid gland		Submandibular gland		Sublingual gland	
	3W (3) ^a	9W (3)	3W (3)	9W (3)	3W (3)	9W (3)
C14:0	0.9±0.1	1.0±0.3	0.9±0.2	0.8±0.1	0.8±0.2	1.2±0.1
C16:0 DMA ^b	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.6±0.2	0.2±0.1
C16:0	43.5±1.7	40.4±1.4	40.9±1.0	37.3±1.0	36.0±3.4	35.1±0.1
C16:1	1.6±0.1	1.3±0.2	1.6±0.2	1.2±0.3	1.5±0.2	1.6±0.1
C18:0	8.1±0.3	8.7±0.3	8.9±0.3	9.5±0.5	11.7±0.1	10.0±0.1
C18:1	13.3±0.6	10.8±0.7	11.8±0.2	8.7±0.5	15.6±0.7	11.4±0.1
C18:2	15.9±0.4	17.4±0.4	19.8±0.3	21.1±1.6	13.5±0.4	12.1±0.2
C20:3	1.9±0.3	1.6±0.2	2.9±0.1	3.0±0.2	2.1±0.1	3.2±0.1
C20:4	9.9±1.2	12.3±1.3	7.8±0.4	12.4±0.3	13.1±2.2	16.9±0.1
C20:5	0.2±0.1	0.8±0.1	0.3±0.1	0.5±0.3	0.1±0.1	0.7±0.2
C22:5	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1
C22:6	0.5±0.1	0.7±0.2	0.4±0.1	0.5±0.1	0.5±0.3	0.8±0.1
Others	3.6	4.5	4.2	4.5	4.3	6.5

^aValues in the parentheses show the number of experiments.

^bDimethylacetal derivatives.

ホスファチジルコリンの場合 (Table 4), 約40%がパルミチン酸で10~20%がリノール酸, オレイン酸, アラキドン酸である。

一方, ホスファチジルエタノールアミン (Table 5) では, アラキドン酸が20~30%存在し, 以下, オレイン酸, ステアリン酸となる。これらの結果は, 両主要リン脂質が生合成される時, 脂肪酸がそれぞれ選択的に導入されていることを示唆している。高等動物細胞のリン脂質は一般的にグリセロール骨格の *sn*-1 位に飽和脂肪酸, *sn*-2 位には不飽和脂肪酸がエステル結合している。リン脂質組成比, アラキドン酸含量の多さから, 唾液腺細胞のホスファチジルコリン, ホスファチジルエタノールアミンの *sn*-2 位は, エイコサノイド前駆体の重要な貯蔵部位になっていることが示唆される。

Table 6 に示すホスファチジルイノシトールの脂肪酸組成は, ホスファチジルコリン, ホスファチジルエタノールアミンとも異なり, *sn*-1 位にステアリン酸, パルミチン酸, *sn*-2 位にアラキドン酸, リノール酸,

エイコサペンタエン酸が局在していることを示唆している。さらに, 極めて微量であるもののホスファチジルイノシトールを前駆体として生合成される PIP, PIP₂ の脂肪酸組成は, ホスファチジルイノシトールの組成と比較して両者ともアラキドン酸, パルミチン酸の増加とステアリン酸の減少が特徴的である (Table 7)。後述するように PIP₂ の代謝回転は著しく速い。このことは脂肪酸鎖の変換も他のリン脂質より速く, イノシトール関連リン脂質間でもそれらの脂肪酸組成に相違が生ずると考えられる。なお, Tables 4, 5, 6 から, 3大唾液腺が生後成熟過程では, それぞれのリン脂質脂肪酸組成に変化がないことが分かる。

分泌顆粒膜由来のリン脂質: ホスファチジルコリン, ホスファチジルエタノールアミンの脂肪酸組成を Table 8 に示す⁵⁾。ホモジェネート, ミクロソーム由来の両リン脂質と比較してもほとんど差異が無かった。

ii) アルキル型, アルケニル型リン脂質

アルキル型, アルケニル型リン脂質は, アシル型に比べて分析が難しいことから, それらの構造と機能の

Table 5 Fatty acid composition (%) of phosphatidylethanolamine from 3- and 9-week (W)-old rat salivary glands (means ± SE)

Fatty acid (%)	Parotid gland		Submandibular gland		Sublingual gland	
	3W (3) ^a	9W (3)	3W (3)	9W (3)	3W (3)	9W (3)
C14:0	0.9 ± 0.7	2.6 ± 1.0	1.3 ± 0.5	3.0 ± 2.6	0.8 ± 0.5	4.8 ± 1.2
C16:0 DMA ^b	6.5 ± 1.4	5.9 ± 0.4	5.2 ± 0.7	3.4 ± 1.5	4.4 ± 0.4	4.6 ± 1.3
C16:0	8.4 ± 0.9	10.1 ± 0.1	8.1 ± 1.8	9.9 ± 1.8	10.0 ± 1.2	10.2 ± 1.0
C16:1	1.3 ± 0.3	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.7	1.8 ± 1.0	1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.5
C18:0	15.3 ± 1.4	14.4 ± 0.6	18.2 ± 0.7	16.8 ± 1.5	16.0 ± 1.5	14.3 ± 1.1
C18:1	18.2 ± 0.7	15.3 ± 0.1	16.1 ± 0.5	15.4 ± 0.1	15.7 ± 0.4	13.7 ± 0.7
C18:2	9.0 ± 0.4	9.5 ± 0.5	12.1 ± 0.5	12.1 ± 1.4	7.8 ± 1.8	5.8 ± 0.2
C20:3	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.2	3.7 ± 1.4	2.6 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.5 ± 0.1
C20:4	22.9 ± 2.5	23.7 ± 0.6	20.6 ± 1.1	22.5 ± 0.1	29.5 ± 5.0	27.3 ± 0.4
C20:5	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	1.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.1 ± 0.5
C22:5	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1
C22:6	5.3 ± 0.6	4.6 ± 0.1	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.3	4.0 ± 1.2	5.7 ± 0.4
Others	8.8	7.3	7.3	6.9	7.9	7.4

^aValues in the parentheses show the number of experiments.

^bDimethylacetal derivatives.

Table 6 Fatty acid composition (%) of phosphatidylinositol from 3- and 9-week (W)-old rat salivary glands (means ± SE)

Fatty acid (%)	Parotid gland		Submandibular gland		Sublingual gland	
	3W (3) ^a	9W (3)	3W (3)	9W (3)	3W (3)	9W (3)
C14:0	1.1 ± 0.7	1.7 ± 1.0	0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1
C16:0 DMA ^b	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1
C16:0	16.2 ± 1.6	15.6 ± 1.0	17.3 ± 1.1	16.5 ± 1.1	14.0 ± 2.1	13.1 ± 0.4
C16:1	1.9 ± 0.4	2.6 ± 1.3	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.7 ± 0.1	1.2 ± 0.3
C18:0	36.6 ± 1.2	29.5 ± 1.3	37.3 ± 2.5	33.8 ± 0.5	42.4 ± 2.1	34.3 ± 1.5
C18:1	11.7 ± 1.8	10.1 ± 0.6	10.6 ± 0.4	8.8 ± 0.8	7.1 ± 0.1	7.0 ± 0.1
C18:2	4.2 ± 0.1	4.0 ± 0.9	5.0 ± 0.2	5.8 ± 0.7	3.8 ± 0.1	3.5 ± 0.1
C20:3	1.8 ± 0.4	1.5 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.8	2.2 ± 0.2
C20:4	11.3 ± 1.4	11.8 ± 1.0	11.8 ± 0.6	14.5 ± 0.6	19.0 ± 0.2	21.2 ± 1.1
C20:5	1.9 ± 0.2	9.9 ± 0.8	2.1 ± 0.7	7.6 ± 2.1	1.2 ± 0.7	5.4 ± 0.8
C22:5	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
C22:6	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.5	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.1	1.0 ± 0.5	1.6 ± 0.3
Others	10.9	10.7	7.8	5.2	6.1	9.0

^aValues in the parentheses show the number of experiments.

^bDimethylacetal derivatives.

解析がアシル型に比べて遅れている。Table 8に示す耳下腺分泌顆粒膜のホスファチジルコリン、ホスファ

Table 7 Fatty acid compositions of phosphatidylinositol and polyphosphoinositides in rat parotid gland

Fatty acids(%)	PI*	PIP	PIP ₂
16:0	15.6	21.1	29.3
16:1	2.6	8.3	6.1
18:0	29.5	14.8	17.1
18:1	10.1	11.8	6.1
18:2	4.0	1.2	0.6
20:3	1.5	n.d.**	1.6
20:4	11.8	30.7	36.7
20:5	9.9	n.d.	2.5

*: PI; phosphatidylinositol

PIP; phosphatidylinositol 4-phosphate

PIP₂; phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

** : not detectable

Table 8 Side-chain compositions of major phospholipids in subfractions from rat parotid gland

Acyl and alkenyl groups (%)	Phosphatidylcholine			Phosphatidylethanolamine		
	Homogenate (3)	Microsomes (4)	Secretory granules (3)	Homogenate (3)	Microsomes (4)	Secretory granules (2)
C14:0	0.40±0.06	0.45±0.02	0.42±0.06	0.17±0.06	0.23±0.06	0.23±0.13
C16:0 alkenyl	0.84±0.22	0.71±0.12	0.80±0.15	9.62±0.48	10.87±0.89	7.01±1.16
C16:0	39.99±0.37	40.93±0.37	40.29±0.86	7.75±0.33	7.78±0.32	7.52±0.41
C16:1	0.89±0.36	1.19±0.19	0.88±0.35	0.95±0.14	1.01±0.10	1.06±0.32
C18:0 alkenyl	0.13±0.01	0.12±0.01	0.13±0.02	4.62±0.58	5.91±0.34	3.37±0.26**
C18:0	7.83±0.29	7.80±0.25	8.17±0.36	14.83±1.94	13.90±1.60	20.80±1.65*
C18:1	10.51±0.28	10.46±0.32	10.74±0.08	15.65±0.15	16.16±0.58	16.08±0.63
C18:2	18.47±1.01	18.36±0.74	18.44±0.66	8.19±0.58	7.53±0.49	9.12±0.73
C20:3	1.66±0.07	1.54±0.11	1.61±0.20	1.48±0.04	1.32±0.06	1.32±0.11
C20:4	14.55±0.42	14.27±0.37	13.87±0.85	26.20±1.52	25.12±2.09	23.73±1.19
C20:5	0.26±0.06	0.19±0.03	0.54±0.13	0.16±0.05	0.36±0.20	0.62±0.35
C22:5	0.20±0.04	0.20±0.02	0.11±0.06	0.92±0.04	1.02±0.12	0.67±0.02
C22:6	0.68±0.03	0.63±0.04	0.60±0.12	5.23±0.28	4.98±0.52	4.44±0.15
C24:0	0.84±0.08	0.84±0.06	0.80±0.10	1.30±0.16	1.23±0.13	1.16±0.11
Others	2.75	2.31	2.60	2.93	2.58	2.87

Values are means ± S.E. of independent experiments shown in parentheses.

The side-chain groups are designated by the number of carbon atoms and double bonds.

* p<0.05, ** p<0.01; Significance of difference between secretory granular fraction and microsomal fraction judged by Student's *t*-test.

Table 9 Composition of choline- and ethanolamine-containing glycerophospholipids in rat parotid gland

Type	Major glycerophospholipid	
	Choline-containing glycerophospholipids	Ethanolamine-containing glycerophospholipids
(mol %)		
1-Acyl-2-acyl	72.7	42.6
1-Alkyl-2-acyl	23.8	25.4
1-Alkenyl-2-acyl	3.5	32.0

チジルエタノールアミンの側鎖の分析から、後者にはアルケニル型が比較的多く存在することが分かる。さらに、分泌顆粒膜のアルケニル型ホスファチジルエタノールアミン組成はホモジェネート、ミクロソームのそれと比較すると有意に減少している。そこで、分析方法を変え、アシル型、アルキル型、アルケニル型の組成比について耳下腺のホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンで検討した。その結果をTable 9に示す⁸⁾。この分析では長鎖炭化水素の種類は分からないがそれぞれの結合様式による組成比が分かる。両リン脂質ともにアシル型が最も多く、次いでホスファチジルコリンの場合はアルキル型が、ホスファチジルエタノールアミンの場合はアルケニル型が多かった。

(2) リン脂質組成と生体膜流動性

生体膜はダイナミックな状態にあり、その物理化学

的性質は構成リン脂質の組成と構造に大きく影響される。その膜物性は、膜が機能を発揮するための大切な条件を規定し、維持することによって、膜タンパク質の機能発現に至適な場を提供している。

膜物性の指標として、スピンプローブを用いた電子スピン共鳴法による膜流動性と相転移現象を観察した。

3大唾液腺から総リン脂質を抽出し、2種類のスピンプローブを用いて膜流動性を観察した(Figs. 1, 2)^{9,10}。膜脂質二重層の浅部(親水性部に近い部分。5-SALスピンプローブを使用。)(Fig. 1)、深部(疎水性部の中心に近い部分。12-SALスピンプローブを使用。)(Fig. 2)共に、3大唾液腺間における膜流動性はほとんど同じであった。一方、動物細胞の生体膜脂質にはリン脂質の他にコレステロールがかなり存在し、オルガネラ間で組成が異なるとともにその濃度によって膜物性への影響に2相性を示すことが知られている。耳下腺、顎下腺、舌下腺には約300mmolコレステロール/総リン脂質molが存在している⁹。3大唾液腺の総リン脂質にそれぞれ300mmolコレステロール/総リン脂質molを添加し、調製したリポソームのオーダーパラメーターをFigs. 1, 2に示す。コレステロール添加によって総リン脂質のみの時よりオーダーパラメーターの

増加、すなわち流動性の低下がみられる。耳下腺の低下が顕著であり、膜脂質二重層の浅部および深部の両方共に同様の傾向を示した。このことは分子レベルでの相互作用までは分からないもののリン脂質-コレステロール間に特異的相互作用が存在することが示唆される。

耳下腺分泌顆粒膜のリン脂質組成(Table 2)、およびその主要構成成分のホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンのアルケニル型組成(Table 8)に僅かであるものも有意な特徴が存在していた。これらの特徴は、分泌顆粒膜由来の総リン脂質の流動性に特徴を及ぼし、ホモジェネート、ミクロソーム由来の両リン脂質リポソームよりオーダーパラメーターが低値、すなわち流動性が高いことが示された(Fig. 3)^{5,6}。この変化は、膜脂質二重層の浅部に著明である。このことは、分泌顆粒膜は他のオルガネラ膜

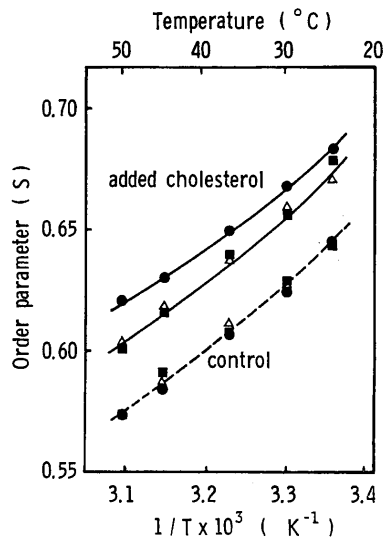


Fig. 1 The effect of cholesterol on the order parameter measured with 5-SAL spin probe in total phospholipid liposomes from rat salivary glands. The dotted line is control and the solid one is added cholesterol (300 mmol/mol of total phospholipids).

- ; parotid
- △ ; submandibular
- ; sublingual

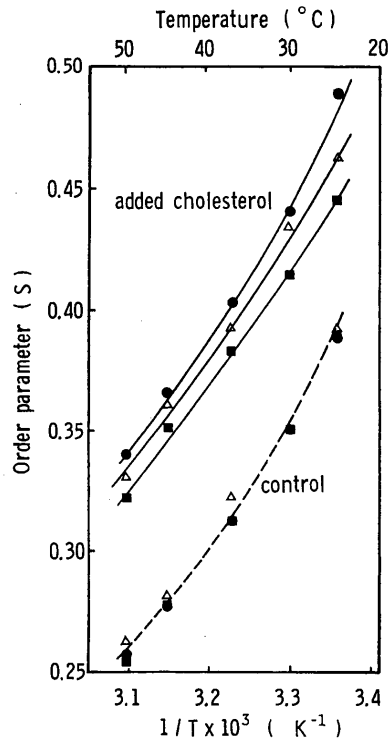


Fig. 2 The effect of cholesterol on the order parameter measured with 12-SAL spin probe in total phospholipid liposomes from rat salivary glands. The dotted line is control and the solid one is added cholesterol (300 mmol/mol of total phospholipids).

- ; parotid
- △ ; submandibular
- ; sublingual

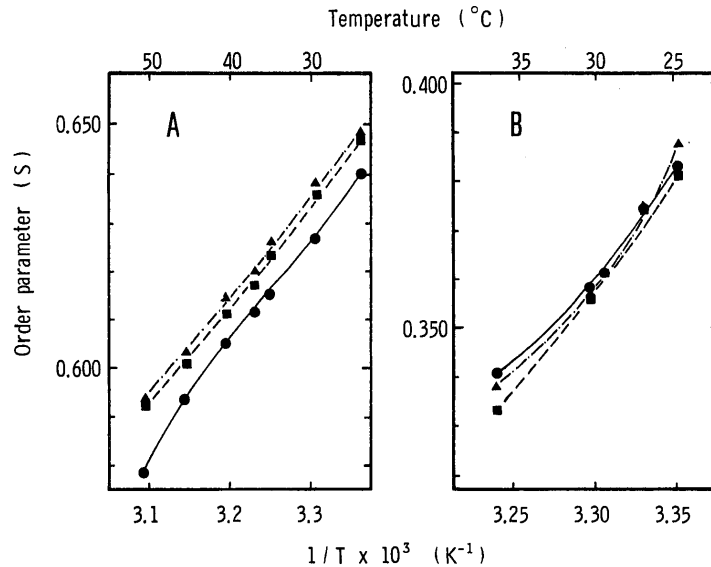


Fig. 3 Comparison of membrane fluidity of phospholipid liposomes from subcellular fractions of rat parotid gland.

Order parameter, S , was calculated from the ESR spectra of spin probes (A ; 5-SAL, B ; 12-SAL) in liposomes from secretory granular fraction, microsomal fraction and homogenates.

As the value of S becomes smaller, the membrane becomes more fluid.

- ; secretory granular fraction
- ▲ ; microsomal fraction
- ; homogenates

より流動性に富み、一度膜融合開始のスイッチがONになって融合が開始されると融合が加速される可能性を示唆している。

ところで、リン脂質の構造を一定にし、エステル型結合とアルキル型結合部分のみを変えて膜流動性、および相転移温度への影響を検討したところ、前者ではほとんど影響は無いが、後者では相転移がブロードになることが観察された⁸⁾。

(3) リン脂質代謝酵素活性

a. アシル基転移酵素活性

i) 1-アシル-GPアシルトランスフェラーゼ

膜リン脂質のなかで最も多量に存在するのはホスファチジルコリンである。そのアシル型脂肪酸の導入経路をFig. 4に示す。sn-1位への脂肪酸の導入にはグリセロール3-リン酸(GP)アシルトランスフェラーゼが行う。一方、sn-2位への導入には、まず最初に1-アシルグリセリン酸(1-アシル-GP)アシルトランスフェラーゼが導入し、生成したホスファチジン酸から1,2-DGを経てホスファチジルコリンが生合成される。完成したホスファチジルコリンは、一旦、ホスホリパーゼA₂の作用を受けて1-アシルグリセロホスホリ

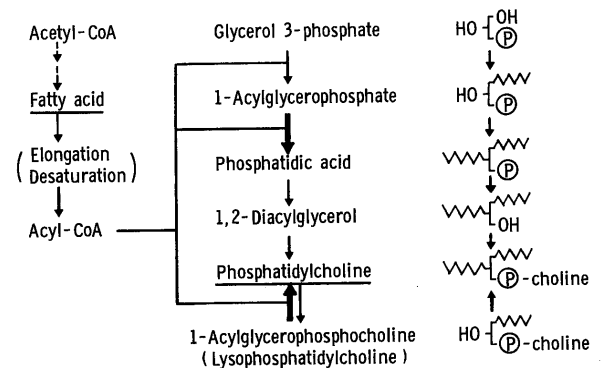


Fig. 4 Biosynthesis of phosphatidylcholine

ン(1-アシル-GPC)へ分解され、もう一度1-アシル-GPCアシルトランスフェラーゼで再アシル化されることによって *de novo* 生合成時の脂肪酸組成と異なったホスファチジルコリンとなる。

ところで、耳下腺ホスファチジルコリンのsn-2位には特徴的な高度不飽和脂肪酸(アラキドン酸(26%)、リノール酸(24%)、エイコサトリエン酸4.6%)がエステル結合している¹¹⁾。この傾向は舌下腺でも同様である¹²⁾。

Table 10 Acyl-CoA selectivity of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase in rat salivary gland and liver microsomes

	Parotid G.		Submandibular G.		Liver	
	activity*	ratio†	activity	ratio	activity	ratio
Palmitoyl-CoA	1.8	0.7	6.7	0.5	37.4	3.7
Stearoyl-CoA	1.7	0.9	2.9	0.4	7.4	2.9
Oleoyl-CoA	1.5	0.1	7.7	0.1	58.4	1.6
Linoleoyl-CoA	2.9	0.4	7.5	0.3	24.5	1.0
Arachidonoyl-CoA	2.5	0.4	4.5	0.2	16.4	0.8

*Each value is the average of 2-4 experiments and represented as nmol/min per mg of protein.

†1-acyl-GP acyltransferase activity/1-acyl-GPC acyltransferase activity.

Table 11 Acyl-CoA selectivity of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphorylcholine acyltransferase in rat salivary gland and liver microsomes

	Parotid G.		Submandibular G.		Sublingual G.		Liver	
	activity*	ratio†	activity	ratio	activity	ratio	activity	ratio
Palmitoyl-CoA	2.6	1.0	13.0	1.0	2.6	1.0	10.2	1.0
Stearoyl-CoA	1.9	0.7	8.4	0.6	1.7	0.7	2.6	0.3
Oleoyl-CoA	17.5	6.7	52.8	4.1	9.4	3.6	37.0	3.6
Linoleoyl-CoA	7.5	2.9	23.8	1.8	n.d.‡	—	25.0	2.5
Arachidonoyl-CoA	6.8	2.6	23.1	1.8	n.d.	—	20.2	2.0

*Each value is the average of 2-4 experiments and represented as nmol/min per mg of microsomal protein.

†Ratio of enzyme activity for each acyl-CoA to the activity for palmitoyl-CoA.

‡Not determined.

Table 10には3大唾液腺および肝ミクロソームの1-アシル-GPアシルトランスフェラーゼ活性の至適条件下での基質選択性を示す¹²⁾。耳下腺、顎下腺は肝より活性が1/5~1/10と低く、飽和アシル-CoAに対して活性が高いものの際だった基質選択性は示さなかった。この基質選択性は耳下腺、顎下腺ホスファチジルコリンの*sn*-2位脂肪酸組成の決定にあまり重要な役割を演じていないことを示唆している。

ii) 1-アシル-GPCアシルトランスフェラーゼホスファチジルコリンの*sn*-2位の脂肪酸組成の決定には、もう一つ重要な酵素が関与している。3大唾液腺および肝ミクロソームの1-アシル-GPCアシルトランスフェラーゼ活性について基質特異性をTable 11に示す¹²⁾。測定したすべての唾液腺で不飽和アシル-CoAに高い活性を示すことがわかる。さらに顎下腺ではオレイン酸、アラキドン酸、リノール酸に高い活性を示し、飽和脂肪酸に対しては低値を示した。この基質特異性は、肝と比較して活性の絶対値は低い耳下腺でも顕著であり、明らかに1-アシル-GPCアシルトランスフェラーゼがホスファチジルコリンの*sn*-2位脂肪酸組成の決定に重要な役割を演じていることが示唆される。

iii) 1-アシル-GPIアシルトランスフェラーゼホスファチジルイノシトールは、膜リン脂質組成としては微量ながら、生理活性脂質の1つであるPIP₂の前駆体である。さらに、顎下腺のこの脂質は*sn*-2位脂肪酸の約40%がアラキドン酸である¹⁴⁾。ホスファチジ

ルイノシトールの*sn*-2位への脂肪酸の導入には、グリセロリン脂質に共通である1-アシル-GPアシルトランスフェラーゼと再アシル化系の1-アシルグリセロホスホイノシトール(1-アシル-GPI)アシルトランスフェラーゼが関与する。Fig. 5に脂肪酸の鎖長と二重結合の数に着目した一連のアシル-CoAを基質とした時の顎下腺1-アシル-GPIアシルトランスフェラーゼ活性を示す¹⁴⁾。鎖長と二重結合の増加にしたがって活性が増加し、アラキドン酸に対する活性は、オレイン酸のそれと比較して7倍にも達した¹⁴⁾。これは唾液腺のホスファチジルイノシトール生合成時に、Fig. 5に示すように1-アシル-GPIアシルトランスフェラーゼが積極的にアラキドン酸を*sn*-2位に導入し、特徴的な機能脂質へと変化させていることがわかる。

iv) 1-アルケニル-GPCアシルトランスフェラーゼ一般に、アルキル型およびアルケニル型リン脂質の*sn*-2位脂肪酸には、アシル型に比較してアラキドン酸に代表される不飽和脂肪酸が多いことが知られている。耳下腺ホスファチジルコリンにはアルケニル型が量的には少ないが存在していることから⁸⁾、基質に1-アルケニル-GPCを用い、アシル-CoAの基質特異性を1-アシル-GPCアシルトランスフェラーゼのそれと比較検討した。Table 12に示すように、1-アルケニル-GPCアシルトランスフェラーゼは、飽和脂肪酸の導入活性が非常に低いのにに対して不飽和脂肪酸に対する活性は飽和脂肪酸より10倍以上高いことがわかる。この傾向は肝の1-アルケニル-GPCアシルトランスフェラ

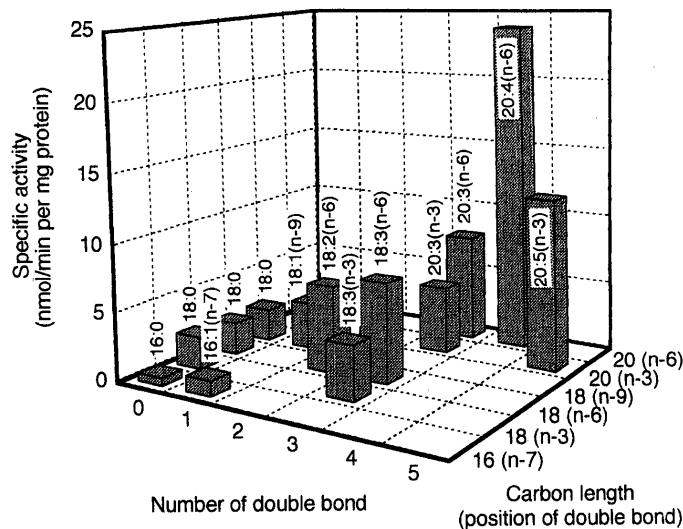


Fig. 5 Effects of the number and the position of the double bonds in acyl-CoA on the activity of microsomal 1-acyl-GPC acyltransferase in the rat sub-mandibular gland. Each bar is the average of a duplicate assay.

Table 12 Specificity for acyl-CoAs in 1-alkenyl-GPC acyltransferase from rat parotid gland microsomes

Acyl-CoA	1-Alkenyl-GPC acyltransferase		1-Acyl-GPC acyltransferase	
	Specific activity	Relative activity	Specific activity	Relative activity
	(nmol/min/mg of protein)		(nmol/min/mg of protein)	
Palmitoyl-CoA	1.8	7	5.5	15
Stearoyl-CoA	<1.0	<4	4.1	11
Oleoyl-CoA	27.5	100	36.9	100
Linoleoyl-CoA	18.2	66	15.9	43
Arachidonoyl-CoA	21.9	80	14.4	39

Each value represents the mean of two separate experiments. The relative activity is expressed as the percent of the specific activity to that for oleoyl-CoA.

GPC: glycerophosphorylcholine

一ゼの基質特異性より顕著である。耳下腺アルケニル型ホスファチジルコリンの特異的な脂肪酸構成はこの酵素が寄与していると考えられる。

v) 1,2-DGアシルトランスフェラーゼ

1,2-DGは、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンの生合成の中間体である (Fig. 4) と同時に、さらにアシル化されてトリアシルグリセロールにもなる。唾液腺細胞の1,2-DGの脂肪酸組成とその前駆体の1つであるホスファチジン酸のそれとの比較から、ホスファチジン酸が1,2-DGの直接の前駆体でないことが示唆される¹⁶⁾。一方、トリアシルグリセロールと1,2-DGの脂肪酸組成もそれぞれ異なっている¹⁶⁾。以上のことは、リン脂質の疎水性部分である脂肪酸の導入経路を議論する上で、ホスファチジン酸から1,2-DGを産生するホスファチジン酸ホスファターゼ、1,2-DGからトリアシルグリセロールを産生する1,2-DGアシルトランスフェラーゼ¹⁷⁾の諸性質をも検

討する必要がある。唾液腺細胞における後者の酵素活性は基質の存在状態に大きく影響される結果を得ている¹⁸⁾。

b. リン脂質N-メチル化酵素活性

膜リン脂質主要構成成分であるホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンの生合成経路を Fig. 7 に示す。両リン脂質ともに1,2-DGのsn-3位にそれぞれコリンまたはエタノールアミンを導入させて合成される。一方、動物細胞ではホスファチジルコリンの5%程度はホスファチジルエタノールアミンの段階的メチル化によって形成されると報告されている。顎下腺にも同様の酵素活性が確認されたが比活性は肝のそれの約1/20であった¹⁹⁾。ホスファチジルエタノールアミンN-メチル化反応の結果生成するホスファチジルコリンの脂肪酸組成は、ホスファチジルエタノールアミンのそれを反映する。しかしながら唾液腺では本酵素活性が低いことから、ホスファチジルコリンの

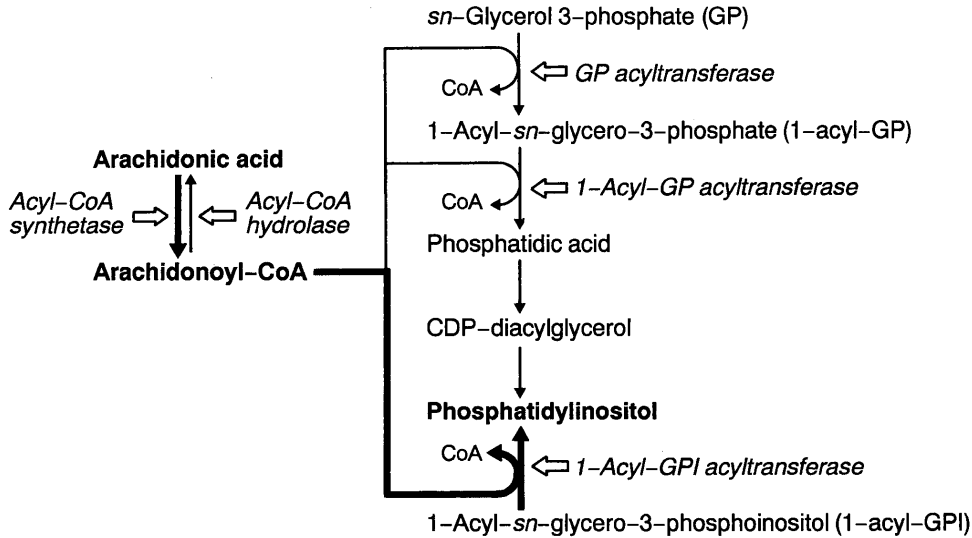


Fig. 6 Phosphatidylinositol biosynthesis in mammalian cells

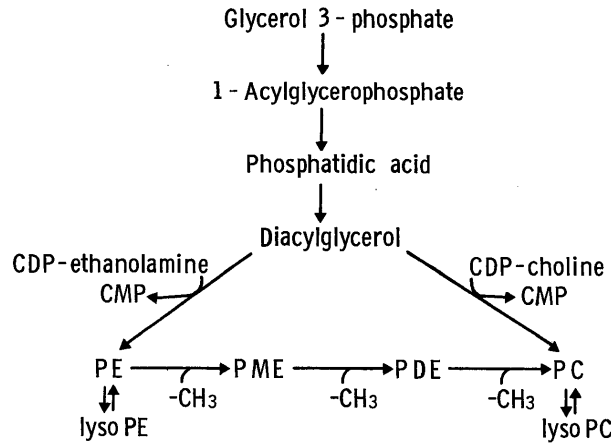


Fig. 7 Biosynthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine

脂肪酸組成の決定には1-アシル-GPCアシルトランスフェラーゼが重要な役割をしていると考えられる。

c. アシル-CoA合成酵素と加水分解酵素の活性

膜リン脂質の脂肪酸組成は各リン脂質に特徴的であり、その決定には脂肪酸を導入(アシル化)する各種アシル基転移酵素の基質特異性が重要な要素となっている。アシル基供与基質は、脂肪酸の活性型のアシル-CoAであり、アシル-CoA合成酵素で生成される。リン脂質への脂肪酸の導入にはアシルトランスフェラーゼの重要性とともに、アシル-CoA合成酵素の基質特異性にもよって生成するアシル-CoAの脂肪酸組成も重要である。

Table 13には、肝と比較した唾液腺細胞のアシル-CoA合成酵素の基質特異性を示す²⁰⁾。至適条件下で唾液腺細胞の酵素活性は肝のほぼ1/10で、ミリスチン酸を除いてはほぼ同程度の基質特異性を示した。これは、

アシル-CoA合成酵素の脂肪酸に対する基質特異性がアシル-CoAの脂肪酸組成を能動的に決定しているのでは無いことがわかる。

アシル-CoA合成酵素で生成されたアシル-CoAは、Fig. 8に示すような様々な代謝活性や生理作用を發揮する。そして必要で無くなればアシル-CoA加水分解酵素の作用によって分解される。肝と比較した顎下腺細胞のアシル-CoA加水分解酵素活性は、約1/5以下であり、基質特異性をほとんど示さなかった(Table 13)²¹⁾。アシル-CoAの合成と加水分解の両酵素の性質は、アシル-CoAの脂肪酸組成決定への寄与は非常に少ないと考えられる。

(4) リン脂質組成およびその脂肪酸のダイナミック変化

膜リン脂質の脂肪酸は、脱アシル化(phospholipase

Table 13 Fatty acid specificity of acyl-CoA synthetase in microsomes from rat salivary glands and liver

	Submandibular gland		Parotid gland		Liver	
	Specific activity ^a	Relative activity ^b	Specific activity	Relative activity	Specific activity	Relative activity
Myristic acid	6.0	0.10	37.5	0.75	226.2	0.42
Palmitic acid	63.1	1.0	50.0	1.0	535.0	1.0
Stearic acid	13.0	0.21	88.5	1.77	471.8	0.88
Oleic acid	55.0	0.87	44.7	0.89	445.1	0.83
Linoleic acid	77.0	1.22	41.3	0.83	397.9	0.74
Dihomo- γ -linolenic acid	27.5	0.44	40.0	0.80	397.9	0.74
Arachidonic acid	74.1	1.17	38.1	0.76	367.6	0.69
Eicosapentaenoic acid	31.0	0.49	— ^c	—	—	—
Docosahexaenoic acid	11.0	0.17	—	—	—	—

^a The specific activity is shown as nmol/h/mg of microsomal protein. Each value represents the mean of two separate experiments.

^b The relative activity is expressed as the ratio of the specific activity to that for palmitic acid.

^c Not determined.

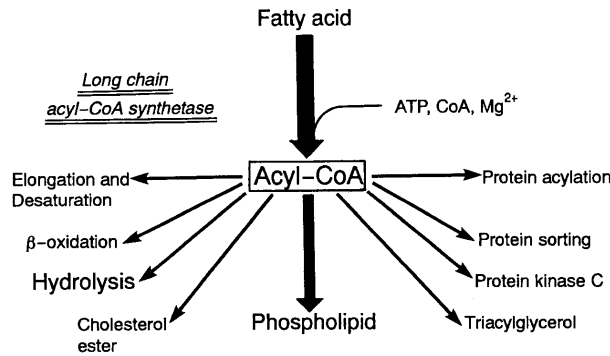


Fig. 8 Metabolic pathways relating to acyl-CoA

Table 14 Substrate specificity for various acyl-CoAs of acyl-CoA hydrolase in rat submandibular gland and liver microsomes

Acyl-CoA	Submandibular gland		Liver	
	Specific activity	Relative activity	Specific activity	Relative activity
Palmitoyl-CoA	5.59	1.00	40.70	1.00
Stearoyl-CoA	5.59	1.00	30.51	0.75
Oleoyl-CoA	2.67	0.48	17.21	0.43
Linoleoyl-CoA	4.87	0.87	18.51	0.45
Linolenoyl-CoA	5.33	0.95	20.05	0.49
Dihomo- γ -linolenoyl-CoA	3.47	0.62	18.51	0.45
Arachidonoyl-CoA	4.82	0.86	17.63	0.43
Eicosapentaenoyl-CoA	4.52	0.81	14.63	0.36
Docosahexaenoyl-CoA	4.87	0.87	27.79	0.68

The specific activity is shown as nmol/min/mg of microsomal protein. Each value represents the mean of two separate experiments. The relative activity is expressed as the ratio of the specific activity to that for palmitoyl-CoA.

A₂反応)と再アシル化(acyltransferase反応)によって活発な代謝回転を行っている。さらに、塩基部分も塩基交換反応やホスホリパーゼC、Dによる加水分解の作用も受ける。唾液腺細胞をリン脂質の脂肪酸の代謝マ

ーカーとして[³H]アラキドン酸、塩基部分のマーカとして[³²P]リン酸の二重パルス標識し、ラベルの取込速度からそれぞれの部位の代謝回転を検討した。その結果をTable 15に示す²²⁾。[³H]/[³²P]の値から、①ホス

ファチジルエタノールアミンはホスファチジルコリンよりアラキドン酸の導入速度が速いこと、②リン脂質合成中間体のホスファチジン酸にはアラキドン酸がほとんど導入されないこと、③ホスファチジリノシトールは量的には少ないが塩基部分の代謝回転が速いことがわかる。ホスファチジリノシトールには総リン脂質の0.1%以下⁷⁾ながら重要な生理機能を発揮するPIP₂を含有している。二重標識ホスファチジリノシトールを詳細に検討したところ、塩基部分の速い代謝回転はPIP₂に起因していた(Table 16)²³⁾。

一方、①、②は、活発な脱アシル化-再アシル化系の存在を示唆している。耳下腺細胞のマイクロソームには、基質の選択性が低い脱アシル化酵素のホスホリパーゼA₂が存在すること(Table 17)²²⁾を明らかにしており、再アシル化系のアシル基転移酵素と協調してそれぞれのリン脂質脂肪酸組成を決定していると考えられる。

ところで、耳下腺分泌顆粒膜にはマイクロソームの酵素とは性質が異なったホスホリパーゼA₂が存在する(Table 17)²²⁾。ホスファチジルコリン sn-2 位のアラキ

Table 15 Distribution of radioactivity in phospholipids by [³H]arachidonic acid (20:4) and [³²P]orthophosphate (Pi) double-labeling in rat salivary glands

Phospholipid (%)	Parotid gland				Submandibular gland			
	Content ^a	[³ H]20:4	[³² P]Pi	[³ H]/[³² P]	Content	[³ H]20:4	[³² P]Pi	[³ H]/[³² P]
Phosphatidylcholine	45.9	69.9	43.5	1.6	44.4	69.0	31.9	2.2
Phosphatidylethanolamine	27.3	14.3	3.9	3.7	25.9	17.4	5.7	3.1
Phosphatidylinositol	3.4	4.5	26.6	0.2	3.4	4.0	26.0	0.2
Phosphatidylserine	3.6	1.9	2.2	0.9	3.9	1.5	2.2	0.7
Phosphatidic acid	1.7	0.8	8.6	0.1	2.2	0.4	7.1	0.1
Others	18.1	8.6	15.2	0.6	20.2	7.7	27.1	0.3

Table 16 Distribution of radioactivity in phosphoinositides by [³H]arachidonic acid and [³²P]orthophosphate double-labeling in rat salivary glands

Phosphoinositides (%)	Parotid gland		Submandibular gland		Sublingual gland	
	[³ H]20:4 ^a	[³² P]Pi ^b	[³ H]20:4	[³² P]Pi	[³ H]20:4	[³² P]Pi
Phosphatidylinositol(PI)	65.8	39.0	84.2	45.3	81.9	59.3
Phosphatidylinositol 4-phosphate(PIP)	26.3	10.3	11.3	10.9	14.8	24.1
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP ₂)	7.9	50.7	4.5	43.8	3.3	16.6

a : arachidonic acid

b : orthophosphate

Table 17 Phosphatidylcholine selectivity of phospholipase A₂ in secretory granules and microsomes from rat parotid gland

Phosphatidylcholine	Secretory granules		Microsomes	
	Specific activity ^a	Relative activity ^b	Specific activity	Relative activity
1-16:0/2-16:0 ^c	59	1.0	1172	1.0
1-16:0/2-18:1	186	3.2	380	0.3
1-16:0/2-18:2	112	1.9	347	0.3
1-16:0/2-20:4	331	5.6	1593	1.4

^a: represented as pmol/h/mg of protein

^b: compared to the activity for 1-16:0/2-16:0 phosphatidylcholine

^c: represented the molecular species of phosphatidylcholine with fatty acid at sn-1 position/sn-2 position

ドン酸に選択性が高く (Table 17), ATPで活性化される²²⁾. さらに, 顆粒膜には21Kd Gタンパク質が存在することを明らかにしている²⁴⁾. ホスホリパーゼA₂をはじめとする一連のホスホリパーゼ系酵素が膜融合をとまなう唾液分泌へどのように寄与しているかについては前稿³⁰⁾に詳述されている.

3. 唾液腺のβ受容体連続刺激による腺の肥大とリン脂質組成およびその代謝酵素

β-adrenergic agonistのイソプロテレノールは唾液分泌を亢進させるとともに, 連続刺激によって3大唾液腺のうち, 耳下腺と顎下腺に特異な腺肥大とDNA, RNAの増加をとまなう細胞の増殖を引き起こす. 細胞増殖, あるいは細胞の成長に膜リン脂質の重要性が指摘されており, 膜の物理化学的性質の変化が膜結合酵素の活性や膜受容体の機能に深く関与している. そこで, イソプロテレノールによるβ-adrenergic受容体の連続刺激が惹起する唾液腺細胞の膜リン脂質組成への影響, リン脂質代謝酵素系への作用について検討した.

(1) リン脂質組成およびその脂肪酸組成の変化

イソプロテレノールがもたらす唾液腺膜リン脂質組成への影響をTable 18に示す^{24, 25)}. 1日1回, 10日間の刺激で, 耳下腺, 顎下腺の湿重量がそれぞれ約12倍, 2.5倍に増加した. それにとまない, ホスファチジルコリンの増加が著明である.

さらに, 腺細胞の増加は, リン脂質脂肪酸組成の変化をもたらし, 耳下腺, 顎下腺ホスファチジルコリン (Table 19)¹¹⁾の場合, sn-2位リノール酸の顕著な増加とsn-2位アラキドン酸, sn-1, 2位のパルミチン酸の相補的減少が認められた. これらの脂肪酸組成変化は, 耳下腺の分泌顆粒膜ホスファチジルコリンでも同様の変化が観察され²⁶⁾, 分泌顆粒膜は連続刺激前より流動性に富むようになった²⁶⁾.

(2) アシル基転移酵素活性の変化

耳下腺のβ-adrenergic受容体の連続刺激は, 1-アシル-GPアシルトランスフェラーゼの比活性を約8倍上昇させ, リノール酸, アラキドン酸への基質選択性を減少させた (Table 20)¹¹⁾. この比活性の増加は, 連続刺激の経時変化による腺重量の増加と正の比例関係を示した (Fig. 9)²⁸⁾. 一方, 連続刺激によって1-アシル-GPCアシルトランスフェラーゼの比活性は, ステアリン酸を除いて約2倍上昇したが, 導入脂肪酸の基質特異性にはほとんど変化が認められなかった¹¹⁾. ところで, β-adrenergic受容体の連続刺激で腺湿重量が耳下腺と同様に増加する顎下腺について, 耳下腺と同じように両アシルトランスフェラーゼの活性への影響を観察してみると, 耳下腺とは反対に腺重量の増加にとまなう両活性が大きく低下した²⁹⁾.

以上の結果は, β-adrenergic受容体の連続刺激による唾液腺細胞の増殖にアシルトランスフェラーゼが直接作用しているのでは無いと考えられる. しかし, 急

Table 18 Comparison of membrane phospholipid composition in rat salivary glands

Results are expressed as mean value ± S.D. with number of independent experiments given in parentheses. Significance of difference between paired data was judged by using Student's *t*-test; *P<0.05, **P<0.01.

	Parotid gland		Submandibular gland		Sublingual gland	
	Control (n=9)	IPR ^a (n=5)	Control (n=9)	IPR ^a (n=5)	Control (n=9)	IPR ^a (n=4)
Total phospholipids (μmol/g of wet tissue)	20.19±2.22	27.71±0.52**	24.47±2.90	24.71±2.75	26.11±2.06	23.78±3.10
Each phospholipid (%)						
Phosphatidylcholine	48.61±5.50	55.93±2.55**	46.56±2.97	54.49±1.67**	47.43±3.29	53.02±1.70**
Phosphatidylethanolamine	27.93±1.72	29.47±1.82	27.45±2.34	28.48±1.15	25.84±1.56	27.82±1.23*
Sphingomyelin	6.77±1.59	2.93±1.01**	7.21±1.56	4.45±0.54**	7.67±1.85	5.29±0.90**
Phosphatidylserine	3.65±1.11	2.43±0.66*	3.99±1.06	3.35±0.88	4.61±1.85	4.56±0.75
Phosphatidylinositol	3.56±0.86	5.99±0.91**	3.72±0.78	4.38±1.51	4.88±1.30	5.45±0.91
Cardiolipin	1.57±0.87	0.61±0.45*	2.66±0.71	0.85±0.56**	1.76±0.71	1.37±0.54
Phosphatidic acid	1.56±0.48	0.40±0.42*	1.95±1.11	0.32±0.22**	1.62±1.21	0.44±0.51*
Others	6.35	2.24	6.46	3.58	6.19	2.05

^a: Isoproterenol-treated rat

Table 19 Positional distribution of fatty acids in phosphatidylcholine from control and isoproterenol (IPR)-treated rat parotid gland

Fatty acid*	Fatty acid composition (weight % of total)			
	Control rat		IPR-treated rat	
	sn-1 position	sn-2 position	sn-1 position	sn-2 position
14:0	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1
16:0-aldehyde	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1
16:0	63.2 ± 0.5	16.5 ± 0.5	58.9 ± 2.7	14.8 ± 1.4
16:1	1.5 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1
18:0	16.7 ± 0.8	2.4 ± 0.4	14.3 ± 0.1	1.4 ± 0.4
18:1	10.2 ± 0.2	12.7 ± 0.3	10.7 ± 1.3	10.2 ± 0.5
18:2	2.2 ± 0.2	23.9 ± 1.3	5.5 ± 0.4†	37.1 ± 1.5†
20:3	0.1 ± 0.1	4.6 ± 0.5	0.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1
20:4	0.3 ± 0.1	25.5 ± 0.7	0.5 ± 0.1	20.0 ± 0.8†
20:5	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2
22:5	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1†	0.3 ± 0.1
22:6	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1
24:0	Trace	1.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	2.2 ± 0.2
Others	4.1	7.1	4.7	4.7

*Fatty acids are designated by the number of carbon atoms and double bonds. Values represent means ± SE of three separate experiments.

†Significantly different from control rat at $P < 0.01$ determined by Student's t -test.

Table 20 Specificities of microsomal 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase in control and isoproterenol(IPR)-treated rat parotid gland

Acyl-CoA	Control rat		IPR-treated rat		B/A
	Specific activity(A)* (nmol/min/mg of protein)	Specificity†	Specific activity(B)* (nmol/min/mg of protein)	Specificity†	
16:0-CoA	1.4 ± 0.8	1.0	10.3 ± 1.7	0.9	7.4
18:0-CoA	1.5 ± 0.2	1.1	7.0 ± 1.4	0.6	4.7
18:1-CoA	1.4 ± 0.2	1.0	11.8 ± 4.3	1.0	8.4
18:2-CoA	2.0 ± 0.9	1.4	8.2 ± 0.7	0.7	4.1
20:4-CoA	1.9 ± 0.7	1.4	5.5 ± 1.7	0.5	2.9

*The activities represent means ± SE of the values obtained from three separate experiments, each of which was determined in duplicate.

†The specificities are expressed as ratios of the specific activities to 18:1-CoA:1-acyl-GP acyltransferase activity in each series.

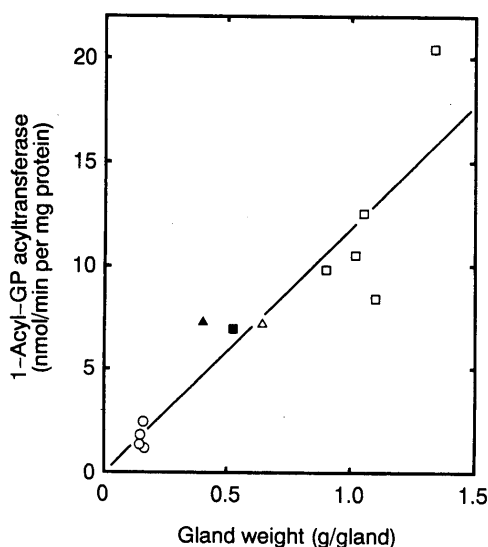


Fig. 9 Relationship between wet gland weight and microsomal 1-acyl-GP acyltransferase activity in the rat parotid gland. Activities are means of duplicate or triplicate determinations. Gland weight (g/gland) versus 1-acyl-GP acyltransferase activity (nmol/min per mg protein), $Y = 11.81X + 0.036$; $r = 0.9192$ ($n = 12$); $p < 0.01$.

- ; normal
- △; isoproterenol treatment (5 days)
- ▲; isoproterenol treatment (5 days) and withdrawal (5 days)
- ; isoproterenol treatment (10 days)
- ; isoproterenol treatment (10 days) and withdrawal (6 days).

激な腺細胞の増殖は、その膜リン脂質およびその脂肪酸組成を変化させるが、それには再アシル化系の本酵素活性、その基質の質と量を制御するアシル-CoA合成酵素および加水分解酵素の活性調節、さらには脱アシル化系のホスホリパーゼA₂の基質特異性、などが複合的に作用しているものと考えられる。

4. おわりに

以上、著者らの研究室で行ってきた研究の内、唾液腺をモデル細胞として開口分泌の分子機構を解明するための基礎的資料を収集することを目的として行ってきたものである。開口分泌の主役はやはり分泌顆粒膜と形質膜の融合であり、生体膜、なかでもリン脂質に焦点を絞り、その構造、物理化学的性質、生合成、唾液分泌との機能相関について明らかにしてきた内容を中心にまとめた。これらの知見のみならず、ホスファチジルエタノールアミンの融合部位形成の重要性、リゾリン脂質の膜物性への作用、遊離脂肪酸の膜融合促進、コレステロールによるラフトの形成、などが報告されている。これらはすべて膜脂質に由来し、開口分泌過程を調節している。本稿では、開口分泌にともなう膜融合時に、各膜リン脂質がどのように関与するのかという分子レベルの解析にまでは至っていない。これらの観察は今後の課題である。

一方、唾液分泌刺激に呼応して、膜融合の初発を制御しているのはどのようなメカニズムなのであろうか。特異な膜タンパク質が引き金になっているとの報告やカルシウムイオンの重要性、ホスホリパーゼ類の関与などが指摘されている。研究室では分泌顆粒および腺腔側形質膜に焦点を絞り、開口分泌に関連したそれぞれの特徴の解明、*in vitro* 開口分泌系モデルの開発なども行っている。この分野に関しては他稿³⁰⁾を参照して頂きたい。

なお、高等動物細胞のリン脂質およびその代謝^{31, 32)}、生体膜とその機能^{32, 33)}、膜融合^{34, 35)}、唾液分泌機構³⁶⁾などについてはそれぞれの専門著書に負うところが多い。

文 献

- 1) Jahn, R. and Sudhof, T. C. : Membrane Fusion and Exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, **68** : 863~911, 1999.
- 2) Kameyama, Y., Yashiro, K., Mizuno, M., Okada, A., Takahashi, K. and Yokota, Y. : Comparison of membrane phospholipid and its fatty acid compositions in developing rat salivary glands. *Comp. Biochem. Physiol.*, **87B** : 741~746, 1987.
- 3) Kameyama, Y., Yashiro, K., Ohno, M., Funabiki, R., Takenaka, T. and Yokota, Y. : Comparison of membrane phospholipid and its fatty acid compositions of the salivary glands from male and female rats. *Jpn. J. Oral Biol.*, **27** : 385~388, 1985.
- 4) Mori, A., Himejima, A., Yoshida, M., Takatsu, F., Shinkai, A., Kameyama, Y. and Yokota, Y. : Analysis of membrane phospholipid and its fatty acid compositions in salivary glands of young female rats. *Jpn. J. Oral Biol.*, **35** : 93~97, 1993.
- 5) Mizuno, M., Kameyama, Y., Yashiro, K. and Yokota, Y. : Characterization of secretory granular membranes from rat parotid gland: Analysis of membrane lipid composition and fluidity. *Jpn. J. Oral Biol.*, **32** : 563~573, 1990.
- 6) Mizuno, M., Kameyama, Y., Yashiro, K. and Yokota, Y. : Properties of membrane phospholipids and their fatty acyl compositions of secretory granules from rat parotid gland. *Cell Biol. Int. Rep.*, **11** : 629~636, 1987.
- 7) 亀山泰永, 岡田明彦, 八代耕児, 水野真子, 慎 順玉, 姫嶋淳克, 森 章, 吉田正道, 新開 明, 鷹津冬昭, 横田 豊 : ラット唾液腺の微量膜磷脂質 : ポリホスホイノシチドの性状. *岐歯学誌*, **19** : 147~154, 1992.
- 8) Shinkai, A., Kameyama, Y., Yashiro, K., Mizuno, K., Kamiya, M. and Fujita, A. : Analyses of membrane phospholipid compositions and their physical properties in rat parotid gland. *J. Gifu Dent. Soc.*, **25** : 247~253, 1998.
- 9) Kameyama, Y., Yashiro, K., Mizuno, M., Takahashi, K., Sakashita, Y., Takenaka, T. and Yokota, Y. : Physical properties of membrane lipids in rat salivary glands: Involvement of cholesterol. *Jpn. J. Oral Biol.*, **30** : 841~847, 1988.
- 10) Kameyama, Y., Okada, A., Yashiro, K., Mizuno, M., Hayashi, S., Mori, A. and Yokota, Y. : Comparison of physical properties of membrane phospholipid liposomes in rat salivary glands. *Jpn. J. Oral Biol.*, **28** : 766~769, 1986.
- 11) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno, M. and Yokota, Y. : Inducing effects of chronic administration of isoproterenol on 1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine acyltransferases in rat parotid salivary gland. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90C** : 397~402, 1988.
- 12) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno, M., Takenaka, T. and Yokota, Y. : Positional distribution of fatty acids in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from rat sublingual salivary gland. *Jpn. J. Oral Biol.*, **30** : 234~238, 1988.
- 13) Kameyama, Y., Yashiro, K., Mizuno, M., Okada, A., Takahashi, K., Hayashi, S. and Yokota, Y. : Comparison of phospholipid synthesis in rat salivary glands: Properties of 1-acylglycerophosphorylcholine and 1-acylglycerophosphate acyltransferase systems in microsomes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B** : 269~273,

- 1988.
- 14) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno-Kamiya, M., Shin, S.-O. and Fujita, A. : Substrate specificity of microsomal 1-acyl-*sn*-glycero-3-phosphoinositol acyltransferase in rat submandibular gland for polyunsaturated long-chain acyl-CoAs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1258** : 288~296, 1995.
 - 15) Kameyama, Y., and Shinkai, A. : Characterization of 1-alkenyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine acyltransferase activity in the microsomes from rat parotid gland. *Jpn. J. Oral Biol.*, **42** : 319~325, 2000.
 - 16) Yashiro, K., Shin, S.-O., Himejima, A., Mori, A., Yoshida, M., Takatsu, F., Shinkai, A., Saito, Y. and Yokota, Y. : Composition of fatty acid in 1,2-diacylglycerol, phosphatidic acid, triacylglycerol, and non-esterified fatty acid in rat submandibular and sublingual salivary glands. *Jpn. J. Oral Biol.*, **35** : 205~212, 1993.
 - 17) Kameyama, Y., Shin, S.-O., Himejima, A., Saito, Y., Söling, H.-D. and Yokota, Y. : Factors affecting the activity of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase in microsomes from bovine brain. *J. Gifu Dent. Soc.*, **19** : 430~439, 1992.
 - 18) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno-Kamiya, M., Shin, S.-O. and Fujita, A. : Microsomal diacylglycerol acyltransferase in rat parotid and submandibular glands: acylation of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol dispersed with phospholipids. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28** : 895~903, 1996.
 - 19) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno, M., Okada, A. and Yokota, Y. : Comparison of phospholipid *N*-methylation activity in rat submandibular salivary gland and liver. *Arch. Oral Biol.*, **34** : 203~208, 1989.
 - 20) Shin, S.-O., Kameyama, Y., Yashiro, K., Mizuno-Kamiya, M., Inokuchi, H. and Fujita, A. : Acyl-CoA synthetase activity in rat salivary gland microsomes. *Jpn. J. Oral Biol.*, **38** : 139~144, 1996.
 - 21) Shin, S.-O., Kameyama, Y., Yoshida, M., Takatsu, F., Shinkai, A., Inokuchi, H., Saito, Y. and Yokota, Y. : Characterization of microsomal long-chain acyl-CoA hydrolase activity in the rat submandibular gland. *Int. J. Biochem.*, **26** : 279~285, 1994.
 - 22) Yokota, Y., Kameyama, Y., Yashiro, K., Mizuno-Kamiya, M., and Shin, S.-O. : Regulation of phospholipid metabolism and its functional relations to secretory exocytosis in rat salivary glands. *Dentistry in Japan*, **30** : 56~62, 1993
 - 23) Kameyama, Y., Himejima, A., Mori, A., Yoshida, M., Shinkai, A., Takatsu, F. and Yokota, Y. : Lipid metabolism in rat salivary glands: Incorporation of labeled arachidonic acid and orthophosphate into phospholipids and neutral lipids. *J. Gifu Dent. Soc.*, **19** : 421~429, 1992.
 - 24) Kameyama, Y., Nagata, K., Mizuno-Kamiya, M., Yokota, Y., Fujita, A. and Nozawa, Y. : Localization of a low Mr GTP-binding protein, rap1 protein, in plasma membranes and secretory granule membranes of rat parotid gland. *Life Sciences*, **55** : 213~219, 1994.
 - 25) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno, M., Okada, A., Takahashi, K. and Yokota, Y. : Isoproterenol-induced changes of membrane phospholipids in rat salivary glands. *Jpn. J. Oral Biol.*, **27** : 996~1000, 1985.
 - 26) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno, M. and Yokota, Y. : Alteration of membrane phospholipids in hypertrophied rat salivary glands induced by chronic administration of isoproterenol. *Arch. Oral Biol.*, **32** : 799~805, 1987.
 - 27) Mizuno, M., Yashiro, K., Kameyama, Y., Hayashi, S., Sakashita, Y. and Yokota, Y. : Biochemical and physical analysis of subcellular membranes in rat parotid gland enlarged by chronic isoproterenol administration. *Comp. Biochem. Physiol.*, **96B** : 171~176, 1990.
 - 28) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno-Kamiya, M., Shin, S.-O., Inokuchi, H., Shinkai, A., Takatsu, F. and Yokota, Y. : Changes in microsomal lysophospholipid acyltransferase activity are correlated with rat parotid gland enlargement induced by chronic administration of isoproterenol. *J. Biochem.*, **115** : 1040~1046, 1994.
 - 29) Yashiro, K., Kameyama, Y., Mizuno, M., Hayashi, S., Sakashita, Y. and Yokota, Y. : Phospholipid metabolism in rat submandibular gland. Positional distribution of fatty acids in phosphatidylcholine and microsomal lysophospholipid acyltransferase systems concerning proliferation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1005** : 56~64, 1989.
 - 30) 藤田 厚, 神谷真子, 八代耕児, 亀山泰永 : 投稿準備中.
 - 31) Vance, D. E. ed. : Phosphatidylcholine Metabolism. CRC Press, (Boca Raton), 1989.
 - 32) Vance, D. E. and Vance, J. eds. : Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. (in New Comprehensive Biochemistry, Vol. 31, Bernardi, G. ed.) Elsevier (Amsterdam), 1996.
 - 33) Bornscheuer, U. T. ed. : Enzymes in Lipid Modification. WILEY-VCH Verlag GmbH (Weinheim), 2000.
 - 34) Hilderson, H. and Fuller, S. eds. : Fusion of Biological Membranes and Related Problems. (in Subcellular Biochemistry, Vol. 34, Harris, J.R. ed.) Kluwer Academic/Plenum Publishers (New York), 2000.
 - 35) Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M. : Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes. *Annu. Rev. Biochem.*, **72** : 175~207, 2003.

- 36) Garrett, J. R., Ekstrom, J. and Anderson, L. C. eds. : Frontiers of Oral Biology, Vol. 11, Linden, R.W.A. ed.) Karger (Basel), 1999.
-