

## 唾液腺における血小板活性化因子 (PAF) 生合成調節機構 及びその役割に関する研究

板 谷 和 徳

### Biosynthesis of platelet-activating factor and its role in salivary glands

Kazunori Itadani

(平成7年12月26日受付)

#### 緒 言

血小板活性化因子 (platelet-activating factor) は1972年 Benveniste ら<sup>1)</sup>により IgE 感作ウサギ好塩基球より抗原刺激により放出され、血小板を活性化する液性因子として発見された。その化学構造は 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine であることが決定された<sup>2)</sup>。その後、それまで腎髄質細胞または間質細胞に由来し、強い血圧降下作用を示す脂質が知られていたが、このものが PAF と同一物質であることが明らかとなった。炎症・免疫関連細胞は PAF 産生・遊離能が高く PAF の標的細胞ともされている。また PAF は極微量で強力な活性を有し、炎症・免疫反応の新しいリン脂質ケミカルメデエーターとして注目されてきた<sup>3)</sup>。しかし PAF はこれらの反応および血小板活性化作用の他に殆ど全ての組織で産生され、多彩な生理・病態生理にも関与し、生体の恒常性を維持する

オートコイド或るいは病原性因子としての役割が注目を集めている。この点に関して、PAF はアナフィラキシーショック、気管支喘息をはじめとする炎症・免疫反応の他に、心臓・血管系、妊娠・分娩、腎・肝及び消化器系において、多くの生理、病態生理に関与することが知られている<sup>4)</sup>。また口腔領域においては、PAF が菌周疾患に関与することが示唆されている<sup>5)</sup>。さらに、中枢神経系においても、その成長、増殖、神経伝達、あるいは神経障害になんらかの関わりがある可能性が示唆されている<sup>6)</sup>。

一般に、PAF は産生細胞から細胞外へ遊離され、細胞膜表面の受容体に結合して、その活性を発現するものと考えられている。受容体と連関する細胞内情報伝達系についてもいくつか明かにされている<sup>7)</sup>。一方、多くの細胞では産生された PAF は細胞外へ遊離されず、細胞内に貯留し何らかの役割を果たす可能性も新たに指摘されている。

唾液腺や腺臓等の外分泌腺もまた高い PAF 産生能を持つことが最近報告され<sup>8,9)</sup>、PAF は外分泌反応にも関与する可能性が示唆されている<sup>9,10)</sup>。しかし、その作用の詳細及び作用機序は明かでない。

唾液腺、特に顎下腺は自律神経刺激に应答して糖蛋白である高分子ムチンを分泌し、潤滑、緩衝、粘膜保護、微生物凝集作用等により非免疫的局所防衛に重要な役割を演じ<sup>11,12)</sup>、更に義歯装着者においては粘膜保護に加え義歯の維持による口腔機能回復にも寄与している<sup>12)</sup>。また、この分泌反応はいくつかの因子によっても調節されている<sup>13)</sup>。

本研究では PAF の唾液腺における生理的役割を明らかにする目的で、唾液腺における PAF 生合成調節機構および PAF の顎下腺ムチン分泌に関わる細胞内情報伝達機構について検索した。

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 赤川安正教授) 本論文の要旨は平成6年6月第85日本薬理学会近畿部会、平成6年10月第36回歯科基礎医学学会学術大会・総会、平成7年6月第28回広島大学歯学会総会、平成7年 Fifth International Congress on Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators (Berlin, Germany) において発表した。

主な略語: PAF, platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine); ACh, acetylcholine; NE, norepinephrine; 8-Br-cAMP, 8-bromo-adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate; PKC, protein kinase C; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trisphosphate; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, 細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度; PI, phosphatidylinositol; GPC, glycero-3-phosphocholine; AA, arachidonic acid; DTT, dithiothreitol

## 材料ならびに方法

### I. 実験動物

実験動物には雑種成犬(体重6~16 Kg)及び4週齢雄性モルモット(体重200~250 g)を用いた。

### II. 細胞調整

イヌおよびモルモットを pentobarbital (30 mg/Kg i.v. 又は 50 mg/Kg i.p.) による深麻酔下に放血致死後、唾液腺を摘出した。唾液腺細胞の単離は、McPherson らの方法<sup>14)</sup>に準拠し、一部改善して行った<sup>13)</sup>。すなわち、摘出顎下腺を McIlwain tissue chopper により細片とし、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>-free modified Hanks solution (NaCl 149 mM, KCl 5.4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM, glucose 5.5 mM, Hepes 5 mM, pH 7.4) で洗浄し、酵素液中で 37°C, 60~90分間、100% O<sub>2</sub> 通気下にて激しく振とう(振動数190回/分)した。酵素液は、collagenase (Worthington type 2, 100 U/ml), hyaluronidase (Sigma, 1000 U/ml), soybean trypsin inhibitor (S1, Worthington 0.01%) 及び deoxyribonuclease (DNase) (Boehringer, 20 U/ml) を含有した Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>-free modified Hanks solution とした。恒温振とう終了後、細胞は nylon mesh によりろ過し、遠心(20×g, 10分間)分離した。単離細胞は、100% O<sub>2</sub> で飽和した normal incubation medium (NaCl 136 mM, KCl 4.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, Hepes 10 mM, glucose 5.5 mM, MEM amino acid (Gibco) 2%, bovine serum albumin (BSA) 2%, soybean trypsin inhibitor 0.01%, pH 7.4) に懸濁し、遠心(20×g, 5分間)により3回洗浄し、実験に供した。Cell viability は Trypan Blue exclusion 及び lactate dehydrogenase の溶液中への遊出により確認した。

### III. PAF の抽出

唾液腺細胞をインキュベーション後、26 μm formic acid を含む chloroform/methanol (1/2, v/v) を加え、polytron homogenizer にてホモジェナイズした。chloroform 層は Bligh and Dyer 法<sup>15)</sup>にて分離し、N<sub>2</sub> 気流中で蒸発乾固した。抽出した脂質は、シリカゲルプレート (Silica Gel 60; Merk) 上、chloroform/methanol/water (65:35:6, by vol) 溶媒にて展開した。標準リピッド帯はプレートより切り離し、iodine vapor にて発色させ、PAF に相当するシリカゲルを掻き取り chloroform/methanol (1/2, v/v) にて抽出した。

### IV. PAF の測定

ウサギ動脈血を耳介中心動脈より採取し、60 mM EDTA を含む 0.5% NaCl 溶液、pH 7.4 と混和 (9:1, v/v) し、遠心 (200×g, 15分間) した上清を更に、遠心 (900×g, 10分間) して得た pellet を 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.6 mM dextrose, 3.8 mM Hepes, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25% ゼラチン, 1 mM EDTA, pH 7.4 に懸濁し、遠心した後、上記溶液から EDTA を除き、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub> を加えた溶液に懸濁したものを洗浄血小板として bioassay に供した。血小板凝集は血小板凝集メーター (Dual Aggregometer, Curono-Log 社製) にて測定した。

### V. Lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase 活性及び DTT-insensitive cholinephosphotransferase 活性の測定

インキュベーション終了後、10倍量 ice-cold sucrose medium (sucrose 0.25 M, DTT 1 mM, EDTA 2 mM, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4) を加え反応を停止し、直ちに遠心 (700×g, 50秒間) 分離し、上清を捨て、顎下腺細胞に 500 μl sucrose medium を加え液体窒素中に浸し、全インキュベーション終了まで保存した。顎下腺細胞は Potter-Elvehjem's teflon-glass ホモジェナイザーにてホモジェナイズし、遠心 (12000×g, 10分間) 後、上清を酵素標本とした。acetyltransferase 活性は、この酵素標本に 30 μM lyso-PAF, 200 μM [<sup>3</sup>H] acetyl-CoA (7.4 KBq, 92.5~122.1 GBq/mmol, New England Nuclear), 0.1 M Tris/HCl, pH 7.4, 200 μl を加え10分間インキュベーション後、chloroform/methanol (1:2, v/v) を加え thin-layer-chromatography にて生成した [<sup>3</sup>H] PAF を分離し、液体シンチレーションカウンターにて測定した。cholinephosphotransferase 活性は、酵素標本に 0.5 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 20 μM CDP-methyl [<sup>14</sup>C] choline (3.7 KBq, 1.7 GBq/mmol, Amersham), 5 μM 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol, 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, 100 μl を加え、以下は acetyltransferase 活性と同様に測定した。

### VI. ムチン分泌

単離細胞および唾液腺スライスは、D-[1-<sup>14</sup>C]-glucosamine (18.5 kBq/ml, 2.18 GBq/nmol, Amersham) 及び DNase (20 U/ml) を含む normal incubation medium 中で 37°C, 3時間, 100% O<sub>2</sub> 通気下にてインキュベーションした。normal incubation medium で3回洗浄した後、細胞浮遊液或いはスライス浮遊液とし、0.8 ml ずつプラスチックチューブに分注し、各

実験条件下でインキュベーションを行った。インキュベーション終了後、各標本を遠心 (950×g, 1分間, 4°C) し、上清を採取した。ムチン分泌量の測定は McPherson らの方法<sup>14)</sup> に従った。すなわち、採取した上清に trichloroacetic acid (最終濃度10%) 及び phosphotungstic acid (最終濃度0.5%) を加え、生じた沈澱中の放射活性をムチン分泌量とし、液体シンチレーションカウンターにより測定した。遠心分離しない標本の全放射活性についても同様に求め総ムチン量とし、ムチン分泌量は総ムチン量に対する割合で求めた<sup>13)</sup>。

## Ⅶ. PAF 受容体 mRNA の検索

イヌおよびモルモット耳下腺および顎下腺における PAF 受容体 mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検索した。イヌおよびモルモット耳下腺および顎下腺さらにモルモット肺より酸性グアニジン法によって全 RNA を抽出した。この全 RNA 10 μg に対して Oligo(dT)<sub>15</sub> をプライマーとして AMV 逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。プライマーの設計はモルモット肺 PAF 受容体 cDNA シークエンスを参考に行った。cDNA を鋳型としてイヌ及びモルモット顎下腺において 5' プライマー (5'-TTGCCCGCCTATACCCTTC-3'), 3' プライマー (3'-ACTACGTTGGTGGAGTCCA-5') の組合せ (primer set A) を用いて Tag polymerase を添加し、PCR を行った。さらに、イヌ及びモルモット耳下腺と顎下腺において 5' プライマー (5'-ACCTA [C/T] TGC [A/T] [G/C] TGT [G/C] GCCTTCC-3'), 3' プライマー (3'-CAGTGGGA [G/C] ACGGA [G/C] GA [A/C] TCGT-5') の組合せ (primer set B) を用いて PCR を行った。

## Ⅷ. 細胞内 Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 量の測定

顎下腺スライス浮遊液 0.8 ml に氷冷20%過塩素酸 0.16 ml を加え反応を停止し、氷上に20分間放置した。次に、遠心分離 (2000×g, 15分間, 4°C) した上清 0.4 ml を採取し 10 mM EDTA (pH 7.0) 0.1 ml を含むチューブに移した。各サンプルは、freon (1,1,2-trichlorotrifluoroethane) 及び tri-n-octylamine の 1:1 (v/v) 混合液 0.3 ml 添加後、攪拌により中和した。遠心 (400×g, 1分間) により三相に分離し、最上層を採取し試料とした。試料調整後、Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 測定用キット (Amersham) を用い、ラジオイムノアッセイにより測定した。

## Ⅸ. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の測定

BSA 0.5% 含有 normal incubation medium により単

離細胞を2回洗浄後、細胞浮遊液とした。細胞浮遊液は、1 μM fura 2/AM を、30°C, 30分間のインキュベーションにより負荷後、2倍量の normal incubation medium (BSA 0.5%) を加え、更に30分間インキュベーションを行った。次に、BSA 0.2% 含有 normal incubation medium により2回洗浄後、細胞浮遊液は 3~8×10<sup>6</sup> cells/ml に調整し、氷上に保存した。キュベット内に細胞浮遊液 0.5 ml と normal incubation medium 0.5 ml を加え、32°C, 5分間攪拌した後、蛍光分光光度計 (F-2000, 日立社製) により励起波長340 および 380 nm, 蛍光波長 510 nm における二波長の蛍光を測定し、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は以下の式により算出した。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \left[ \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \right] \cdot \left[ \frac{F_{\min}(\lambda 380)}{F_{\max}(\lambda 380)} \right]$$

$$R = \frac{F(\lambda 340) - Z(\lambda 380)}{F(\lambda 380) - Z(\lambda 380)}$$

R: 340 nm における蛍光 F(λ340) と 380 nm における蛍光 F(λ380) の比

K<sub>D</sub>: Ca<sup>2+</sup> と fura 2 の解離定数 (224 nM)

R<sub>max</sub>: digitonin 添加により fura 2 を Ca<sup>2+</sup> と十分結合させたときの R

R<sub>min</sub>: EGTA により Ca<sup>2+</sup> を完全にキレートした後の Ca<sup>2+</sup> 非結合時の R

Z: サンプルのみの自己蛍光

## X. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性の測定

イヌ顎下腺を 0.25 M sucrose でホモジェナイズ (1:9, w/v) し、遠心 (1,000×g, 15分間, 4°C) にて得た上清を更に遠心 (105,000×g, 30分間, 4°C) 分離し、沈査を粗ミクロゾーム画分として得た。この粗ミクロゾーム画分を更に SDS を用いて部分精製し、酵素標本とした。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性は total ATPase 活性から Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性を差し引くことにより求めた。Total ATPase 活性は 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を含む medium で 3°C, 10分間酵素標本と反応させ、遊離する無機リン量を求めた。Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性は、100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM ouabain, 5 mM ATP, 40 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 を含む medium で同様に反応させ求めた。遊離した無機リン量は反応液に2倍量の chloroform/methanol (2:1, v/v) を加え反応を停止し、除蛋白後、水槽中の無機リンを Fiske and Subbarow の方法<sup>16)</sup> により定量して求めた。

## XI. Digitonin 膜透過性細胞からの Ca<sup>2+</sup> 遊離

Normal incubation medium (BSA 0.5%) により単離細胞を2回洗浄後、37°C, 30分間インキュベーション

を行った。次に、2 mM EGTA 含有 intracellular buffer (KCl 110 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Hepes 20 mM, pH 7.2) により 2 回洗浄後、50 μM digitonin と共に 37°C、5 分間インキュベーションを行い、膜透過性処置を施した。膜透過性細胞は、intracellular buffer により 2 回洗浄後、ATP generation system (MgATP 2 mM, creatine phosphokinase 20 unit/ml, phosphocreatine 20 mM) 含有 intracellular buffer にて 3~8×10<sup>7</sup> cell/ml に調整し、水上保存した。測定は、キュベット内に細胞浮遊液 0.5 ml と ATP generation system 含有 intracellular buffer 0.5 ml を加え、32°C、5 分間攪拌後、蛍光分光光度計 (HITACHI 850, 日立社製) を用いて行った。Ca<sup>2+</sup>遊離は、励起波長 340 nm 及び蛍光波長 510 nm における吸光度の変化より求めた。

Ⅹ. 統計学的処理

有意差の検定は Student's t-test により行った。

ⅩⅢ.

そのほかの主な使用薬物は下記の通りである。

Acetylcholine chloride (第一製薬), L-noradrenarine (半井化学), isoproterenol, L-phenylephrine, ionomycin, 8-bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate sodium salt, 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-GPC (PAF), 1-O-hexadecyl-2-lyso-sn-GPC (lyso-PAF) (SIGMA Chemical Company), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), mezerein, staurosporine (フナコシ薬品), digitonin (和光純薬), fura-2, fura-2AM, inositol 1,4,5-trisphosphate (同仁化学研究所), heparin (片山化学), BN50739 (Institut Henri Beaufour, Reserch Laboratories から供与)。

結 果

Ⅰ. イヌ唾液腺細胞における PAF 産生

イヌ耳下腺、顎下腺、舌下腺において acetylcholine (ACh) は PAF 産生を著明に促進した (表 1)。また Ca<sup>2+</sup> イオノファーである ionomycin でも著明な PAF 産生が認められた。一方、非刺激細胞では PAF は検出されなかった。イヌ顎下腺において norepinephrine (NE) は濃度依存的に PAF 産生を促進し、phenylephrine でも PAF 産生が認められた (図 1A)。しかし isoproterenol では PAF 産生は認められなかった。NE による PAF 産生は phentolamine により拮抗されたが propranolol ではまったく阻害されなかった (図 1B)。

表 1 アセチルコリン及びイオノマイシンによるイヌ唾液腺における PAF 産生

	PAF production (pmol/mg of DNA)		
	None	アセチルコリン 30 μM	イオノマイシン 10 μM
耳下腺	N.D.	0.11±0.04	2.15±0.21
顎下腺	N.D.	0.41±0.03	2.62±0.14
舌下腺	N.D.	0.29±0.03	1.23±0.12

PAF 産生量はアセチルコリンあるいはイオノマイシン添加後10分間インキュベーションしたときの産生量を表した。各値は 6 例の平均値 ± S.E.M. を表す。

N.D.: Not detectable

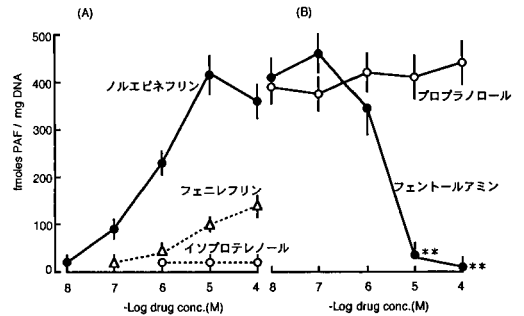


図 1 アドレナリン受容体作動薬によるイヌ顎下腺細胞における PAF 産生 (A) 及びアドレナリン受容体阻害薬の効果 (B)

PAF 産生量はノルエピネフリン 30 μM 添加後 10分間インキュベーションしたときの産生量を表した。プロプラノロール及びフェントールアミンはノルエピネフリン添加の5分前に添加した。各値は 5 例の ±S.E.M. を示す。

\*\*P<0.05

Ⅱ. PAF 産生およびアラキドン酸遊離に対するの細胞外 Ca<sup>2+</sup> の影響

細胞外 Ca<sup>2+</sup> の除去により ACh および NE による PAF 産生は消失したが (図 2), [<sup>14</sup>C]-arachidonic acid (AA) の増加は認められた。細胞外液 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加に伴って ACh および NE による PAF 産生量増加および [<sup>14</sup>C]AA の増加が認められた。

Ⅲ. Lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase および DTT-insensitive cholinephosphotransferase 活性の測定

イヌ顎下腺細胞において acetyltransferase 活性は ACh による刺激後 2分をピークとして活性が上昇した (図 3A)。細胞外液 Ca<sup>2+</sup> の除去および EGTA,

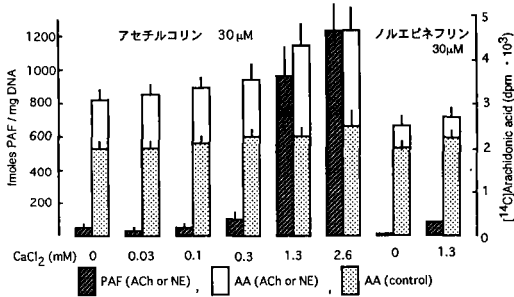


図2 アセチルコリン (ACh) 及びノルエピネフリン (NE) によるイヌ顎下腺細胞における PAF 産生及びアラキドン酸 (AA) 遊離に対する細胞外 Ca<sup>2+</sup> の影響

PAF 産生量はアセチルコリン及びノルエピネフリン 30 μM 添加後10分間インキュベーションしたときの PAF 産生量及びアラキドン酸遊離量を表した。各値は4例の ±S.E.M. を示す。

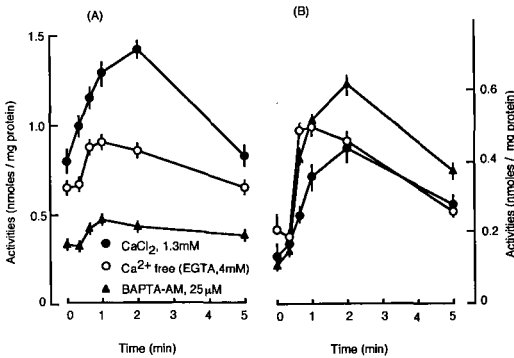


図3 ACh によるイヌ顎下腺細胞における PAF 合成酵素活性の経時的変動及び酵素活性に対する Ca<sup>2+</sup> 影響 (A): アセチルトランスフェラーゼ (B): コリンホスホトランスフェラーゼ 各値は5例の ±S.E.M. を示す。

BAPTA-AM により Ca<sup>2+</sup> をキレートすることにより ACh による acetyltransferase 活性上昇は減少した。cholinephosphotransferase 活性は ACh により上昇し、細胞外液 Ca<sup>2+</sup> の除去によりさらに上昇した (図 3B)。NE, isoproterenol, 8Br-cAMP は lyso-PAF acetyltransferase を上昇させた (図 4A)。この活性上昇は細胞外液 Ca<sup>2+</sup> の除去によりほとんど影響されなかった (図 4B)。NE, isoproterenol, 8Br-cAMP は cholinephosphotransferase 活性を上昇させ、この上昇は細胞外液 Ca<sup>2+</sup> の除去により更に上昇した (未発表)。

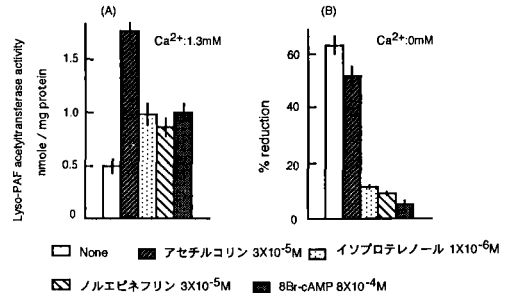


図4 アドレナリン受容体作動性薬によるイヌ顎下腺細胞におけるアセチルトランスフェラーゼの各種薬物による変動及び Ca<sup>2+</sup> の影響 各値は5例の ±S.E.M. を示す。

#### IV. PAF 産生への protein kinase C (PKC) の関与

PKC 活性化物質である 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), mezerein および PKC 活性化阻害薬 staurosporine のそれぞれ単独では PAF 産生を認めなかった (図 5)。また TPA, mezerein, staurosporine 前処置は ACh による PAF 産生量に影響を与えなかった。

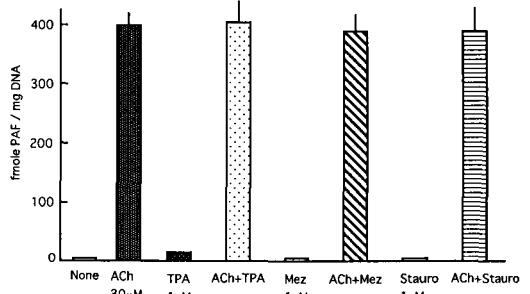


図5 TPA, mezerein (Mez) 及び staurosporine (Stauro) によるイヌ顎下腺細胞における PAF 産生及びアセチルコリンによる PAF 産生に対する影響 TPA, mezerein 及び staurosporine はアセチルコリン添加の10分間に処置した。各値は6例の ±S.E.M. を示す。

#### V. 細胞内外における PAF の分布

イヌ顎下腺細胞懸濁液を ACh とインキュベートした後、細胞画分と上清に分画したところ、PAF は細胞画分に高濃度検出されたが medium 中には認められなかった (図 6)。一方、モルモット顎下腺細胞においては、ACh により産生された PAF の約11%が medium 中へ遊離された。

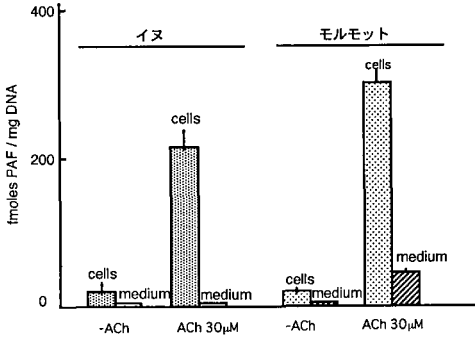


図6 アセチルコリンにより産生された PAF のイヌ及びモルモット顎下腺細胞内外における分布 PAF 産生量はアセチルコリン添加後10分間インキュベーションしたときの産生量を表した。各値は6例の平均値±S.E.M.を表す。

Ⅵ. モルモット顎下腺からの PAF によるムチン分泌

モルモット顎下腺においては PAF は  $10^{-10}$  M から  $10^{-9}$  M のオーダーにおいて用量依存的にムチン分泌を促進した (図7A)。このムチン分泌は細胞外液  $Ca^{2+}$  の除去により著明に減少した。PAF によるムチン分泌促進作用は特異的 PAF 受容体拮抗薬である BN50739 により著明に抑制された (図7B)。

Ⅶ. 唾液腺における PAF 受容体 mRNA 発現

モルモット肺同様、モルモット顎下腺において PAF 受容体に特異的と予測される約 360 b.p. のバンドが検出された (図8)。モルモット耳下腺においても顎下腺と同様に PAF 受容体に特異的なバンドが認められたが、イヌ耳下腺および顎下腺ではこのバンドが認められなかった (未発表)。

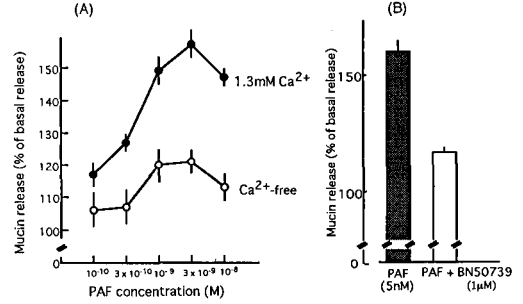


図7 PAF によるイヌ顎下腺細胞からのムチン分泌 (A) 及び PAF 受容体拮抗薬の効果 (B) ムチン分泌量は、PAF 添加後、30分間インキュベーションした時の分泌量で表した。BN50739 は、PAF 添加10分前に処置した。

Ⅷ. PAF によるモルモット顎下腺細胞内  $Ins-(1,4,5)P_3$  量の経時的变化

モルモット顎下腺スライスにおいて細胞内  $Ins-(1,4,5)P_3$  量は PAF 添加5秒後から増加が認められた (図9)。

Ⅸ. PAF によるモルモット顎下腺細胞内  $[Ca^{2+}]_i$  濃度

モルモット顎下腺細胞において PAF により軽度ではあるが持続性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が認められた (図10)。

X. PAF の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 活性に対する作用

PAF は濃度依存的にイヌ顎下腺細胞膜  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 活性を阻害した (図11A)。PAF の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 活性阻害作用は酵素標本の蛋白質濃度が低いほど強く、蛋白質濃度の増加に伴って、減弱した。lyso-PAF においても同様な阻害が認められた。

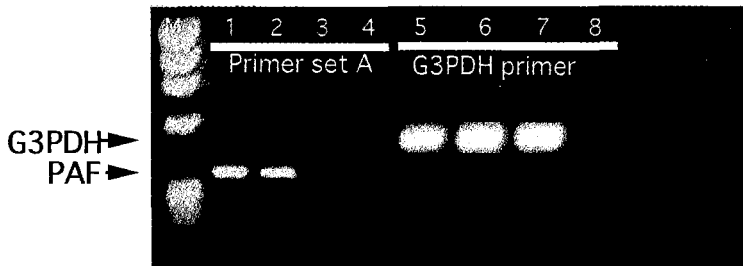


図8 RT-PCR 法による唾液腺における PAF 受容体遺伝子発現 モルモット肺 (1, 5), モルモット顎下腺 (2, 6), イヌ顎下腺 (3, 7), PCR negative control (4, 8) M :  $\phi \times 174$  DNA III marker

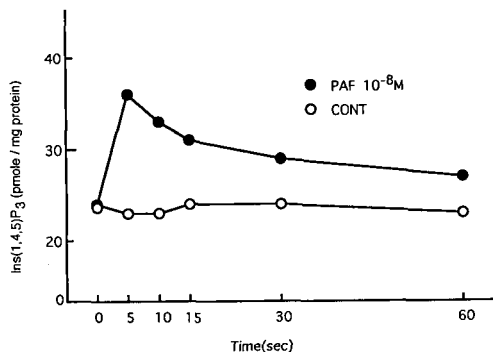


図9 PAFによるモルモット顎下腺細胞内 Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 量の経時的变化  
PAF (10<sup>-8</sup>M) 添加後の各時間における細胞内 Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 蓄積量を pmole/mg protein で表した。

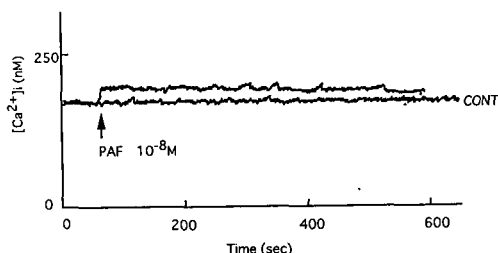


図10 モルモット顎下腺細胞における PAF による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇作用  
PAF 添加後の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の経時的变化を絶対濃度で表した。

PAFによるNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性阻害は PAF 受容体拮抗薬 BN50739 により拮抗されなかった (図11B)。

#### XI. PAF の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性阻害様式

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性阻害様式を Lineweaver-Burk plots 及び Hill plots により解析した。PAF による阻害は ouabain において認められる Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の K<sup>+</sup> 結合部位での競合拮抗とは異なり, より複雑な阻害様式が認められた (図12)。

#### XII. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性阻害によるムチン分泌

イヌ顎下腺細胞において ouabain は濃度依存的にムチン分泌を促進した (図13)。

#### XIII. Digitonin 膜透過性細胞からの Ca<sup>2+</sup> 遊離

Digitonin 50 μM 処置膜透過性としたイヌ顎下腺細

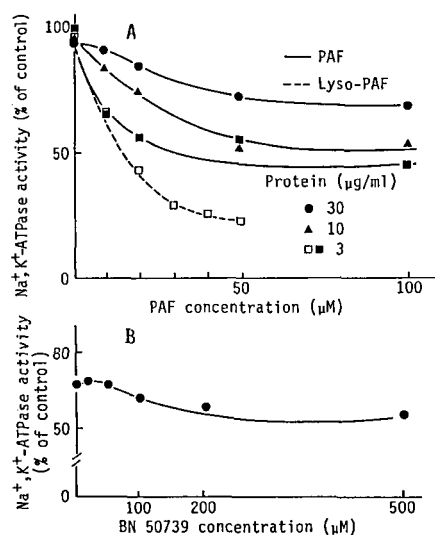


図11 PAFによるイヌ顎下腺細胞膜 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性阻害効果 (A) 及び阻害効果に対する PAF 受容体拮抗薬の影響 (B)

胞において, PAF は 1 μM から濃度依存的に一過性の Ca<sup>2+</sup> 遊離をひき起こした (図14)。Ca<sup>2+</sup> 濃度が静止レベルにもどった後, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> を作用させると再び Ca<sup>2+</sup> 遊離が認められた。Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬 heparin 前処置により Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> による Ca<sup>2+</sup> 遊離をほぼ完全に抑制した条件下でも PAF により Ca<sup>2+</sup> 遊離が認められた。

## 考 察

PAF は極微量で強力な活性を有するリン脂質ケミカルメディエーターとして様々な炎症・免疫反応の病態に関与していることが知られ, 注目されている。炎症・免疫関連細胞は PAF 産生, 遊離能が高く, また PAF の標的細胞ともされている。しかし近年 PAF は殆ど全ての組織において remodelling pathway 或るいは de novo pathway によって産生され, 様々な生理, 病態生理にも関与し, 生体の恒常性を維持するオートコイドとしての作用が注目を集めている。

モルモット耳下腺細胞およびイヌ顎下腺細胞ではムスカリン受容体刺激により PAF が産生されることが報告されている<sup>8,9)</sup>。

本研究において, イヌ顎下腺細胞に加え耳下腺細胞および舌下腺細胞においてもムスカリン受容体刺激により PAF が産生されることが示された。また, イヌ顎下腺細胞において NE および α アドレナリン受容体作動性薬 phenylephrine は PAF 産生を促進した。NE による PAF 産生は α アドレナリン受容体遮断薬

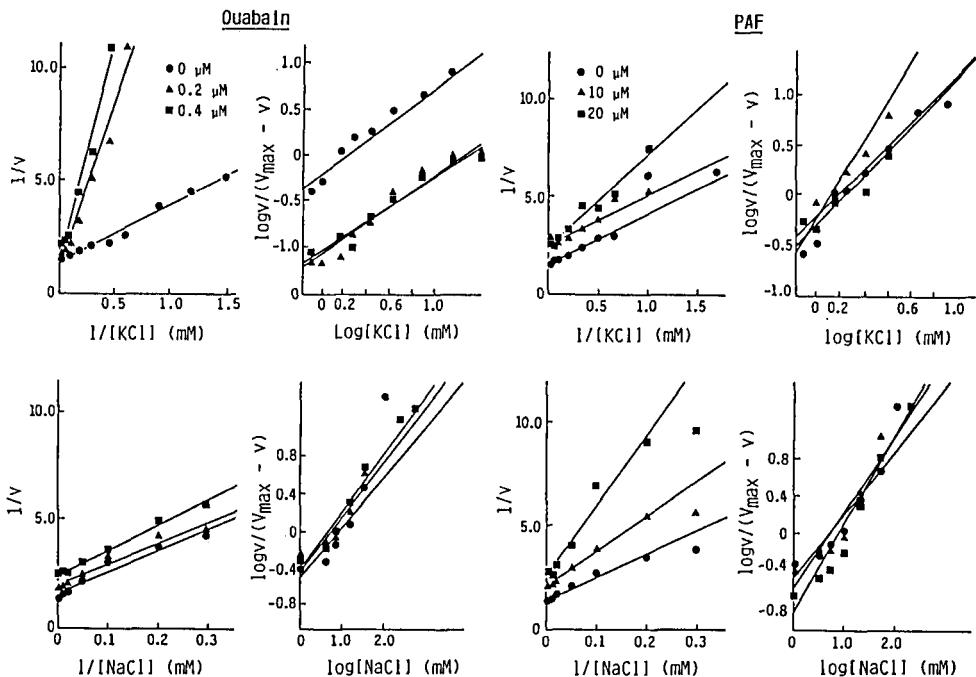


図12 PAFによるイヌ顎下腺細胞膜 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性阻害様式

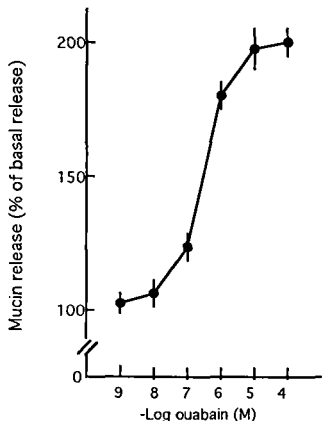


図13 ouabain によるイヌ顎下腺細胞からのムチン分泌

ムチン分泌量は、ouabain 添加後、30分間インキュベーションした時の分泌量で表した。

phentolamine により抑制されたが、βアドレナリン受容体遮断薬 propranolol では全く抑制されなかった。また、βアドレナリン受容体作動薬 isoproterenol では PAF 産生は全く認められなかった。従って、NE による PAF 産生は αアドレナリン受容体を介する作用と考えられる。

ムスカリン受容体および αアドレナリン受容体は、

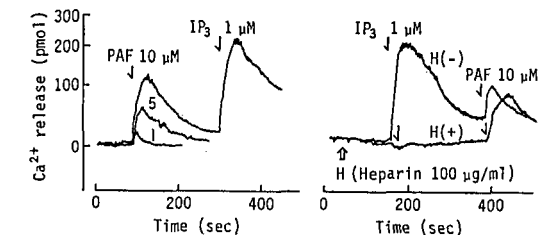


図14 Digitonin 膜透過性イヌ顎下腺細胞からの PAF 及び Ins(1, 4, 5)P<sub>3</sub> による Ca<sup>2+</sup> 遊離作用  
Digitonin 50 μM を 5 分間作用させ、膜透過性処置を行った。矢印において、各薬物（最終濃度で示す）を添加した時の、Ca<sup>2+</sup> 遊離量を絶対濃度で示した。

GTP 結合蛋白質を介して phospholipase C と共役し phosphatidylinositol (PI) 加水分解を促進することによる細胞内 Ca<sup>2+</sup> プールからの Ca<sup>2+</sup> 遊離と細胞外 Ca<sup>2+</sup> 流入により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起こす<sup>13)</sup>。本研究において Ca<sup>2+</sup> イオノファーである ionomycin により多量の PAF 産生が認められ、細胞外 Ca<sup>2+</sup> の除去により ACh および NE により PAF 産生が抑制された。加えて、digitonin により膜透過性処置を施したイヌ顎下腺細胞において Ca<sup>2+</sup> 単独で PAF 産生が認められること<sup>9)</sup> から、唾液腺における PAF 産生に Ca<sup>2+</sup> が重要な役割を果たしていることが考えられる。



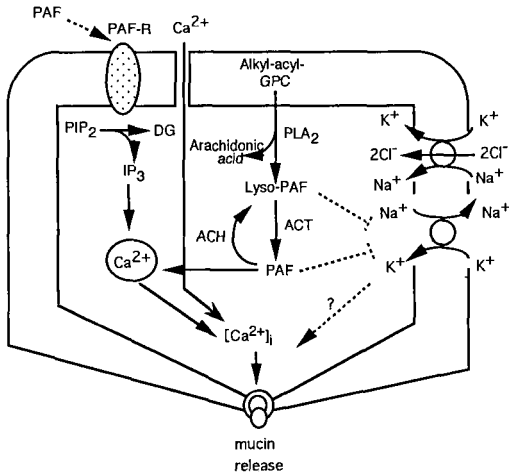


図15 唾液腺における PAF 生合成調節機構及び PAF の顎下腺ムチン分泌に関わる細胞内情報伝達機構の仮想図

PLA<sub>2</sub>: phospholipase A<sub>2</sub>, ACT: acetyltransferase, ACH: acetylhydrolase, PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4,5-disphosphate, DG: diacylglycerol, IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-trisphosphate

多くの細胞における PAF 合成系として, lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase を介する remodelling pathway と DTT-insensitive cholinephosphotransferase を介する de novo pathway があり, 前者は Ca<sup>2+</sup> 依存性で細胞刺激に伴って活性化され PAF 合成に関与すること, 後者は Ca<sup>2+</sup> 非依存性で刺激とは無関係に PAF を産生すると言われている。remodelling pathway では細胞膜エーテル型リン脂質 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine から phospholipase A<sub>2</sub> の活性化により sn-2 位のアシル基が脱アシル化されアラキドン酸等の遊離を伴って生理活性を示さない PAF 前駆物質 lyso-PAF が産生される。さらに, lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase の活性化により lyso-PAF がアセチル化されて PAF が産生される。好中球<sup>17)</sup>, 好塩基球, 好酸球<sup>18)</sup>, 単球<sup>19)</sup>, マクロファージ<sup>20)</sup> などの炎症・免疫細胞の多くは A23187 などの刺激性因子と感応し remodelling pathway で PAF を産生することが知られている。Alonso ら<sup>21)</sup> はヒト好中球細胞質画分に AA 含有アルキルアシル GPC やジアシル GPC を選択的に加水分解する phospholipase A<sub>2</sub> の存在を報告し, Diez と Mong ら<sup>22)</sup> は AA 含有リン脂質に特異的に働く phospholipase A<sub>2</sub> を U937 細胞より部分精製し, この酵素活性が Ca<sup>2+</sup> 依存性であることを報告している。また血小板より精製された分子量 105~110 KDa の phospholipase A<sub>2</sub> は Ca<sup>2+</sup> を介して活性化され

ることおよび AA 含有アルキルアシル GPC に高い親和性を有することが報告されている<sup>23,24)</sup>。digitonin 膜透過性イヌ顎下腺細胞において Ca<sup>2+</sup> による PAF 産生は phospholipase A<sub>2</sub> 阻害剤 p-bromophenacyl bromide および mepacrine により抑制されることより<sup>9)</sup>, イヌ顎下腺細胞における PAF 産生には phospholipase A<sub>2</sub> の活性化が必須であると考えられる。

本研究において, ACh および NE による PAF 産生は細胞外 Ca<sup>2+</sup> 存在下では [<sup>14</sup>C]AA の増加を伴っておりこのことは PAF 産生時における phospholipase A<sub>2</sub> の活性化を示唆している。しかし, 細胞外 Ca<sup>2+</sup> 非存在下においても PAF 産生は生じていないものの [<sup>14</sup>C]AA の増加は認められた。ムスカリン受容体及び α アドレナリン受容体刺激は細胞外 Ca<sup>2+</sup> 非存在下でも Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 感受性 Ca<sup>2+</sup> プールからの Ca<sup>2+</sup> 遊離により一過性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇を引き起こす。また, 最近ある種の phospholipase A<sub>2</sub> は膜と結合し GTP 結合蛋白質と共役した受容体刺激により活性化されることが報告されている<sup>8)</sup>。従って, 細胞外 Ca<sup>2+</sup> 非存在下においても ACh 及び NE により [<sup>14</sup>C]AA の増加が認められたのは上記の様な機序によるのかも知れない。いずれにしてもこの場合, phospholipase A<sub>2</sub> の活性化は起こるものの PAF 産生には至らないことになる。

モルモット耳下腺<sup>25)</sup> およびイヌ顎下腺<sup>9)</sup> においてはムスカリン受容体刺激および Ca<sup>2+</sup> イオノファーにより acetyltransferase が活性化されることが報告されている。また多くの細胞において, acetyltransferase の活性化には細胞外 Ca<sup>2+</sup> が重要な役割を果たしていることも示唆されている<sup>26,27)</sup>。これらは本研究においてもイヌ顎下腺細胞における ACh による acetyltransferase 活性化は細胞外 Ca<sup>2+</sup> の除去により大きく減弱したことと一致している。

Domenech ら<sup>25)</sup> はモルモット耳下腺のミクロゾーム画分における acetyltransferase 活性が部分精製した Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼおよび cyclic AMP 依存性プロテインキナーゼにより活性化されることを報告している。しかし, 無傷唾液腺細胞においては β アドレナリン受容体—cAMP 系によって acetyltransferase の活性化はもたらされないと報告されている<sup>25)</sup>。一方, ヒト好中球において cAMP が acetyltransferase 活性化を制御していることが報告されている<sup>28)</sup>。

本研究においては, イヌ顎下腺細胞において NE, isoproterenol, 8 Br-cAMP により acetyltransferase が活性化されることが示された。しかしこれらのアゴニストによる acetyltransferase の活性化は細胞外 Ca<sup>2+</sup>

に非依存性であった。また、イヌ顎下腺細胞では isoproterenol により acetyltransferase は活性化されるが PAF 産生は認められなかった。これらの結果は  $\beta$  アドレナリン受容体—cAMP 系により acetyltransferase は活性化されるものの、このような  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が生じていない条件下では phospholipase  $A_2$  の活性化が伴わないため acetyltransferase の基質となる lyso-PAF の供給が十分でなく PAF 合成は促進されなかったことを示唆するものと考えられる。

従って、イヌ顎下腺細胞では phospholipase  $A_2$  あるいは acetyltransferase の一方だけの活性化では PAF は産生されず、PAF 産生には両酵素が同時に活性化されることが必要であると考えられる。

唾液腺においては、ムスカリン受容体および  $\alpha$  アドレナリン受容体刺激は  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こし<sup>33)</sup>、 $Ca^{2+}$  を介する phospholipase  $A_2$  および acetyltransferase の活性化をもたらす PAF 生合成を促進するものと考えられる。NE による PAF 産生は  $\beta$  アドレナリン受容体遮断薬 propranolol によりほとんど影響されなかったことから、NE による PAF 産生に対する  $\beta$  アドレナリン受容体—cAMP 系による acetyltransferase 活性化の関与は少ないことが伺える。

近年、CoA-independent および CoA-dependent トランスアシラーゼが lyso-PAF の産生に重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>29,31)</sup>。PKC もまた、phospholipase  $A_2$ 、acetyltransferase および CoA-independent トランスアシラーゼ活性化を制御することにより白血球、単球および肥満細胞における PAF 産生を制御していることが報告されている<sup>32-34)</sup>。本研究においてイヌ顎下腺細胞では PKC の活性化剤である TPA、mezerein および阻害剤 staurosporine ではいずれも PAF 産生は認められず、また ACh による PAF 産生にも影響を与えなかった。これはモルモット耳下腺ミクロゾーム画分における acetyltransferase は部分精製した PKC により活性化されないことと一致している<sup>26)</sup>。しかし唾液腺における PAF 産生に対する PKC の役割については不明な点が多く、今後の検討課題である。

de novo 系による PAF 合成は DTT-insensitive cholinephosphotransferase による alkyl-acetyl-glycerol への phosphocholine の取込みによって制御されており、この系は  $Ca^{2+}$  非依存性であることが知られている。chick embryonic retinas において ACh および dopamine により cholinephosphotransferase は活性化されるが acetyltransferase は活性化されず、この組織においてはこれらの神経伝達物質による PAF 産生に cholinephosphotransferase が重要な役割を果たしているこ

とが示唆されている<sup>35)</sup>。一方、多形核白血球においてフォルボールエステルは acetyltransferase に影響を与えず cholinephosphotransferase を活性化することが報告されている<sup>36)</sup>。イヌ顎下腺においては acetyltransferase、cholinephosphotransferase とともに ACh、NE、isoproterenol、8 Br-cAMP により活性化された点が特徴的である。また、多くの細胞において acetyltransferase の活性化は  $Ca^{2+}$  依存性であり cholinephosphotransferase の活性化は  $Ca^{2+}$  非依存性であると言われている。本研究においても、ACh による acetyltransferase の活性化は細胞外  $Ca^{2+}$  の除去により著しく抑制されるのに対し、cholinephosphotransferase はむしろ増強された。

イヌ顎下腺細胞において非刺激時には PAF は検出されないが PAF 分解酵素アセチルヒドラーゼ阻害剤存在下では PAF が経時的に増加すること<sup>9)</sup>より、非刺激細胞においても PAF 生合成は生じていることが推察される。従って、非刺激細胞においては  $[Ca^{2+}]_i$  濃度上昇が生じていない条件下では de novo 系により PAF 合成が制御されている可能性が考えられる。

一般に PAF は刺激に応じて産生され細胞外へ遊離し、細胞膜 PAF 受容体に作用して autocrine あるいは paracrine 的に作用するものと考えられている。しかし、イヌ顎下腺細胞においてはムスカリン受容体刺激により PAF 産生は著しく促進されるものの細胞外への遊離は認められなかった。一方、モルモット顎下腺においてはムスカリン受容体刺激により産生された PAF は大部分細胞内に貯留しているものの、約11%の PAF が medium 中へ遊離することが認められた。従って、顎下腺においても産生された PAF が一部細胞外へ遊離し受容体に作用し顎下腺ムチン分泌に影響を与えている可能性が考えられる。

近年 in vivo においては PAF の細胞外への遊離促進因子の存在が示唆されている。Miwa ら<sup>37)</sup> はヒト血清中に PAF の遊離因子が存在する可能性を報告し、Cabot ら<sup>38)</sup> は PAF が BSA と複合体を形成すること及び Clay ら<sup>39)</sup> はヒト血清アルブミン 1 分子が 4 個の PAF 結合部位を有することをそれぞれ報告している。これらのことから、アルブミンが PAF のキャリアーとして機能している可能性が示唆されている。ラット循環血液中にはホスホコリン結合性を有する蛋白質が<sup>40,41)</sup>、また他の動物種には C 反応性蛋白質が存在し<sup>42,43)</sup>、これらの蛋白質は急性炎症や傷害時に1000倍にも増加するとされている。その他、ヒト血清  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白質が PAF と結合することも報告されている<sup>44)</sup>。従って、in vivo においては細胞膜を通る PAF トランスポートが動的に行われており、これが色々な

因子により調節されていると思われる。また、ある種の病態時にこのトランスポートがより一層促進される等の可能性も考えられ、ひいてはこのことが唾液腺分泌機能にも影響を及ぼすことが推察される。

血小板や好中球において PAF は開口分泌を促進することが報告されている<sup>1,45)</sup>。Söling ら<sup>10)</sup> はモルモット膵臓および耳下腺において PAF がアミラーゼ分泌、<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> 取込み、PI 代謝回転を促進することを報告している。本研究においても、モルモット顎下腺スライスにおいて PAF は 0.1 nM の低濃度から濃度依存的にムチン分泌を促進した。また、この PAF によるムチン分泌促進作用は PAF 受容体特異的拮抗薬である BN50739 により拮抗された。従って、この反応は PAF 受容体を介する反応であるものと考えられる。

最近、モルモット肺 PAF 受容体の全構造が遺伝子工学的手法で明らかとなった。PAF 受容体はアミノ酸 342 個、分子量 39 KDa からなる単量体で、その配列パターンより 7 つの疎水性アミノ酸に富む領域とそれらを連結する短い親水性のループで構成されると推定されている<sup>46)</sup>。従って、PAF 受容体は GTP 結合蛋白質と共役し、形質膜を 7 回貫通する受容体スーパーファミリーの一員であると考えられている。またヒト好中球由来の mRNA を用いて類似の研究が行われ、好中球 PAF 受容体の 342 個のアミノ酸配列が推定されている<sup>47)</sup>。モルモット各臓器を用いた RNA 分析により、PAF 受容体 mRNA は白血球、腎臓、脾臓、肺の順に多いことが報告されている<sup>48)</sup>。

本研究で唾液腺における PAF 受容体 mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて調査した結果、モルモット耳下腺および顎下腺において PAF 受容体に特異的なフラグメントの増幅がモルモット肺と同様に認められた。このことはモルモット唾液腺において PAF 受容体 mRNA が発現していることを示している。

PAF 受容体はいく種かの細胞内情報伝達系と共役しており、ある種のものには pertusis toxin により阻害されることから GTP 結合蛋白質との共役が示唆されている<sup>7)</sup>。PI 代謝回転の促進は多くの細胞において PAF 受容体の最もよく知られた細胞内情報伝達系である。PAF はラット破骨細胞に作用しその形態変化を誘発し、二層性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起こすこと、初期の一過性の上昇は細胞外液 Ca<sup>2+</sup> に非依存性で後の持続した上昇は外液 Ca<sup>2+</sup> の流入によることが報告されている<sup>49)</sup>。ウサギ好中球において PAF は受容体と共役した GTP 結合蛋白質及び phospholipase C の活性化を介する [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起こし、初期の一過性の上昇は Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> による Ca<sup>2+</sup> プールから

の Ca<sup>2+</sup> 遊離に、持続した [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は細胞外 Ca<sup>2+</sup> 流入によることが報告されている<sup>50)</sup>。本研究においても、PAF はモルモット顎下腺スライスにおいて Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 産生を促進し [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起こした。近年 Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> により細胞内 Ca<sup>2+</sup> プールから Ca<sup>2+</sup> が遊離し、プールの Ca<sup>2+</sup> が減少することが細胞膜 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを活性化して細胞外 Ca<sup>2+</sup> 流入を引き起こす store operated channel (SOC) 機構が提唱されている。この SOC は特に唾液腺等の非興奮性細胞に発達している。また、この SOC の messenger として calcium influx factor (CIF) の存在が報告されている。当教室においても PAF による CIF の産生とその Ca<sup>2+</sup> 流入作用を認めている (未発表)。

一般にムチン分泌は β アドレナリン受容体—cAMP 系によって引き起こされ、α アドレナリン受容体及びムスカリン受容体の関与は少ないと言われている<sup>51,52)</sup>。しかし近年、α アドレナリン受容体及びムスカリン受容体と共役する Ca<sup>2+</sup> 動員系が顎下腺ムチン分泌に重要な役割を担っていることが明かにされた<sup>13)</sup>。これらの結果は、PAF が唾液腺および膵臓等の外分泌腺において細胞膜 PAF 受容体に作用し PI 代謝回転を促進して外分泌機能に関与する可能性を示唆している。このことは、モルモット顎下腺において PAF による Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> と [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇及びムチン分泌の細胞外 Ca<sup>2+</sup> の除去による抑制からも支持される。

本研究において、イヌ耳下腺および顎下腺においては PAF 受容体 mRNA 発現が認められなかった。イヌ副腎において、イヌ副腎 mRNA を用いた RT-PCR 法により PAF 受容体 mRNA 発現が認められている<sup>53)</sup>。また、PAF 受容体拮抗薬である [<sup>3</sup>H]WEB2086 を用いた結合実験によってもイヌ副腎細胞膜に PAF の特異的結合部位が存在することが明らかにされ、PAF がイヌ副腎クロマフィン細胞においてカテコールアミン遊離を促進的に調節するという機能を有している<sup>54)</sup>。従って、イヌでは PAF 受容体発現の臓器特異性が認められる。

イヌとモルモット唾液腺における PAF 受容体 mRNA 発現の相違は本研究においてイヌ顎下腺において合成された PAF が細胞外へ遊離せず、モルモット顎下腺細胞では遊離されることを考え合わせると、モルモット唾液腺外分泌機構において PAF が autocrine 的な役割を果たしている可能性がより強く示唆される。

多くの細胞において産生された PAF は細胞外へ遊離されず、細胞内に貯留していることが知られてい

る。PAF 産生能が高くその標的細胞である好中球や血小板においても産生された PAF の一部が遊離されるにすぎない。本研究においても、イヌおよびモルモット顎下腺において産生された PAF はその大部分が細胞内に貯留していることが示された。

Stewart ら<sup>55)</sup> は血管内皮細胞において bradykinin, A23187 や ATP により PAF は産生されるが遊離されないこと、またこれらの刺激による PGI<sub>2</sub> 産生は PAF 拮抗薬 WEB2086 および CV6209 によって抑制されること、同様にマクロファージにおいても FMLP により産生された PAF は細胞外へ遊離せず、FMLP による PGI<sub>2</sub> 産生は PAF 拮抗薬によって抑制されることを報告している。Tool ら<sup>56)</sup> はヒト好中球において opsonin による第 2 相 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は PAF によって仲介され、PAF は細胞内 Ca<sup>2+</sup> ホメオスタシスの細胞内 messenger として働いているとの考えを示している。Bazan ら<sup>6,57)</sup> はラット大脳皮質から細胞膜画分とミクロゾーム画分を調整しその両者に PAF の特異的結合部位の存在することを明らかにし、細胞内に PAF 結合部位の存在することを示唆している。これらの結果は PAF の細胞膜 PAF 受容体を介する作用様式とは別の役割、すなわち PAF が細胞内情報伝達物質として機能する可能性を示唆している。

ウシ副腎クロマフィン細胞において PAF は膜 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase を阻害し、Na<sup>+</sup> 依存性にカテコールアミン分泌を促進することが報告されている<sup>53)</sup>。また Hollister ら<sup>58)</sup> は赤血球膜 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性が PAF により阻害され、PAF が内因性の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性調節因子である可能性を報告している。

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase は唾液腺基底膜に存在し溶液分泌時におけるイオン輸送を制御している<sup>59)</sup>。

本研究において、PAF は 10 μM 以上の濃度でイヌ顎下腺細胞膜 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase を阻害した。この阻害効果は PAF 受容体特異的拮抗薬 BN50739 により拮抗されなかったため PAF 受容体を介する反応ではないものと考えられる。PAF の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性阻害は用いた蛋白濃度に依存していた。この点、細胞膜の外から K<sup>+</sup> 結合部位に親和性をもつ ouabain はそのような蛋白による希釈は受けないと異なっている。lysophosphatidylcholine (lyso-PC) などの lyso 体は水溶性を獲得し、膜から細胞質へ移行し lipid second messenger として働いている可能性が示唆されている。lyso-PC は Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性を阻害しその作用は細胞膜の内側から Na<sup>+</sup> 結合部位に作用することが最近報告されている<sup>60)</sup>。Lineweaver burk plot 及び Hill plot 解析により、PAF のイヌ顎下腺細胞膜 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 阻害が ouabain 様の K<sup>+</sup> 結合部位への作

用あるいは lyso-PC 様の Na<sup>+</sup> 結合部位への作用ではなく、より複雑な阻害様式であることが示唆された。

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の阻害がムチン分泌に与える影響については明かではない。Petersen ら<sup>61)</sup> はネコ顎下腺における唾液分泌が Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 特異的阻害薬 ouabain により抑制されることを報告している。本研究においてはイヌ顎下腺細胞からのムチン分泌は ouabain により濃度依存的に促進されることが示された。

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase は Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2 Cl<sup>-</sup>-cotransporter 等他のイオン輸送系とともに唾液腺房細胞における分泌反応に重要な機能を担っているため、唾液腺房細胞において PAF がイオン輸送を制御することにより分泌機能に関与している可能性が考えられる。

細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇のメカニズムのうち細胞内 Ca<sup>2+</sup> プールからの Ca<sup>2+</sup> 遊離は種々の細胞でその機能を果たす上で重要な現象であり、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体、ライアノジン受容体を介した 2 種類の経路が良く知られている<sup>62)</sup>。

本研究において PAF は digitonin で膜透過性としたイヌ顎下腺細胞において Ca<sup>2+</sup> 遊離を引き起こした。

Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 前処置後および Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬 heparin 前処置後でも PAF により Ca<sup>2+</sup> 遊離が認められること、また比較的高濃度の PAF を要することから PAF による Ca<sup>2+</sup> 遊離は上記のような受容体を介するものとは異なる機序で作用していると思われる。

PAF は phospholipid vesicle において Ca<sup>2+</sup>-lipid interaction に影響することが知られており<sup>63)</sup>、そのような Ca<sup>2+</sup> 動態に対する作用が果たして生理的な役割であるかどうかは今後の検討課題である。

水溶性の PAF あるいは lyso-PAF は細胞内においては膜から細胞質へ遊離し情報伝達にあずかる可能性が考えられる。唾液腺においては無傷細胞では産生された PAF は細胞外では検出されないが digitonin で膜透過性とした細胞では medium へ遊出することから、PAF は細胞内で実際細胞質へ遊離されることが示されている<sup>9)</sup>。細胞質に PAF に特異的な transfer protein が存在すること<sup>64)</sup> や細胞内あるいは細胞膜の inner leaflet に PAF 受容体があることも示唆されている<sup>65)</sup>。また、ウサギ血小板において PAF は PKC を enzyme protein translocation とは異なった機序で活性化すること<sup>66)</sup> や血小板膜 adenylate cyclase 活性を阻害すること<sup>67)</sup> も報告されており、PAF の細胞内で messenger としての役割が注目される。

以上より、顎下腺における PAF 生合成は神経伝達物質 ACh および NE により Ca<sup>2+</sup> を介する remodel-

ing系を介して調節されることが示された。また、顎下腺には PAF 受容体が存在し、顎下腺において産生された PAF は一部細胞外へ遊離し細胞膜 PAF 受容体—PI 代謝回転を介してムチン分泌に関与する可能性が示唆された。さらに、顎下腺において産生された PAF は膜  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性を阻害し、また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールから  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を引き起こすことにより細胞内情報伝達物質として機能する可能性が示唆された (図15)。

## 総 括

唾液腺における PAF 生合成調節機構および PAF の顎下腺ムチン分泌反応とそれに関わる細胞内情報伝達機構について検討し、以下の結果を得た。

1) イヌ耳下腺, 顎下腺, 舌下腺細胞において ACh, NE, ionomycin は PAF 産生を著明に促進した。NE の作用は  $\alpha$  受容体遮断薬により拮抗された。

2) ACh および NE は細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存してアラキドン酸の遊離と PAF 産生を促進した。

3) PAF 合成酵素 lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase 活性は ACh, NE, isoproterenol および 8 Br-cAMP により上昇した。

4) 細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  の除去により ACh による acetyltransferase 活性上昇は減少したが NE, isoproterenol および 8 Br-cAMP による上昇は影響されなかった。

5) DTT-insensitive cholinephosphotransferase 活性は ACh により上昇し、細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  除去によりさらに上昇した。

6) PKC 活性化物質である TPA, mezerein, および PKC 活性阻害薬 staurosporine それぞれ単独では PAF 産生を認めなかった。また TPA, mezerein, staurosporine 前処置は ACh による PAF 産生量に影響を与えなかった。

7) イヌ顎下腺細胞において ACh により産生された PAF は細胞中に高濃度検出されたが medium 中への遊離は認められなかった。一方ホルモット顎下腺細胞においては ACh により産生された PAF の一部が medium 中へ遊離された。

8) PAF はホルモット顎下腺からのムチン分泌を促進した。この分泌は PAF 受容体拮抗薬 BN50739 および細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  の除去により減少した。

9) RT-PCR 法により PAF 受容体 mRNA の発現がホルモット耳下腺, 顎下腺において認められた。

10) PAF は顎下腺細胞内  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  濃度を上昇させた。

11) PAF は顎下腺細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を軽度上

昇させた。

12) PAF はイヌ顎下腺細胞膜標本において  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性を阻害した。この阻害効果は  $\text{K}^+$  および BN50739 により拮抗されなかった。

13)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 特異的阻害薬 ouabain によりムチン分泌が促進された。

14) digitonin 膜透過性細胞において PAF は一過性の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を引き起こした。

これらの結果より、顎下腺における PAF 生合成は神経伝達物質 ACh および NE により  $\text{Ca}^{2+}$  を介する remodelling 系を介して調節されることが示された。また、顎下腺には PAF 受容体が存在し、顎下腺において産生された PAF は一部細胞外へ遊離し細胞膜 PAF 受容体—PI 代謝回転を介してムチン分泌に関与する可能性が示唆された。さらに、顎下腺において産生された PAF は膜  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性を阻害し、また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールから  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を引き起こすことにより細胞内情報伝達物質として機能する可能性も示唆されるなど、唾液腺における PAF 生合成と PAF のムチン分泌における役割の一端を明らかにできた。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第一講座赤川安正教授ならびに終始御懇篤なる御指導を賜りました前本学歯科補綴学第一講座教授津留宏道名誉教授に衷心より感謝の意を表します。また、本研究の遂行及びまともに際し、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座土肥敏博教授ならびに御校閲を賜りました本学口腔生理学講座柴芳樹教授に深甚なる謝意を表します。さらに、本研究に対し、御助言、御協力をいただきました本学歯科薬理学講座北山滋雄助教授に感謝の意を表します。多大な御支援をいただきました佐藤裕二助教授、津賀一弘講師ならびに和田本昌良講師をはじめとする歯科補綴学第一講座教室員各位ならびに森田克也講師をはじめとする歯科薬理学講座関係者各位に感謝致します。BN50739 を御供与いただいた P. Brauquet 博士 (Institute Henri Beaufour, Le Plessis Robinson, France) に感謝致します。

## 文 献

- 1) Benveniste, J., Henson, P.M. and Cochrane, C.G.: Leucocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 136, 1356-1377, 1972.
- 2) Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N. and Hanahan,

- D.J.: Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine as the active component (A new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem.* **254**, 9355-9358, 1979.
- 3) Camussi, G. and Brentjens, J.R.: The role of platelet-activating factor in inflammation; in Platelet-activating factor and related lipid mediators (Snyder, F., editor). *Plenum Press, New York*, 299-322, 1987.
  - 4) Snyder, F.: Biochemistry of platelet-activating factor; a unique class of biologically active phospholipid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **190**, 125-135, 1989.
  - 5) Garito, M.L., Prihoda, T.J., and McManus, L.M.: Salivary PAF levels correlate with the severity of periodontal inflammation. *J. Dent. Res.* **74**, 1048-1056, 1995.
  - 6) Bazan, N.G., Squinto, S.P., Braquet, P., Panetta, T. and Marcheselli, V.L.: Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: intracellular PAF-binding site and activation of a Fos/Jun/AP-1 transcriptional signalling system. *Lipids* **26**, 1236-1242, 1991.
  - 7) Choa, W. and Olson, M.S.: Platelet-activating factor; receptors and signal transduction. *Biochem. J.* **292**, 617-629, 1993.
  - 8) Söling, H.-D. and Fest, W.: Synthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) in exocrine glands and its control by secretagogues. *J. Biol. Chem.* **261**, 13916-13922, 1986.
  - 9) Dohi, T., Morita, K., Kitayama, S. and Tsujimoto, A.: Calcium-dependent biosynthesis of platelet-activating factor by submandibular gland cells. *Biochem. J.* **276**, 175-182, 1991.
  - 10) Söling, H.-D., Eibl, H. and Fest, W.: Acetylcholine-like effects of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) and its analogues in exocrine secretory glands. *Eur. J. Biochem.* **144**, 65-72, 1984.
  - 11) Levine, M.J., Reddy, M.S., Tabak, L.A., Loomis, R.E., Bergey, E.J., Jones, P.C., Cohen, R.E., Stinson, M.W. and Al-Hashimi, I.: Structural aspects of salivary glycoproteins. *J. Dent. Res.* **66**, 436-441, 1987.
  - 12) Edgar, W.M.: Saliva: its secretion, composition and functions. *Br. Dent. J.* **172**, 305-312, 1992.
  - 13) 山木博司: イヌ顎下腺細胞からのカルシウムイオン動員によるムチン分泌. 広大歯誌 **26**, 14-28, 1994.
  - 14) McPherson, M.A. and Dormer, R.L.: Mucin release and calcium fluxes in isolated rat submandibular acini. *Biochem. J.* **224**, 473-481, 1984.
  - 15) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917, 1959.
  - 16) Fiske, C.H. and Subbarow: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400, 1925.
  - 17) Alonso, F., Gil, G., Sanchez-Crespo, M. and Mato, J.M.: Activation of 1-alkyl-2-lysoglycero-3-phosphocholine. Acetyl-CoA transferase during phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **257**, 3376-3378, 1982.
  - 18) Ojima-Uchiyama, A., Masuzawa, T., Sugiura, T., Waku, K., Fukuda, T. and Makino, S.: Production of platelet-activating factor by human normodense and hypodense eosinophils. *Lipids* **26**, 1200-1203, 1991.
  - 19) Elstad, M.R., Prescott, S.M., McIntyre, T.M. and Zimmerman, G.A.: Synthesis and release of platelet-activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* **140**, 1618-1624, 1988.
  - 20) Elstad, M.R., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. and Zimmerman, G.A.: Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* **264**, 8467-8470, 1989.
  - 21) Alonso, F., Henson, P.M. and Leslie, C.C.: A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl containing phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **878**, 273-280, 1986.
  - 22) Diez, E. and Mong, S.: Purification of a phospholipase A<sub>2</sub> from human monocytic leukemic U937 cells. Calcium-dependent activation and membrane association. *J. Biol. Chem.* **265**, 14654-14661, 1990.
  - 23) Clark, J.D., Milona, N. and Knoop, J.L.: Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> from the human monocytic cell line U937. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7708-7712, 1990.
  - 24) Kramer, R.M., Hessio, C., Johanson, B., Haynes, G., McGray, P., Chow, E.P., Tizard, R. and Pepinsky, R.B.: Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **264**, 5768-5775, 1989.
  - 25) Domenech, C., Domenech, E.M.-D. and Soling, H.-D.: Regulation of Acetyl-CoA: 1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF-acetyltransferase) in exocrine glands. Evidence for an activation via phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **262**, 5671-5676, 1987.
  - 26) Gomez-Cambronero, J., Inarrea, P., Alonso, F. and Sanchez-Crespo, M.: The role of calcium

- ions in the process of acetyltransferase activation during the formation of platelet-activating factor (PAF-acether). *Biochem. J.* **219**, 419–424, 1984.
- 27) Gomez-Cambronero, J., Neito, M.L., Mato, J.M. and Sanchez-Crespo, M.: Modulation of lyso-platelet-activating factor: acetyl-CoA acetyltransferase from rat splenic microsomes. *The role of calcium ions. Biochim. Biophys. Acta.* **845**, 511–515, 1985.
  - 28) Neito, M.L., Velasco, S. and Sanchez-Crespo, M.: Modulation of acetyl-CoA: 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic AMP-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **263**, 4607–4611, 1988.
  - 29) Chilton, F.H. and Connell, T.R.: 1-ether-linked phosphoglycerides. Major endogenous sources of arachidonate in the human neutrophil. *J. Biol. Chem.* **263**, 5260–5265, 1988.
  - 30) Tessner, T.G., Greene, D.G. and Wykle, R.L.: Selective deacylation of arachidonate-containing ethanolamine-linked phosphoglycerides in stimulated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **265**, 21032–21038, 1990.
  - 31) Uemura, Y., Lee, T.C. and Snyder, F.: A coenzyme A-independent transacylase is linked to the formation of platelet-activating factor (PAF) by generating the lyso-PAF intermediate in the remodeling pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 8268–8272, 1991.
  - 32) Hayashi, M., Imai, Y. and Oh-ishi, S.: Phorbol ester stimulates PAF synthesis via the activation of protein kinase C in rat leukocytes. *Lipids* **26**, 1054–1059, 1991.
  - 33) Elstad, M.R., Prescott, S.M., McIntyre, T.M. and Zimmerman, G.A.: Synthesis and release of platelet-activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* **140**, 1618–1624, 1988.
  - 34) Joly, F., Vilgrain, I., Bossant, M.J., Benveniste, J. and Ninio, E.: Biosynthesis of PAF-acether. Activators of protein kinase C stimulate cultured mast cell acetyltransferase without stimulating PAF-acether synthesis. *Biochem. J.* **271**, 501–507, 1990.
  - 35) Bussolino, F., Gremo, F., Tetta, C., Pescarmona, G.P. and Camussi, G.: Production of platelet-activating factor by chick retina. *J. Biol. Chem.* **261**, 16502–16508, 1986.
  - 36) Nieto, M.L., Velasco, S. and Sanchez-Crespo, M.: Biosynthesis of platelet-activating factor in human polymorphonuclear leukocytes. Involvement of the cholinephosphotransferase pathway in response to the phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **263**, 2217–2222, 1988.
  - 37) Miwa, M., Sugitani, J., Ikemura, T., Okamoto, Y., Ino, M., Saito, K., Suzuki, Y. and Matsumoto, M.: Release of newly synthesized platelet-activating factor (PAF) from human polymorphonuclear leukocytes under in vivo conditions. Contribution of PAF-releasing factor in serum. *J. Immunol.* **148**, 872–880, 1992.
  - 38) Cabot, M.C., Blank, M.L., Welsh, C.J., Horan, M.J., Cress, E.A. and Snyder, F.: Metabolism of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by cell cultures. *Life Sci.* **31**, 2891–2898, 1982.
  - 39) Clay, K.L., Johnson, C. and Henson, P.M.: Binding of platelet activating factor to albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1046**, 309–314, 1988.
  - 40) Nagpurkar, A., Randell, E., Choudhury, S. and Mookerjee, S.: Effect of rat phosphorylcholine-binding protein on platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta.* **967**, 76–81, 1990.
  - 41) Randell, E., Mookerjee, S. and Nagpurkar, A.: Interaction between rat serum phosphorylcholine binding protein and platelet activating factor. *Biochim. Biophys. Acta.* **167**, 444–449, 1990.
  - 42) Vigo, C.: Effect of C-reactive protein on platelet-activating factor-induced platelet aggregation and membrane stabilization. *J. Biol. Chem.* **260**, 3418–3422, 1985.
  - 43) Filep, J.G., Herman, F., Kelemen, E. and Foldes-Filep, E.: C-reactive protein inhibits binding of platelet-activating factor to human platelets. *Thromb. Res.* **61**, 411–421, 1991.
  - 44) McNamara, P.J., Brouwer, K.R. and Gillespie, M.N.: Autacoid binding to serum proteins. Interaction of platelet activating factor (PAF) with human serum alpha-1-acid glycoprotein (AAG). *Biochem. Pharmacol.* **35**, 621–624, 1986.
  - 45) Shaw, J.O., Pinchard, R.N., Ferringni, K.S., McManus, L. and Hanahan, D.J.: Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine (platelet activating factor). *J. Immunol.* **127**, 1250–1255, 1981.
  - 46) Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T. and Shimizu, T.: Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* **349**, 342–346, 1991.
  - 47) Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., Noma, M. and Shimizu, T.: Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 20400–20405, 1991.
  - 48) Takano, T.: Demonstration of platelet activating

- factor receptor in guinea pig kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 54, 1991.
- 49) Wood, D.A., Hapak, L.K., Sims, S.M. and Dixon, S.J.: Direct effects of platelet-activating factor on isolated rat osteoclasts. Rapid elevation of intracellular free calcium and transient retraction of pseudopods. *J. Biol. Chem.* **266**, 15369-15376, 1991.
- 50) Shibata, K., Okamoto, H. and Dohi, T.: Study on pathway of platelet-activating factor induced rise of intracellular calcium in rabbit neutrophils. *Jpn. J. Pharmacol.* **61**, 155, 1993.
- 51) Bogart, B.I. and Picarelli, J.: Agonist-induced secretions and potassium release from rat submandibular gland slices. *Am. J. Physiol.* **235**, C256-C268, 1978.
- 52) Quissell, D.O. and Barzen, K.A.: Secretory response of dispersed rat submandibular cells. II. Mucin secretion. *Am. J. Physiol.* **238**, C99-C106, 1980.
- 53) Dohi, T., Morita, K., Imai, Y. and Kitayama, S.: Functional role of platelet-activating factor in secretory response in adrenal chromaffin cells; in Platelet-activating factor and related lipid mediators in health and disease (Nigam, G., Kunkel, G., Prescott, S.M. and Vargaftig, B.B., editors). Plenum Press, New York, (in press).
- 54) Morita, K., Suemitsu, T., Uchiyama, Y., Miyasako, T. and Dohi, T.: Platelet-activating factor mediated potentiation of stimulation-evoked catecholamine release and the rise in intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration in adrenal chromaffin cells. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **11**, 219-230, 1995.
- 55) Stewart, A.G., Duffin, P.N., Harris, T. and Dusting, G.J.: Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of eicosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3215-3219, 1990.
- 56) Tool, A.T.J., Verhoeven, A.J., Roos, D. and Koenderman, L.: Platelet-activating factor (PAF) acts as an intracellular messenger in the changes of cytosolic free  $Ca^{2+}$  in human neutrophils induced by opsonized particles. *FEBS Lett.* **259**, 209-212, 1989.
- 57) Marcheselli, V.L., Rossowska, M.J., Domingo, M.-T., Braquet, P. and Bazan, N.G.: Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* **265**, 9140-9145, 1990.
- 58) Hoolister, A.S. and Kochhar, S.: Platelet activating factor has potent ouabain-like activity in vitro. *Clin. Res.* **37**, 3954, 1989.
- 59) Nauntofte, B.: Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *American J. Physiol.* **263**, G823-837, 1992.
- 60) Oishi, K., Zheng, B. and Kuo, J.F.: Inhibition of Na, K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulator sphingosine, lysophosphatidylcholine and oleic acid. *J. Biol. Chem.* **265**, 70-75, 1990.
- 61) Petersen, O.H. and Poulsen, J.H.: Inhibition of salivary secretion and secretory potentials by gastrophantin, dinitrophenol and cyanide. *Acta Physiol. Scand.* **71**, 194-202, 1967.
- 62) Berridge, M.J.: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325, 1993.
- 63) Bratton, D.L., Harris, R.A., Clay, K.L. and Henson, P.M.: Effects of platelet-activating factor on calcium-lipid interactions and lateral phase separations in phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **943**, 211-9, 1988.
- 64) Lumb, R.H., Pool, G.L., Bubacz, D.G., Blank, M.L. and Snyder, F.: Spontaneous and protein-catalyzed transfer of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) between phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **750**, 217-22, 1983.
- 65) Henson, P.M.: Extracellular and intracellular activities of PAF; in Platelet-activating factor and related lipid mediators (Snyder, F., editor). *Plenum Press, New York*, 255-271, 1987.
- 66) Salari, H., Duronio, V., Howard, S., Demos, M. and Pelech, S.L.: Translocation-independent activation of protein kinase C by platelet-activating factor, thrombin and prostacyclin. Lack of correlation with polyphosphoinositide hydrolysis in rabbit platelets. *Biochem. J.* **267**, 689-96, 1990.
- 67) Haslam, R.J. and Vanderwel, M.: Inhibition of platelet adenylate cyclase by 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor). *J. Biol. Chem.* **257**, 6879-85, 1982.