

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21322

研究課題名(和文) 脂質ラフト制御を起点とするMARCKSリン酸化を介した開口分泌調節機序の解明

研究課題名(英文) The study of exocytosis associated with regulation of lipid raft via MARCKS phosphorylation

研究代表者

佐藤 慶太郎 (Sato, Keitaro)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：10549041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：開口分泌を調節するメカニズムの解明を目指して、耳下腺および膵外分泌腺で起こるアミラーゼ分泌におけるMyristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) タンパク質リン酸化の役割について検討した。具体的には、細胞膜上に存在すると考えられている脂質ラフトの制御と関連付けて検索を行った。本研究によりMARCKSタンパク質は、脂質ラフト上で多くの情報伝達を受けて、開口分泌を調節する役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I investigated the involvement of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) phosphorylation in amylase release in parotid and pancreatic acinar cells. Concretely, I examined as the study which are associated with regulation of lipid raft on cell membrane. Findings from this study suggest that MARCKS, which is regulated by many signal transduction in lipid raft, play an important role for exocytosis.

研究分野：細胞生理学および細胞薬理学

キーワード：開口分泌 アミラーゼ MARCKS 耳下腺 膵外分泌腺 脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) はプロテインキナーゼC (PKC) の主な基質であり、可逆的膜ドメインとして働く性質を持つことから、細胞内シグナル伝達の中でも特に開口分泌など細胞膜周辺で起こるダイナミックな反応に寄与すると考えられている。一方、このような細胞膜周辺の現象に脂質ラフトによる調節が示唆されている。実際に耳下腺腺房細胞において、分泌顆粒膜と細胞膜との膜融合にラフトの関与が議論されているが、その詳細は明らかではない。私は MARCKS の外分泌における役割の解明をテーマに研究を進めており、耳下腺腺房細胞において MARCKS がリン酸化により細胞膜から細胞質へ局在変化を起こしアミラーゼ分泌に関与することを明らかにした (Sato et al. Am J Physiol, 2009)。また、平成 25 年より若手研究 (B) に採択された研究課題「唾液腺・膵外分泌腺における MARCKS リン酸化を共通とした開口分泌機構の解明」により、耳下腺と膵臓では開口分泌の細胞内シグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーが異なるにも関わらず、MARCKS のアミラーゼ分泌への関与は共通であることを見つけた。以上より、脂質ラフトから MARCKS が離れることが、開口分泌に大きな役割をもつとする仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、外分泌腺開口分泌のモデルとして耳下腺アミラーゼ分泌を用いて、開口分泌における MARCKS の役割を明らかにする。これにより、開口分泌の分子機構、特に脂質ラフトによる制御メカニズムを解明することを目的とする。併せて、MARCKS を脂質ラフト機能制御の新たな因子として提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MARCKS のリン酸化とアミラーゼ分泌

ラットより耳下腺および膵臓を摘出し、腺房細胞をトリプシンおよびコラゲナーゼによる酵素処理により分離・調整した。単離した耳下腺腺房細胞に アゴニストのイソプロテレノール (IPR) を、膵外分泌腺腺房細胞に消化管ホルモンのコレシストキニン (CCK) およびインクレチンホルモンのグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) をそれぞれ作用させ、ライセート画分を得た。MARCKS およびリン酸化 MARCKS の発現をウェスタンブロット法で、細胞内局在を免疫染色法により検出し、リン酸化した MARCKS が増えているか、細胞内の局在が変化しているか、検討した。続いて、IPR、CCK および GLP-1 刺激前に各種阻害剤を作用させ、MARCKS のリン酸化へどのような影響を与えるか、検討した。併せて、各種阻害剤のアミラーゼ分泌への影響を Bernfeld の方法 (Bernfeld. Methods Enzymol, 1955) を用いて測定および検討し

た。

(2) MARCKS と相互作用する可能性のある分泌関連タンパク質の検索

界面活性剤不溶画分のショ糖密度勾配法により分離したフラクションにおいて、脂質ラフトのマーカである GM1a と MARCKS が同じ画分に回収されるか、リン酸化の影響があるか、検討した。

4. 研究成果

(1) 脂質ラフトにおける MARCKS リン酸化と局在変化

耳下腺腺房細胞を用いた実験と共に、膵外分泌腺腺房細胞を用いた実験を並行して行い、以下の内容を得た。耳下腺腺房細胞および膵外分泌腺腺房細胞において、MARCKS の一部が脂質ラフトに局在した。IPR または CCK をそれぞれ作用させると、両腺房細胞において脂質ラフトに MARCKS の局在が認められなくなった。膵外分泌腺腺房細胞において、MARCKS 阻害ペプチド存在下で CCK を作用させても、阻害ペプチド非存在下における CCK 作用時と同様に、MARCKS は細胞膜から細胞質へ局在を変化させた。

これらの結果から、耳下腺においても膵外分泌腺においても MARCKS は脂質ラフトを介してアミラーゼ分泌に関与しているが、MARCKS の局在変化と機能発現は制御機構が異なる可能性が示唆された。MARCKS はリン酸化により細胞内局在が細胞膜から細胞質へ変化する。そして細胞質へ局在を変化させた MARCKS が機能を発現すると予想していたが、局在変化と機能発現は必ずしも連動するものではないことが考えられた。

(2) MARCKS を介するアミラーゼ分泌シグナル伝達

MARCKS リン酸化とそれに続くアミラーゼ分泌を引き起こすシグナル伝達の解析を中心に、以下の内容を得た。

耳下腺腺房細胞に IPR を作用させて引き起こす MARCKS リン酸化は、PKC 特異的阻害剤で抑制された。PKC 特異的阻害剤は IPR 誘発性アミラーゼ分泌も同様に抑制した。Phospholipase D (PLD) 特異的阻害剤は、IPR 刺激により引き起こされる MARCKS リン酸化を抑制した。PLD 特異的阻害剤は IPR 誘発性アミラーゼ分泌も同様に抑制した。

これらの結果から、耳下腺において IPR 刺激により引き起こされる MARCKS リン酸化とそれに続くアミラーゼ分泌は、PLD を介した PKC の活性化により調節されていることが示唆された。このことから、MARCKS の局在する脂質ラフトに PLD や PKC の調節機能があることも考えられ、非常に興味深い。MARCKS が脂質ラフト上で機能発現することを示唆する知見を得ているが、MARCKS の局在する脂質ラフトがより多く細胞機能を調節している可能性が高いことが考えられた。分泌に関連

したタンパク質のみならず、シグナル伝達調節因子も含めて、MARCKS との関連性を紐解くことが重要と考えられた。

(3) cAMP 系シグナルによる MARCKS リン酸化における PLD の関与

耳下腺腺房細胞で得られた MARCKS を介する細胞内シグナル伝達の共通性を検討するため、膵外分泌腺腺房細胞において cAMP をセカンドメッセンジャーとするアミラーゼ分泌の研究を進め、以下の内容を得た。

膵外分泌腺腺房細胞に GLP-1 を作用させると、アミラーゼ分泌が引き起こされた。cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) 阻害剤は GLP-1 誘発性アミラーゼ分泌を部分的に抑制した。GLP-1 を作用させると MARCKS のリン酸化が引き起こされた。PKA 阻害剤は GLP-1 により引き起こされる MARCKS リン酸化を阻害した。PLD 阻害剤は GLP-1 刺激により引き起こされる MARCKS リン酸化を抑制した。PLD 阻害剤は GLP-1 誘発性アミラーゼ分泌を部分的に抑制した。MARCKS 阻害ペプチドは GLP-1 誘発性アミラーゼ分泌を部分的に抑制した。

これらの結果から、膵外分泌腺において GLP-1 刺激により cAMP をセカンドメッセンジャーとするアミラーゼ分泌が起こり、この細胞内シグナル伝達には PLD の活性化や MARCKS のリン酸化が関与することが示唆された。このことから、PKA や PLD、そして MARCKS が cAMP 依存性アミラーゼ分泌の細胞内シグナル伝達を有する耳下腺と膵外分泌腺の両者に共通する経路であることが考えられた。さらに MARCKS の開口放出への関与は臓器特異的なものではなく、多くの外分泌腺が有する分子基盤である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Keitaro Satoh, Takanori Narita, Osamu Katsumata-Kato, Hiroshi Sugiya, Yoshiteru Seo .
Involvement of myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation and translocation in cholecystokinin-induced amylase release in rat pancreatic acini .
American Journal of Physiology .
Gastrointestinal and Liver Physiology .
査読有 . 310 巻 . 2016 . G399-G409 .

[学会発表](計7件)

佐藤 慶太郎、成田 貴則、加藤 治、杉谷 博士 .
耳下腺腺房細胞における MARCKS リン酸化と局在変化のイソプロテレノール誘発性アミラーゼ分泌への関与 .
第 57 回歯科基礎医学会学術大会 .

2015 年 9 月 11 日 ~ 2015 年 9 月 13 日、
朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

佐藤 慶太郎、成田 貴則、加藤 治、杉谷 博士、瀬尾 芳輝 .
ラット膵外分泌腺アミラーゼ分泌における MARCKS リン酸化および局在変化の関与 .
第 93 回日本生理学会大会 .
2016 年 3 月 22 日 ~ 2016 年 3 月 24 日、
札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Keitaro Satoh .

Involvement of MARCKS phosphorylation and translocation in amylase release in exocrine gland acinar cells .
The 4th International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen .
2016 年 11 月 30 日 ~ 2016 年 12 月 2 日、
岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

Keitaro Satoh, Takanori Narita, Osamu Katsumata-Kato, Hiroshi Sugiya, Yoshiteru Seo .

Involvement of MARCKS phosphorylation and translocation in pancreatic acinar cells .
Gordon Research Conferences Salivary Glands & Exocrine Secretion .
2017 年 2 月 19 日 ~ 2017 年 2 月 24 日、
ガルベストーン (アメリカ合衆国)

佐藤 慶太郎、柏俣 正典、杉谷 博士 .
ラット耳下腺腺房細胞 アゴニスト刺激によるアミラーゼ分泌における MARCKS リン酸化を介した PLD の関与 .
第 94 回日本生理学会大会 .
2017 年 3 月 28 日 ~ 2017 年 3 月 30 日、
アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

佐藤 慶太郎、柏俣 正典、瀬尾 芳輝、杉谷 博士 .
外分泌腺タンパク質分泌における MARCKS リン酸化と局在変化 . 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 .
2017 年 9 月 16 日 ~ 2017 年 9 月 18 日、
松本歯科大学 (長野県・松本市)

佐藤 慶太郎、柏俣 正典 .
耳下腺および膵アミラーゼ分泌における MARCKS と PLD の関与 .
第 95 回日本生理学会大会 .
2018 年 3 月 28 日 ~ 2018 年 3 月 30 日、
サンポートホール高松 (香川県・高松市)

6. 研究組織

研究代表者
佐藤 慶太郎 (SATOH, Keitaro)

朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号：10549041