

平成21年5月22日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590192  
 研究課題名（和文） プロテインフォスファターゼが外分泌機構で果たす役割の形態機能解析  
 研究課題名（英文） Morphological and functional analysis which protein phosphatases play a role in regulating the exocrine mechanism  
 研究代表者  
 齋野 朝幸（SAINO TOMOYUKI）  
 岩手医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：40305991

## 研究成果の概要：

外分泌細胞として耳下腺を用い、アラキドン酸（AA）刺激時の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変動 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) とプロテインフォスファターゼ (PPases) の関係を解析した。AA 刺激によって  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を認めた。PPases 抑制剤のカリキュリン A によって、AA 誘発性  $Ca^{2+}$  流入が増強された。詳細な解析によって非興奮性細胞の耳下腺細胞でもプロテインキナーゼ A (PKA)、A キナーゼ結合タンパク (AKAP) とリアノジン受容体が大きな分子コンプレックスを形成していることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、分泌現象においてセカンドメッセンジャーの変動、すなわち細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇やサイクリック AMP (cAMP) 動態が必須要件であるといわれてきたが、それが分泌を

どのようにして引き起こすか不明な点が多い。

そこで細胞内情報伝達系において、 $Ca^{2+}$  と cAMP およびプロテインフォスファターゼ (PPases) の相互関係が存在していることが

伺われるが、鳥瞰的に整理された図を描くに至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、耳下腺あるいは涙腺といった外分泌細胞という機能単位の中で、カルシウム濃度変動とキナーゼ系・PPase系の動態変化を経時的に観察し、解析することである。当該研究期間では、まず正常外分泌細胞内での変化を観察し、その実験結果をもとに外分泌腺の疾患の病態解明へ進むことを目標とした。

(到達目標) ; 外分泌腺における細胞内情報伝達系の相関を明らかにするため、6段階の到達目標を定めた。

(1) 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動やフリーラディカル(例:一酸化窒素)の産生をイメージングできる腺細胞および腺房標本を、耳下腺・涙腺から作製する。

(2) セリン/トレオニンホスファターゼの同定と局在化を観察する。

(3) 耳下腺や涙腺での $Ca^{2+}$ シグナリングにおけるPPasesの役割を決定する。腺細胞にAA、カルバコールおよびタブシガルジンを投与して細胞がどのような反応を示すか、イメージング法で検討する。さらに、PPasesの促進剤あるいは抑制剤の効果を定量化する。

(4) 上記反応がどのように分泌に影響を及ぼすか生化学的に検討する。

(5) 組織形態(腺房構造)を維持した細胞と、単離細胞の反応性( $[Ca^{2+}]_i$ 動態と分泌能)がどのように異なるか検証する。

(6) 細胞内局所のカルシウム変動が、PPasesの活性化に大きな意味を持つてくる。そこでミトコンドリアや核の $[Ca^{2+}]_i$ の動態も検討する。また、小胞体の $[Ca^{2+}]_i$ の変動を見るプローブ開発を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動やフリーラディカル(含、一酸化窒素 NO)の産生をイメージングできる標本を各種腺組織で作製する。

①細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動やフリーラディカルの産生をイメージングできる標本作製する。外分泌細胞として耳下腺細胞を使用し、この細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 動態を、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon RCM/Ab-既設)を用いて観察する。

(2) セリン/トレオニンホスファターゼの同定と局在を観察する。

①耳下腺細胞ではアミラーゼ分泌でのcAMP依存性制御におけるPPasesの役割は完全に解明されていないが、我々の予備実験からPKA、AKAPに作用していると予測される。

(3) 標本周囲を灌流し、刺激薬物としてアラキドン酸(AA)—細胞内情報伝達カスケードを刺激、タブシガルジン—細胞内カルシウム貯蔵場を枯渇、カルバコール—受容体刺激等を用い、それぞれどのように反応が違うかどうか $[Ca^{2+}]_i$ を指標として検討する。

① $[Ca^{2+}]_i$ 変動についても特に $Ca^{2+}$  releaseと $Ca^{2+}$  entryに分けて解析する。

② $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はNOS活性上昇を引き起こし、ひいてはNO産生をおこす可能性があるため、NOのイメージングもおこなう。

(4) 上記アゴニストの $Ca^{2+}$ シグナリングにおけるメカニズムをセリン/トレオニンキナーゼ・ホスファターゼの役割を中心に検討する。

## 4. 研究成果

当該研究期間で以下の結果が得られた。

(1) AA刺激によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。

(2) PPases抑制剤のcalyculin Aによって、アラキドン酸誘発性 $Ca^{2+}$  entryが増強された。

(3) calyculin Aはcapacitative calcium entryを完全に抑制するが、反対にnon capacitative calcium entryを増強させ、こ

の増強はPKA依存性であることがわかった。

(4) PKAがリアノジン受容体に直接作用するかどうか検討したところ、リアノジン受容体阻害剤のテトラカイン存在下ではその反応を回復させることはなく、間接的に受容体に作用していることが示唆された。

(5) PKAの結合タンパク(AKAP)阻害剤のStHt31によって(1)で認められた反応が完全に阻害された。

以上の結果から総合して考えるとPKA、AKAPとリアノジン受容体が大きな分子コンプレックスを形成していることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Saino T, Watson EL (2009) : Inhibition of serine/threonine phosphatase enhances arachidonic acid-induced  $[Ca^{2+}]_i$  via protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol.* (査読有) 296(1): C88-96.
2. Saino T, Misaki T, Matsuura M, Shikanai T, Satoh Y (2008) : Dipyridamole inhibits intracellular calcium transients in isolated rat arteriole smooth muscle cells. *Arch Histol Cytol.* (査読有) 71:235-247.
3. Russa AD, Ishikita N, Masu K, Akutsu H, Saino T, Satoh Y (2008) : Microtubule remodeling mediates the inhibition of store-operated calcium entry (SOCE) during mitosis in COS-7 cells. *Arch Histol Cytol.* (査読有) 71:249-263.
4. Misaki T, Satoh Y, Saino T, Ogawa A (2008) : Immunohistochemical localization of protease-activated receptors in cerebral and testicular arterioles of

rats: their dependence on arteriole size and organ-specificity. *Arch Histol Cytol.* (査読有) 71:179-184.

5. Kuroda T, Saino T (2007) : Application of tomato lectin and phalloidin in morphological analyses of the vascular network of various tissues : With special reference to postnatal development of skin. *J Iwate Med Assoc.* (査読有) 59:111-126.

[学会発表] (計 27 件)

1. Saino T, Watson EL, Satoh Y : Protease-activated receptor 2 induces  $Ca^{2+}$  entry via non capacitative calcium entry in rat parotid glands. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2008, Dec, San Francisco
2. Ishikita N, Masu K, Russa AD, Kuroda T, Akutsu H, Saino T, Satoh Y : Aberrant intracellular calcium dynamics of neurohypophysis of thalidomide-induced autistic rats. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2008, Dec, San Francisco
3. Masu K, Saino T, Kuroda T, Matsuura M, Russa AD, Ishikita N, Satoh Y :  $Ca^{2+}$  imaging revealed regional differences of 5-HT receptors in cerebral and testicular arterioles of rats: dependence on arteries size and organ specificity. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2008, Dec, San Francisco
4. Russa AD, Saino T, Akutsu-Yamauchi H, Satoh Y : Microtubule remodeling mediates the inhibition of store-operated calcium entry (SOCE) during mitosis in COS-7 cells. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2008, Dec, San Francisco

5. Matsuura M, Kuroda T, Saino T, Satoh Y: ATP-induced intracellular calcium dynamics in prostatic smooth muscles of golden hamsters. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2008, Dec, San Francisco
6. Tamagawa Y, Matsuura M, Saino T, Satoh Y: Comparison of effects with respect to diuretics on intracellular calcium dynamics in rat testicular arteriole smooth muscle cells. The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2008, Dec, San Francisco
7. 齋野朝幸, Eileen L. Watson, 佐藤洋一: ラット耳下腺における細胞内カルシウム動態を指標としたProtease-activated receptor 2 機能の検討。第54回日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会 2008年9月 郡山
8. 齋野朝幸、ワトソン アイリーン、佐藤洋一: ラット耳下腺における細胞内カルシウム動態に及ぼすProtease-activated receptor 2 の役割。第113回日本解剖学会全国学術集会 2008年3月 大分
9. Satoh Y, Masu K, Saino T, Misaki T.:  $Ca^{2+}$  imaging of vascular smooth muscles indicates that PARs play a role in tissue circulation in brain. 47th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2007, Dec, Washington DC
10. Saino T, Matsuura M, Satoh Y: Dipyridamole Inhibits Intracellular Calcium Transients in Isolated Rat Arteriole Smooth Muscle Cells. 47th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2007, Dec, Washington DC
11. Akutsu-Yamauchi H., Hitomi J., Satoh Y.: Imaging analysis of vomeronasal sensory cell in male rats -  $[Ca^{2+}]_i$  is evoked by female urinary stimulation. 47th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2007, Dec, Washington DC
12. Shikanai Y, Saino T, Akutsu-Yamauchi H., Satoh Y: Comparison of intracellular  $Ca^{2+}$  sequestration system between peripheral limbus and central cornea epithelia. 47th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2007, Dec, Washington DC
13. Satoh Y, Saino T, Akutsu-Yamauchi H.: Confocal microscopy for dynamic morphology of living tissue/cells: with special reference to  $Ca^{2+}$  dynamics in peripheral nervous system. 14th International Symposium of Morphological Sciences, 2007, Aug, Budapest (Hungary)
14. 齋野朝幸、松浦 誠、佐藤洋一、熊谷美保: 生組織カルシウムイメージング法が示す細胞の多様性。日本顕微鏡学会第63回学術講演会 2007年5月 新潟
15. 齋野朝幸, Kerry L. Jacobon, Dennis H. DiJulio, Eileen L. Watson, 佐藤洋一: プロテインフォスファターゼ抑制はアラキドン酸誘発性細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇を増強する。第112回日本解剖学会全国学術集会 2007年3月 大阪
16. Russa AD, Akutsu H, Saino T, Satoh Y: Intracellular calcium ion dynamics vary with the cell cycle phases in COS-7 cells. 第112回日本解剖学会全国学術集会 2007年3月 大阪
17. Saino T, Kuroda T, Matsuura M, Satoh Y: Comparison of effects of serotonin (5-HT) on intracellular calcium dynamics between rat testicular and cerebral arterioles. 46th American Society for Cell

Biology Annual Meeting, 2006, Dec, San Diego

18. Satoh Y, Nakamura Y, Oosaka M, Saino T: Extracellular ATP-induced intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics without following normal exocytosis. 46th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2006, Dec, San Diego

19. Kuroda T, Akutsu H, Matsuura M, Saino T, Kobayashi S, Hitomi J, Satoh Y: ATP-induced intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics in fibroblasts of rats. 46th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2006, Dec, San Diego

20. Matsuura M, Kuroda T, Saino T, Satoh Y: Effect of ATP on calcium dynamics in prostatic smooth muscle cell of golden hamsters. 46th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2006, Dec, San Diego

21. Akutsu H, Hitomi J, Satoh Y: Imaging analysis of responses of sensory neuron in rat vomeronasal epithelium to urine substances. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2006, Oct, Atlanta

22. Satoh Y, Satou H, Saino T, Matsuura M, Akutsu H: Evaluation of effects of neurotransmitters and  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists on smooth muscles of rat prostate gland; Application of digital imaging analysis of  $[Ca^{2+}]_i$  dynamics. The 16th International Microscopy Congress, 2006, Sept, Sapporo

23. Misaki T, Satoh Y, Saino T: Effect of thrombin and trypsin on intracellular calcium ion dynamics of vascular smooth muscles with special reference to cerebral arterioles. The 16th International

Microscopy Congress, 2006, Sept, Sapporo

24. Saino T, Kuroda T, Matsuura M, Satoh Y: Comparison of effects with respect to serotonin (5-HT) on intracellular calcium dynamics between rat testicular and cerebral arteriole smooth muscle cells. The 16th International Microscopy Congress, 2006, Sept, Sapporo

25. Akutsu H, Satoh Y: Live Cell Imaging in Vomeronasal Epithelium: Urinary substance make change the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of the sensory cells. The 16th International Microscopy Congress, 2006, Sept, Sapporo

26. Kuroda T, Misaki T, Saino T, Satoh Y, Kobayashi S: Three dimensional image analysis of the skin microvasculature of rats. The 16th International Microscopy Congress, 2006, 9, Sapporo.

27. Satoh Y, Misaki T, Saino T: Proteases induced intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics of smooth muscles of arterioles via RARs1 and 2. 7th Joint Meeting of The Histochemical Society & The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry, 2006, Aug, Hawaii

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋野 朝幸 (SAINO TOMOYUKI)  
岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40305991

### (2) 研究分担者

佐藤 洋一 (SATO YOICHI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40118253  
阿久津 仁美 (AKUTSU HITOMI)  
岩手医科大学・医学部・ポストドクター  
研究者番号：30398482

### (3) 連携研究者