

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791368
 研究課題名（和文）新規情報伝達タンパク質の唾液分泌調節における役割の解明
 研究課題名（英文）Roles of a novel signaling molecule in salivary secretion
 研究代表者
 竹内 弘（Takeuchi Hiroshi）
 九州大学・大学院歯学研究院・助教
 研究者番号 70304813

研究成果の概要：新しい情報伝達タンパク質分子、PRIPを見いだした。この分子の唾液分泌における役割を解明するための第一歩として、細胞の種々の分泌現象に対する影響を調べた。PRIPを持っていない細胞と持たせる様に遺伝子で強制的に発現させた細胞を用いて比較しながら、多面的に分泌現象を調べると、PRIPは分泌現象に抑制的に作用していることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 390,000 | 3,690,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：シグナル伝達、分泌機構、イノシトールリン脂質、カルシウム、リン酸化

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞内情報伝達に関わる新規のイノシトール 1,4,5-三リン酸 [Ins(1,4,5)P₃] 結合性タンパク質を発見し、PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) と名付けたが、その細胞内機能は不明である。

唾液は口腔機能発揮の重要な一端を担っており、約800万人にも上る口腔乾燥症（ドライマウス）が社会的に認知されることなどから唾液の分泌機構の解明が望まれている。水チャネル（アクアポリン）などの重要な分子群が相次いで見出されているうえ、

その顆粒分泌には、他組織における分泌過程では必須とされる細胞内カルシウム変動を介さないことが明らかとなるなど、複雑な分泌調節機構の詳細に語るには至っていない。

2. 研究の目的

新規分子、PRIPの唾液を始めとする細胞の種々の分泌現象における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

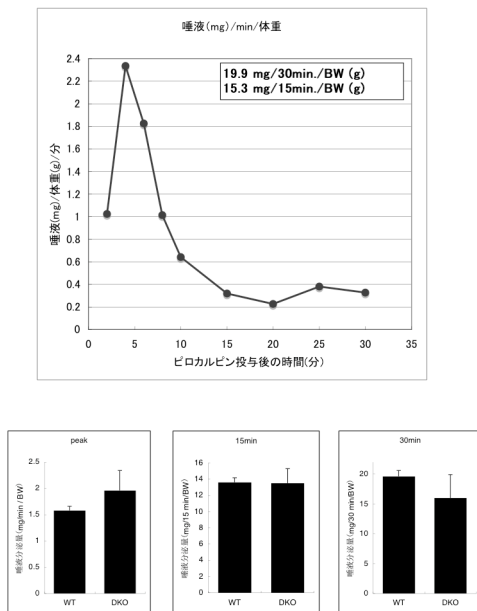
- (1) PRIP-KOマウスを用いて野生型と比較しながら唾液の分泌程度などを検討する。
- (2) 試験管内実験によって膜融合における

PRIP の働きを調べる。(3) 唾液腺や他の細胞を用いて、漏出化したり、あるいはインタクトなまま用いて分泌に対する PRIP の働きを調べる。

4. 研究成果

(1) PRIP-KO マウスを用いてピロカルピン刺激による唾液分泌量を測定したところ、遺伝子変異マウスの方が野生型と比較して僅かに唾液分泌量が多い傾向にあったが、統計的有意差を認めるには至らなかった。

下に(上段)ピロカルピン刺激後のマウスの唾液分泌時間経過(下段)野生型及び PRIP ノックアウトマウスにおけるピロカルピン刺激後マウスからの唾液分泌量の比較結果(ピーク値、15分間及び30分間)を示す。



但し、個体レベルでは刺激強度の細かい調節が困難であることが原因で PRIP による分泌調節への関与が見いだせなかった可能性が大きい。そこで、細胞レベルでの実験を行うために、マウスから唾液腺細胞を単離し、外来遺伝子の導入法の検討を行った。リポフェクション、エレクトロポレーション法を含めて種々の条件を検討したが、いずれの条件でも1割の導入効率に届かず唾液腺細胞を用いた実験には困難が伴うことが予測された。

そこで、分泌を再現よく定量的に観察でき、さらには遺伝子導入も容易に行える他の細胞を用いて PRIP の役割を解明することを第

一步に行うこととした。

(2) 膜融合に必須の分子群(SNARE)を含んだドナーやターゲットのリポソーム(一部のリン脂質に蛍光分子を導入して、蛍光強度の増加を膜融合の指標とする実験系)を用いて外来性に添加した PRIP 分子の影響を検討した。ターゲットリポソームにホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] を含ませただけでは膜融合の亢進は観察されないが、その際に CAPS (Ca²⁺-activated protein for secretion) を加えると膜融合は著明に亢進した。PRIP の全長分子さらには PH ドメインのみを添加したが、用量に応じて膜融合の抑制が認められた(図参照)。

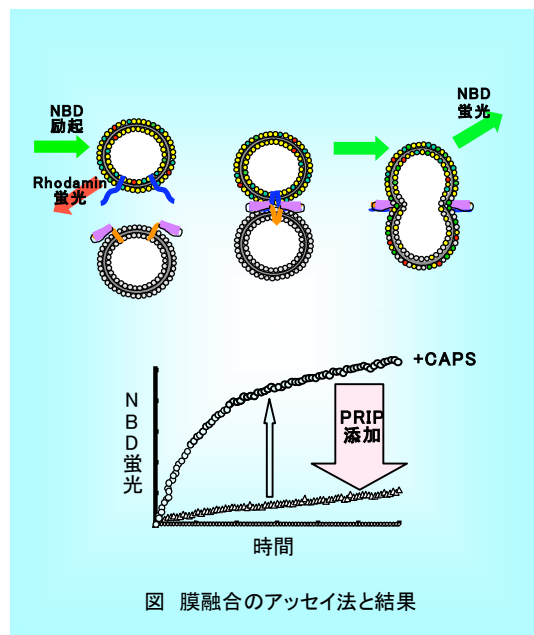


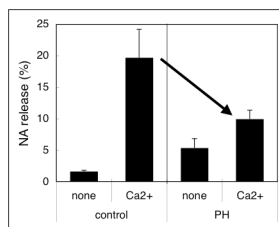
図 膜融合のアッセイ法と結果

(3) PC12 細胞は内在性に PRIP を有していない。そこで、安定的に全長 PRIP やその PH ドメインを発現する細胞株を数種類ずつ構築した。野生型を含めていずれの細胞株も高 K⁺ 刺激に応じてノルアドレナリン (NA) を分泌するが、全長 PRIP やその PH ドメインを発現する細胞株ではその分泌程度が低かった。構築した細胞株のロットによって抑制程度はまちまちであった。しかし、電気泳動によって発現している PRIP あるいはその PH ドメインの量を調べると抑制程度と良い対応を示した。これらの結果は、PRIP 分子は分泌現象には抑制効果を持つことを示している。さらに、少なくともその一部は PH ドメインを介していることを示している。

サポニンあるいはジギトニンで PC12 細胞を漏出化した。サポニンで漏出化した細胞で

は、高 Ca^{2+} (1 μM 程度) の添加による NA 遊離は認められず、また脳抽出液を加えても同様で、細胞内の有芯小胞を分泌するためのマシナリーが破壊されていると思われた。ところがジギトニン処理では高 Ca^{2+} の添加による NA 遊離が認められた。しかしながら、ATP を含まない溶液中に 30 分以上放置すると NA 遊離は認められなくなった。そこに、ATP を加えておくと継続して NA 遊離を認めることが出来た。

これらのジギトニン漏出化細胞を用いた実験の際に、PRIP あるいはその PH ドメインを安定的に発現する細胞株を用いるとジギトニン漏出化後でも内在性の PRIP やその PH ドメインは細胞内に保持されており、NA 放出は一樣に予測される程度の差を示しながら抑制された (下図参照)。



これらの結果は、一義的にはインタクト細胞で見られたのと同様に PRIP が分泌現象に抑制的な作用を持つことを明確に示している。更には、ジギトニン処理は細胞の小胞放出マシナリーにとっては非常にマイルドであること、内在性のホスファターゼによって小胞遊離に重要な分子の脱リン酸化が起って放出現象が認められなくなること、ATP 存在下では内在性キナーゼによって、その重要分子のリン酸化程度が維持されて、小胞放出に至るということを明確に示している。ATP を添加する際に脳抽出液を併せて存在させると更に高度の分泌現象が認められた。脳抽出液中に含まれているキナーゼが内在性のものを補填するためであろう。PRIP およびその PH ドメインでタンパク質脱リン酸化酵素 (protein phosphatase、PP-1 と PP-2A) と結合して、特に PP-1 の活性調節に関わっているから、タンパク質分子のリン酸化/脱リン酸化の調節も検討しなければならない。この内在性にリン酸化/脱リン酸化によって放出を調節している分子 (群) を解明するために、タンパク質ホスファターゼの阻害剤やキナーゼ阻害剤などを添加して、NA 遊離を調べた。ATP 不在下にホスファターゼ阻害剤

を添加した場合には放出の減弱程度がやや (20% 程度) 緩和された、ATP 存在下にキナーゼ阻害剤を添加しておくとも NA 遊離はやや (20% 程度) 抑制された。この薬剤効果は野生型および遺伝子導入 PC12 細胞でも同様であった。これらの結果は、小胞放出マシナリーに属するタンパク質のリン酸化/脱リン酸化は現象の 20% 程度を説明出来るが、残りは他の分子に基づくことを示している。また、PRIP による抑制は PP-1 あるいは PP-2A との物理的な結合には無関係であるようである。現時点では積極的に示唆するデータはないが、これまでに蓄積されている報文による情報を考え合わせると、PI (4, 5)P₂ の量が重要な役割を果たしていると考えられる。

これらの結果を踏まえて、PRIP の作用点を分子レベルで解明していきたい。

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 3 件)

(1) Ogata, S., Kubota, Y., Yamashiro, T., Takeuchi, H., Ninomiya, T., Suyama, Y. and Shirasuna, K.: Signaling pathways regulating IL-1 alpha-induced COX-2 expression. *J. Dent. Res.* **86**, 186-191, 2007. (査読あり)

(2) 竹内 弘: 咬合不全は GABA_A 受容体の機能異常を引き起こすか: 九州地区連合歯科医師会会務報告書 pp22-24 2007 (査読無し)

(3) Gao, J., Takeuchi, H., Zhao, Z., Fujii, M., Kanematsu, T. and Hirata, M.: Binding of phospholipase C-related but catalytically inactive protein to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate via the PH domain. *Cell. Signal.* **21**, 1180-1186, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

(1) Gao, J., Takeuchi, H., Kanematsu, T. and Hirata, M.: Intramolecular regulation in membrane localization of pleckstrin homology domain of PRIP. The 5th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, Gyeongju, July 9-11, 2007.

(2) 竹内 弘、兼松 隆、松田美穂、塩井誠次郎、平田雅人: 開口分泌現象への PRIP 分子の関わり: 第 117 回日本薬理学会関東部会 10 月 6 日 東京都 2007

(3) Takeuchi, H., Gao, J., Cantley, L.C. and Hirata, M.: A multimodular protein, phox

homology domain-containing protein kinase like protein, binds actin and is involved in receptor trafficking. International Symposium in Membrane Traffic, Awaji Yumebutai, Nov. 27-29, 2007.

- (4) Gao, J., Takeuchi, H., Kanematsu, T. and Hirata, M.: Differential membrane localization of pleckstrin homology domains from 2 isoforms of phospho- lipase C-related inactive protein. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会 合同大会 12 月 11～15 日、横浜市、2007
- (5) Takeuchi, H., Gao, J., Cantley, L.C. and Hirata, M.: PXX, phox homology domain containing protein kinase-like protein, is an actin binding protein involved in receptor trafficking. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会 合同大会 12 月 11～15 日、横浜市、2007
- (6) Takeuchi, H.: A new member of phox homology domain-containing protein family binds actin and is involved in receptor trafficking. KUSCR Japan/Korea Symposium on Cellular Signaling, December 17, 2007, Fukuoka
- (7) Gao, J., Takeuchi, H., Kanematsu, T. and Hirata, M.: Intramolecular inhibition in the membrane localization of pleckstrin homology domain from phospholipase C-related inactive protein. 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athens, Greece, June 28-July 3, 2008
- (8) 竹内 弘、兼松 隆、平田雅人：咀嚼が脳における GABA_A 受容体分子に及ぼす影響の解析：第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 23 日～25 日 東京都江東区 2008
- (9) 高 靖、竹内 弘、兼松 隆、平田 雅人：Roles for the membrane localization of pleckstrin homology domain from phospholipase C-related inactive protein in dense-core vesicle exocytosis. 第 31 回日本日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 12 月 9 日～12 日 神戸市 2008
- (10) 竹内 弘、高 靖、平田 雅人：Phox homology domain containing protein kinase-like protein is involved in receptor trafficking. 第 31 回日本日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 12 月 9 日～12 日 神戸市 2008

[その他]

ホームページ：

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a04/index.html>

6. 研究組織 (1) 研究代表者

竹内 弘 (TAKEUCHI HIROSHI)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：70304813