

様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592161

研究課題名（和文）ラット耳下腺腺房細胞のプロテオミクスとリン酸化基質タンパク質の分泌における役割

研究課題名（英文）Identification by proteome analysis and the role of substrate protein for phosphorylation in the rat parotid acinar cells

研究代表者 下村 浩巳 (SHIMOMURA HIROMI)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号：40139259

研究成果の概要：ラット耳下腺腺房細胞のプロテオーム解析によって FGF-13 が同定された。腺房細胞に FGF-13 の mRNA が発現していること、および免疫組織化学によって尖端膜に局在していることを確認した。このことは FGF-13 が分泌に対して何らかの働きをしていると示唆された事からその機能について現在検討中である。他方、kinase A および CDK5 に対するリン酸化サイトを分子内に有するタンパク質（shimo-7）が同定され、その抗体やペプチド断片を化学合成し、現在それらを用いて分泌との関わりを鋭意検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：耳下腺，kinase A，リン酸化，開口放出，プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの内分泌・外分泌における開口放出には細胞内 Ca イオンの上昇が関わっているが、唾液腺のそれには cAMP が関わる。

(2) 一般に cAMP の役割は、cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (kinase A) の活性化とそれに続く細胞内基質タンパク質のリン酸化である。唾液腺において Kinase A は核内タンパク質である cAMP 応答配列結

合タンパク質 (CREB) をリン酸化し CREB 結合タンパク質と結合することによって遺伝子発現を亢進する事が知られている。

(3) 唾液腺における開口放出の際の分泌顆粒の移動や膜融合に kinase A がどのように関わっているかは不明である。細胞質や顆粒膜上に存在する kinase A の基質タンパク質について明らかにすることは、cAMP を細胞内情報伝達物質とする開口放出機構

解明に大きく寄与することが期待される。

2. 研究の目的

(1) プロテオーム解析で同定された FGF-13 の唾液腺における役割を明らかにする。

(2) Kinase A のリン酸化基質とされる膜タンパク質成分を同定し、開口放出との関わりを明らかにする。

(3) kinase A のリン酸化サイトを有する CDK5 の inhibitor が amylase 分泌を抑制することから、CDK5 が分泌に関与していると推定される。このことから CDK5 の耳下腺における活性化の解明機構に興味がある。

3. 研究の方法

ラット耳下腺腺房細胞をトリプシンおよびコラゲナーゼで処理し腺房細胞を調製する。

(1) 腺房細胞を isoproterenol と処理し、すぐに細胞を破碎し膜画分を調製し、2 次元電気泳動に付す。コントロール細胞膜成分との泳動像を比較検討し、リン酸化タンパク質を検索し、候補スポットをプロテオーム解析する。

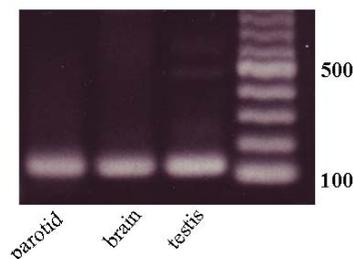
(2) ①プロテオーム解析の結果から当該タンパク質の遺伝子発現を確認する。

②遺伝子発現を確認した後に、ペプチド合成を行い、また、抗体を作成し耳下腺における発現およびその細胞内における部位を調べる。

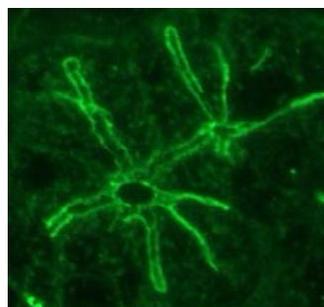
③耳下腺細胞から膜透過性細胞を調製し、作成した抗体、ペプチド等を細胞内に導入して isoproterenol による分泌への影響を検討する。

4. 研究の成果

(1) FGF-13 の耳下腺腺房細胞での発現とその機能：プロテオーム解析により腺房細胞で FGF-13 が同定されたことから、その発現を J Invest Dermatol 122:1084 (2004) 記載の primer を用いた RT-PCR により確認した。下図に示すように、brain, testis と共に parotid においても理論値 128bp 付近にバンドを認めた。更に、同論文で使用されている抗体を用いて腺房細胞に対して免疫組織化学反応を行い FGF-13 の局在を調べた。

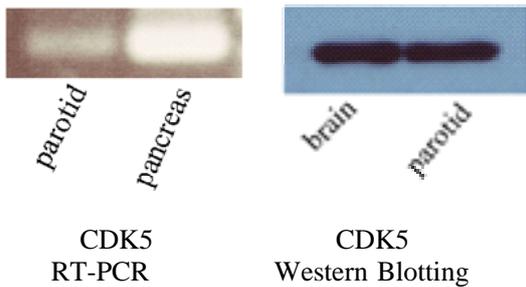


図に示したように、FGF-13 は、腺房細胞の尖端膜に存在することが明らかとなった。FGF-13 は典型的な kinase A によるリン酸化サイトは有しないが、近似したアミノ酸配列を有するサイトを数多く有することから、kinase A によるリン酸化反応の基質タンパク質として機能することが考えられる。現在、FGF-13cDNA からタンパク質



を合成し、kinase A によるリン酸化および分泌への影響を精査中である。他方、FGF は成長因子であることから、ラット、マウスの唾液腺発生過程における FGF-13 の変動に興味を持っている。

(2) CDK5 の分泌への関与：cyclin dependent kinase (CDK) は cyclin と共に細胞周期を調節していることが知られている。それらの内で、CDK5 は結合する cyclin が存在しないことから主な作用は細胞周期以外と考えられており、B 細胞では insulin 分泌に関与していることが知られている。CDK5 は kinase A のリン酸化サイトを有することから、耳下腺における発現と、分泌における関与を検討した。CDK5 の inhibitor である olomoucine および構造類似で抑制しない iso-olomoucine を膜透過性腺房細胞に導入し、isoproterenol による amylase 分泌への効果を調べた。その結果、olomoucine は分泌を抑制するが、iso-olomoucine は抑制しない事が明らかとなった。他方、腺房細胞から調製した mRNA に対する RT-PCR により CDK5 の発現を確認することが出来たが、通常 CDK5 を活性化するとされている p35/25 の発現を確認できなかった。



これらの事から、耳下腺において CDK5 は p39 により活性化されるのではなく、Spy/Ringo あるいは未知のタンパク質を介し活性化され尖端膜にある Munc18 等の CDK5 リン酸化反応の基質をリン酸化し分泌に関わっていると推定されたことから、現在検証中である。

(3) Shimo-7 の唾液分泌における役割：プロテオーム解析により、分子量 19 kDa のタンパク質 (Shimo-7) が候補としてあがってきた。Shimo-7 は kinase A によるリン酸化サイトを 2 カ所、また、CDK5 によるリン酸化サイトを 1 カ所有することから、その発現及び機能について検討を行った。

耳下腺由来の cDNA の調製が不備なためか、あるいは primer の設計が好ましく無いためか、これまでの所 RT-PCR により発現を認めていない。平衡して shimo-7 の peptide 数カ所の化学合成を行い、また一つを選び抗体を作成し、発現及び peptide を用いた分泌に対する作用を検討した。

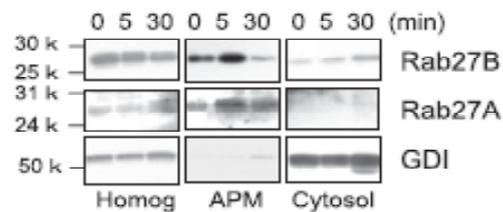
リン酸化サイトを含む peptide を膜透過性細胞に導入し、isoproterenol による分泌に対する効果を調べた所、kinase A の inhibitor として知られる PKI tide と同様に著しい抑制効果を示さなかった。現在、抗体を導入し、その効果を検討中である。

(4) Rab27, effector タンパク質の刺激後の挙動：先に、耳下腺腺房細胞の isoproterenol による amylase 分泌に低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab27 が関与すること、さらにその effector タンパク質である Noc 1, Slac2-c/MyRIP や Slp4-a/granuphilin なども関与していることを報告した。本研究では、isoproterenol 刺激後のそれらのタンパク質の挙動について検討した。その結果、

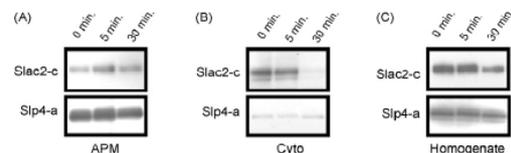
① Rab27 は刺激前には、主に分泌顆粒膜に存在しているが、isoproterenol 刺激 5 分後には尖端膜へ移動しその後、細胞質へ拡散することが判明した。また、尖端膜から

細胞質への移動には、GDI が関与し、Rab27-GDI complex を形成することによってなされることを明らかにした。

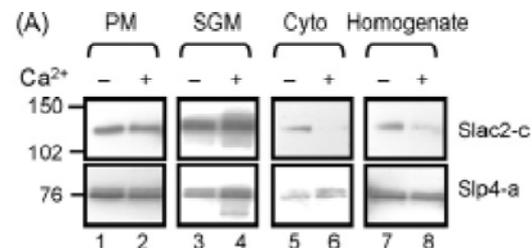
② isoproterenol 刺激前には、Slac2-c や Slp4-a は尖端膜および分泌顆粒膜を主とする膜上に存在しているが、刺激後 5 分では、Slac2-c は尖端膜へ移動し、その後細胞質へ移動したものは Ca イオン依存性のタンパク質分解酵素の作用によって分解されると推定された。他方、Slp4-a は刺激によってその移動には大きな変化がないと判断された。



Effects of isoproterenol (IPR) treatment on the distribution of Rab27B, Rab27A, and Rab-specific GDP dissociation inhibitor (GDI) in the homogenate (Homog), in the apical plasma membrane (APM) fraction, and in the cytosol (Cytosol).



Effects of IPR treatment on distribution of Slac2-c and Slp4-a in the APM fraction, cytosol fraction and total homogenate.



Proteolysis of Slac2-c, but not Slp4-a, by endogenous Ca²⁺-dependent proteases. After parotid homogenate was incubated with or without 1 mM CaCl₂ and 2mM EGTA, plasma membrane (PM), secretory granule membrane (SGM), cytosol (Cyto) fractions and total homogenate were prepared and determined by Western blot analysis.

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4件)

① Nashida T, Yoshie S, Shimomura H, Imai A. Transferrin secretory pathways in rat parotid acinar cells. Arch Biochem Biophys. 2009; in press. 査読有り

② Imai A, Yoshie S, Nashida T, Fukuda M and Shimomura H. Redistribution of small GTP-binding protein Rab27B after isoproterenol-stimulation in rat parotid acinar cells. Eur J Oral Sci., 117: 224-230, 2009. 査読有り

③ Imai A, Fukuda M, Yoshie S, Nashida T, and Shimomura H. Redistribution of Rab27-specific effector Slac2-c, but not Slp4-a, after isoproterenol-stimulation in rat parotid acinar cells. Arch Oral Biol. 54:361-368, 2009. 査読有り

④ Nashida T, Imai A, Shimomura H, Yoshie S, Yokosuka H, and Kumakura M. Unstimulated amylase secretion is proteoglycan-dependent in rat parotid acinar cells. Arch Biochem Biophys. 469: 165-173, 2008. 査読有り

[学会発表] (計6件)

1. 今井あかね: β 刺激後の耳下腺腺房における Rab27B、Slac2-c および Slp4-a の細胞内局在について, BMB, 12.9.2008, 神戸市.

2. NASHIDA, T: Secretory pathway of transferrin in rat parotid acinar cells, BMB, 12.9.2008, 神戸市.

3. 今井あかね: ラット耳下腺腺房細胞における Exocyst メンバーの検索と相互作用について, 歯科基礎医学会, 9.24.2008, 東京.

4. 梨田智子: ラット耳下腺からのトランスフェリン非刺激分泌経路の解明, 歯科基礎医学会, 9,24,2008, 東京.

5. NASHIDA,T: Secretion of transferrin from rat parotid acinar cells, JADR,

7.4.2008, Toronto.

6. IMAI, A: Isoproterenol-dependent redistribution of Rab27, Slac2-c and Slp4-a in parotid glands, JADR, 7.4.2008, Toronto.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下村 浩巳 (SHIMOMURA HIROMI)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号: 40139259

(2) 研究分担者

梨田 智子 (NASHIDA TOMOKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 10133464

今井 あかね (IMAI AKANE)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 60180080

(3) 連携研究者