

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870667

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) The study of exocytosis via common pathway of MARCKS phosphorylation in parotid and pancreatic exocrine glands

研究代表者

佐藤 慶太郎 (SATO, Keitaro)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：10549041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：外分泌腺開口分泌機構の解明を目指して、唾液腺および膵外分泌腺アミラーゼ分泌における Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) のリン酸化の関与について検討した。ラット耳下腺腺房細胞および膵外分泌腺腺房細胞を用いた実験により、PKC によるMARCKSのリン酸化が、耳下腺アミラーゼ分泌においても膵外分泌腺アミラーゼ分泌においても、関与していることが示唆された。さらに膵外分泌腺においては、脂質ラフトからMARCKSが離れることが、SNAREタンパク質の制御を介して、開口分泌に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：I investigated the role of Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) phosphorylation in parotid and pancreatic amylase release. This study suggest that MARCKS phosphorylation via the activation of PKC is involved in parotid and pancreatic amylase release. In pancreatic acini, MARCKS displacement from the membrane lipid rafts might play a role for exocytosis via regulation of SNARE proteins.

研究分野：生理学

キーワード：MARCKS 唾液腺 膵臓 外分泌 開口放出 PKC 腺房細胞 アミラーゼ

## 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、特に開口放出など細胞膜周辺で起こるダイナミックな反応に寄与していると考えられている。しかし、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すすめており、耳下腺腺房細胞において MARCKS のリン酸化が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、様々な外分泌腺での MARCKS の発現を検索し、耳下腺、顎下腺、舌下腺、涙腺、膵臓における MARCKS の発現を確認した。アミラーゼ分泌の細胞内シグナル伝達は、耳下腺ではサイクリック AMP、膵臓ではカルシウムイオンがそれぞれセカンドメッセンジャーとして働いていることが知られている。よって、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かかわらず、MARCKS の分泌への関与が共通である可能性が考えられた。本研究は、耳下腺および膵臓アミラーゼ分泌における MARCKS の役割を明らかにし、耳下腺・膵臓における共通の開口分泌機構を解明しようとするものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、外分泌腺の開口分泌のモデルとして唾液腺アミラーゼ分泌および膵外分泌腺アミラーゼ分泌を用いて、開口分泌の細胞内シグナル伝達における MARCKS のリン酸化の制御機構とその役割を明らかにし、開口分泌の分子機構を解明することを目的とした。

具体的には、以下の3項目である。

- (1) MARCKS のリン酸化とそれに伴う細胞内局在変化の解析
- (2) MARCKS をリン酸化させる PKC の検索
- (3) 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

## 3. 研究の方法

- (1) MARCKS のリン酸化とそれに伴う細胞内局在変化の解析

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βアゴニストのイソプロテレノール (IPR) を、膵臓腺房細胞に消化管ホルモンのコレシストキニン (CCK) をそれぞれ作用させ、ライセート、細胞膜、細胞質の画分を得た。各画分における MARCKS およびリン酸化 MARCKS の発現および局在をウェスタンブロッティング法および共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光免疫染色によ

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 および CCK 刺激前に PKC 阻害剤であるビスインドリルマレイミドを作用させ、MARCKS のリン酸化へどのような影響を与えるか、細胞膜や細胞質における MARCKS の局在はどう変化するか、検討した。また、これら阻害剤のアミラーゼ分泌への影響を Bernfeld の方法 (Bernfeld. Methods Enzymol, 1955) を用いて測定した。

- (2) MARCKS をリン酸化させる PKC の検索

腺房細胞に IPR および CCK を作用させ細胞膜画分を得た。この細胞膜画分に PKC の各アイソフォームに対する抗体を用いてウェスタンブロッティング法を行い、分泌刺激により細胞膜に動員される PKC を検討した。これにより、アミラーゼ分泌シグナルにおいて MARCKS をリン酸化させる PKC のアイソフォームを検索した。また、検索されたアイソフォームが分泌刺激により活性化を起し細胞質から細胞膜へ局在を変化させるか、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに、このアイソフォームに特異的な PKC 阻害剤を用いて、IPR および CCK 刺激による MARCKS のリン酸化やアミラーゼ分泌が抑制されることを確認した。

- (3) 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ーである 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。さらに MARCKS と同じフラクションに SNARE タンパク質があるか、検討した。

## 4. 研究成果

- (1) MARCKS のリン酸化・脱リン酸化とそれに伴う細胞内局在変化の解析

様々な外分泌腺での MARCKS の発現を検索したところ、耳下腺、顎下腺、舌下腺、涙腺、膵臓において検出した (図 1)。IPR または CCK を耳下腺腺房細胞または膵外分泌腺房細胞にそれぞれ作用させると、MARCKS はリン酸化し、リン酸化した MARCKS は細胞内局在が細胞膜から細胞質へと変化した。PKC 阻害剤であるビスインドリルマレイミドを作用させると、分泌刺激剤による MARCKS のリン酸化が抑制された。MARCKS の細胞内局在変化を阻害する MANS ペプチド (MARCKS 阻害剤) を作用させると、分泌刺激剤によるアミラーゼ分泌が抑制された (図 2)。以上より、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かかわらず、MARCKS の分泌への関与は共通であることが示唆された。

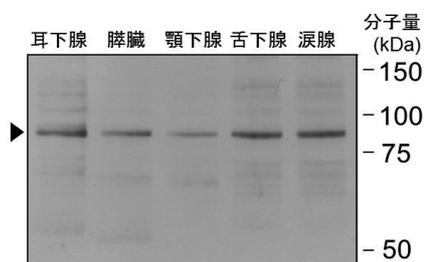


図1 MARCKSタンパク質の発現  
各臓器より腺房細胞を分離・調整し、得られたライセート画分に対して抗MARCKS抗体によるウェスタンブロッティングを行った。

### (2) MARCKS をリン酸化させる PKC の検索

耳下腺腺房細胞または膵外分泌腺腺房細胞において、PKC 阻害剤であるロテレリンをそれぞれ作用させると、分泌刺激剤による MARCKS のリン酸化およびアミラーゼ分泌が抑制された。分泌刺激剤を作用させると、PKC は細胞内局在が細胞質から細胞膜へと変化し、活性化した。MANS ペプチドを作用させても、PKC の活性化に影響しなかった。これらの結果、PKC による MARCKS のリン酸化とそれに続く細胞内局在変化が、耳下腺アミラーゼ分泌においても膵外分泌腺アミラーゼ分泌においても、制御機構として働いていることが示唆された。

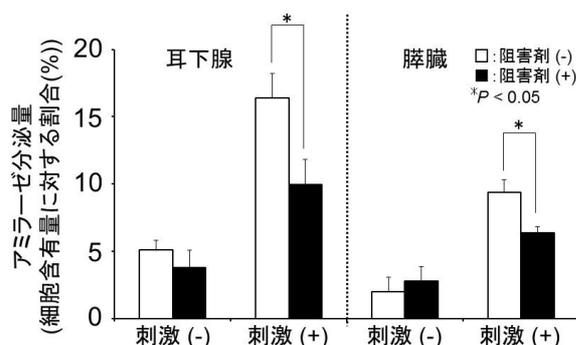


図2 アミラーゼ分泌におけるMARCKS阻害剤の効果  
腺房細胞を分離・調整し、MARCKS阻害剤存在下での刺激時および非刺激時のアミラーゼ分泌量を測定した。

### (3) 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

耳下腺および膵外分泌腺の両腺房細胞において、MARCKS の一部が細胞膜脂質ラフトに局在していた。分泌刺激剤を耳下腺腺房細胞または膵外分泌腺腺房細胞にそれぞれ作用させると、両腺房細胞において細胞膜脂質ラフトに MARCKS の局在は認められなくなった (図3)。膵外分泌腺腺房細胞において、MARCKS の局在する細胞膜脂質ラフトと同じ膜ドメインから、SNARE タンパク質であるシンタキシン 2 が検出された。これらの結果から、MARCKS は細胞膜脂質ラフトを介してアミラーゼ分泌に関与していることが示唆された。さらに膵外分泌腺腺房細胞にお

いては、分泌顆粒膜と細胞膜との膜融合に重要な役割を果たす SNARE タンパク質の一つであるシンタキシン 2 が、MARCKS の脂質ラフト機能調節におけるターゲットの一つである可能性が考えられた。

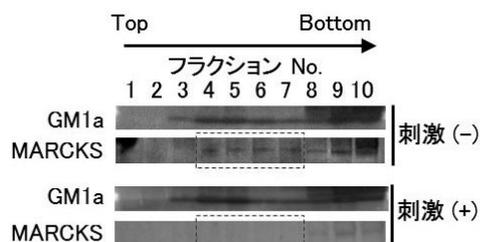


図3 MARCKSの一部は細胞膜脂質ラフト (GM1a-rich画分 [フラクションNo.4~7: 破線枠]) に局在し分泌刺激により脂質ラフトから離れた。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[学会発表] (計5件)

佐藤慶太郎、成田貴則、加藤治、杉谷博士、瀬尾芳輝 . 耳下腺腺房細胞における脂質ラフト局在 MARCKS リン酸化のアミラーゼ分泌への関与 . 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日 ~ 2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

佐藤慶太郎、成田貴則、杉谷博士 . 耳下腺および膵外分泌腺アミラーゼ開口分泌における MARCKS シグナリングの関与 . 第 56 回歯科基礎医学会学術大会総会、2014 年 9 月 25 日 ~ 2014 年 9 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

佐藤慶太郎、成田貴則、杉谷博士、瀬尾芳輝 . 耳下腺・膵外分泌腺における MARCKS リン酸化を共通としたアミラーゼ分泌メカニズム . 生理学研究所研究会、2014 年 8 月 4 日 ~ 2014 年 8 月 5 日、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

Keitaro Satoh, Takanori Narita, Hiroshi Sugiya. Involvement of MARCKS phosphorylation in amylase release in exocrine cells . 92nd General Session of the International Association for Dental Research、2014 年 6 月 25 日 ~ 2014 年 6 月 28 日、ケープタウン (南アフリカ共和国)

佐藤慶太郎、成田貴則、杉谷博士、瀬尾芳輝 . ラット膵外分泌腺腺房細胞アミラーゼ分泌における PKC $\delta$  による MARCKS リン酸化の関与 . 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日 ~ 2014 年 3 月 18 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)

6 . 研究組織

研究代表者

佐藤 慶太郎 ( SATOH, Keitaro )

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：10549041