

平成21年 6月 8日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791369  
 研究課題名 (和文) 蛍光分子センサーを用いた培養耳下腺細胞のイノシトール三リン酸のリアルタイム測定  
 研究課題名 (英文) Monitoring of inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics in cultured parotid cells using a fluorescent biosensor  
 研究代表者  
 根津 顕弘 (NEZU AKIHIRO)  
 北海道医療大学・歯学部・講師  
 研究者番号：00305913

## 研究成果の概要：

本研究は、我々の開発したIP<sub>3</sub>分子センサーLIBRAを唾液腺細胞に導入し、刺激によるIP<sub>3</sub>動態を明らかにすることを目的とする。LIBRAを腺房細胞に発現させるため、その初代培養法を検討した。培養細胞が腺房細胞としての形態と機能を保持していることを確かめ、腺房細胞へのGFP付加蛍光タンパク質の導入に成功した。またpH抵抗性の改良型LIBRAを開発した。細胞培養法をさらに改良し、改良型LIBRAにより培養腺房細胞のIP<sub>3</sub>動態を解析中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：歯科薬理学

科研費の分科・細目：歯科・機能系基礎歯科学

キーワード：イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>)、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度、唾液腺細胞、唾液分泌、細胞内情報伝達機構、受容体

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺細胞の受容体を刺激すると、腺腔側から基底側へCa<sup>2+</sup>上昇が波のように伝わる細胞内Ca<sup>2+</sup>ウェーブが観察される。このCa<sup>2+</sup>ウェーブの

発生機構に、ホスホリパーゼC(PLC)の活性化を介したイノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) の産生によるIP<sub>3</sub>受容体 (IP<sub>3</sub>R) からのCa<sup>2+</sup>放出が重要な役割を果たしている。細胞内Ca<sup>2+</sup>ウェーブの発生機構とし

て、IP<sub>3</sub>に対する感受性の高いIP<sub>3</sub>Rが腺腔側に存在し、そのIP<sub>3</sub>RからのCa<sup>2+</sup>放出によって惹起されるといった仮説が考えられているが、このような仮説を実証することは、生きた細胞のIP<sub>3</sub>濃度を測定する良いプローブが無かったことから困難であった。

近年、我々の開発したIP<sub>3</sub>分子センサーLIBRA含め、いくつかのIP<sub>3</sub>プローブが開発され、培養細胞のIP<sub>3</sub>動態をリアルタイムに測定することが可能となった。

唾液腺細胞にIP<sub>3</sub>分子センサーを導入することで、生きた唾液腺細胞のIP<sub>3</sub>動態を測定することが可能となる。しかし、唾液腺細胞は、培養系に移すことで細胞の極性が失われるといった唾液腺細胞の特徴的な機能が失われることが多く、このような分子センサーを唾液腺細胞に導入することは困難であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、唾液腺細胞における受容体刺激を介した細胞内IP<sub>3</sub>動態をリアルタイムでモニターし、細胞内のIP<sub>3</sub>産生とCa<sup>2+</sup>動態の相互関係を明らかにすることである。本目的を達成するため、1) 耳下腺腺房細胞の初代培養法の確立を試みる。2) IP<sub>3</sub>センサーLIBRAを腺房細胞に導入し、受容体刺激による細胞内IP<sub>3</sub>濃度のモニターを試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット耳下腺腺房細胞の初代培養

#### ① ラット耳下腺腺房細胞の初代培養法:

ラットを麻酔により屠殺後、耳下腺を摘出し、酵素処理によって単離腺房細胞を調整した。単離腺房細胞を10%血清入り培養液中あるいは牛血清アルブミン含有 Hanks' 緩衝液中で18-24時間培養した。最適な培養腺房細胞を得

るため、培養液、培養時間などを変えて検討した。得られた培養腺房細胞を、様々な染色法で染色し、腺房細胞としての構造を保持しているか否かを検討した。

#### ② 培養細胞のCa<sup>2+</sup>応答性の検討:

培養腺房細胞にCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬fura-2を取り込ませ、ムスカリン受容体刺激などによるCa<sup>2+</sup>応答を測定し、得られた腺房細胞が受容体刺激に対する反応性を保持しているか否かを検討した。

#### ① 培養腺房細胞への遺伝子導入法の検討。

効率のより遺伝子導入法を確立するため、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法などを検討した。発現したGFP付加タンパク質は蛍光顕微鏡により確認した。

#### ② GFPタンパク質発現培養細胞のCa<sup>2+</sup>応答性の検討:

GFPタンパク質の発現した培養腺房細胞のCa<sup>2+</sup>応答を測定し、得られた細胞が受容体刺激に対する反応性を保持しているか否かを検討した。

#### (3) 測定用 LIBRA の改良

よりpH抵抗性の高いLIBRAを作成するため、分子生物学的手法を用いて、LIBRAを構成するYFPをpH抵抗性の高いVenus (LIBRAv) に置換したものを作成した。またその構造をベースとしてpH、に抵抗性の高いIP<sub>3</sub>非感受性LIBRA (LIBRAvN)を作成した。

#### (4) LIBRAによる培養腺房細胞のIP<sub>3</sub>動態測定

腺房細胞にLIBRAを導入し、受容体刺激を介したIP<sub>3</sub>動態の測定を試みる。LIBRAの蛍光比変化測定は、AQUACOSMOS/ASHURA イメージングシステム(浜松ホトニクス)を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット耳下腺腺房細胞の初代培養

ラットより単離調製した耳下腺腺房細胞を細胞培養用培地あるいは Hanks 緩衝液中で 6~24 時間細胞を培養した。培養後の腺房細胞を光学顕微鏡で観察したところ、腺房細胞に特徴的な房状の構造が観察され、細胞内に分泌顆粒が観察された。

腺房細胞が受容体刺激に対する反応性を保持しているか否か確かめるため、培養腺房細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬を取り込ませ、受容体アゴニスト刺激に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答を調べた。培養腺房細胞をムスカリン受容体アゴニストのカルバコールで刺激したところ、用量依存的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 上昇が観察された (図 1)。この  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、培養時間を 18 時間以下に短縮することで改善した。

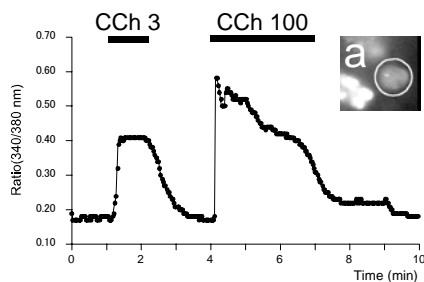


図 1: 培養 18 時間後の腺房細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答。

a) fura-2 を取り込ませた培養腺房細胞 (○)。カルバコール (CCh) 刺激による fura-2 蛍光比変化の経時測定。CCh 刺激は 3 および 100  $\mu\text{M}$  で行った。

##### (2) 培養腺房細胞への GFP 発現法

培養腺房細胞に LIBRA などの GFP 蛍光タンパク質を発現させるため、蛍光タンパク質発現ベクターの導入方法について検討した。マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、昆虫由来のバキュロウイルスを用いた方法、リポフェクション法などの方法を検討した。小胞体局在シグナルを付加した mKO (赤色蛍光タンパク質; ER-mKO) を腺房細胞に導

入を試みたところ、リポフェクション法によって、培養腺房細胞に ER-mKO の発現が観察された。(図 2; 発現効率 5% 以下)

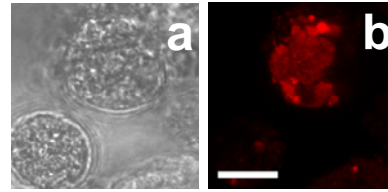


図 2: ER-mKO 発現ベクターを導入後、18 時間後の培養腺房細胞。a) 腺房細胞の透過像。b) ER-mKO の発現。Bar: 10  $\mu\text{m}$

培養した腺房細胞では、培養前と比べ強い自家蛍光が観察された。これは細胞培養が、腺房細胞の細胞内環境を変化させたことによるものと考えられ、このような自家蛍光は LIBRA の蛍光観察に影響を与える。そこで、これらの影響を抑制するため、以下の 2 つについて検討した。1) より細胞への負荷の少ない培養方法の確立、2) pH 変化などの環境変化に対しより安定なプローブの開発することである。

##### (4) 測定用 LIBRA の改良

pH 変化に対して抵抗性の高い LIBRA を開発するため、LIBRA を構成する YFP を Venus に改良した LIBRA<sub>v</sub> を作成した。この改良により、 $\text{IP}_3$  に対する感受性を保持し、pH 6~8 の範囲で安定なプローブとなった (図 3A)。

また LIBRA<sub>v</sub> をもとに、LIBRA<sub>v</sub> の  $\text{IP}_3$  結合部位 (レジジン 507 をアラニンに変換; K507A) に変異を加え、 $\text{IP}_3$  に対する感受性を消失させた LIBRA<sub>vN</sub> を作成した。

我々はこれらの改良型 LIBRA を用いて、培養細胞における細胞内  $\text{IP}_3$  濃度の定量法を開発し、 $\text{IP}_3$  濃度変化と  $\text{Ca}^{2+}$  振動との相互関係についての報告を行った (論文 (1); Tanimura A., et al JBC., 2009)。また、これらの改良型  $\text{IP}_3$  センサーを用いて、機械刺激による細胞内および細胞間  $\text{Ca}^{2+}$  ウェーブの発生に  $\text{IP}_3$  濃度変化が重要な役

割を果たしていることを明らかにした(図 3B: および学会発表(1), (3)~(5))。

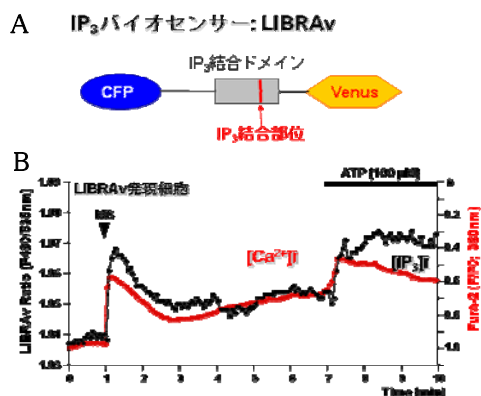


図 3: 改良型IP<sub>3</sub>バイオセンサーLIBRAvを用いた細胞内IP<sub>3</sub>動態測定。

A) 従来のYFPをpH変化に耐性を持つYFP変異体Venusに置換した構造を持つ。B) LIBRAvを用いた機械刺激およびATP刺激によるIP<sub>3</sub>およびCa<sup>2+</sup>動態の同時測定。

#### (4) 改良型LIBRAを用いた培養腺房細胞のIP<sub>3</sub>動態測定

現在、改良型 LIBRA (LIBRAv および LIBRAvN) を培養腺房細胞への導入を試みている。

現在、細胞培養の方法のさらなる改良を行うとともに、他の手法による唾液腺腺房細胞への LIBRAv の導入方法についても検討している。

1) 培養細胞より抽出したLIBRAvタンパク質を直接腺房細胞へ注入する方法、2) ウイルスベクターにより生きた動物の唾液腺組織へLIBRAを発現させる方法である。これらの方法を用い、最終目的である、唾液腺腺房細胞のIP<sub>3</sub>動態のリアルタイム測定を検討中である。

#### 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) Use of Fluorescence Resonance Energy Transfer-based Biosensors for the Quantitative Analysis of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Dynamics in Calcium Oscillations. Tanimura A, Morita T, Nezu A, Shitara A, Hashimoto N, Tojyo Y. J Biol Chem. 2009, 284(13):8910-7. (査読有)

2) The clustering of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptors is triggered by IP<sub>3</sub> binding and facilitated by depletion of the Ca<sup>2+</sup> store. Tojyo Y, Morita T, Nezu A, Tanimura A., J Pharmacol Sci. 2008, 107(2):138-50. (査読有)

3) Multi-photon microscopic imaging of rat parotid ducts demonstrates cellular heterogeneity in Ca<sup>2+</sup> responsiveness. Shitara A, Tanimura A, Nezu A, Morita T, Tojyo Y. Arch Oral Biol. 2007, 52(11):1072-1078. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1) 根津顕弘、谷村明彦、森田貴雄、東城庸介、機械刺激による細胞内および細胞間Ca<sup>2+</sup>ウェーブ発生におけるIP<sub>3</sub>濃度変化のリアルタイムモニター、第89回日本薬理学会年会、2009年3月、神奈川

2) 谷村明彦、森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、FRET型バイオセンサーを用いたカルシウムオシレーションにおけるIP<sub>3</sub>動態の定量的解析、第89回日本薬理学会年会、2009年3月、神奈川

3) 根津顕弘、谷村明彦、森田貴雄、東城庸介、機械刺激による細胞間のCa<sup>2+</sup>ウェーブとIP<sub>3</sub>動態のリアルタイム測定、北海道医療大学歯学会第27回学術大会、2009年2月、北海道

4) 根津顕弘、谷村明彦、森田貴雄、東城庸介、機械刺激によって惹起される細胞内および細胞間Ca<sup>2+</sup>ウェーブとIP<sub>3</sub>動態のリアルタイム測定、第59回日本薬理学会北部会、2008年9月、宮城

5) 根津顕弘、谷村明彦、森田貴雄、東城庸介、

- 機械刺激による細胞内および細胞間Ca<sup>2+</sup>ウェーブとIP<sub>3</sub>動態のリアルタイムモニター、第 50 回歯科基礎医学会学術大会、2008 年 9 月、東京
- 6) 谷村明彦、森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、蛍光バイオセンサーによるIP<sub>3</sub>オシレーションの定量的解析、第 50 回歯科基礎医学会学術大会、2008 年 9 月、東京
- 7) 設楽彰子、谷村明彦、森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、ラット耳下腺導管における自発的Ca<sup>2+</sup>反応の発生機構とその役割、第 50 回歯科基礎医学会学術大会、2008 年 9 月、東京
- 8) 東城庸介、森田貴雄、根津顕弘、谷村明彦、IP<sub>3</sub>によって惹起されるGFP-IP<sub>3</sub>受容体のcluster形成、第 35 回薬物活性シンポジウム、2007 年 11 月、広島
- 9) 谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、望月哲也、周東智、東城庸介、FRET型バイオセンサーを使ったIP<sub>3</sub>受容体リガンド化合物の解析、第 58 回日本薬理学会北部会、2007 年 9 月、北海道
- 10) 谷村明彦、森田貴雄、設楽彰子、根津顕弘、東城庸介、FERT型バイオセンサーを使ったIP<sub>3</sub>ダイナミクスの解析と薬物スクリーニングへの応用、第 49 回歯科基礎医学会学術大会、2007 年 8 月、北海道
- 11) 設楽彰子、谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、ラット耳下腺導管細胞におけるCa<sup>2+</sup>反応と管腔の拡大におけるその役割、第 49 回歯科基礎医学会学術大会、2007 年 8 月、北海道
- 12) 設楽彰子、谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、ラット耳下腺導管細胞におけるCa<sup>2+</sup>反応と管腔拡大、第 21 回北海道薬物作用談話会、2007 年 7 月、北海道

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

根津 顕弘 (NEZU AKIHIRO)  
北海道医療大学・歯学部・講師