

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：30110
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592073
 研究課題名（和文）顎下腺細胞における IP₃ 産生の時空間パターンの蛍光分子センサーによる解析
 研究課題名（英文） Analysis of spatiotemporal pattern in IP₃ production in submandibular gland using fluorescent-biosensor
 研究代表者
 東城 庸介（TOJYO YOSUKE）
 北海道医療大学歯学部・教授
 研究者番号：90111731

研究成果の概要（和文）：細胞質発現型の IP₃ バイオセンサー cLIBRAvIIs のアデノウイルスベクターを作製した。ラット顎下腺開口部から逆行性にアデノウイルス粒子を注入し、顎下腺に cLIBRAvIIs の蛍光が発現することを確認した。cLIBRAvIIs を発現した顎下腺から単離腺房細胞を調製し、カルバコール刺激によって蛍光比が有意に上昇することが観察された。Ca²⁺ バイオセンサー（YC-Nano 50）を顎下腺に発現させ、[Ca²⁺]_i の in vivo イメージングに成功した。

研究成果の概要（英文）： We constructed an adenovirus vector that expressed the cytosolic type IP₃ biosensor cLIBRAvIIs. The adenovirus vector was transferred to rat submandibular glands by retrograde ductal injection, and we detected the expression of cLIBRAvIIs in submandibular glands. We examined the effects of carbachol (CCh) on the fluorescence ratio of cLIBRAvIIs in dispersed submandibular acinar cells. Stimulation with CCh significantly increased the ratio. Furthermore, we successfully performed in vivo Ca²⁺ imaging in rat submandibular glands expressing the Ca²⁺ biosensor YC-Nano-50.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：唾液腺、IP₃、Ca²⁺、LIBRA、イメージング

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで Ca²⁺ イメージング解析により、唾液腺細胞の Ca²⁺ 上昇が腺腔膜近傍で始まる Ca²⁺ ウェーブや、上昇と下降を繰り返す Ca²⁺ オシレーションなどの特徴的な変化をすることを明らかにしてきた。

唾液腺細胞で見られる Ca²⁺ 反応の時間的・空間的ダイナミクスはイノシトール 1,4,5 三リン酸 (IP₃) の細胞内動態と密接に関連し

ていると思われるが、IP₃ が唾液腺細胞のどの部位で産生され、どのようなパターンで変化するかは不明である。唾液腺の IP₃ の細胞内動態の研究が進んでいないのは、高感度 IP₃ 感受性プローブの開発が遅れていること、またそれを唾液腺細胞に発現させる技術が十分に確立していないことが理由の 1 つである。

先の研究で我々は、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を応用した IP₃ 感受性蛍光分子セ

ンサー-LIBRA の開発に成功した。さらに、培養細胞を使ってアゴニスト刺激による細胞内 IP_3 と Ca^{2+} の同時測定を行い、 IP_3 の変化と Ca^{2+} シグナルとの関連性について解析した。本研究では、改良型 LIBRA を使ってラット顎下腺の IP_3 の変動を解析する。

2. 研究の目的

(1) これまでに開発した細胞膜発現型 LIBRA をより感度の高く、細胞全体の変化を感知することが可能な細胞質発現型 LIBRA に改変する。

(2) LIBRA 融合ウイルスベクターをラット顎下腺の開口部から導入し、in vivo で顎下腺細胞に LIBRA を発現させる技術を確認する。

(3) LIBRA を発現した顎下腺から単離細胞を調製し、アゴニスト刺激に伴う細胞内 IP_3 濃度と Ca^{2+} の同時測定を行い。

(4) Ca^{2+} 蛍光バイオセンサーのウイルスベクターを顎下腺に導入し、アゴニスト刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の変化の in vivo イメージングを行う。

(5) 小胞体の Ca^{2+} センサーである Stim1-mK01 を発現した顎下腺細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を解析する。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜発現型 LIBRAvIII から細胞膜標的シグナルを除き、ヒスチジンタグを導入し、細胞質発現型に改変した。次に、ラット IP_3 受容体サブタイプ 3 の IP_3 結合部位を、 IP_3 に対して感受性の高いサブタイプ 2 に置換した。また、 IP_3 結合部位のアミノ酸 1 個を置換し

(R440 から Q440)、高感受性の細胞質発現型 LIBRA (cLIBRAvIIs) を作成した (図 1)。さらにアデノウイルスベクターに、cLIBRAvIIs cDNA を組み込み、cLIBRAvIIs 発現ウイルスを作成した。

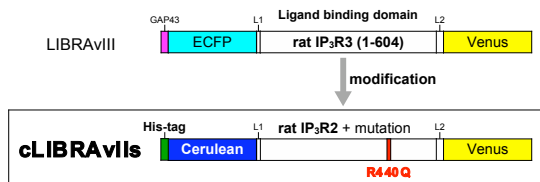


図 1. 細胞膜発現型 LIBRAvIII (上段) と細胞質発現型 cLIBRAvIIs (下段) の構造。

(2) cLIBRAvIIs 融合アデノウイルスベクターを HEK293A 細胞に感染させ、増殖後、培養上清からウイルス粒子を精製した。

(3) ラットをペントバルビタールで麻酔し、アデノウイルス粒子を満たしたプラスチックチューブを実体顕微鏡下で顎下腺開口部に挿入し、シリンジ圧でウイルスを顎下腺組織に注入した (図 2)。

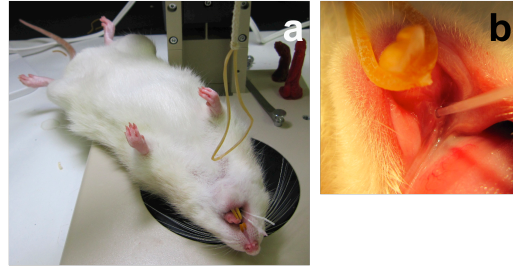


図 2. ラット顎下腺へのウイルスベクターの逆行性注入。(a) 注入時のラットの全体像、(b) チューブの挿入部分の拡大像。

(4) ウイルスベクターを注入後、2 日あるいは 3 日でラットを屠殺し、顎下腺を摘出した。

(5) 摘出した顎下腺をコラゲナーゼ処理し、単離細胞を調製した。

(6) Ca^{2+} 蛍光バイオセンサー (YC-Nano50 および G-GECO) や Stim-mK01 融合ウイルスベクターは LIBRA 融合ウイルスの導入と同じ方法でラット顎下腺に発現させた。

(7) 蛍光比の変化および蛍光イメージングは CCD カメラを装着した蛍光イメージング装置あるいは共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 研究方法の (1) で作製した細胞質発現型 cLIBRAvIIs ウイルスベクターを COS-7 細胞に感染させ、cLIBRAvIIs を発現させた。サポニン処理で蛍光が完全に消失したことから、cLIBRAvIIs が細胞質に発現したことが確認できた。100 μM ATP 刺激によって cLIBRAvIIs の蛍光比が上昇した。また、cLIBRAvIIs の蛍光比は β -escin と 30 μM IP_3 の添加によってさらに大きく上昇した (図 3)。

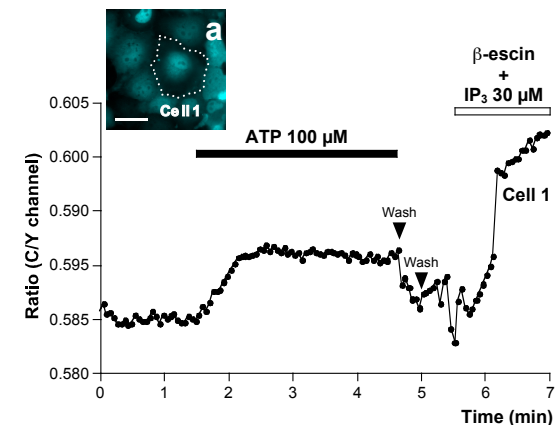


図 3. ATP および IP_3 刺激による cLIBRAvIIs 発現細胞 (a) の蛍光比の変化。

(2) cLIBRAvIIs をタンパク質として精製するため、cLIBRAvIIs を発現した COS-7 細胞の細胞質成分を抽出し、Talon ビーズを用いて cLIBRAvIIs を精製した。精製した cLIBRAvIIs は 30 μM から 300 μM の IP_3 によって濃度依存的に蛍光比を上昇させた。この結果は、精製 cLIBRAvIIs が IP_3 に対する感受性を保持していることを示している。

(3) マイクロエレクトロポレーション法あるいはマイクロインジェクション法を使って、精製 cLIBRAvIIs タンパク質を単離唾液腺腺房細胞あるいは唾液腺由来培養細胞に導入した。エレクトロポレーション法による導入効率は 12% であった。cLIBRAvIIs を発現した細胞を 100 μM カルバコールで刺激すると蛍光比の上昇が観察された。また、 β エスチンで穿孔した細胞に 10 μM IP_3 を作用させたところ、同様の蛍光比の上昇が観察された (図 4)。この結果は、精製した cLIBRAvIIs タンパク質が IP_3 の測定プローブとして十分機能することを示している。

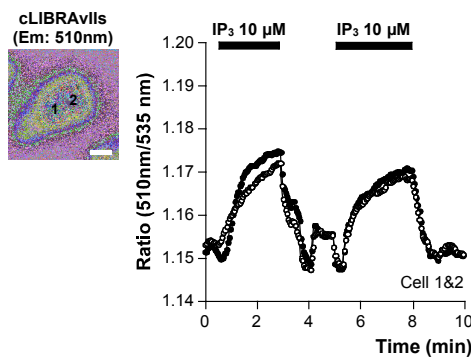


図 4. エレクトロポレーション法による cLIBRAvIIs の導入。

(4) 方法 (2) で精製した cLIBRAvIIs 融合アデノウイルス粒子をラット顎下腺の開口部から注入し、cLIBRAvIIs の発現を観察した。注入後 1~2 日で顎下腺を摘出し、実体顕微鏡で観察したところ、顎下腺に強い蛍光発現が見られた。一方、舌下腺には蛍光発現は見られなかった (図 5)。

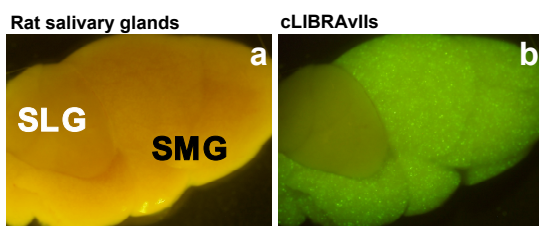


図 5. ラット顎下腺の蛍光観察。(a) ラット顎下腺 (SMG) と舌下腺 (SLG) の実体顕微鏡像。(b) cLIBRAvIIs 蛍光像。

(5) cLIBRAvIIs を発現したラットから顎下腺を摘出し、単離細胞を調製した。cLIBRAvIIs の蛍光は主に腺房細胞の細胞質に発現していた。3CCD イメージング装置を使って蛍光比の変化をモニターした。100 μM カルバコールで刺激したところ、蛍光比の有意な上昇が観察された。

(6) 顎下腺開口部から Stim1-mK01 のウイルスベクターを注入し、顎下腺に Stim1-mK01 を発現させた。Stim1-mK01 の蛍光は主に腺房細胞に発現していた。単離細胞に fura-2 を取り込ませ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化をモニターした。Stim1-mK01 発現細胞ではアゴニスト刺激による Ca^{2+} 遊離と Ca^{2+} 流入が増加した。

(7) ラット顎下腺に YC-Nano あるいは G-GECO の融合ウイルス粒子を顎下腺に注入し、これらの蛍光バイオセンサーをラットの顎下腺に in vivo で発現させることに成功した。

(8) 顎下腺に YC-Nano を発現させたラットを使って in vivo での Ca^{2+} イメージングを行った。ラットをウレタンで麻酔し、顎下腺を露出し、YC-Nano の蛍光変化を CCD カメラを装着したイメージング装置で計測した。アセチルコリンを顎下腺に直接滴下すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が見られた。さらに、ベタネコールの腹腔内投与によっても顎下腺全体で有意な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観察された。生理的食塩水の投与は効果がなかった。

本研究によって、顎下腺における IP_3 の動態解析、さらには $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の in vivo イメージングが可能になった。

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 2 件)

(1) Yosuke Tojyo, Takao Morita, Akihiro Nezu, Akihiko Tanimura. Staurosporine maintains the activation of store-operated Ca^{2+} entry even after the refilling of Ca^{2+} stores. Cell Calcium (査読有) 53, 2013, 349-356.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2013.03.002>

(2) Takao Morita, Akihiko Tanimura, Akiko Shitara, Yuko Suzuki, Akihiro Nezu, Taishin Takuma, Yosuke Tojyo. Expression of functional Stim1-mK01 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector.

Archs Oral Biol. (査読有) 56, 2011,
1356-1365.
DOI:10.1016/j.archoralbio.2011.06.001

[学会発表] (計7件)

①根津顕弘 他. 唾液腺の Ca^{2+} 応答と唾液分泌に対するピロカルピンの作用. 第86回日本薬理学会年会. 2013年3月21日(福岡市)

②森田貴雄 他. ラット顎下腺腺房細胞への Stim-mK01 発現による Ca^{2+} ストアおよび Ca^{2+} 放出量の増大. 2012年9月15日(郡山市)

③根津顕弘 他. 唾液腺の Ca^{2+} 応答と唾液分泌に対するムスカリン受容体パーシャルアゴニストとしてのピロカルピンの作用. 第54回歯科基礎医学会学術大会. 2012年9月15日(郡山市)

④根津顕弘 他. 細胞質発現型 IP_3 バイオセンサーの唾液腺腺房細胞への導入と IP_3 動態の測定. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月14日(京都市)

⑤森田貴雄 他. アデノウイルスの導入により *in vivo* で発現させた Stim による Ca^{2+} 応答と唾液分泌の増強. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月14日(京都市)

⑥根津顕弘 他.
 IP_3 バイオセンサーのラット唾液腺腺房細胞への導入と IP_3 動態の観察. 第53回歯科基礎医学会学術大会. 2011年10月2日(岐阜市)

⑦根津顕弘 他. 細胞質発現型 IP_3 バイオセンサーの分離精製と耳下腺腺房細胞への導入. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月23日(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東城 庸介 (TOJYO YOSUKE)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号: 90111731

(2) 研究分担者

谷村 明彦 (TANIMURA AKIHIKO)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号: 70217149

根津 顕弘 (NEZU AKIHIRO)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号: 00305913

森田 貴雄 (MORITA TAKAO)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号: 20326549

(3) 連携研究者

なし