

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5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010年～2012年

課題番号：22659329

研究課題名（和文） 唾液腺に局在する膜輸送蛋白質の新規時空間定量解析法の開発

研究課題名（英文） New spatiotemporal analysis in membrane proteins of salivary glands.

研究代表者

庄野 正行（SHONO MASAYUKI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・技術職員

研究者番号：60380101

研究成果の概要（和文）：細胞内の標的蛋白質の局在や刺激による細胞内移動を可視化して見る方法の一つとして、緑色蛍光蛋白質(GFP)を目的の標的蛋白質に融合させて細胞あるいは個体に発現させて、その蛍光を蛍光顕微鏡あるいは共焦点顕微鏡で捉える方法が、広く使われている。しかし、GFPは分子量が27kDaもあり、標的蛋白質の分子量が小さい時、定常配置に位置しにくくなること、標的蛋白質の刺激に応答した動きを阻害する。それには、レポーター分子の低分子量化が必要不可欠である。また、GFPは哺乳動物が持たない異種蛋白質であるために、個体に発現させた場合、その毒性や抗体の出現も問題となる。そこで、分子量が小さく、抗体ができないレポーター分子としてビタミン B12 のポルフィリン環の蛍光を用いる手法を開発することを試みた。

研究成果の概要（英文）：The green fluorescent protein (GFP) gene is frequently used in spatiotemporal analysis of membrane protein as a reporter gene. GFP gene is introduced into cell using vector systems to trace of a target membrane protein. However, GFP protein is composed of 238 amino acids with the molecular mass of 27kDa. In the target membrane protein with small molecular mass, GFP affects the localization of target membrane protein. It is more convenient that the molecular mass of reporter protein is smaller than that of GFP. We tried to develop to use porphyrin ring of vitamin B12 as a reporter, because porphyrin ring has small molecular mass and fluorescence.

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 | 0 | 1,200,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 総計 | 2,700,000 | 450,000 | 3,150,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：組織学、時空間的定量解析、膜輸送蛋白質、レポーター、ビタミン B12、ポルフィリン環

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内の標的蛋白質の局在や刺激による細胞内移動を可視化して見る方法の一つとして、緑色蛍光蛋白質(GFP)を目的の標的蛋白質に融合させて細胞あるいは個体に発

現させて、その蛍光を蛍光顕微鏡あるいは共焦点顕微鏡で捉える方法が、広く使われている。しかし、GFPは分子量が27kDaもあり、標的蛋白質が定常配置に位置しにくくなること、標的蛋白質の刺激に応答した動きを阻

害することのために、多くの研究者が困難を極めている。それには、レポーター分子の低分子量が必要不可欠である。

(2) また、GFPは哺乳動物が持たない異種蛋白質であるために、個体に発現させた場合、その毒性や抗体の出現も問題である。

2. 研究の目的

標的蛋白質の細胞内発現や刺激に伴う細胞内移動を追跡するためのレポーターとして、分子量が小さく、抗体ができないレポーター分子を探索することを目的とした。

ビタミン B12 は分子量 1.3kDa と小さく、ポルフィリン環を有し、このポルフィリン環は 460nm の励起波長で、660nm に赤色蛍光を発する。このビタミン B12 をレポーターとし、ポルフィリン環蛍光を利用する方法を探索する。

3. 研究の方法

(1) 標的蛋白質とビタミン B12(レポーター)をつなぐ結合蛋白質を検索するため、ビタミン B12 結合蛋白質を同定した。

ビタミン B12 が結合したアフィニティカラム(VB12-bounded Sepharose)を作製し、0.2M Phosphate buffer (pH 7.5) でラット耳下腺のホモジネートを調製し、このアフィニティカラムを平衡化した。非吸着画分を洗浄後、10% glucose を含む 0.1M Phosphate buffer で溶出し、溶出画分を 0.1M Phosphate buffer に対し透析した。アフィニティ溶出画分を電気泳動後、ペプチド解析からビタミン B12 結合蛋白質を同定した。

(2) (1)にて同定されたビタミン B12 結合ペプチドの遺伝子をクローニングした。

(3) ビタミン B12 結合ペプチド融合標的蛋白質遺伝子発現用プラスミドベクターを作製した。

(2)で作製されたビタミン B12 結合ペプチドの cDNA を挿入したプラスミドベクターを調製した。標的蛋白質として水チャンネル・アクアポリン(AQP)-5 を用い、既に研究分担者が作製した AQP5cDNA (Biochim Biophys Acta. 1790, 49-56, 2009)をビタミン B12 結合蛋白質発現ベクターに挿入した。この際 AQP5 の C-末にビタミン B12 結合蛋白質を挿入するベクター(pFP-N1)と N-末に挿入するベクター(pFP-C1)の両方を用いて作製した。

(4) ビタミン B12 結合蛋白質融合標的蛋白質発現用プラスミドベクターの細胞へトランスフェクションした。

前法(J Dent Res. 82:476-80, 2003)に従って、ラットより耳下腺を摘出し、コラゲナーゼとヒアルロニダーゼを用いて遊離細胞を調製する。調製した遊離細胞、HMG cell および ACC3 cell へ、(3)で作製されたベクターをトランスフェクションした。2 時間後血

清入り培養液の入った「生体培養チャンバー構造体」(庄野正行, 特許出願番号:2004-368661)へ移し培養した。

(5) レポーターの局在・動態を可視化した。

(4)より適宜細胞を集め、先に開発した「Fluorescent Microscope」(Masayuki Shono, 国際特許公開番号;W0 2007/136075 A1)や「蛍光顕微鏡および遮蔽部材および顕微鏡観察システム」(庄野正行, 特許出願番号:2006-143441)を用い、本システムへセビメリンをはじめとする各種刺激薬を添加したり、システム内のカルシウム濃度を変えたり、カルシウムキレーターを添加して可視化した。

4. 研究成果

(1) 標的蛋白質とビタミン B12(レポーター)をつなぐ結合蛋白質の検索

ほとんどの標的蛋白質は、ビタミン B12 と直接結合しない。そこで、まず、両者を繋ぐ結合蛋白質を見つけるひつようがある。

血漿中に存在してビタミン B12(と結合しているトランスコバラミン)の分子量は 37kDa であり、ビタミン B12 をレポーターとして使うための結合蛋白質としてはふさわしくない。ビタミン B12 が結合したアフィニティカラム(VB12-bounded Sepharose)を用いて種々の物質を探索探索した結果、ペプチド luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)が分子量 1.2 kDa と小さく、使える可能性を得た。

(2) 図1のように LHRHcDNA と AQP5cDNA を挿入したプラスミドベクターを調製した。こ

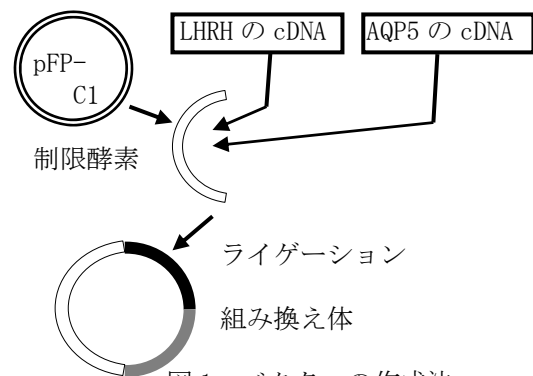


図1 ベクターの作成法

のベクターを耳下腺遊離細胞へトランスフェクションすることとした。

(3) トランスフェクションし、2 時間培養後、培地へカルシウムイオノフォア・A-23187 の濃度が $10^{-5}M$ となるように添加して(図 2-2)蛍光強度を観察し、無添加(図 2-1)の蛍光強度と比較した。A-23187 を添加して細胞内のカルシウム濃度を上昇させると、細胞膜、特に管腔膜で蛍光強度の増強が認められた。

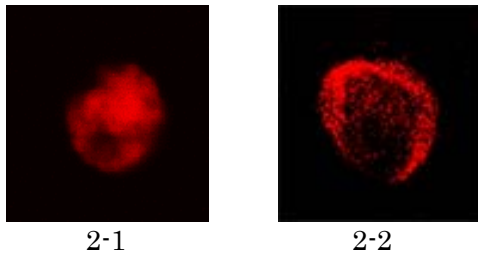


図2 刺激に伴う AQP5 の細胞内移動
2-1 は生理食塩水、2-2 は A-23187 を添加して 3 分後の蛍光を 460nm で励起し、660nm にて測定した。

以上のことから、ビタミン B12 と標的蛋白質を直接つなぐことはできないので、それらを繋ぐ因子として LHRH を用いることを提案する。LHRHcDNA と標的膜輸送蛋白質の cDNA (ここでは AQP5cDNA を使用) をベクターへ導入し、そのベクターを細胞へトランスフェクトして発現させ、細胞内のビタミン B12 を結合させてレポーターとして利用できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Di Wang, Zhenfang Yuan, Noriko Inoue, Gota Cho, Masayuki Shono, Yasuko Ishikawa. Abnormal subcellular localization of AQP5 and downregulated AQP5 protein in parotid glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 査読有 1810, 543-554, 2011. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.01.013
- ② Toshitaka Ikehara, Masayuki Shono, Hiroshi Miyamoto et. al, Effects of a 1.5 T time-varying magnetic field on cell volume regulation of bovine adrenal chromaffin cells in hyposmotic media. 査読有 *Journal of Medical Investigation*, 58, 95-105, 2011. DOI: 10.1016/j.bbagen.2010.09.001
- ③ Di Wang, Yasuko Ishikawa, Autonomic nerve-regulated AQP5 distribution in salivary glands and AQP5 release in to saliva. 査読有. *Journal of Oral Biosciences*. 53, 38-47, 2011
- ④ Toshitaka Ikehara, Masayuki Shono, Miyamoto H et. Al, Effects of exposure to a time-varying 1.5 T magnetic field on the neurotransmitter-activated increase in intracellular Ca²⁺ in

relation to actin fiber and mitochondrial functions in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 査読有 800, 1221-1230, 2011. DOI:10.1016/j.bbagen.2010.09.001

- ⑤ Kayo Hirose, Masayuki Shono, Shuzo Oshita Role of the O-linked beta-N-acetylglucosamine in the Cardioprotection Induced by Isoflurane. 査読有 *Anesthesiology*, 115, 955-962, 2011. DOI:10.1097/ALN.0b013e31822fcede
- ⑥ Kaya Yoshida, Masayuki Shono, Hideo Yoshida et al., Interaction between PKR and PACT mediated by LPS-inducible NF- κ B in human gingival cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 査読有 113, 165-173, 2011 DOI: 10.1002/jcb.23340
- ⑦ Tadahiro Nakagawa, Masayuki Shono, Yutaka Nakaya et al., Membrane topology of murine glycerol-3-phosphate acyltransferase 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読有 418, 506-511, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.055
- ⑧ 庄野正行、北村光夫、小中健、川添和義、水口和生. DPI により誘導されるヒト培養 HepG2 細胞死の DNA 構造の解明. *臨床検査* 56、331-334、2012
- ⑨ 庄野正行、北村光夫、小中健、川添和義、水口和生 新規開発培養チャンバーを用いた物理的圧迫による HUVEC 細胞骨格への影響 *臨床検査* 56、803-805、2012
- ⑩ 庄野正行、仁木裕史、中村教泰 小型レーザ顕微鏡の開発-DAPI による DNA 染色観察への応用 *臨床検査* 56、1402-1403、2012

[学会発表] (計 6 件)

- ① 庄野正行. バチラス水系およびアルコール系抽出成分によるウシ副腎クロマフィン細胞内遊離カルシウムへの影響 第 35 回生理技術研究会 2013 年 2 月 21 日岡崎コンファレンスセンター(愛知県)
- ② Tomasz Pieczonka, 張剛太、Mariusz Skowronski, 石川康子. Trafficking of aquaporin-5 to nuclei upon activation of M3 muscarinic receptors in rat

parotid glands. 第 122 回日本薬理学会
近畿部会 2012年11月16日 千里ラ
イフサイエンスセンター(大阪府)

- ③ 庄野正行. 開発培養チャンバーを用いた
物理的圧迫による HUVEC 細胞骨格変化の
影響 第 34 回生理学技術研究会 201
2年2月16日 岡崎コンファレンスセ
ンター(愛知県)
- ④ 王 頤、庄野正行、石川康子. Genome
assessment of parotid glands
associated with oral dysfunction in
streptozotocin-induced diabetic rat.
第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月
22 日 パンフィコ横浜(神奈川県)
- ⑤ 庄野正行. DPI により誘導されるヒト培
養 HepG2 細胞死の DNA 構造の解明. 第 33
回生理学技術研究会, 2011 年 2 月 17 日
岡崎コンファレンスセンター(愛知県)
- ⑥ Di Wang, Gota Cho, Masasyuki Shono,
Yasuko Ishikawa. ctivation of M3
muscarinic acetylcholine receptors
and α 1-adrenoceptors induces AQP5
trafficking in rat parotid acinar
cells. 16th World Congress of Basic and
Clinical Pharmacology, July 20, 2010.
Bella Center Copenhagen (Denmark)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 顕微鏡用細胞収容器
発明者: 庄野 正行、井戸 良浩
権利者: 国立大学法人: 徳島大学
種類: 特許
番号: 特願2011-137224
出願年月日: 2011年6月21日
国内外の別: 国内

○取得状況(計2件)

名称: 蛍光顕微鏡
発明者: 庄野 正行、中村 教泰
権利者: 国立大学法人徳島大学
種類: 特許
番号: 4998804号
取得年月日: 2012年5月25日
国内外の別: 国内

名称: 蛍光光度計
発明者: 庄野 正行、石田 富士雄
権利者: 国立大学法人徳島大学
種類: 特許
番号: 5076142号
取得年月日: 2012年9月7日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄野 正行 (SHONO MASAYUKI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・技術職員
研究者番号: 60380101

(2) 研究分担者

石川 康子 (ISHIKAWA YASUKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号: 40144985

