

## 研 究

## マウス耳下腺細胞でミオシン軽鎖キナーゼは細胞内カルシウム流入過程の capacitative calcium entry, non-capacitative calcium entry を相反する形で制御する

齋野朝幸<sup>1)</sup>, 熊谷美保<sup>2)</sup>, 佐藤洋一<sup>1), 3)</sup><sup>1)</sup> 岩手医科大学解剖学講座細胞生物学分野<sup>2)</sup> 岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座小児歯科学・障害者歯科学分野<sup>3)</sup> 岩手医科大学全学教育推進機構

(主任: 齋野 朝幸)

(受付: 2019年11月18日)

(受理: 2020年2月5日)

## 和 文 抄 録

目的: アラキドン酸 (AA) は, さまざまな細胞の細胞内カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を調節する. 細胞内  $Ca^{2+}$  上昇機構として, 細胞内貯蔵場からの  $Ca^{2+}$  放出と細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入の2つがあげられる. 本研究では, その中でも細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入に着目した. マウス耳下腺腺房を用い, タブシガルジン (Tg) 誘発性, および AA 誘発性の  $Ca^{2+}$  流入におけるセリン/スレオニンキナーゼの一つであるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の効果を, 細胞内  $Ca^{2+}$  測定試薬の Fura-2 を用いて解析した.

材料と方法: 雄性スイスウエブスターマウスを用い, 炭酸ガス麻酔下で屠殺後, 耳下腺を取り出しコラゲナーゼ等を用いて腺房細胞単位にまで消化した. その後細胞に Fura-2/AM を導入し標本とした. 各種試薬を用いて刺激し, Fura-2 の特性から 380 nm と 340 nm の比をとったものを Ratio として示し, この蛍光強度比の変化を  $[Ca^{2+}]_i$  変化の指標とした.

結果: MLCK 阻害剤の ML9 および wortmannin 単独では,  $[Ca^{2+}]_i$  に影響を及ぼさなかった. ML9 および wortmannin 存在下で, Tg 誘発性の  $Ca^{2+}$  流入 (capacitative  $Ca^{2+}$  entry : CCE) が抑制された. これに対し, AA 誘発性  $Ca^{2+}$  流入 (non-capacitative  $Ca^{2+}$  entry : NCCE) は wortmannin 存在下では減弱したのに対し, ML9 存在下では増強した. ML9 存在下で, PKA が関与するカリキュリンA 共存下での AA 誘発性  $Ca^{2+}$  上昇の作用増強に対し, MLCK 阻害剤はこの NCCE を増強させる結果となった. また, MLCK 阻害剤の投与順序を変更してもカリキュリンA 共存下での AA 誘発性  $Ca^{2+}$  上昇に違いは認められなかった.

結論: MLCK は CCE を増強させる反面, AA 誘発性の  $Ca^{2+}$  流入である NCCE を抑制する. また, PKA は NCCE 増強に働くが, その近傍に存在する MLCK によって修飾を受け, お互いに協調して NCCE に働いている可能性がある.

---

MLCK reciprocally regulates capacitative calcium entry and non-capacitative calcium entry in intracellular calcium influx process in mouse parotid gland acinar cells  
Tomoyuki SAINO, Miho KUMAGAI, Yoh-ichi SATOH

<sup>1)</sup> Department of Anatomy (Cell Biology) , <sup>2)</sup> Division of Special Care Dentistry, Department of Developmental Oral Health Science, School of Dentistry and <sup>3)</sup> Department of Medical Education, Iwate Medical University, Japan  
1-1-1 Idaidori, Yahaba, Iwate, 028-3694, Japan.

## I. 緒 言

唾液腺には耳下腺, 顎下腺, 舌下腺の3大唾液腺とその他の小唾液腺があり, いずれもタンパク質と電解質を含んだ分泌物を生成・放出する腺房部と分泌物を輸送する導管部から構成される<sup>1)</sup>. 唾液腺は, 腺房部のイオンチャネルやトランスポーターによる電解質輸送を駆動力として, 腺腔内に水を輸送する. また, 腺房細胞は酵素等を含む多くの分泌顆粒を蓄えており, 開口分泌によって内容物を腺腔内に分泌する.

Ebashi ら<sup>2)</sup>によって細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  が骨格筋の収縮に必須であると最初に提唱されて以来, 細胞内シグナル物質としての  $\text{Ca}^{2+}$  は, 骨格筋の収縮のみならず他の酵素反応も  $\text{Ca}^{2+}$  により調節されていることが明らかにされた. 今日では,  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内のシグナル物質(セカンドメッセンジャー)として細胞機能の制御に極めて重要な因子であることに疑いを持つ人はいない<sup>3,5)</sup>.

唾液腺を含む非興奮性細胞での細胞内カルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 制御において, 細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵場, 特に小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  の枯渇によって起こると考えられてきた. すなわち capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry (CCE) である<sup>6)</sup>. 現在では, CCE は store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (SOC) が関与しているものと考えられている<sup>7)</sup>. 近年, 2つの重要なタンパク質, stromal interacting molecule 1 (STIM1) と Orai1 (CRACM1) が SOCE において重要な役割を果たすことがわかってきた. STIM1 は, 小胞体膜に存在し, 小胞体内腔に N 末端を持つ一本鎖膜貫通型タンパク質である. 一方, Orai1 は, 4つの膜貫通ドメインを有する細胞膜貫通タンパク質である. STIM1 は小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の低下に応答して, 細胞膜型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルと考えられる Orai 1 を活性化する機能を持つことが知られている<sup>8),9)</sup>. 唾液腺においても  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  調節機構に関して, STIM1 ならびに Orai1 に関する研究が報告されている<sup>10)</sup>. しかしながら, 耳下腺腺房細胞や膵臓の腺房細胞など外分泌腺を含むいくつかの細胞種において,  $\text{Ca}^{2+}$  の流入

は CCE 以外に non-CCE (NCCE) によっても制御されると言われている<sup>11,17)</sup>. さらに, 非興奮性細胞での  $\text{Ca}^{2+}$  流入チャネルとして代表的なものに, 細胞膜に存在するイオンチャネル型受容体の1つである transient receptor potential (TRP) チャネルがある<sup>18,20)</sup>. その中でも TRP cation channels (TRPC) は, TRP チャネルの哺乳類ホモログの1つである<sup>21)</sup>. 多くの研究の結果は, CCE および NCCE 経路の両方における TRPC の役割を支持している<sup>22,25)</sup>. 哺乳類の TRPC ファミリーは, 配列の相同性と機能特性に基づいて TRPC1/4/5 と TRPC3/6/7 サブグループに分けることができる<sup>26)</sup>. 我々は以前に涙腺でのプロテアーゼ活性化型受容体の研究において, TRPC1 が CCE と NCCE に作用し, TRPC3 と 6 が NCCE に関与する可能性があることを報告している<sup>17)</sup>. Lopes らも TRPC6 が NCCE に関与すると報告している<sup>27)</sup>.

アラキドン酸 (AA) は不飽和脂肪酸の一つであり, ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  により細胞内に遊離され, 細胞間のシグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーとしても働くことが知られている. 遊離 AA は, AA カスケードと呼ばれる代謝経路でシクロオキシゲナーゼにより代謝され, プロスタグランジンが合成される. 今日までの研究で, AA は  $\text{IP}_3$  受容体を抑制し, リアノジン受容体を活性化するという報告<sup>28),29)</sup> や, CCE を抑制し NCCE を活性化するという報告<sup>11),12),30),31)</sup>, さらに STIM1 が AA 制御の NCCE に関与するという報告<sup>32)</sup> もあり, その働きは統一的な見解を示していないのが現状である. しかしながら近年では, ストア非依存性カルシウム流入 (SICE = NCCE) が AA によって活性化されるという考えが有意となってきた. この NCCE のように  $\text{Ca}^{2+}$  に依存しない  $\text{Ca}^{2+}$  流入も近年関心が集まってきている.

細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を制御するものの一つとして, プロテイン・キナーゼ (PK) とプロテイン・フォスファターゼ (PP) があげられる. PP は, 今までに耳下腺<sup>33),34)</sup>, 涙腺<sup>35)</sup>, 血小板<sup>36)</sup> において, カルバコールやタプシガルジン誘発性の

Ca<sup>2+</sup> 流入を制御するとの報告がある。著者らは、マウス耳下腺細胞を用い、PP1 および PP2A の阻害剤である calyculin A (caly A) が CCE をほぼ完全に抑制する反面 AA 誘発性 Ca<sup>2+</sup> 反応である NCCE を増強し、PKA 阻害剤はこの caly A 存在下での AA 誘発性 Ca<sup>2+</sup> 反応の増強作用をほぼ完全に抑制することを報告した<sup>37)</sup>。この NCCE の増強が PKA 依存性である結果から、AA がリアノジン感受性細胞内ストアの Ca<sup>2+</sup> の枯渇によって Ca<sup>2+</sup> の流入を調節する<sup>38)</sup>、<sup>39)</sup> ことを踏まえると、リアノジン受容体と PKA、PP および A キナーゼ係留タンパク (AKAP) が大きな複合体を形成して Ca<sup>2+</sup> 調節に働いていることが示唆された<sup>37)</sup>。

本研究の目的は、耳下腺細胞での AA 誘発性 Ca<sup>2+</sup> 反応において、PP が Ca<sup>2+</sup> 流入機構において PKA のみを活性化するのか、それ以外のキナーゼが活性化されないのか我々の結果をさらに検証することが目的である。PP 阻害によって相反して種々のキナーゼが活性化されることが示唆されるが、その中でも特にミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) に着目した。カルシウム検出法として蛍光 Ca<sup>2+</sup> 指示薬である Fura-2/AM を細胞に導入し、各種試薬によるマウス耳下腺腺房細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化を測定し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 変動を観察した。MLCK が CCE を制御するという報告は散見される<sup>40)</sup>、<sup>41)</sup> が、NCCE への関与についてはよくわかっていない。MLCK が CCE や NCCE といった Ca<sup>2+</sup> 流入機構にどのような影響を与えるか検証することは、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 制御において重要である。NCCE のメカニズム研究の一端を担えればと考える。

## II. 方 法

### (1) 標本の作製

詳しい方法については、Watson らの報告に従って行った<sup>42)</sup>。また、ワシントン大学の動物取扱指針、岩手医科大学動物取扱指針に則って実験を行った。雄性スイスウエブスターマウス (Taconic ; 27-30g) を炭酸ガス殺処理後、耳下腺を取り出し、リンパ節を除去後、細切した。

Krebs-Henseleit bicarbonate solution (KHB mM : NaCl 118; KCl 4.7; CaCl<sub>2</sub> 1.25; MgSO<sub>4</sub> 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; NaHCO<sub>3</sub> 25; glucose 11.1; HEPES 10, pH 7.4) 20ml に 90 U/ml のタイプ II コラゲナーゼと 1 mg/ml のヒアルロニダーゼを加えた溶液を作成し、これに耳下腺組織を加え、37°C の浴槽中で 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> のガス存在下で 60 分間酵素消化した。組織液は 10ml のピペットにて 20 分後、40 分後、47 分後、54 分後に 10 回ピペット内で上下して混和させ、60 分後には同様の作業を 5 回行い混和・分離した。その後 4% BSA を含む KHB を用いて 800 rpm で 2 分間、2 回洗浄し、その後ストックングで作成したフィルターを通して、回収した沈渣をさらに同様に 2 回洗浄後、上清を捨て遠心ペレットを秤量した。ペレットには、フィルターを通過した耳下腺細胞および耳下腺腺房小細胞塊が含まれている。

### (2) カルシウム感受性蛍光試薬の導入

回収した腺房細胞は、0.176 mg/ml アスコルビン酸と 0.2% BSA を含んだ KHB に 1:50 (w/v) になるように懸濁し、カルシウム感受性蛍光試薬の Fura-2/AM を 3.3 μg/ml の濃度になるように加えた。その後、37°C で 45 分間、5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> 存在下で振盪した。Fura-2/AM を導入完了した細胞は、3 回 0.2% BSA/ KHB で洗浄後、室温で 0.2% BSA/ KHB 中で維持した。アラキドン酸は BSA に結合する事が知られているが<sup>43)</sup>、BSA はタンパクを紫外線から保護する作用があるため<sup>38)</sup>、アラキドン酸の反応は BSA の濃度を 0.025% まで落として行った。アラキドン酸以外の反応は 0.2% BSA 存在下で行った。室温での 30 分間のインキュベーション後、試料を 2 回洗浄し、細胞懸濁溶液を 10 分の 1 の濃度に希釈して用いた。測定キュベットとして UV grade の fluorometric cuvettes (Spectrocel) を用い、Calcium Ratio は Photon Technology International Inc. の Filterscan Spectrofluorometer System (S. Brunswick, NJ) を用いてキュベット全体を測定した。測定頻度は

1秒間隔で、測定時間は800秒とした。測定データはFura-2/AMの蛍光の特性から380nmと340nmの比をとったものをRatioとして示し、この蛍光強度比の変化を $[Ca^{2+}]_i$ 変化の指標とした。

## (2) 使用薬物

以下の試薬を使用した。arachidonic acid, thapsigargin, hyaluronidase, bovine serum albumin (BSA), HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO), calyculin A, wortmannin (Calbiochem, LaJolla, CA), ML9 (Biomol Research Lab., Plymouth Meeting, PA), collagenase type 2 (Worthington, Freehold, NJ), Fura-2/AM (Molecular Probes, Eugene, OR)

## Ⅲ. 結 果

### 1. ミオシン軽鎖キナーゼはタプシガルジン誘発性 $Ca^{2+}$ 流入に関与する。

非興奮性細胞において細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の調節は、アゴニストによる刺激後細胞内 $Ca^{2+}$ 貯蔵場の枯渇を介して細胞外 $Ca^{2+}$ の流入が増加する。これをCCEと呼んでいる<sup>6)</sup>。耳下腺腺房細胞で、タプシガルジン(Tg)誘発性の $Ca^{2+}$ 流入に対するミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の役割を検討した。実験に先立ち、まずMLCKの阻害剤であるML9, wortmannin存在下で耳下腺腺房細胞を刺激したが明らかな $[Ca^{2+}]_i$ 変化はなかった(データは割愛)。Tg誘発性の $Ca^{2+}$ 流入はCCEとして知られているが<sup>3)</sup>, wortmanninおよびML9の存在下で、Tg誘発性の $Ca^{2+}$ 流入を観察したところ、CCEは部分的に抑制された(Figs. 1,2)。プロテイン・フォスファターゼ(PP)1およびPP2A阻害薬であるカリキュリンA(caly A)はCCEを阻害することが知られている<sup>37)</sup>。このcaly A投与前にML9前投与を行うと、CCEはさらに相加的に阻害された(Fig. 3)。

### 2. アラキドン酸誘発性 $Ca^{2+}$ 流入の増強をMLCKは抑制する。

以前にWatsonらは、AA誘発性 $Ca^{2+}$ 流入は

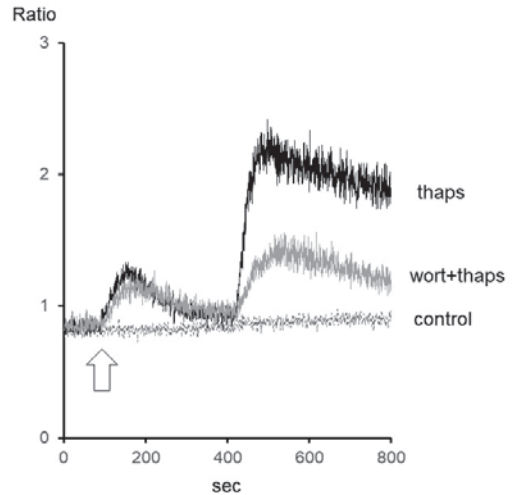


Fig. 1 : タプシガルジン刺激でのマウス耳下腺腺房細胞の細胞内 $Ca^{2+}$ 変動。- $Ca^{2+}$ 状態で反応させ、400秒に1.28mMの $Ca^{2+}$ を添加している。矢印部でthapsigargin(2 $\mu$ M)投与。実線 thaps : thapsigargin 単独, 灰線 wort+thaps : wortmannin(10 $\mu$ M)で30分インキュベーション後 thapsigargin 投与, 点線 cont : コントロール。実験は8回試行。

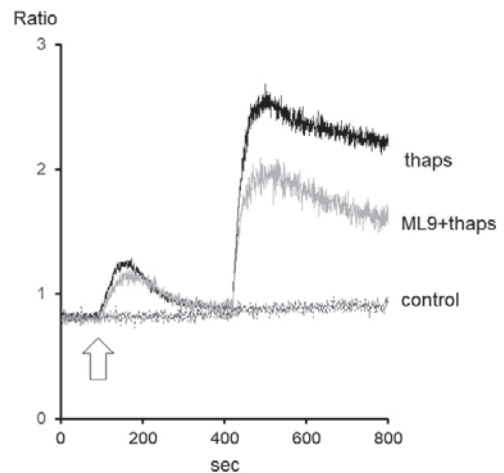
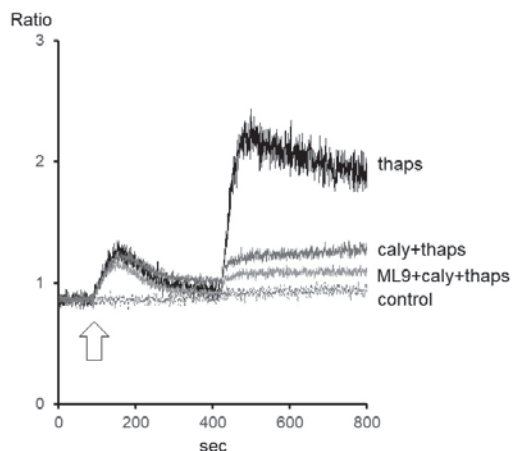


Fig. 2 : タプシガルジン刺激でのマウス耳下腺腺房細胞の細胞内 $Ca^{2+}$ 変動。- $Ca^{2+}$ 状態で反応させ、400秒に1.28mMの $Ca^{2+}$ を添加している。矢印部で thapsigargin(2 $\mu$ M)投与。実線 thaps : thapsigargin 単独, 灰線 ML9+thaps : ML9(30 $\mu$ M)で30分インキュベーション後 thapsigargin 投与, 点線 cont : コントロール。実験は8回試行。

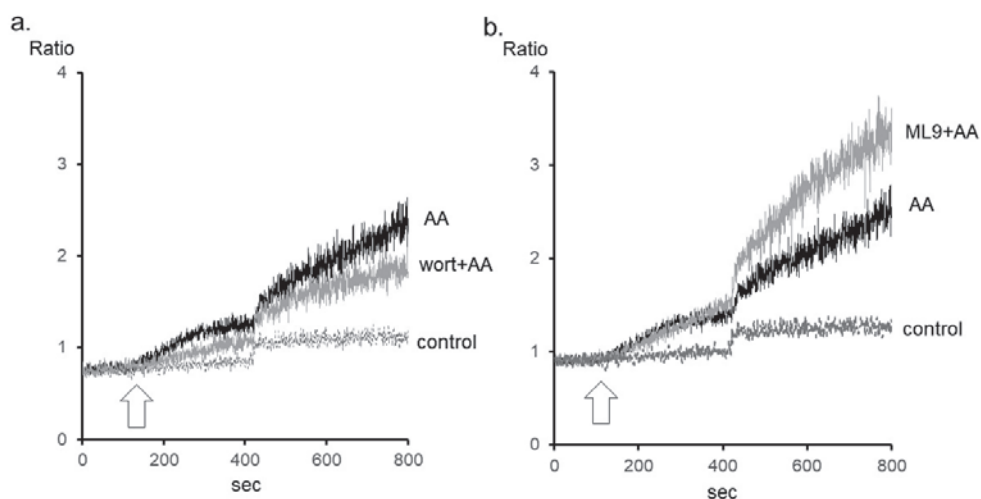


**Fig. 3:** タブシガルジン誘発性の  $\text{Ca}^{2+}$  流入 (CCE) に対するカリキュリンAおよびML9の効果.  $-\text{Ca}^{2+}$  状態で反応させ, 400秒に1.28mMの  $\text{Ca}^{2+}$  を添加している. 矢印部で thapsigargin (2 $\mu\text{M}$ ) 投与. 黒線 thaps: thapsigargin 単独, 茶線 caly+thaps: カリキュリンA (100nM) で10分インキュベーション後 thapsigargin 投与, 灰線 ML9+caly+thaps: ML9 (30 $\mu\text{M}$ ) で30分インキュベーション後カリキュリンAを10分間反応させ thapsigargin 投与, 点線 cont: コントロール. 実験は6回試行.

CCEとは全く別物であり, これを non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry (NCCE) であると報告した<sup>38)</sup>. 我々は, このNCCEに対するPPの抑制による実験結果を通してPKAがその増強に関与することを報告している<sup>37)</sup>. 今回PKA以外のキナーゼとしてMLCKがNCCEに関与しているかどうかをAA誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入に対し検討した. PP抑制によって相対的に何らかのキナーゼが活性化されるはずであることがその理由である. 以前に報告したようにPP抑制により活性化されるのがPKAのみとは限らず, これだけがNCCEに影響を及ぼしているとは断定できないからである. ML9およびwortmannin存在下でAA誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を確認したところ, wortmanninはAA誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を軽度抑制し (Fig. 4a), それに対しML9はAA誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を増強した (Fig. 4b).

### 3. PKAが関与するカリキュリンAによるアラキドン酸誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入の増強をMLCKは修飾する.

先ほど示したように, 同じMLCKを阻害す



**Fig. 4:** アラキドン酸 (AA) 誘発性の  $\text{Ca}^{2+}$  流入 (NCCE) に対するMLCK阻害薬の効果.  $-\text{Ca}^{2+}$  状態で反応させ, 400秒に1.28mMの  $\text{Ca}^{2+}$  を添加している. 矢印部でAA (45 $\mu\text{M}$ ) 投与. (a) wortmanninの効果. 黒線 AA: AA 単独, 灰線 wort+AA: wortmannin (10 $\mu\text{M}$ ) で10分インキュベーション後AA投与, 点線 cont: コントロール. (b) ML9の効果. 黒線 AA: AA 単独, 灰線 ML9+AA: ML9 (30 $\mu\text{M}$ ) で30分インキュベーション後AA投与, 点線 cont: コントロール. 実験は双方とも6回試行.

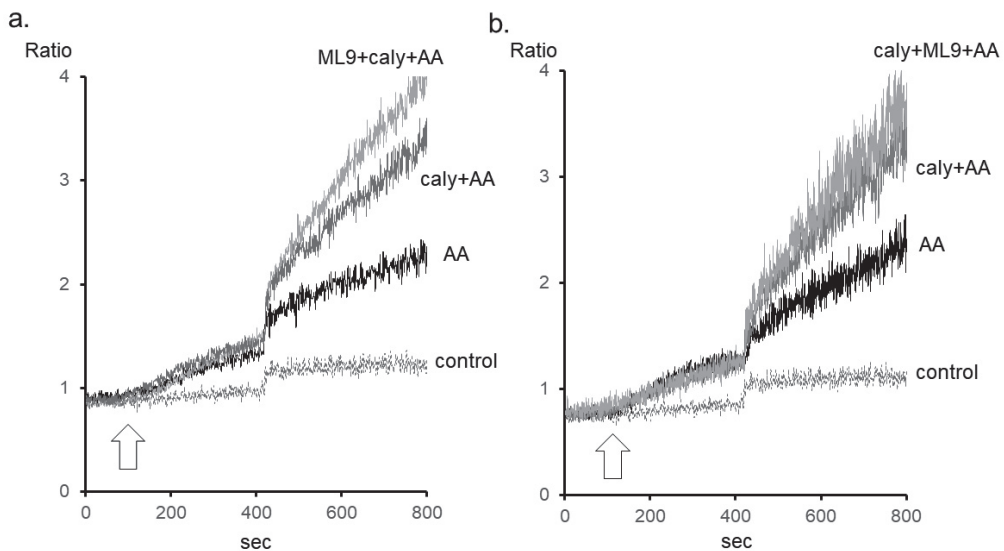
る薬剤で相反する結果を得たことから以下のように考えた. 今まで使用してきた wortmannin は MLCK を阻害する<sup>44)</sup> 以外にフォスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K) も阻害する事が知られており<sup>45)</sup>, MLCK 単独阻害による影響を見ているとは断定できない. このため wortmannin と ML9 存在下での NCCE に対する作用が相対する結果となった可能性がある. このことから, 以後選択的に MLCK を阻害する ML9<sup>46)</sup> を使用して以下の実験を行った. PKA の NCCE 増強作用に対する MLCK の関与について, ML9 の投与順序を変える, すなわち① ML9 を前投与して先に MLCK を抑制し, その後に caly A によって PP を抑制するもの, ② caly A 前投与によって PP を抑制し, その後 ML9 によって MLCK を抑制するもの, この二群で差があるかどうかを検討した. 双方とも同様に caly A の AA 誘発性  $Ca^{2+}$  流入を軽度増強させる結果となり, 両者でほとんど差を認めなかった (Figs. 5a,b). これは PKA の NCCE 増

強反応の上流や下流で MLCK が作用しているわけではなく, MLCK が直接 NCCE に作用していることを示している.

#### IV. 考 察

今回の研究は, AA 誘発性  $Ca^{2+}$  反応に対し MLCK がどのように作用しているかについて検討したものである. 我々は以前にマウス耳下腺腺房細胞では, caly A は単体で反応することはなく, その効果はアゴニスト依存性であり, AA 誘発性  $Ca^{2+}$  反応を増強させる反面, Tg やカルバコール誘発性  $Ca^{2+}$  反応を抑制すること, 並びに PP の抑制によって AA 誘発性  $Ca^{2+}$  反応が増強し, これは PKA 依存性であることを報告した<sup>37)</sup>. この研究と同様に, Gratschev らは甲状腺 FRTL-5 細胞でセリン/スレオニン・フォスファターゼの抑制が  $Ca^{2+}$  流入経路を増強させ, これが PKA 依存性であると報告している<sup>47)</sup>.

今回の研究では, MLCK 抑制剤である ML9 および wortmannin は, CCE 由来の  $Ca^{2+}$  流入

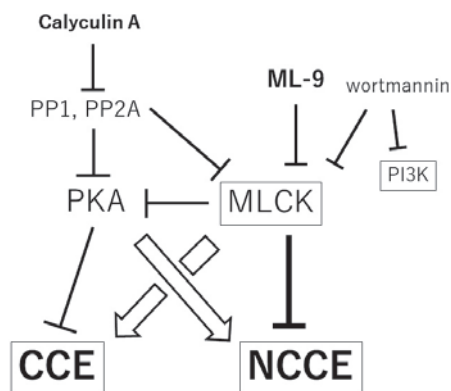


**Fig. 5 :** アラキドン酸(AA)誘発性の  $Ca^{2+}$  流入(NCCE)に対する ML9 の効果.  $-Ca^{2+}$  状態で反応させ, 400 秒に 1.28mM の  $Ca^{2+}$  を添加している. 矢印部で AA (45 $\mu$ M) 投与. (a) ML9 前投与の効果. 黒線 AA : AA 単独, 濃灰線 caly+AA : カリキュリン A (100nM) で 10 分インキュベーション後 AA 投与, 灰線 ML9+caly+AA : ML9 (30 $\mu$ M) で 15 分インキュベーション後カリキュリン A を 10 分間反応させ AA 投与, 点線 cont : コントロール. (b) ML9 後投与の効果. 黒線 AA : AA 単独, 濃灰線 caly+AA : カリキュリン A (100nM) で 10 分インキュベーション後 AA 投与, 灰線 caly+ML9+AA : カリキュリン A を 10 分インキュベーション後 ML9 (30 $\mu$ M) で 15 分間反応させ AA 投与, 点線 cont : コントロール. 実験は双方とも 6 回試行.

を部分的に抑制した。同様な報告を Kawamura らがウシ副腎皮質の筋膜細胞を用いて行っており<sup>48)</sup>、我々の結果と一致する。我々は以前に caly A によって CCE がほぼ完全に阻害されることを報告している<sup>37)</sup>。本研究により MLCK 阻害剤は、この caly A による抑制作用を増強した。caly A はアクチンに関与しているとの報告もある<sup>49), 50)</sup>。試薬により化学的に誘導された細胞表面皮質での厚いアクチンクラスターが、小胞体と細胞膜の SOC の間のシグナル伝達を物理的にブロックし、store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) を抑制すると言われている<sup>51-53)</sup>。同様に、caly A による血小板の処理によって、タンパク質のリン酸化および細胞骨格の構造変化が引き起こされるという報告もある<sup>54)</sup>。これらのような機序によって caly A により CCE が抑制されるのではないかと考えられる。これらとは反対に、我々の培養細胞系を用いた以前の報告では、caly A は SOCE (CCE) を抑制しなかったが、微小管のリモデリングによって SOCE が抑制されるという結果を得た<sup>55)</sup>。これらの結果の違いは、細胞の種類による細胞骨格であるアクチンの配向の違いによるものなのかもしれない<sup>52)</sup>。特に、SOCE に関係する STIM1 のアイソフォームの STIM1L には、アクチン細胞骨格に自身を固定するためのアクチン結合ドメインを持つ 106 個のアミノ酸が含まれており、小胞体が枯渇する前に小胞体-形質膜接触部位で Orail とともに事前に塊を作ることがわかっている<sup>56)</sup>。MLCK が ATP 依存性にアクチンフィラメントの動きを抑制するという報告もあり<sup>57)</sup>、今回の実験から考察すると、caly A や MLCK は共に細胞骨格、アクチンやミオシンに働きかけている可能性が高く、MLCK の作用部位はこの STIM1 が作用するアクチンとは別の部位に作用して、相加的に CCE に働く可能性が高いと考えられる。

今回の研究での重要な所見としては、MLCK 抑制によって、AA 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  の流入に変化が見られたことである。すなわち、AA 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入が wortmannin によって抑制され、ML9 に

よって増強されるという相反する結果が得られた。wortmannin も ML9 も双方 MLCK を阻害する役割を持つが、なぜ相反する結果となったのか。wortmannin は MLCK を阻害する<sup>44)</sup> 以外に PI3K も阻害する事が知られており<sup>45)</sup>、wortmannin が PI3K を抑制することにより、何らかの別の修飾経路が作用して ML9 単独投与とは異なる作用を引き起こしている可能性がある。この ML9 と wortmannin の相反する結果に対しては今後のさらなる研究が必要となる。本結果から NCCE に対し PKA とはさらに別の経路である MLCK が関与している事が示唆され、MLCK が NCCE を部分的に抑制していることが考えられた。さらに、この MLCK 阻害剤と PP 抑制剤の投与の順序によって NCCE に対する作用に差を認めなかった。このことは、MLCK は PKA を修飾する形で作用しており、MLCK が NCCE に間接的にも直接的にも作用していると考えられることができる (図)。MLCK と相対する平滑筋ミオシン軽鎖フォスファターゼ (MLCP) は PP1 ホロ酵素の 1 つである<sup>58)</sup>。また、PP1 の native form の主要な反応機構として、PKA, PKC, MLCK, casein kinase II の調節サブユニットをリン酸化するこ



図：今回の PKA, MLCK, CCE, NCCE の相関図

——|：抑制， $\longleftrightarrow$ ：促進

CCE : Capacitative calcium entry, MLCK : Myosin light chain kinase, NCCE : Non-capacitative calcium entry, PI3K : Phosphoinositide 3-kinase, PKA: Protein kinase A, PP : Protein phosphatase

とがあげられる<sup>59)</sup>. やはり caly A によって PP1 および PP2A が抑制されることにより, MLCP が抑制され相対的に MLCK が活性化されることが考えられよう.

非興奮性細胞では, AA によって刺激されたチャンネルを介する  $Ca^{2+}$  流入 (NCCE) が  $Ca^{2+}$  律動に関わっているようであるが詳しいメカニズムについてはわかっていない. 気道平滑筋では AA 誘発性の  $Ca^{2+}$  律動機構が存在し, 喘息に関与している可能性がある<sup>60)</sup>. 今回の我々の観察では  $Ca^{2+}$  律動は認められなかった. 組織や細胞の違いが関係している可能性も否定できない. 今後, MLCK と NCCE との関係性や MLCK と PKA が協調して働くことを証明する実験, ならびに組織形態も含めたさらなる研究が必要であり, 別な実験系を用いてこの研究を遂行していく予定である.

まとめとして今回の研究から, マウス耳下腺腺房細胞のアゴニスト刺激後の CCE と NCCE に対して MLCK 阻害剤を使用したところ, CCE の軽度抑制, NCCE の軽度増強が認められた. この MLCK 阻害薬の作用は投与順序によっても caly A 存在下での AA 誘発性の  $Ca^{2+}$  流入に影響を及ぼさなかった. これらのことから, MLCK は CCE を促進し, NCCE を抑制していると考えられ, PKA を軽度抑制する形で作用して MLCK に協調して働くことが考えられる. これらのことから従来その働きがよくわからなかった TRPC などの NCCE を構成するチャンネルの PKA の作用部位の近傍に MLCK が存在し, PKA と MLCK 双方が協調して働いていることが示唆される.

最後に,  $Ca^{2+}$  流入機構は一元的に制御されているわけではなく, CCE と NCCE が協調して働いていることがわかる. 最近の2つの研究では, Orai3 がエストロゲン受容体発現乳癌細胞株での SOCE に関与していることが示され, アラキドン酸制御  $Ca^{2+}$  チャンネル (ARC) に加えて Orai3 が  $Ca^{2+}$  選択的コンダクタンスに関与している可能性が示唆されている<sup>61) 62)</sup>. この Orai タンパク質が CCE チャンネルと NCCE チャン

ネルの両方のポアを形成することが示されているという事実は, これら2つのチャンネルタイプがまったく新しいイオンチャンネルファミリーとして独立していることが示唆されよう.

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり, 本研究に多大なる御協力をいただいたワシントン大学歯学部口腔生物学講座の Eileen L. Watson 教授, Kerry L. Jacobson 博士, Dennis H. DiJulio 博士ならびに岩手医科大学口腔保健育成学講座小児歯科学・障害者歯科学分野の久慈昭慶先生に深く御礼申し上げます. また, 本研究の一部は平成 18 ~ 20 年度文部科学省研究費補助金 (基盤研究 (C), 課題番号 18590192), 並びに文部科学省ハイテクリサーチプロジェクト (平成 17 年度 - 平成 21 年度) の助成を受けて行った.

## 利益相反について

本研究において, 開示すべき利益相反はない.

## 文 献

1. Young, J.A., Cook, D.I., van Lennep, E.W., Roberts M.: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 2nd ed., by Johnson L.R., Raven Press, New York, pp. 773-815, 1987.
2. Ebashi, S., Endo, M.: Calcium ion and muscle contraction. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 18: 123-183, 1968.
3. Rasmussen, H.: Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science*, 170: 404-412, 1970.
4. Berridge, M.J.: Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature*, 361: 315-325, 1993.
5. Berridge, M.J., Bootman, M.D., Lipp, P.: Calcium-a life and death signal. *Nature*, 395: 645-648, 1998.
6. Putney, J.W. Jr.: Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 11: 611-624, 1990.
7. Putney, J.W. Jr.: Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium*, 21: 257-261, 1997.
8. Lewis, R.S.: The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature*, 446 (7133) : 284-287, 2007.
9. Ambudkar, I.S., de Souza, L.B., Ong, H.L.: TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium*, 63:33-39, 2017.
10. Ambudkar, I.S.: Calcium signalling in salivary



- gland physiology and dysfunction. *J. Physiol.*, 594:2813-2824, 2016.
11. Mignen, O., Thompson, J.L., Shuttleworth, T.J.: Arachidonate-regulated  $Ca^{2+}$ -selective (ARC) channel activity is modulated by phosphorylation and involves an A-kinase anchoring protein. *J. Physiol.*, 567: 787-798, 2005.
  12. Shuttleworth, T.J.: Arachidonic acid activates the noncapacitative entry of  $Ca^{2+}$  during  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations. *J. Biol. Chem.*, 271: 21720-21725, 1996.
  13. Munaron, L., Antoniotti, S., Distasi, C., Lovisolo, D.: Arachidonic acid mediates calcium influx induced by basic fibroblast growth factor in Balb-c 3T3 fibroblasts. *Cell Calcium*, 22: 179-188, 1997.
  14. Broad, L.M., Cannon, T.R., Taylor, C.W.: A non-capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major  $Ca^{2+}$  entry mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentrations of vasopressin. *J. Physiol.*, 517: 121-134, 1999.
  15. Ito, K., Rome, C., Bouleau, Y., Dulon, D.: Substance P mobilizes intracellular calcium and activates a nonselective cation conductance in rat spiral ganglion neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 16: 2095-2102, 2002.
  16. Moneer, Z., Dyer, J.L., Taylor, C.W.: Nitric oxide co-ordinates the activities of the capacitative and non-capacitative  $Ca^{2+}$ -entry pathways regulated by vasopressin. *Biochem. J.*, 370: 439-448, 2003.
  17. Oikawa, M., Saino, T., Kimura, K., Kamada, Y., Tamagawa, Y., Kurosaka, D., Satoh, Y.: Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. *Histochem. Cell Biol.*, 140: 463-476, 2013.
  18. Birnbaumer, L., Zhu, X., Jiang, M., Boulay, G., Peyton, M., Vannier, B., Brown, D., Platano, D., Sadeghi, H., Stefani, E., Birnbaumer, M.: On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 15195-15202, 1996.
  19. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T.: Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J. Mol. Med (Berl)* ., 78: 14-25, 2000
  20. Venkatachalam, K., Montell, C.: TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 76: 387-417, 2007.
  21. Montell, C.: The venerable invertebrate invertebrate TRP channels. *Cell Calcium*, 33:409-417, 2003.
  22. Vazquez, G., Wedel, B.J., Kawasaki, B.T., Bird, G.S., Putney, J.W. Jr.: Obligatory role of Src kinase in the signaling mechanism for TRPC3 cation channels. *J. Biol. Chem.*, 279: 40521-40528, 2004.
  23. Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., Ambudkar, I.S.: Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *J. Biol. Chem.*, 283: 12935-12940, 2008.
  24. Jardin, I., Redondo, P.C., Salido, G.M., Rosado, J.A.: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 1783: 84-97, 2008.
  25. Liao, Y., Erxleben, C., Abramowitz, J., Flockerzi, V., Zhu, M.X., Armstrong, D.L., Birnbaumer, L.: Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 2895-2900, 2008.
  26. Birnbaumer, L., Yildirim, E., Abramowitz, J.: A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium*, 33: 419-432, 2003.
  27. Lopez, E., Berna-Erro, A., Salido, G.M., Rosado, J.A., Redondo, P.C.: FKBP25 and FKBP38 regulate non-capacitative calcium entry through TRPC6. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853: 2684-2696, 2015.
  28. Uehara, A., Yasukochi, M., Imanaga, I.: Modulation of ryanodine binding to the cardiac  $Ca^{2+}$  release channel by arachidonic acid. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28: 43-51, 1996.
  29. Woolcott, O.O., Gustafsson, A.J., Dzabic, M., Pierro, C., Tedeschi, P., Sandgren, J., Bari, M.R., Nguyen, K.H., Bianchi, M., Rakonjac, M., Rådmark, O., Ostenson, C.G., Islam, M.S.: Arachidonic acid is a physiological activator of the ryanodine receptor in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium*, 39: 529-537, 2006.
  30. Mignen, O., Shuttleworth, T.J.: I (ARC) , a novel arachidonate-regulated, noncapacitative  $Ca^{2+}$  entry channel. *J. Biol. Chem.*, 275: 9114-9119, 2000.
  31. Shuttleworth, T.J.: Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins. *Cell Calcium*, 45: 602-610, 2009.
  32. Mignen, O., Thompson, J.L., Shuttleworth, T.J.: STIM1 regulates  $Ca^{2+}$  entry via arachidonate-regulated  $Ca^{2+}$ -selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *J. Physiol.*, 579: 703-715, 2007.
  33. Sakai, T., Ambudkar, I.S.: Role for protein phosphatase in the regulation of  $Ca^{2+}$  influx in parotid gland acinar cells. *Am. J. Physiol.*, 271: C284-C294, 1996.
  34. Tojyo, Y., Tanimura, A., Matsumoto, Y.: Suppression of capacitative  $Ca^{2+}$  entry by serine/threonine phosphatase inhibitors in rat parotid acinar cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, 69: 381-389, 1995.
  35. Zoukhri, D., Hodges, R.R., Sergheraert, C., Dartt, D.A.: Cholinergic-induced  $Ca^{2+}$  elevation in rat lacrimal gland acini is negatively modulated by PKCdelta and PKCepsilon. *Invest. Ophthalmol.*

- Vis. Sci., 41: 386-392, 2000.
36. Murphy, C.T., Bullock, A.J., Westwick, J.: A role for protein phosphorylation in modulating  $\text{Ca}^{2+}$  elevation in rabbit platelets treated with thapsigargin. *Biochem. J.*, 313: 83-89, 1996.
  37. Saino, T., Watson, E.L.: Inhibition of serine/threonine phosphatase enhances arachidonic acid-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  via protein kinase A. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 296: C88-C96, 2009.
  38. Watson, E.L., Jacobson, K.L., Singh, J.C., DiJulio, D.H.: Arachidonic acid regulates two  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways via nitric oxide. *Cell Signal.*, 16: 157-165, 2004.
  39. Luo, D., Sun, H., Lan, X., Xiao, R., Han, Q.: Direct coupling between arachidonic acid-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Ca}^{2+}$  entry in HEK293 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 75: 141-151, 2005.
  40. Tran, Q.K., Watanabe, H., Le, H.Y., Pan, L., Seto, M., Takeuchi, K., Ohashi, K.: Myosin light chain kinase regulates capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human monocytes/macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:509-515, 2001.
  41. Martin, A.C., Willoughby, D., Ciruela, A., Ayling, L.J., Pagano, M., Wachten, S., Tengholm, A., Cooper, D.M.: Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry via Orail and stromal interacting molecule 1 (STIM1) regulates adenylyl cyclase type 8. *Mol. Pharmacol.*, 75:830-842, 2009.
  42. Watson, E.L., Wu, Z., Jacobson, K.L., Storm, D.R., Singh, J.C., Ott, S.M.: Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry is involved in cAMP synthesis in mouse parotid acini. *Am. J. Physiol.*, 274: C557-C565, 1998.
  43. Bojesen, I.N., Bojesen, E.: Binding of arachidonate and oleate to bovine serum albumin. *J. Lipid Res.*, 35: 770-778, 1994.
  44. Nakanishi, S., Kakita, S., Takahashi, I., Kawahara, K., Tsukuda, E., Sano, T., Yamada, K., Yoshida, M., Kase, H., Matsuda, Y., Hashimoto, Y., Nonomura, Y.: Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.*, 267: 2157-2163, 1992.
  45. Okada, T., Kawano, Y., Sakakibara, T., Hazeki, O., Ui, M.: Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.*, 269: 3568-3573, 1994.
  46. Saitoh, M., Naka, M., Hidaka, H.: The modulatory role of myosin light chain phosphorylation in human platelet activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 140: 280-287, 1986.
  47. Gratshev, D., Blom, T., Bjorklund, S., Tornquist, K.: Phosphatase inhibition reveals a calcium entry pathway dependent on protein kinase A in thyroid FRTL-5 cells: comparison with store-operated calcium entry. *J. Biol. Chem.*, 279: 49816-49824, 2004.
  48. Kawamura, M., Terasaka, O., Ebisawa, T., Kondo, I., Masaki, E., Ahmed, A., Kagata, M.: Integrity of actin-network is involved in uridine 5'-triphosphate evoked store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in bovine adrenocortical fasciculata cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 91:23-33, 2003.
  49. Menzel, D., Vugrek, O., Frank, S., Elsner-Menzel, C.: Protein phosphatase 2A, a potential regulator of actin dynamics and actin-based organelle motility in the green alga *Acetabularia*. *Eur. J. Cell Biol.*, 67: 179-187, 1995.
  50. Ribeiro, C.M., Reece, J., Putney, J.W. Jr.: Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  signaling, but not for capacitative calcium entry. *J. Biol. Chem.*, 272: 26555-26561, 1997.
  51. Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Gill, D.L.: Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell*, 98: 487-499, 1999.
  52. Rosado, J.A., Sage, S.O.: The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry. *J. Physiol.*, 526: 221-229, 2000.
  53. Lockwich, T., Singh, B.B., Liu, X., Ambudkar, I.S.: Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3) -associated caveolar  $\text{Ca}^{2+}$  signaling complex and loss of  $\text{Ca}^{2+}$  influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *J. Biol. Chem.* 276: 42401-42408, 2001.
  54. Murata, K., Sakon, M., Kambayashi, J., Yukawa, M., Ariyoshi, H., Shiba, E., Kawasaki, T., Kang, J., Mori, T.: The effect of okadaic acid and calyculin A on thrombin-induced platelet reaction. *Biochem. Int.*, 26: 327-334, 1992.
  55. Russa, A.D., Ishikita, N., Masu, K., Akutsu, H., Saino, T., Satoh, Y.: Microtubule remodeling mediates the inhibition of store-operated calcium entry (SOCE) during mitosis in COS-7 cells. *Arch. Histol. Cytol.*, 71: 249-263, 2008.
  56. Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C.R., Konig, S., Bernheim, L.: STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J. Cell Biol.*, 194: 335-346, 2011
  57. Sato, M., Ye, L.H., Kohama, K.: Myosin light chain kinase from vascular smooth muscle inhibits the ATP-dependent interaction between actin and myosin by binding to actin. *J. Biochem.*, 118: 1-3, 1995.
  58. Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M., Cohen, P.: The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur. J. Biochem.*, 210: 1023-1035, 1992.
  59. Sim, A.T., Baldwin, M.L., Rostas, J.A., Holst, J.,

- Ludowyke, R.I.: The role of serine/threonine protein phosphatases in exocytosis. *Biochem. J.*, 373: 641-659, 2003.
60. Thompson, M.A., Prakash, Y.S., Pabelick, C.M.: Arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup> influx in human airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 51:68-76, 2014.
61. Motiani, R.K., Abdullaev, I.F., Trebak, M.: A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 285: 19173-19183, 2010.
62. Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., Ouadid-Ahidouch, H.: Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J. Cell Physiol.*, 226: 542-551, 2011.

## MLCK reciprocally regulates capacitative calcium entry and non-capacitative calcium entry in intracellular calcium influx process in mouse parotid gland acinar cells

Tomoyuki SAINO<sup>1)</sup>, Miho KUMAGAI<sup>2)</sup>, Yoh-ichi SATOH<sup>1) 3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Anatomy (Cell Biology), <sup>2)</sup> Division of Special Care Dentistry, Department of Developmental Oral Health Science, School of Dentistry and <sup>3)</sup> Department of Medical Education, Iwate Medical University, Japan

(Chief: Tomoyuki SAINO)

[Received : November 18 2019 : Accepted : February 5 2020]

**Abstract** : Arachidonic acid (AA) regulates intracellular calcium concentration in a variety of cell types. In the present study, the effects of serine/threonine phosphatases and myosin light chain kinase (MLCK) on AA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mouse parotid acinar cells were investigated. Treatment of acinar cells with MLCK inhibitors, ML9 and wortmannin, thapsigargin-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry (capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry: CCE) was partially blocked. In contrast, AA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry (non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry: NCCE) was attenuated by wortmannin but increased by ML9. Calyculin A, a protein phosphatase (PP) inhibitor, resulted in an enhancement of AA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry. Our previous study suggested that this inhibition of PP resulted in an enhancement of AA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry via PKA. In the presence of ML9, AA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx enhanced by calyculin A was further increased. However, even when the order of ML9 administration was changed, the enhancement of AA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry by calyculin A was not changed. Taking everything into consideration, MLCK partially enhances CCE, but suppresses AA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry, i.e. NCCE. MLCK is probably present in the vicinity of PKA and is presumed to have a cooperative effect on the PKA response against CCE and NCCE.

**Key words** : INTRACELLULAR CALCIUM ION, ARACHIDONIC ACID, CAPACITATIVE CALCIUM ENTRY (CCE), NON-CAPACITATIVE CALCIUM ENTRY (NCCE), MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE