

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 24 年 4 月 19 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590200

研究課題名（和文）外分泌機転におけるプロテアーゼ活性化型受容体2に着目した形態機能解析
 研究課題名（英文）Morphological and functional analysis of protease-activated receptor 2 on intracellular calcium dynamics in rat parotid gland acinar cells

研究代表者

齋野 朝幸 (SAINO TOMOYUKI)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40305991

研究成果の概要（和文）：Protease-activated receptor (PAR)は、特定のプロテアーゼによって活性化されるGタンパク共役型7回膜貫通型受容体である。最近の研究では、PARは分泌など種々の細胞機能に関わっているとの報告がある。本研究では、ラット耳下腺を用いてPAR-2の機能をカルシウムイメージング法を用いて検討した。耳下腺においてPAR-2受容体の発現が強く認められた。PAR-2アゴニストのSLIGRL-NH₂の投与によって[Ca²⁺]_iの上昇を認めた。これは細胞外のCa²⁺除去によっても消失せず、Gd³⁺投与によっても同様であった。また、NOのdonorの投与でこの流入は増強した。これらのことから、PAR-2は細胞内ストアを刺激して[Ca²⁺]_iの上昇を引き起こし、続くCa²⁺濃度の上昇は、non-capacitative calcium entry (NCCE)によるものと示唆された。また、PAR-2APによる[Ca²⁺]_iの上昇は、一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害剤のL-NAME投与によって部分的に抑制され、リアノジン受容体抑制剤のテトラカイン存在下やADPRリボシルサイクラーゼを抑制しても同様な部分抑制が見られた。これに対し、calmodulin kinase IIを抑制することによって[Ca²⁺]_iの上昇完全に阻害された。その他各種キナーゼ阻害剤使用によって[Ca²⁺]_i上昇に変化は認められなかった。また、calmodulinを抑制した場合も同様に完全抑制が見られた。以上から、PAR-2受容体刺激による[Ca²⁺]_iの上昇にNOS、リアノジン受容体が関与していることが示唆され、これらの上流にCalmodulinやCAM kinase IIが存在していることが示唆された。

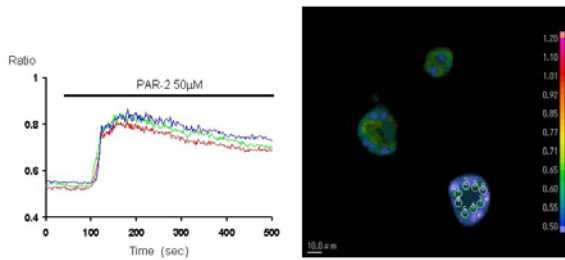
研究成果の概要（英文）：Protease-activated receptors (PARs) represent a novel class seven transmembrane domain G-protein coupled receptors, which are activated by proteolytic cleavage. Recent studies have reported that PARs are present in a variety of cells and have been prominently implicated in the regulation of a number of vital functions. The issue of whether the stimulation of PARs induces responses in parotid glands was examined; with special reference to intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) dynamics during PARs stimulation. In the present study, PAR2 mRNA was expressed strongly in the parotid glands. In parotid acinar cells, PAR2-activating peptide (PAR2-AP), SLIGRL-NH₂, induced an increase in [Ca²⁺]_i. Both removing of extracellular Ca²⁺ and using of Ca²⁺ channel blockers did not inhibit the PAR2-AP-induced [Ca²⁺]_i increase. The response to PAR-2 activation was mainly caused by Ca²⁺ mobilization from intracellular Ca²⁺ stores. This peptide induced Ca²⁺ release and entry were partially inhibited by the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, L-NAME. The NO donor, GEA 3162, but not 8-bromo-cGMP, mimicked the effects of PAR2 in activating non capacitative calcium entry (NCCE). Both KN93 (a CAM kinase II inhibitor) and W7 (a calmodulin inhibitor) completely blocked a Ca²⁺ release from intracellular Ca²⁺ store and a Ca²⁺ influx from extracellular spaces. Tetracaine and DHAB partially blocked these increases. These results indicate that PAR2-AP activates NCCE pathway. And we proposed that an effect of PAR-2 in parotid gland is dependent on CAMKII and a PAR2-AP activates the ryanodine-like receptors.

交付決定額

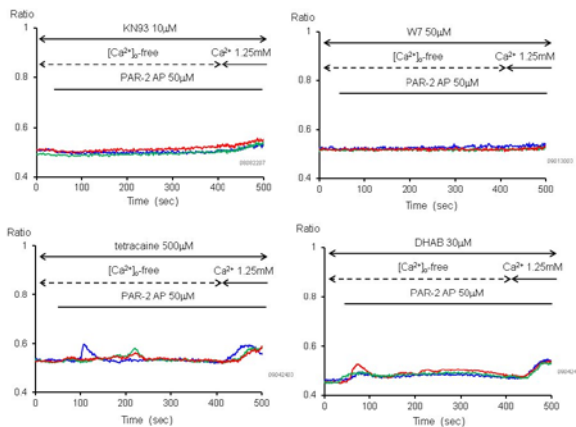
(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

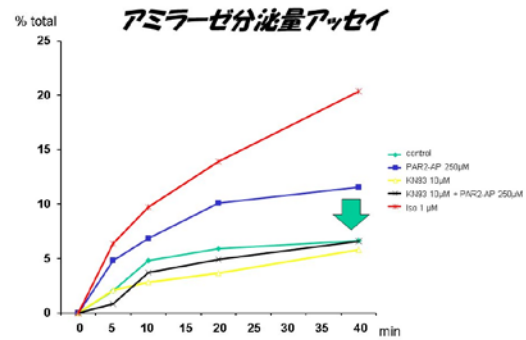
2) PAR-2 アゴニストのSLIGRL-NH₂の投与によって[Ca²⁺]_iの上昇を認めた。



これは細胞外のCa²⁺除去によっても消失せず、Gd³⁺投与によっても同様であった。また、NOのdonorの投与でこの流入は増強した。これらのことから、PAR-2は細胞内ストアを刺激して[Ca²⁺]_iの上昇を引き起こし、続くCa²⁺濃度の上昇は、non-capacitative calcium entry (NCCE) によるものと示唆された。また、PAR-2APによる[Ca²⁺]_iの上昇は、NOS阻害剤のL-NAME投与によって部分的に抑制され、リアノジン受容体抑制剤のテトラカイン存在下やADPリボシルサイクラーゼを抑制しても同様な部分抑制が見られた。これに対し、calmodulin kinase II (CAMK II)を抑制することによって[Ca²⁺]_iの上昇完全に阻害された。その他各種キナーゼ阻害剤使用によって[Ca²⁺]_i上昇に変化は認められなかった。また、calmodulinを抑制した場合も同様に完全抑制が見られた。以上から、PAR-2受容体刺激による[Ca²⁺]_iの上昇にNOS、リアノジン受容体が関与していることが示唆され、これらの上流にCalmodulinやCAMK IIが存在していることが示唆された。

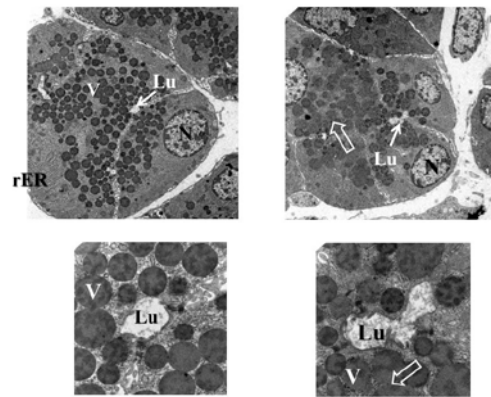


3) アミラーゼの分泌について検討したところ、PAR-2 刺激によってアミラーゼの分泌が認められ、この分泌はCAMKIIの抑制によって完全に阻害された。



KN93によってPAR2刺激アミラーゼ分泌がほぼ完全に抑制された。

4) 電顕でPAR-2刺激反応を確認したところ、PAR-2APによって、白抜きの矢印で示す様に顆粒の複合融合が認められ、分泌が起こることを認めた。



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 7 件)

(1) Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Satoh Y (2009) : The effects of diuretics on intracellular Ca²⁺ dynamics of arteriole smooth muscles as revealed by laser confocal microscopy. *Acta Histochem Cytochem* 42(4):121-128.

(2) Wakabayashi T, Kimura Y, Ohba Y, Adachi R, Satoh Y, Shingai R (2009) : In vivo calcium imaging of OFF-responding ASK chemosensory neurons in *C. elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790(8):765-769.

(3) Russa AD, Maesawa C, Satoh Y (2009) : Spontaneous [Ca²⁺]_i oscillations in G1/S phase-synchronized cells. *J Electron Microsc* (Tokyo) 58(5):321-329.

(4) Zou K, Maeda T, Watanabe A, Liu J, Liu S, Oba R, Satoh Y, Komano H, Michikawa M (2009) : Abeta42-to-Abeta40- and angiotensin-converting activities in different

domains of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 284(46):31914-31920.

(5) Sadzuka Y, Matsuura M, Sonobe T (2009) : The effect of taurine, a novel biochemical modulator, on the antitumor activity of Doxorubicin. *Biol Pharm Bull.* 32(9):1584-1587.

(6) Miura M, Saino T, Sato M, Satoh Y (2011) : The role of protease activated receptors in the intracellular calcium dynamics of neurons and satellite cells in the rat superior cervical ganglia. *Bioimages* 19:17-27.

(7) Yan J, Akutsu H, Satoh Y (2011) : The morphological and functional observation of the gap junction proteins in the oviduct epithelia in young and adult hamsters. *Okajimas Folia Anat Jpn* 88(2): 57-64.

(8) Kamada Y, Saino T, Oikawa M, Kurosaka D, Satoh Y (2012) : P2Y purinoceptors induce changes in intracellular calcium in acinar cells of rat lacrimal glands. *Histochem Cell Biol.* 137(1):97-106.

[学会発表] (計 24 件)

(1) 佐藤洋一, 齋野朝幸, 黒田敬: カルシウムイメージング法入門。第 34 回組織細胞化学講習会 2009 年 7 月 徳島

(2) 齋野朝幸, Eileen L. Watson, 佐藤洋一: Calmodulin あるいは Calmodulin kinase II の抑制によってラット耳下腺における Protease activated receptor 2 誘発性の Ca^{2+} 上昇が完全抑制される。第 55 回 日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会 2009 年 9 月 仙台

(3) 齋野朝幸, ワトソン アイリーン, 佐藤洋一: 細胞内カルシウム動態を指標としたラット耳下腺における Protease-activated receptor 2 の機能解析。第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 神戸

(4) Kuroda T, Kashiwa K, Kobayashi S, Satoh Y : Intracellular calcium dynamics of fibroblasts continuously exposed to high concentration of ATP. American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, 2009 December, San Diego

(5) Matsuura M, Kuroda T, Tamagawa Y, Saino T, Satoh Y, Sadzuka Y: Age-associated change in the reactivity of Noradrenaline-induced intracellular calcium dynamics in prostatic smooth muscles. The 49th American Society for

Cell Biology Annual Meeting 2009, Dec, San Diego

(6) 鎌田有紀, 齋野朝幸, 黒坂大次郎, 佐藤洋一: ラット涙腺腺房細胞に及ぼす ATP の効果。第 115 回日本解剖学会全国学術集会 2010 年 3 月 盛岡

(7) 玉川靖則, 松浦誠, 齋野朝幸, 佐藤洋一: ラット精巣細動脈での各利尿剤の作用特性の比較。第 115 回日本解剖学会全国学術集会 2010 年 3 月 盛岡

(8) Satoh Y: Tissue Bioimaging Examination of Morphological And Functional Heterogeneity In Various Organs. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会 2010 年 3 月 盛岡

(9) 阿久津仁美, 人見次郎, 佐藤洋一: 尿が誘発する鋤鼻感覚細胞内 Ca^{2+} 上昇パターンの多様性 第 115 回日本解剖学会全国学術集会 2010 年 3 月 盛岡

(10) 阿久津仁美: 尿が誘発する鋤鼻感覚細胞内 Ca^{2+} の上昇 平成 22 年度日本農芸化学会東北支部シンポジウム 2010 年 6 月 盛岡

(11) Satoh Y, Russa D: Microtubule Remodeling Resulting in Inhibition of Store-Operated Calcium Entry during Mitosis. The 3rd International Symposium on Bioimaging, 2010, January, Okazaki

(12) Satoh Y, Saino T, Akutsu-Yamauchi H, Hamano Y: New era of morphology - Developed by the fluorescent markers and the confocal microscopy. XXI International Symposium on Morphological Sciences, 2010, September, Taormina, Italy

(13) 鎌田有紀, 齋野朝幸, 黒坂大次郎, 佐藤洋一: ATP 受容体刺激による涙腺腺房細胞からの涙液分泌は P2Y 受容体が主である。日本解剖学会 第 56 回 東北・北海道連合支部学術集会 2010 年 9 月 旭川

(14) Russa D, Kuroda T, Satoh Y: Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in G1/S phase synchronized cells. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2010, Dec, Philadelphia, USA

(15) Saino T, Watson EL, Satoh Y : Functional analysis of protease-activated receptor 2 on intracellular calcium ion dynamics in rat parotid gland acinar cells. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2010, Dec,

Philadelphia, USA

(16) Kamada Y, Saino T, Kurosaka D, Satoh Y: Effect of ATP on intracellular calcium dynamics in rat lacrimal gland. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2010, Dec, Philadelphia, USA

(17) 佐藤洋一、東尾浩典、齋野朝幸 : 細胞外 ATP はマスト細胞で、開口放出を伴わない細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こす。第 88 回日本生理学会大会、116 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会 2011 年 3 月 横浜

(18) 齋野朝幸、Eileen L. Watson、佐藤洋一 : ラット耳下腺における細胞内カルシウム動態を指標とした Protease-activated receptor 2 機能の解析。第 88 回日本生理学会大会、116 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会 2011 年 3 月 横浜

(19) 阿久津仁美、人見次郎、佐藤洋一: 雄ラット鋤鼻感覚細胞を刺激する雌ラット尿中生理活性物質の分離精製。第 88 回日本生理学会大会、116 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会 2011 年 3 月 横浜

(20) 鎌田有紀、齋野朝幸、黒坂大次郎、佐藤洋一: ATP 受容体刺激による涙腺腺房細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は P2Y 受容体が主である。日本解剖学会 第 57 回 東北・北海道連合支部学術集会 2011 年 9 月 盛岡

(21) 玉川靖則、齋野朝幸、松浦誠、佐藤洋一: 利尿剤である spironolactone のラット精巣細動脈における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇機構の検討。日本解剖学会 第 57 回 東北・北海道連合支部学術集会 2011 年 9 月 盛岡

(22) 齋野朝幸、柁一毅、松浦誠、佐藤洋一: 血管細動脈の多様性: カルシウムイメージング法による検証。第 37 回日本微小循環学会総会 2012 年 3 月 盛岡

(22) 玉川靖則、齋野朝幸、松浦誠、佐藤洋一: ラット精巣細動脈におけるスピロノラクトン誘発性 Ca^{2+} 上昇メカニズムの研究。第 37 回日本微小循環学会総会 2012 年 3 月 盛岡

(23) 齋野朝幸、Watson Eileen、佐藤洋一 : ラット耳下腺における細胞内カルシウム動態を指標としたプロテアーゼ活性化型受容体 2 の機能解析。第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会 2012 年 3 月 甲府

(24) 阿久津仁美、人見次郎、佐藤洋一: 雄ラット

鋤鼻感覚細胞を活性化させる雌ラット尿中生理活性物質の分離精製。第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会 2012 年 3 月 甲府

〔図書〕(計 1 件)

佐藤洋一、齋野朝幸、阿久津仁美 (2011) : カルシウムイメージング技術の基礎。日本組織細胞化学会編 組織細胞化学 2011 p175-185.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋野 朝幸 (SAINO TOMOYUKI)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40305991

(2) 研究分担者

阿久津 仁美 (AKUTSU HITOMI)
岩手医科大学・医学部・ポストドクター
研究者番号: 30398482

松浦 誠 (MATSUURA MAKOTO)
岩手医科大学・薬学部・講師
研究者番号: 00405846

佐藤 洋一 (SATO YOH-ICHI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40118253

(3) 連携研究者