

学 位 論 文 内 容 の 要 約

愛知学院大学

甲 第 654 号	論文提出者 大隅 縁里子
論 文 題 目 ラット耳下腺デストリンキナーゼの部分精製および 酵素学的解析	

I. 緒言

唾液は、様々な生理機能をもち、近年では種々の疾病の診断材料としても注目されているが、その分泌機序については不明な点も多い。唾液タンパク質の分泌機構については、耳下腺アミラーゼを指標とした研究が行われ、 β 受容体刺激によって cAMP 依存性プロテインキナーゼが活性化され、内在性タンパク質がリン酸化されることによって最終的に開口分泌の起こることが知られている。共同研究者らは、 β 受容体刺激によりリン酸化される内在性タンパク質を検索する過程で、逆に脱リン酸化される内在性タンパク質を認め、それらをデストリンとコフィリンとして同定した。デストリンとコフィリンは、F アクチンの切断と脱重合を促進するアクチン結合タンパク質で、安静時耳下腺組織には、両者のリン酸化された不活性型と脱リン酸化された活性型が共存する。分泌細胞の細胞膜直下には皮質アクチン層が存在し、分泌小胞と細胞膜の融合を妨げるバリアとして機能していると考えられているが、ラット耳下腺腺房細胞の細胞膜直下にもアクチン層が存在し、 β 受容体刺激による消失と再構築が観察されている。したがって、デストリンとコフィリンの β 受容体刺激誘導性の脱リン酸化が、皮質 F アクチンの脱重合とそれに伴うアミラーゼ分泌に関与している可能性があり、先行研究では、ラット耳下腺にコフィリンより多量に存在するデストリンをリン酸化するプロテインキナーゼが検索され、上清画分中にデストリンキナーゼ活性が存在すること、この酵素を「DS2K」として DS2K

の酵素学的性質が他の細胞や組織で報告されているデストリンキナーゼの性質と異なっていることが報告されている。そこで本研究では、ラット耳下腺デストリンキナーゼの同定に向けて、酵素活性測定法と精製方法を検討し、得られた部分精製 DS2K を酵素学的に解析した。

II. 方法

1. DS2K の活性測定法

DS2K 活性の測定に使用した標準反応液は、50 mM Bis-Tris (pH 6.8)、5 mM 酢酸マグネシウム、70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ デストリン、2 mM ATP、3 mM 2-メルカプトエタノールおよび酵素標品を含み、30°Cで30分間インキュベートした。測定はトリプリケートで行った。反応液を PVDF 膜上にドットブロットし、リン酸化デストリンを特異的に認識する抗リン酸化デストリン抗体で免疫染色した。染色後の膜をスキャナーにかけ、リン酸化デストリンを NIH Image を用いたデンストメトリーにより定量した。

2. カラムクロマトグラフィーによる DS2K の部分精製

雄性ウィスター系ラットの耳下腺ホモジネートを 100,000 $\times g$ で 90 分間遠心し、「100,000 $\times g$ 上清画分」を得た。この画分を DEAE セルロースカラムに添加し、カラムを 40 mM NaCl を含む溶出液で洗浄した後、0.2 M NaCl を含む溶出液によって DS2K を溶出した。採取した活性画分に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加して 0.5 M とした後、これをフェニルセファロースカラムに添加した。カラムを 0.5 M と 0.4 M の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む溶出液で順に洗浄した後、50%

エチレングリコールを含む溶出液で DS2K を溶出した。得られた活性画分を直接ヒドロキシアパタイトカラムに添加し、10 mM, pH 6.8, リン酸ナトリウム (NaPB) を含む溶出液でカラムを洗浄した後、0.1 M NaCl と 0.1 M NaPB (pH 6.8) を含む溶出液で DS2K を溶出した。得られた活性画分を透析し、「部分精製 DS2K」として使用した。

3. 電気泳動法

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) には 12% アクリルアミドゲルを使用し、native PAGE には、SDS を含まない緩衝液系と 3 % アクリルアミドゲルを使用した。2D-PAGE は 1 次元目に native PAGE を用い、2 次元目には SDS-PAGE を使用した。

4. ゲル上の DS2K 活性の検出

部分精製 DS2K を native PAGE にかけ、泳動後のゲルを DS2K 活性測定反応液 (デストリン無添加) 中で平衡化した。これに併行して、PVDF 膜にデストリンを均等に吸着させ、膜を牛血清アルブミンでブロッキングした。この膜上に、上記の平衡化したゲルをのせて圧迫し、30℃で 4 時間インキュベートした後、PVDF 膜を抗リン酸化デストリン抗体で免疫染色した。

5. 質量分析によるタンパク質同定

2D-PAGE 後、ゲルから切り出したスポットに含まれるタンパク質を還元した後、アルキル化し、トリプシン消化した。生成したペプチドの質量分析には、MALDI TOF-TOF Analyzer を使用し、GPS Explore と Mascot search

engine を用いてデータベース検索を行った。

Ⅲ. 結果および考察

1. DS2K の活性測定法

ラット耳下腺の 100,000 × g 上清画分を用いてドットブロットアッセイ方法の定量性を検討した。デストリンのリン酸化は反応時間および酵素量に依存して直線的に増加した。50 検体以上のサンプルも迅速かつ簡便に測定可能となった (図 2、Osumi et al. *Advances in Enzyme Research*. 2014, 2, 100-112; Figure1)。

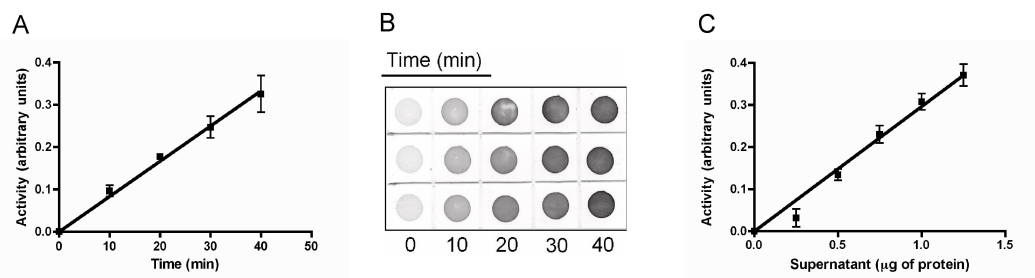


図 2. ドットブロットアッセイ法による DS2K 活性測定法の定量性

2. DS2K の部分精製

3 種のカラムクロマトグラフィーを順次行うことにより、100,000 × g 上清画分に多量に含まれる主要なタンパク質が除かれ、回収率は低いものの ($3.6 \pm 0.4\%$, $n = 4$)、活性を保持した状態で DS2K を部分精製することができた。比活性の増加は 2.3 ± 0.6 倍であった ($n = 4$) (表 1; Osumi et al. *Advances in Enzyme Research*. 2014, 2, 100-112; Table 1)。いずれのクロマトグラフィーにおいても、溶出力を緩徐に上昇させた場合には DS2K の回収率は低く、極端な場合には全く活性を回収できなかった。DS2K は、

溶出力を急激に増加させるステップワイズ溶出によって効率よく回収された。この結果から、DS2K がなんらかの細胞構成成分と複合体を形成しており、その成分と DS2K を同時に溶出させることによって、効率よく回収できる可能性が考えられた (図 3 ; Osumi et al. *Advances in Enzyme Research*. 2014, 2, 100-112; Figure 2)。

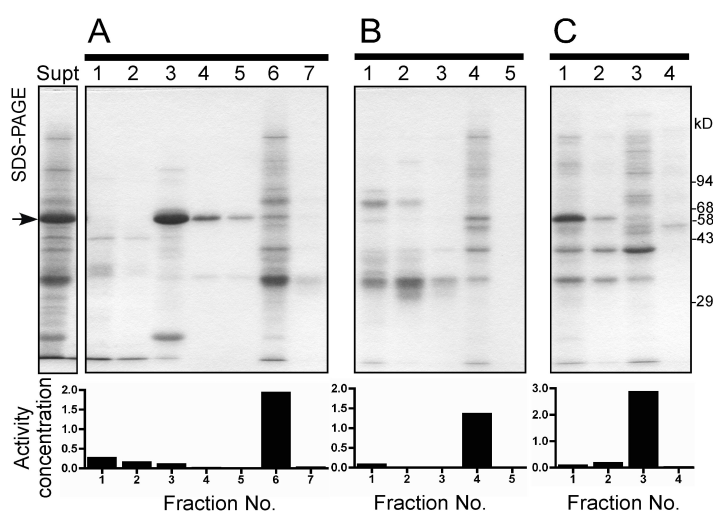


図 3. DS2K の部分精製

3. 部分精製 DS2K の酵素学的性質

DS2K の回収率が低いことから、精製の過程で、何らかの因子が脱落している可能性が危惧された。このため、部分精製 DS2K について主要な酵素学的性質を調べ、既報の上清画分中の DS2K の性質と比較検討した。

部分精製 DS2K の至適 pH は 6.8 付近にあり、至適 Mg^{2+} 濃度は 3 ~ 5 mM の間にあった。これらの値は、上清画分中の DS2K について得られた値と同様であった。部分精製 DS2K の活性は、上清画分中の DS2K 活性同様、NaCl で顕著に抑制され、0.1M NaCl によって活性の 70% が抑制された。部分精

製 DS2K のデストリンおよび ATP に対する K_m 値は、それぞれ、 $120 \pm 20 \mu\text{g/ml}$ ($n = 3$) と $230 \pm 40 \mu\text{M}$ ($n = 4$) であり、上清画分中の DS2K について得られた値との間に有意差を認めなかった (対応のない両側 t 検定により、 $p > 0.05$)。プロテインキナーゼ阻害薬の中で、部分精製 DS2K は ML-7、W-7、Y-27632、KN-93 によって強く阻害され、1 mM の ML-7 と KN-93 は DS2K 活性を完全に阻害した。同じ濃度で、H-7、H-8 および HA-1077 は部分精製 DS2K 活性を有効に阻害し得なかった。これらの阻害薬の効果も、上清画分中の DS2K に対する効果と類似していた。以上の結果から、部分精製後の DS2K の酵素学的性質は、上清画分中の DS2K の性質と同様で、回収された酵素については酵素活性発現に必要な因子等の脱落は起きていないと思われた (図 4、5 ; Osumi et al. *Advances in Enzyme Research*. 2014, 2, 100-112; Figure4)。

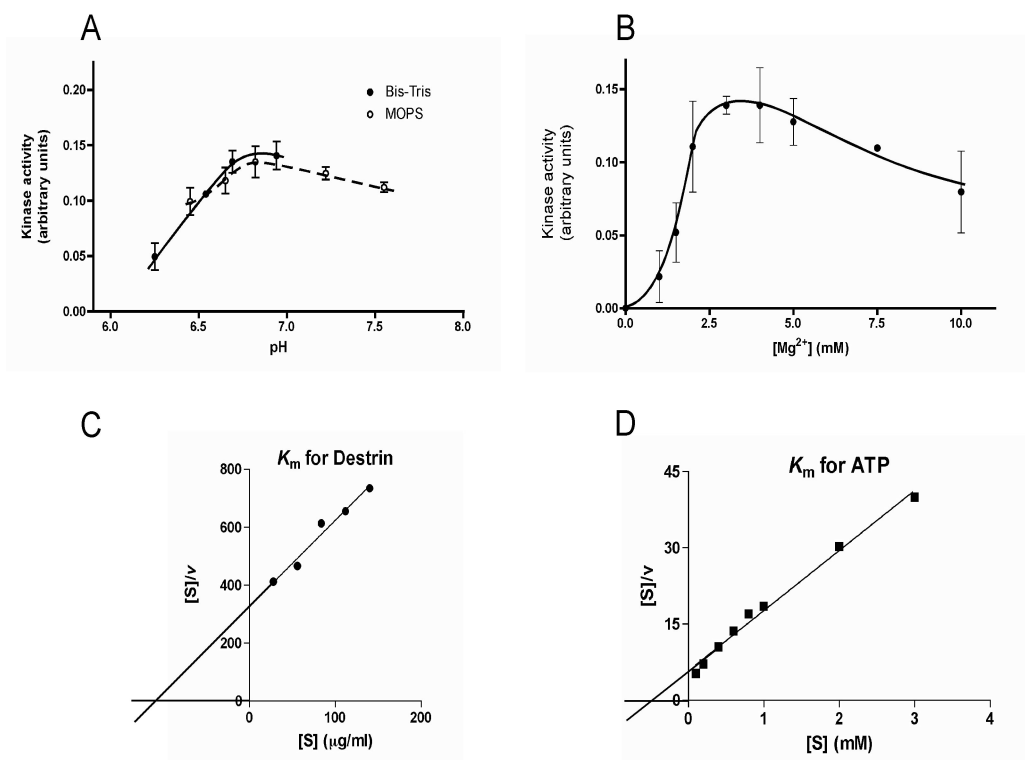


図 4. 部分精製 DS2K の酵素学的性質

4. 2D-PAGE による DS2K の精製と解析

部分精製 DS2K を用い、2D-PAGE による DS2K 精製の可能性を検討した。具体的には、部分精製 DS2K を 30 mm 幅のウェルに添加して一次元目の native PAGE を行い、泳動後にウェル幅で切り取ったゲルを 3 等分して中央のゲルを DS2K 活性の検出に用いた。その結果、DS2K 活性は 2 本のバンドとして検出され、タンパク染色したゲルと比較することにより、DS2K は他の大部分のタンパク質から分離されることが判明した (図 6、Osumi et al. *Advances in Enzyme Research*. 2014, 2, 100-112; Figure4)。

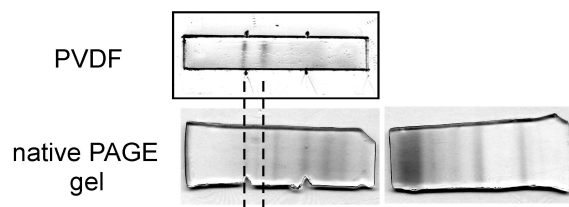


図 6 native PAGE 後のゲル上の DS2K 活性の検出

残りのゲルの一方は PVDF 膜上の活性染色バンドの位置で 2 カ所切断し、間隔をあけて 2 次元目ゲル上に固定した。他方はスポット検出時の補助と確認のため、切断することなく SDS-PAGE にかけた。その結果、DS2K 活性部位由来のタンパク質が、ゲル片間の空レーンに面して分離されたいくつかのスポットとして検出された (図 7 ;Osumi et al. *Advances in Enzyme Research*. 2014, 2, 100-112; FigureS1)。質量分析の結果、これらの中に既知のプロテインキナーゼは同定されなかったが、複合体を形成することが知られている sec31 と sec13 が一方の空レーンに面して上下に位置し、また

同様に複合体を形成することが知られている CSN2 と CSN4 が他方の空レーンに面して上下に位置していた。これらの結果は、実験条件をさらに改善することにより、本法を DS2K とその仮定的構成要素の検出に用い得る可能性を支持した。

IV. 結語

本研究では、デストリンキナーゼの活性測定にドットブロット法を導入して酵素活性測定の効率化を図るとともに、ラット耳下腺 100,000 × g 上清から DS2K を活性を保持した状態で部分精製する方法を開発した。また、部分精製 DS2K を酵素学的に解析し特徴づけた。さらに、ゲル上で DS2K 活性を検出する方法を確立し、DS2K 候補となり得るスポットの 2D-PAGE 後のゲル上での検出方法を提案した。この方法で DS2K を同定するためには、実験条件のさらなる検討が必要とされるが、本研究結果がラット耳下腺デストリンキナーゼの同定と耳下腺における開口放出メカニズムの将来的な研究基盤を形成することが期待される。