

顎下腺導管系の分化における遺伝子発現の研究

研究代表者	井関 尚一
雑誌名	平成18(2006)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2005-2006
ページ	6p.
報告年度	2007-05
研究課題番号	17590154
URL	http://doi.org/10.24517/00048956



顎下腺導管系の分化における遺伝子発現の研究

17590154

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金

基盤研究(C)研究成果報告書

金沢大学附属図書館

平成19年5月



1300-04393-8

研究代表者 井関 尚一

(金沢大学大学院医学系研究科教授)

金沢大学附属図書館



1300-04393-8

著 者 寄 贈

<はしがき>

ラットやマウスなど齧歯類の顎下腺は、生後に腺房部分が自律神経(主に β アドレナリン作動性)の作用により増殖分化し、導管系が内分泌(主にアンドロゲン)の作用により分化するため、細胞の増殖と分化の制御を *in vivo* で研究する系としてすぐれている。導管系のうち齧歯類に特有の顆粒性導管部分は、種々の増殖因子などの多様な生理活性蛋白質を産生する。顆粒性導管は雄において雌よりはるかによく発達し、精巣切除や下垂体切除で退縮する。雌マウスや精巣切除マウス、下垂体切除ラットなどにアンドロゲンであるテストステロンを投与すると、短期間のうちに線条部導管細胞が顆粒性導管細胞に分化するが、その分子機構は不明である。本研究ではラットやマウス顎下腺でアンドロゲン投与に伴い顎下腺での発現が誘導される遺伝子を解析することにより、アンドロゲンによる細胞分化の調節のメカニズムを解明することを目的とした。

研究組織

研究代表者 : 井関尚一(金沢大学大学院医学系研究科教授)

研究分担者 : 若山友彦(金沢大学大学院医学系研究科助教授)

交付決定額(配分額)

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,200,000	0	2,200,000
平成18年度	1,400,000	0	1,400,000
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究発表

(1) 学会誌等

1) Sakulsak, N., Wakayama, T., Hipkaeo, W., Yamamoto, M. and Iseki, S.: Cloning and characterization of a novel animal lectin expressed in the rat sublingual gland. *J. Histochem. Cytochem.* 53: 1335-1343, 2005.

2) Wakayama, T., Kato, Y., Utsumi, R., Tsuji, A. and Iseki, S.: A time- and cost-saving method of producing rat polyclonal antibodies. *Acta Histochem. Cytochem.* 39: 79-87, 2006.

3) Sakulsak, N., Wakayama, T., Hipkaeo, W. and Iseki, S.: A novel mouse protein differentially regulated by androgens in the submandibular and lacrimal glands. *Arch. Oral Biol.*, in press, 2007.

(2) 口頭発表

1) 井関尚一, 若山友彦, Natthiya Sakulsak, Wiphawi Hipkaeo: アンドロゲンにより発現抑制を受ける新規のマウス顎下腺分泌蛋白質について
第46回日本組織細胞化学会総会・学術集会 京都 2005年10月1-2日

2) 若山 友彦, 井関 尚一: 簡便(低コスト・短時間)な特異的ポリクローナル抗体の作製 第46回日本組織細胞化学会総会・学術集会 京都 2005年10月1-2日

3) Sakulsak N, Wakayama T, Hipkaeo W, Yamamoto M, Iseki S: A new member of the L-type lectin protein family identified in the rat sublingual gland. 4th World Congress of Cellular and Molecular Biology, Poitiers, France, Oct. 7-12, 2005.

4) 井関尚一, Natthiya Sakulsak, 若山友彦, Wiphawi Hipkaeo: マウスの顎下腺と涙腺に発現する新規蛋白質 日本解剖学会第65回中部支部学術集会 石

川・内灘 2005年10月8-9日

5) 若山友彦, 加藤将夫, 辻 彰, 井関尚一: 低コスト・短時間での特異的なポリクローナル抗体作製法 日本解剖学会第 65 回中部支部学術集会 石川・内灘 2005年10月8-9日

6) サクンサク・ナチャ, 若山友彦, ヒプカエオ・ウイパウィー, 井関尚一: アンドロゲンにより発現抑制を受ける新規のマウス顎下腺蛋白質について 第 111 回日本解剖学会総会・全国学術集会 北里大学相模原 2006年3月29-30日

7) 若山友彦, 加藤将夫, 辻 彰, 井関尚一: 作製期間を短縮できるラットポリクローナル抗体作成法 第 111 回日本解剖学会総会・全国学術集会 北里大学相模原 2006年3月29-30日

8) Iseki, S: Plenary Lecture: The rodent submandibular gland as the model of cell growth and differentiation. The 29th Annual Meeting of the Society of Anatomy of Thailand, Patthaya, Thailand, May 2-4, 2006.

9) Iseki S, Sakulsak N, Wakayama T, Hipkaeo W: A novel mouse protein differentially regulated by androgens in the submandibular and lacrimal glands. 3rd International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen, Okazaki, Oct. 20-23, 2006.

10) Natthiya Sakulsak, Sunisa Keattikunpairoj, 若山友彦, 井関尚一: マウス顎下腺由来の蛋白質 SMARP の発現と局在に対する神経性および内分泌性因子の影響 日本解剖学会第 112 回総会・全国学術集会 大阪 2007年3月27-29日

11) Sunisa Keattikunpairoj, Natthiya Sakulsak, 若山友彦, 井関尚一: マウス唾液腺における脂肪酸受容体 GPR40 の発現と局在 日本解剖学会第 112 回総会・全国学術集会 大阪 2007年3月27-29日

研究成果（概要）

1) ラット舌下腺に発現する新規蛋白質:

ラットの舌下腺に特異的に発現し、顎下腺には発現しない遺伝子を見いだしてこれをクローニングし、そのコードする蛋白質への抗体を作成した。この蛋白質は動物 L 型レクチンの一種であるヒト ERGL と高いホモロジーを有する膜蛋白質であり、Sublingual acinar membrane protein (SLAMP) と名付けた。SLAMP は舌下腺の腺房細胞において主に小胞体-ゴルジ中間区画 (ERGIC) の膜に局在し、粘液成分の形成や輸送、分泌に関与することが示唆された (発表論文1)。

2) 短期間、低予算でのラットポリクローナル抗体作成法の開発:

抗体を用いた蛋白質の発現と局在の検出は本研究に不可欠の技術であるが、抗体の作成には通常3ヶ月以上がかかる。そこでラットを用いて約1ヶ月でポリクローナル抗体をつくる方法を開発した。抗原である蛋白質をコードする cDNA の一部を、相補的な合成オリゴヌクレオチドから作成し、細菌に導入してキャリアー蛋白との融合蛋白質を産生させる。これを抗原としてラット足蹠に注射し、2週間後に追加免疫を行って1週後に抗血清を得た。最大で 1600 倍の抗体価が得られた。マウスの ERGIC-53 は、小胞体から小胞体-ゴルジ中間区画 (ERGIC) への小胞性蛋白質輸送に関与する膜蛋白質で、我々の発見した SLAMP と相同性があることで知られる。今回の方法でつくった抗 ERGIC-53 ラット抗体によりマウス顎下腺を免疫染色したところ、ERGIC に局在し、SLAMP の生理学的役割がこれと関係深いことが確認された (発表論文2)

3) 顎下腺導管系の分化における Menin の発現と局在:

Menin は、転写因子 JunD と結合してその活性を抑制する核内蛋白質である。マウス顎下腺における menin の発現は、雄より雌ではるかに高かった。Menin の免疫反応は介在部導管および雌の線条部導管遠位部の細胞に認められ、雄の顆粒性導管 (GCT) 細胞には存在しなかった。雄の思春期および雌へのアンドロゲン投与で線条部導管細胞が顆粒性導管細胞に分化する際に、核の menin が消失した。JunD と menin の発現と局在のパターンは一致し、両者の複合体が顎下腺導管系の分化を制御する可能性が示唆された (発表準備中)。

4) アンドロゲンにより発現を抑制される顎下腺の新規蛋白質:

雄と雌のマウス顎下腺から抽出した mRNA を用い、PCR を用いた遺伝子サブトラクション法により、雄または雌マウスの顎下腺に優位に発現する顎下腺の遺伝子を同定した。そのうち、雌で優位に発現する新規の遺伝子をひとつ見いだした。この遺伝子によりコードされる蛋白質は、N 末端のシグナル配列と思われる疎水性アミノ酸を含む 165 アミ

ノ酸からなり、ラット顎下腺に多く含まれるグルタミン／グルタミン酸の豊富な蛋白質 (GRP)と相同性があった。この蛋白質の合成ペプチドに対するラット抗体を作成した。Northern ブロット解析において、この蛋白質の mRNA はマウス全身の主な器官のうち、顎下腺と涙腺のみに発現し、約 1.2kb の単独サイズを示した。顎下腺では雄より雌で36倍高く、逆に涙腺では雌より雄で28倍高い発現が見られた。精巣切除マウスや雌マウスにテストステロンを投与する実験により、mRNA 発現は顎下腺ではアンドロゲンにより顕著に抑制され、逆に涙腺ではアンドロゲンにより顕著に促進されることがわかったため、この蛋白質を Submandibular androgen-repressed protein (SMARP)と名づけた。In situ ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学において、SMARP の mRNA と蛋白質は雌の顎下腺および雄の涙腺の腺房細胞に局在し、導管細胞には認められなかった。異なる器官においてアンドロゲンにより反対の発現制御を受ける遺伝子産物は極めて稀であり、アンドロゲンによる遺伝子発現制御機構の解明に糸口を与えると思われた(発表論文3)。