

蛋白リン酸化酵素 P A S K の免疫組織化学的局在

—消化器系器官における P A S K の細胞分布—

宇城啓至・飯田津喜美・奥村明日香・小林沙季・高橋匠

Immunohistochemical Localization of Protein Kinase PASK:
Cellular Localization of PASK in Mouse Alimentary Tract

Hiroshi USHIRO・Tsukimi IIDA・Asuka OKUMURA・Saki KOBAYASHI・Takumi TAKAHASHI

1 はじめに

自然界には、ATPのリン酸基を化合物に結合させたり、リン酸が結合している化合物からリン酸基を脱離させたりする反応がひろくみられ、前者はリン酸化反応、後者は脱リン酸化反応と呼ばれている。蛋白リン酸化反応では、リン酸化されることで蛋白の機能が活性化されたり抑制されたりし、実際の生体内でもこの蛋白リン酸化反応が蛋白機能の調節に大きな役割を果たしていることが明らかにされている。蛋白リン酸化酵素は、ヒトの細胞でも数千種類存在し、それぞれ細胞の状況に応じて特定の標的蛋白をリン酸化することで細胞機能を制御する、分子スイッチの役割を果たしている。蛋白リン酸化酵素 P A S K はそのうちの一つであるが、ほかの蛋白リン酸化酵素にはみられない特徴的な組織分布を示し、脳の脈絡叢上皮細胞や胃底腺壁細胞など、電解質輸送の活発な細胞に強く発現している(1)。このような特徴から、P A S K は体液のイオン組成の調節に関与している可能性が考えられている。

P A S K の生理的機能について、著者らは、P A S K が F - アクチン結合能をもち、高温や高張 Na C l などの細胞ストレス刺激に応じて、P A S K がサイトゾルから細胞骨格画分へ移行することから、細胞ストレス応答時の細胞骨格制御に関与していると考えている(2)。一方、P A S K (S P A K とも呼称されている)が、ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオンの輸送に関わる Na-K-2Cl 共輸送体 (N K C C 1) に結合して、その機能を制

御していることが明らかにされ(3)、P A S K が細胞のかたちとイオン濃度の調節に関与している可能性が示唆されている。さらに、P A S K の上流にあって、P A S K のリン酸化を通して Na-K-2Cl 共輸送体の機能を制御している蛋白リン酸化酵素 (W N K 1 や W N K 4 と呼ばれている酵素)が存在すること、そして、それらの蛋白リン酸化酵素の機能異常がある種の先天性高血圧症(ゴードン症候群)をもたらすことが明らかにされ、電解質代謝における P A S K の役割が注目されている(4)。

P A S K の標的蛋白質と、P A S K を制御している蛋白リン酸化酵素が同定されたことで、P A S K の生理的機能の一端が明らかにされた。しかしながら、生体内では組織の違いによって異なる蛋白質と相互作用して、別の機能を果たしている可能性もある。そこで、著者らは遺伝子ターゲティング法によって P A S K 遺伝子を破壊し、P A S K を欠失したマウスにどのような異常が現れるかを解析して、P A S K の生理的機能を明らかにすることを試みている。その成果の一つとして、P A S K 欠失オスマウスでは精巣が小さく生殖能の低下がみられることを示した(昨年度紀要)。しかしながら、そのほかの組織では P A S K 欠失による顕著な異常がみられていない。その理由として、一般に蛋白リン酸化酵素の欠失マウスでは、欠落した酵素を代償する細胞内情報伝達経路(バイパス経路)が働くため、顕著な異常を観察しにくいということがあげられる。著者らは、P A S K が多く発現されている細胞では P

ASKの機能が重要な役割を果たしているはずと考え、これまで不明なところのある消化器系器官においてPASKの免疫組織化学染色を行ってPASKの細胞分布を明らかにし、PASK欠失マウスで欠落症状を探る手がかりにすることを狙っている。

2 PASK免疫組織染色

抗PASK抗体：ラットPASKのカルボキシル基側半分を含む部分ペプチドとGlutathione S-transferase (GST)との融合蛋白を大腸菌で合成し、その融合蛋白をウサギに免疫して抗PASK抗体を作成した(1)。この抗体がPASK蛋白のみに反応するという抗体の特異性はすでに確かめている。

免疫組織化学染色：10%ホルマリンで灌流固定したマウス(16月齢オス)から臓器を切り出し、定法に従って6μメートル厚のパラフィン組織切片を作成した。脱パラフィン処理した組織切片に0.3%過酸化水素加メタノールによる内因性ペルオキシダーゼ除去操作を行い、10mMクエン酸緩衝液(pH7.4)中で120度C20分の熱処理を行った(抗原の賦活化)。切片を3%ウシ血清アルブミン(BSA)/phosphate-buffered saline(PBS)でブロッキング処理したあと、抗PASK抗体(1μグラム/ml 3%BSA/PBS)と18時間4度C反応させた。結合した抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体と反応させた後、0.05%過酸化水素加ジアミノベンチジン反応液(0.2mg/ml 50mMトリス塩酸緩衝液、pH7.6)中で発色させて検出し、ヘマトキシレンによる後染色をしたのち、オリンパス生物顕微鏡BH-2で観察し、オリンパスデジタルカメラE-330で記録した。

3 PASKの細胞分布

図1は野生型マウスの胃粘膜の免疫組織化学染色の結果を示している。胃底腺の細胞が褐色に陽性反応を示している。図左下にみられる前胃の重層扁平上皮はほとんど染まっていない。図2の拡大像では、胃小窩のすべての細胞がPASK陽性となった。ラット胃底腺では壁細胞のみが強陽性であった(1)ことを考えると、この違いがマウス胃底腺に

おける壁細胞や主細胞の分布の違いによるものか、PASK自体の分布の違いによるものか、今後、壁細胞特異的抗体等で細胞を特定して明らかにしたい。

図3、4は十二指腸と膵臓の免疫組織染色像であるが、膵臓の外分泌細胞と十二指腸陰窩の粘膜上皮細胞がPASK陽性であった。図5、6の回腸では、PASKは陰窩と表層の腸上皮細胞がともにPASK陽性であった。膵臓がPASK強陽性であることはすでに報告されているが、十二指腸では陰窩の粘膜上皮細胞のみがPASK陽性で、小腸でも回腸まで下がると、すべての粘膜上皮細胞がPASK陽性であることは興味深い。図7、8の結腸染色像に示したように、結腸では表層の円柱細胞をはじめリーベルキューン陰窩の粘膜上皮細胞もPASK陽性であった。小腸と結腸の筋層間神経叢の神経細胞はいずれもPASK陽性であった。

以上のことから、消化管では胃底腺の壁細胞以外でも、小腸・結腸の粘膜上皮細胞がPASK陽性であることが明らかとなった(図9)。結腸のうちでも、ナトリウム塩と水の再吸収を活発に行っている円柱細胞がPASK陽性であることは、PASKの機能を考える上で興味深い。今後、PASK欠失マウスをつかって、PASK欠失によって結腸の機能に異常が見られるか検証する予定である。

4. 文献

1. Ushiro, H., Tsutsumi, T., Suzuki, K., Kayahara, T., and Nakano, K. (1998) Arch. Biochem. Biophys. 355, 233-240
2. Tsutsumi, T., Ushiro, H., Kosaka, T., Kayahara, T., and Nakano, K. (2000) J. Biol. Chem. 275, 9157-9162
3. Piechotta, K., Lu, J., and Delpire, E. (2002) J. Biol. Chem. 277, 50812-50819
4. Flatman, P. W. (2007) Clinical Science 112, 203-216
5. 宇城啓至 (2006) 三重短大紀要 54, 9-12
6. 宇城啓至 (2007) 三重短大紀要 55, 35-37

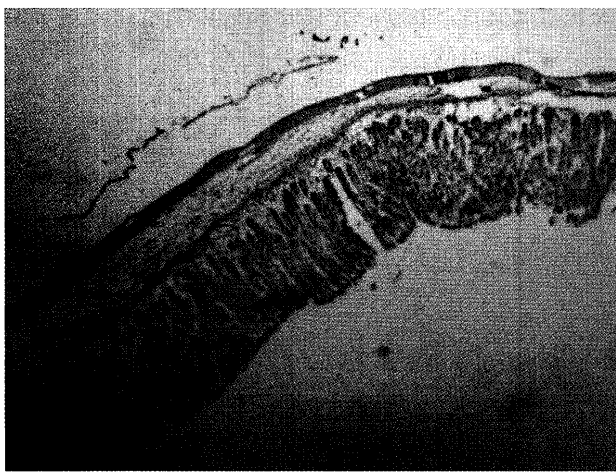
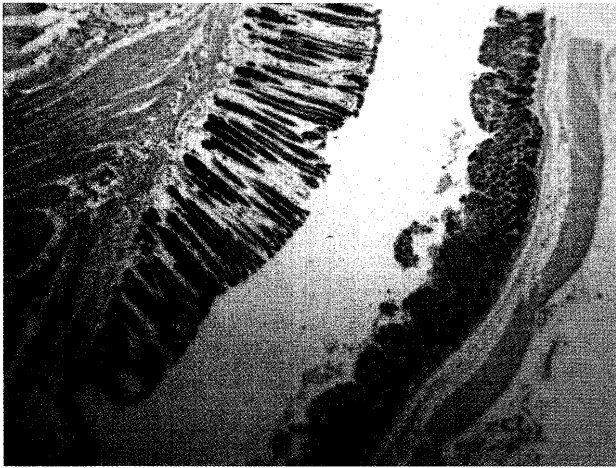


図1. 抗PASK抗体によるマウス胃底腺の免疫組織化学染色. 上図, 抗PASK抗体. 対物4倍. 胃底腺上皮細胞が褐色に染まっている. 図左下部の重層扁平上皮はマウスの前胃部. 下図, 正常ラビットIgGによるネガティブコントロール染色. 対物4倍. ペルオキシダーゼによる発色はみられない.

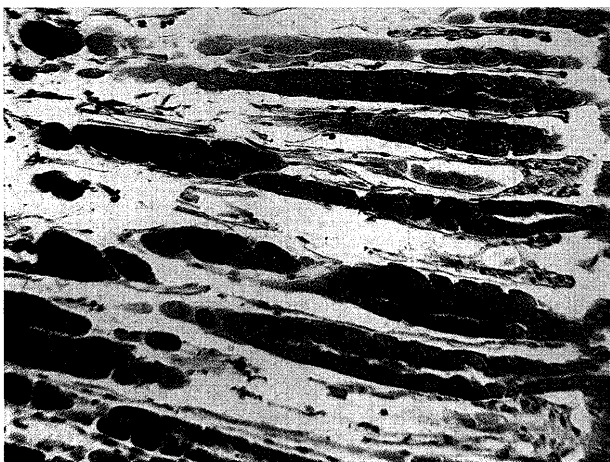


図2. 抗PASK抗体によるマウス胃底腺の免疫組織化学染色. 対物20倍.

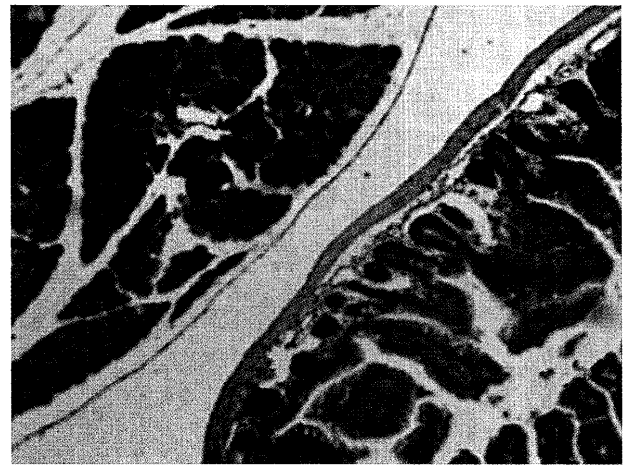
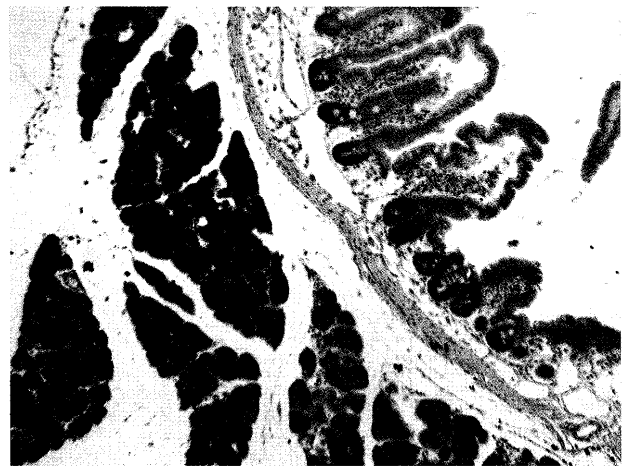


図3. 抗PASK抗体による膵臓・十二指腸の免疫組織化学染色. 対物10倍. 上図, 抗PASK抗体. 対物4倍. 下図, 抗PASK抗体によるPASK欠失マウス臓器の染色(ネガティブコントロール染色). 対物10倍.

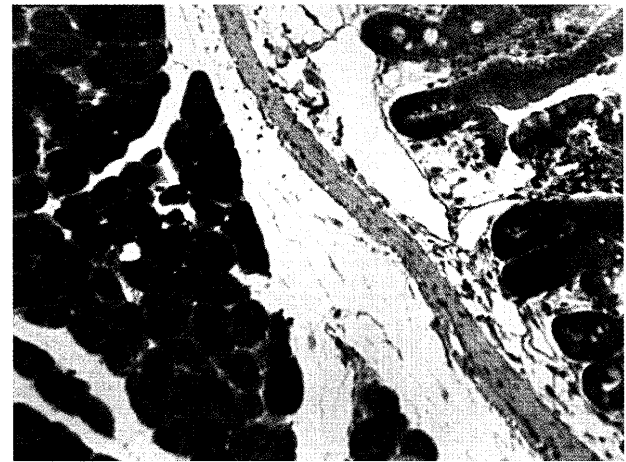


図4. 抗PASK抗体による膵臓・十二指腸の免疫組織化学染色. 対物20倍.

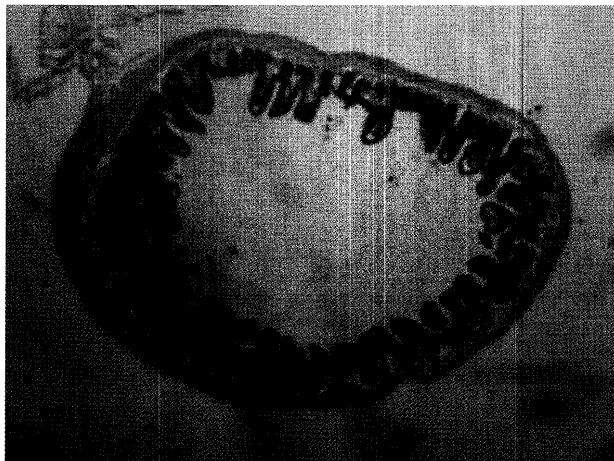


図5. 抗PASK抗体による回腸の免疫組織化学染色. 対物4倍。

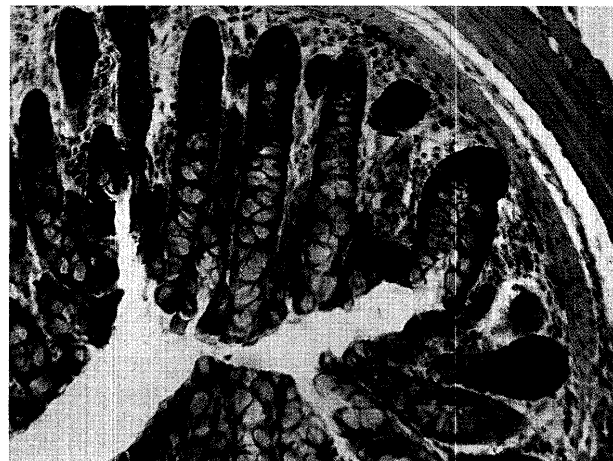


図8. 抗PASK抗体による結腸の免疫組織化学染色. 対物20倍。



図6. 抗PASK抗体による回腸の免疫組織化学染色. 対物20倍。

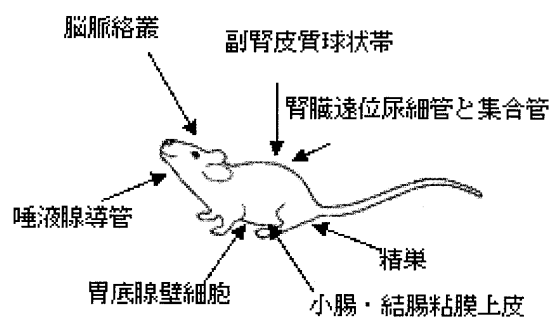


図9. PASKの組織分布

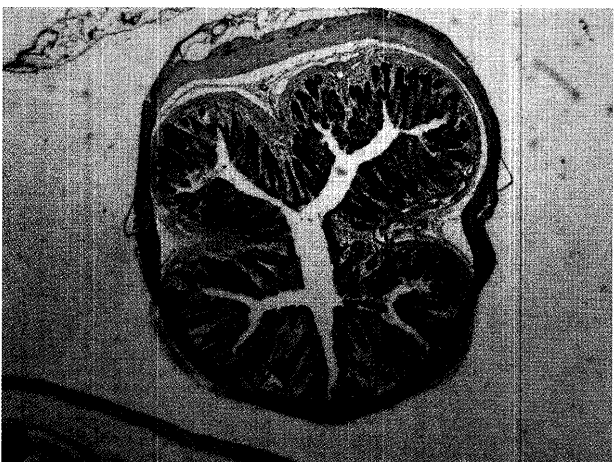


図7. 抗PASK抗体による結腸の免疫組織化学染色. 対物4倍。