ラット顎下腺カルモジュリンの電気泳動法による検出

東 城 庸 介 内 田 雅 巳 相 良 り か 子
松 井 聡 子 松 本 仁 人

東日本学園大学歯学部歯科薬理学講座（主任：松本仁人教授）

〔受付：昭和61年10月7日〕

Electrophoretic detection of calmodulin in rat submandibular gland

Yosuke Tojyo, Masami Uchida, Rikako Sagara,

Satoko Matsui and Yoshito Matsumoto

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry,

Higashi-Nippon-Gakuen University

Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-02

(Chief: Prof. Yoshito Matsumoto)

[Accepted for publication : October 7, 1986]

Key words: Submandibular gland / calmodulin / calcium

Abstract: The heat-stable extract of rat submandibular gland was chromatographed on DEAE-cellulose. Calmodulin activity was eluted in a range of 0.25-0.4 M NaCl. When fractions containing the activity were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, a calmodulin-like protein was detected as a protein band with a changed mobility in the presence and absence of Ca^{2+} . The electrophoretic mobility was identical with that of bovine brain calmodulin. With ^{45}Ca -autoradiography, the protein was shown to have a high affinity for Ca^{2+} . These results indicate that the protein is calmodulin.

緒 言

近年、カルモジュリンが種々の Ca^{2+} 依存性の細胞機能調節に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。唾液分泌機能にもカルモジュリンが関与している可能性は十分考えられるが、今のところそれを直接的に証明した報告はない。耳下腺カルモジュリンの同定¹⁾や精製²⁾はすでに行われており、最近、我々もラットの耳下腺カルモジュリンの存在を電気泳動法により確認した³⁾。一方、顎下腺カルモジュリンについては耳下腺ほどその報告例は多くない。今回、我々は1)

脳のホスホジエステラーゼに対する Ca^{2+} 依存性の活性化能、2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上での Ca^{2+} の有無による易動度の変化、3) 見かけの分子量、4) Ca 結合能を基準としてラット顎下腺カルモジュリンを検出したので報告する。

材料と方法

1. 試料の調製

体重約300gのWistar系ラット20匹から顎下腺を摘出し、5mM 2-メルカプトエタノールと0.2mM EGTAを含む3倍量の10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中でホモジナイズした。ホモジネートを10万g、1時間で遠心し、上清を集めた。

沈査は再度ホモジナイズして遠心し、上清を先に得られた上清と混合後、2分間沸とう水中で熱処理を行った。さらに、10万gで遠心し、その上清を試料として用いた。

2. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

先に調製した試料を20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)で平衡化したDEAE-セルロースカラム(1×10cm)により分画した。タンパクの溶出は0-0.5M NaClの直線的濃度勾配により行った。溶出液は3ml ずつのフラクションに分取した。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

15%ポリアクリルアミドスラブゲルを用い、Laemmliの方法⁴⁾に従って行った。分子量算定のための標準タンパクとして β -galactosidase (分子量130,000), serum albumin (68,000), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (32,000), β -lactoglobulin (18,000), lysozyme (15,000)を用いた。電気泳動後、ゲルはクマジーブルー染色、または、ウェスタンブロットティングによるタンパク転写に供した。

4. ^{45}Ca -オートラジオグラフィー

ウェスタンブロットティング法 (Towbin ら⁵⁾)によりゲル上のタンパク質をデュラポア膜(ミリポア)に転写した。この後のオートラジオグラフィーの行程はMaruyama らの方法⁶⁾に準じて行っ

た。すなわち、デュラポア膜を60mM KClと5 mM MgCl_2 を含む10mM イミダゾール・HCl buffer (pH 6.8)中でよく洗い、さらに15分間、 $1\mu\text{Ci/ml}$ の $^{45}\text{CaCl}_2$ を含む同じbuffer中でインキュベートした。50%エタノールで5分間洗った後、 ^{45}Ca でラベルされたタンパクバンドを3日間、 -80°C でフジX線フィルムに感光させた。オートラジオグラフィー後、デュラポア膜をアミドブラックでタンパク染色した。

5. カルモジュリン活性の測定

カルモジュリン活性は脳ホスホジエステラーゼに対する Ca^{2+} 依存性の活性化能に基づいて測定した(Wallace ら⁷⁾)。ホスホジエステラーゼの基質としては $[^3\text{H}]$ -cyclic AMPを用い、ホスホジエステラーゼはラットの脳から硫酸分画とDEAE-セルロースカラムクロマトにより部分的に精製した。

結 果

Fig. 1はDEAE-セルロースカラムクロマトにより分画されたカルモジュリン活性の溶出パターンである。活性の測定は $100\mu\text{M}$ CaCl_2 の存在下(○—○)と1 mM EGTAの存在下(●—●)で行われた。フラクション No. 40-50のサンプルは CaCl_2 存在下で脳のホスホジエステラーゼを顕著に活性化させた。この活性化はEGTA存在下で

Fig. 1 Elution profile of rat submandibular gland calmodulin activity from a DEAE-cellulose column. The activity was assayed on the basis of its ability to stimulate calmodulin-dependent cyclic AMP phosphodiesterase in the presence of $100\mu\text{M}$ CaCl_2 (○—○). (●—●), phosphodiesterase activity in the presence of 1 mM EGTA; (.....), protein; (---), NaCl.

Fig. 2 Electrophoresis of proteins eluted from a DEAE-cellulose column. Samples were electrophoresed on 15% SDS-polyacrylamide slab gels in the presence of Ca^{2+} or EGTA. Arrows indicate a calmodulin-like protein. (40)-(54), fraction numbers; (St), standard proteins.

完全に消失した。これは、No. 40-50のフラクション中に Ca^{2+} 依存性のホスホジエステラーゼ活性化因子、すなわちカルモジュリンが含まれていることを示している。

次に、カルモジュリンの存在をより直接的に明らかにするため、各フラクションについて SDS-ゲル電気泳動と ^{45}Ca -オートラジオグラフィーによる解析を行った。各サンプルに CaCl_2 あるいは EGTA を最終濃度が 2 mM になるように添加し、数時間、水中で放置後、電気泳動に供した。Fig. 2 には No. 40-54のフラクションの電気泳動パターンを示す。タンパクはクマジーブルーで染色した。No. 40-50のフラクション中にゲル上の易動度が Ca^{2+} の存在下で促進されるタンパクバンドが検出された。バンドとしてのピークは No. 44-46であった (Fig. 2 の矢印)。このタンパクの見かけの分子量は、EGTA の存在下で約20,000, Ca^{2+} の存在下で約18,000であった。図には示していないが、No. 1-39のフラクション中にはこのタンパクは検出されなかった。次に、フラクション No. 46のサンプルを牛の脳カルモジュリン (Sigma) と同時に電気泳動し、泳動パターンを比較した (Fig. 3)。No. 46のフラクション中のカルモジュリン様タンパクは牛の脳カルモジュリンと完全に一致した易動度を示した。

このタンパクの Ca 結合能を ^{45}Ca -オートラジオグラフィーにより調べたところ、Fig. 4A に示したように、1本の強い放射活性バンドと複数の弱い活性バンドが検出された。強い活性バンドのピークは No. 44-46のフラクションで観察され、 Ca^{2+} の有無によりその易動度は大きく変化した。

Fig. 3 Comparison of the calmodulin-like protein in rat submandibular gland with bovine brain calmodulin on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. (St), standards proteins; (CM), bovine brain calmodulin; (46), no. 46-fraction; (46+CM), mixture of no.46-fraction and bovine brain calmodulin.

た。この結果から、この放射活性バンドが先に示したカルモジュリン様タンパクであることは明らかである。Fig. 4B はオートラジオグラフィー後、メンブレンをアミドブラック染色したものであるが、デュラポア膜に対する吸着性が低いためカルモジュリン様タンパクは検出されなかった。しかし、このことは、逆に、このタンパクの Ca^{2+} に対する親和性の高さを示している。

考 察

カルモジュリンの電気泳動上の易動度が Ca^{2+} の存在下と非存在下で大きく変化することはよく知られている⁸⁾。カルモジュリンの同定には種々の方法があるが⁹⁾、この電気泳動的性質を利用し

Fig. 4 ^{45}Ca -autoradiography (A) of proteins eluted from a DEAE-cellulose column. (B) shows the protein bands stained by amido black after autoradiography. (40)-(54), fraction numbers, (St), standard proteins.

て調べるのがもっとも簡便である。カルモジュリンのこの性質は、 Ca^{2+} の結合により立体構造が大きく変化するためである。カルモジュリン以外にもトロポニンC、S-100タンパク、パルプアルブミンなどのいわゆるEF handの Ca^{2+} -結合性タンパクはいずれも似たような電気泳動的挙動を示すが、非筋肉細胞で約20,000の分子量のタンパクであれば、大体においてカルモジュリンと判断してよいと思う。本実験で見積もられたカルモジュリン様タンパクの見かけの分子量は同じ方法で算定された脳や精巣カルモジュリンの分子量とほぼ一致する¹⁰⁻¹²⁾。さらに、今回は、牛の脳カルモジュリンの電気泳動パターンとの比較、Ca結合能の検索を同時に行っており、いずれの結果もこのタンパクがカルモジュリンであることを強く示唆する。我々は同様の方法でラットの耳下腺³⁾と頭蓋冠¹³⁾のカルモジュリンを検出し、報告している。

Ca^{2+} -カルモジュリン系は果たして唾液分泌機能に深く関与しているのだろうか？この点を明らかにするため、刺激分泌に対するフェノチアジン

系薬物やW-7などのいわゆるカルモジュリン阻害薬の効果が調べられているが、1つの報告¹⁴⁾を除き、否定的な結果が多い¹⁵⁻¹⁸⁾。しかし、一方で、カルモジュリン依存性のホスホジエステラーゼ^{1,19)}やアデニルシクラーゼ²⁰⁾の存在が耳下腺で報告されている。さらに、最近、Singhら²¹⁾はラット顎下腺に複数のカルモジュリン結合性タンパクが存在することを明らかにしている。これらの事実は、カルモジュリンが唾液分泌機能に何らかの役割をはたしている可能性を示唆するものである。このように、唾液分泌とカルモジュリンとの係わりについては、今だ、混々としており、今後、この分野での研究の発展が待たれる。

結 論

ラット顎下腺の抽出物をDEAE-セルロースカラムクロマトにより分画後、1) 脳のホスホジエステラーゼに対する Ca^{2+} 依存性の活性化能、2) Ca^{2+} の有無による電気泳動上の易動度の変化、3) 見かけの分子量、4) Ca^{2+} 結合能を基準としてカルモジュリンを検出した。

抄録：ラットの顎下腺抽出物を熱処理後、その上清を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画した。カルモジュリン活性は0.25-0.4M の範囲の NaCl 中に溶出された。カルモジュリン活性を含む分画を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で検索したところ、 Ca^{2+} の有無で易動度が大きく変化するタンパクバンドが検出された。その見かけの分子量は Ca^{2+} の存在下で約18,000, EGTA の存在下で約20,000 であり、牛の脳カルモジュリンの易動度と一致した。 ^{45}Ca -オートラジオグラフィーにより、このタンパクは Ca^{2+} に対する強い親和性を有することがわかった。こうして我々は、ラット顎下腺におけるカルモジュリンの存在を確認した。

文 献

- 1) Ku, K. Y. and Butcher, F. R. : Detection of a calmodulin-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat parotid gland. *Biochim. Biophys. Acta* **631** : 70-78, 1980.
- 2) Yokoyama, N., Murota, Y., Saito, M., Kon, S. and Furuyama, S. : Purification of calmodulin from bovine parotid gland. *Biochem. Int.* **6** : 257-265, 1983.
- 3) Tojyo, Y., Matsumoto, Y., Saida, K. and Suzuki, A. : Electrophoretic identification of calmodulin in rat parotid gland. *Arch. Oral Biol.* **31** : 489-490, 1986.
- 4) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680-685, 1970.
- 5) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76** : 4350-4354, 1979.
- 6) Maruyama, K., Mikawa, T. and Ebashi, S. : Detection of calcium binding proteins by ^{45}Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J. Biochem.*, **95** : 511-519, 1984.
- 7) Wallace, R. W., Tallant, E. A. and Cheung, W. Y. : Assay of calmodulin by Ca^{2+} -dependent phosphodiesterase. *Methods Enzymol.* **102** : 39-47, 1983.
- 8) 垣内史郎, 祖父江憲治 : カルモジュリンの生化学. *生体の科学*. **31** : 367-379, 1980.
- 9) 祖父江憲治, 垣内史郎 : 続生化学実験講座6-カルシウム結合タンパク質 (カルモジュリン), (日本生化学会編), 第1版, pp. 397-419, 東京化学同人, 東京, 1986.
- 10) Grab, D. J., Berzins, K., Cohen, R. S. and Siekevitz, P. : Presence of calmodulin in postsynaptic densities isolated from canine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* **254** : 8690-8696, 1979.
- 11) Dedman, J. R. and Kaetzel, M. A. : Calmodulin purification and fluorescent labeling. *Methods Enzymol.* **102** : 1-8, 1983.
- 12) Waisman, D. M., Tokuda, M., Morys, S. J. M., Buckland, L. T. and Clark, T. : Identification of bovine brain Ca^{2+} -binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128** : 1138-1144, 1985.
- 13) Tojyo, Y. and Matsumoto, Y. : Identification of calmodulin in new-born rat calvaria. *Biochem. Int.* **13** : 155-161, 1986.
- 14) Kanagasuntheram, P. and Teo, T. S. : Does calmodulin mediate stimulus-secretion coupling in the parotid gland? Studies using trifluoperazine. *Biochem. Int.* **7** : 511-518, 1983.
- 15) Kurtzer, R. J. and Roberts, M. : Calcium-dependent K^+ efflux from rat submandibular gland. The effects of trifluoperazine and quinidine. *Biochim. Biophys. Acta* **693** : 479-484, 1982.
- 16) Spearman, T. N. and Butcher, F. R. : The effect of calmodulin antagonists on amylase release from the rat parotid glands in vitro. *Pflügers Arch.* **397** : 220-224, 1983.
- 17) Komabayashi, T., Nakano, K., Izawa, T., Nakamura, T. and Tsuboi, M. : Effect of Ca^{2+} and calmodulin antagonists on the oxygen uptake induced by acetylcholine or substance P in rat submandibular gland slices. *Jpn. J. Pharmacol.* **36** : 441-447, 1984.
- 18) Maitra, S. R., Carretero, O. A., Smith, S. W. and Rabito, S. F. : Role of calcium and calmodulin in release of kallikrein and tonin from rat submandibular gland. *Am. J. Physiol.* **250** : C480-C485, 1986.
- 19) Yokoyama, N., Abe, M. and Furuyama, S. : Cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat parotid gland. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **59** : 293-299, 1981.
- 20) Piascik, M., Babich, M., Jacobson, K. L. and Watson, E. L. : Calmodulin activation and calcium regulation of parotid gland adenylate cyclase. *Am. J. Physiol.* **250** : C642-C645, 1986.
- 21) Singh, J., Brady, R. C., Dedman, J. R. and Quissel, D. O. : Subcellular distribution of calmodulin and its binding proteins within the rat submandibular gland. *Am. J. Physiol.* **251** : C403-C410, 1986.