

# アルギニンペプチドによる膵腺房細胞タンパク質翻訳開始の活性化機構

応用生物科学専攻 食資源科学講座 食品健康科学 吉田 和馬

## 1. 背景

食事たんぱく質摂取に応じて、大量の消化酵素を合成・外分泌する組織である膵腺房において、タンパク質翻訳促進因子である mammalian target of rapamycin (mTOR) が、アルギニン (Arg) により活性化されることを、ラットおよびラット膵腺房細胞株 AR42J において見いだした。私どもは、Arg による mTOR 経路活性化作用機構を探る中で、Arg 高含有ペプチドであるプロタミンが、Arg とは別経路で、mTOR 経路を活性化させることを明らかにした。本実験では、プロタミンの作用機構を探るため、実験 1: 鎖長の異なる塩基性ペプチドが、mTOR 経路活性に及ぼす影響 実験 2: マクロピノサイトーシスの阻害による影響 実験 3: トリプシン処理による細胞膜受容体破壊の影響 実験 4: Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の阻害による影響 を検討した。

## 2. 方法

全実験共通: AR42J を 48 時間 MEM 培地で培養、分化させた後、アミノ酸濃度を MEM の 1/5 にした低アミノ酸培地で 2 時間培養した。その後、各種添加群に分け、30 分後に細胞を回収し、Western blot 法により、mTOR, 4EBP1, S6K1 リン酸化割合を調べた。実験 1: 低アミノ酸培地で培養後、対照群 (低アミノ酸培地)、プロタミン群 (0.029 mM)、Arg 群 (1.50 mM)、テトラ Arg 群 (0.375 mM)、ヘキサ Arg 群 (0.250 mM)、ヘプタ Arg 群 (0.214 mM)、ヘキサ Lys 群 (0.250 mM)、ペンタ Lys 群 (0.300 mM)、Lys-rich ヘプタペプチド群 (0.214 mM)、脱グアニジルプロタミン群 (1.43 mg/ml) に分けた。実験 2: 低アミノ酸培地で 1 時間 30 分培養後、マクロピノサイトーシス阻害剤 (EIPA 2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, IPA-3 2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) を添加。30 分後に対照群、プロタミン群 (0.0145 mM) に分けた。実験 3: 低アミノ酸培地で培養後、培地を除去し、トリプシン (15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml) を添加した。15 分後にトリプシンを除き、対照群、プロタミン群 (0.0145 mM)、CCK 群 (10 pM) に分けた。実験 4: 低アミノ酸培地で 1 時間 45 分培養後、PI3K 阻害剤 (LY294002 10  $\mu$ M) を添加。15 分後に対照群、プロタミン群 (0.0145 mM) に分けた。

## 3. 結果と考察

実験 1: テトラ Arg, テトラ Lys, ペンタ Lys は mTOR 経路リン酸化に影響を与えなかったが、ヘキサ Arg, ヘプタ Arg, Lys-rich ヘプタペプチド, 脱グアニジルプロタミンはリン酸化を促進した。このことから、Arg ペプチドの作用は、Arg 残基が作用部位ではなく、6 残基以上の塩基性ペプチドによる作用であることが示唆された。実験 2: マクロピノサイトーシスの阻害による影響は見られず、プロタミンは細胞外から作用していることが示唆された。実験 3: トリプシン濃度依存的にプロタミンの作用が消失し、プロタミンの作用は細胞膜受容体を介している可能性が示された。実験 4: PI3K の阻害により、mTOR, S6K1 のリン酸化上昇は抑制されたが、4EBP1 のリン酸化上昇は抑制されず、プロタミンの作用に PI3K を介さない経路が存在することが示唆された。

## 4. まとめ

Arg ペプチドによる膵腺房細胞 mTOR 経路活性化作用は、6 残基以上の塩基性ペプチドの作用であり、細胞膜受容体を介して作用していることが示唆された。