

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592189

研究課題名（和文） 唾液腺における分泌顆粒の開口放出制御機構に関する研究

研究課題名（英文） Study of mechanisms for secretory granule exocytosis from salivary gland

研究代表者 今井 あかね (IMAI AKANE)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：60180080

研究成果の概要（和文）：本研究は、分子レベルの相互作用から唾液腺における開口分泌の制御機構を明らかにすることを目的とした。 β アゴニストであるイソプロテレンール(IPR)刺激後のRab27とそのエフェクター分子であるSlac2-cおよびSlp4-aの挙動を明らかにした。すなわち、IPR刺激後、Rab27は5分で先端膜に集められ、30分後にはGDIにより抽出され細胞質へ移動しリサイクルされた。また、Slac2-cも5分後には先端膜に集まり、Rab27と結合することにより分泌顆粒と先端膜を融合させる1ステップに寄与していると推察された。その後、Slac2-cは役割（開口放出）を終えると細胞質に移動してカルシウム依存的に分解消化されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Small GTP-binding protein, Rab27, has been implicated in the regulation of different types of membrane trafficking, including melanosome transport in melanocytes and regulated secretion events in a wide variety of secretory cells. We have previously shown that Rab27 is involved in the control of isoproterenol (IPR)-induced amylase release from rat parotid acinar cells. Although Rab27 is predominantly localized on secretory granules under resting conditions, changes to its intracellular localization after β -stimulation have never been elucidated. The present study investigated IPR-induced redistribution of Rab27B in the parotid acinar cells, revealing translocation from secretory granules to the subapical region after 5 min of IPR treatment and then diffusion into the cytosol after 30 min of IPR treatment. Dissociation of Rab27B from the apical plasma membrane is probably mediated through the Rab GDP dissociation inhibitor (GDI) in the cytosol extracting GDP-bound Rab protein from membranes, as a dramatic increase in the amount of the Rab27B-GDI complex in the cytosol was observed 30 min after stimulation with IPR. These results indicate that, in parotid acinar cells, Rab27B is translocated, in a time-dependent manner, from secretory granules into the apical plasma membrane as a result of exposure to IPR, and then into the cytosol through binding with the GDI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：唾液腺、アミラーゼ分泌、開口分泌、exocyst、Rab27

1. 研究開始当初の背景

我々は継続的に耳下腺腺房細胞における開口分泌機構を研究してきた。そして多くのSNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)タンパク質や低分子量Gタンパク質であるRabおよびRabエフェクターを同定し、アミラーゼ分泌への関与を明らかにしてきた。我々はこれまで調べたタンパク質を抑制してもアミラーゼ分泌が完全に止まらないことを踏まえ、開口分泌の様式が一つではなく、分泌顆粒と先端膜を結びつけるSNARE複合体も複数のパターンが存在し、それらの組み合わせにより待機状態型から開口分泌開始型へと変化して分泌を制御していると推測している。また、Rab27が開口分泌に関わっていることを報告してきたが、その挙動については不明な点が多かった。SNAREタンパク質とRab27の発現と相互作用を明らかにして、唾液分泌のアクセラとブレーキになる機構を分子レベルで解明しようと考えた。

2. 研究の目的

低分子量GTPaseあるRabは細胞内膜輸送に関わる一大ファミリーである。我々はこれまでにラットの耳下腺腺房細胞においてRab27とそのエフェクター分子であるSlac2-c/MyRIPとSlp4-a/granuphilin-a, およびNoc2がイソプロテレノール(IPR)刺激によるアミラーゼ分泌を制御していることを報告した。けれども、 β 刺激後のそれらの腺房細胞内での挙動や局在は全く知られていなかった。この研究で、我々はIPRに依存したこれらタンパク質の局在について検討し、開口分泌の分子レベルでのメカニズムを解明しようと考えた。

3. 研究の方法

10週齢のWistar系雄性ラットの耳下腺スライスまたは耳下腺腺房細胞を $1\mu\text{M}$ IPRで5分または30分間刺激した後、直ちに氷冷した。Rab27とエフェクターの細胞内局在を調べるため、ウエスタンブロッティングおよびimmunohistochemistryにより分析を行った。Rab27、Slac2-cおよびSlp4-aの細胞内での分解を調べるため、細胞分画を行い各画分を調製した。それに 1mM Ca^{2+} を添加したものとし、 37°C 、30分間インキュベートし、ウエスタンブロッティングにより分析を行った。

4. 研究成果

耳下腺腺房細胞ではRab27のエフェクターとして知られている13種のタンパク質のうち、Slac2 (Slp homologue lacking C2 domains) -c, Slp4-a, Noc2, Munc13-4の4種が発現している。膜透過性腺房細胞にRab27抗体およびSlac2-c抗体を導入してIPRで刺激するとアミラーゼ分泌が抗体濃度依存的に抑制された。この開口分泌にはRab27とSlac2-cの結合が必要である。耳下腺腺房細胞におけるRab27およびSlac2-c, Slp4-aの β 刺激による時間的局在およびサイクルはよく知られていなかった。我々はIPRを用いて、5分および30分刺激後のこれらの局在を調べ、分子の動きを予測した。その結果、Slp4-aは先端膜に存在し、刺激後の局在変化は観察できなかった。Slac2-cは開口分泌が盛んになる刺激5分後には先端膜直下に集積した。その後、開口分泌がほぼ終了する30分後にはカルパインのような Ca^{2+} 依存性プロテアーゼにより速やかに消化された。顆粒輸送および開口分泌のカギを握るRab27は分泌顆粒上に存在し刺激前から一部がSlp4-aやSlac2-c, Noc2と結合して分泌顆粒を先端膜に繫留している形を取っているが、刺激を受けるとよりGTP型が増加し腺腔側付近に凝集する。そして30分後にはRab27のGTPアーゼが働き不活性型のGDP結合型が増加し、GDI(GDP解離抑制因子)と複合体を形成して細胞質に移動することが明らかになった。一方、Noc2は分泌顆粒膜上でRab27と結合しているが先端膜への繫ぎとめには関わっておらず、刺激を受けると速やかに解離した。Noc2のその後の挙動は不明だが、膜透過性細胞にNoc2-RBD(Rab binding domain)抗体を導入した場合、アミラーゼ分泌が抑制されることから開口分泌に関わっていると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Shimomura H, Imai A, Nashida T. Evidence for amylase release by cyclin-dependent kinase 5 in the rat parotid. *Arch Biochem Biophys* 査読有 Vol.507, 2011, pp.310-314.
- ② 今井あかね: ミニレビュー 耳下腺腺房細胞における唾液分泌メカニズム. *生化学*, 査読無、82巻、2010、130-135.
- ③ Nashida T, Sato R, Imai A, Shimomura

- H. Gene expression profiles of the three major salivary glands in rats. *Biomedical Research* 査読有 Vol. 31, 2010, pp. 387-399.
- ④ Imai A, Yoshie S, Nashida T, Fukuda M, Shimomura H. Redistribution of small GTP-binding protein, Rab27B, in rat parotid acinar cells after stimulation with isoproterenol. *Eur J Oral Sci* 査読有 Vol. 117, 2009, pp. 224-230.
- ⑤ Imai A, Fukuda M, Yoshie S, Nashida T, Shimomura H. Redistribution of Rab27-specific effector Slac2-c, but not Slp4-a, after isoproterenol-stimulation in rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol* 査読有 Vol. 54, 2009, pp. 361-368.
- ⑥ Paco S, Margel MA, Olkkonen VM, Imai A, Blasi J, Fischer-Colbrie R, Aguado F. Regulation of exocytotic protein expression and Ca²⁺-dependent peptide secretion in astrocytes. *J Neurochem* 査読有 Vol. 110, 2009, pp. 143-156.
- ⑦ Nashida T, Yoshie S, Imai A, Shimomura H. Transferrin secretory pathways in rat parotid acinar cells. *Arch Biochem Biophys* 査読有 Vol. 487, 2009, pp. 131-138.
- ⑧ Sadik G, Rashid Md H, Nashida T, Ishii K, Sato Y, Shiraishi T, Uda Y. Chemical and immunological characterization of the two α -N-acetylgalactosaminidases from squid liver. *Biol Pharm Bull* 査読有 Vol. 32, 2009, pp. 1469-1473.
- ⑨ Nashida T, Imai A, Yoshie S, Shimomura H, Yokosuka H, Kumakura M. Unstimulated amylase secretion is proteoglycan-dependent in rat parotid acinar cells. *Arch Biochem Biophys* 査読有 Vol. 469, 2008, pp. 165-173.
- [学会発表] (計 23 件)
- ① Imai A, Fukuda M, Yoshie S, Haga M, Ishibashi K, Nashida T, Shimomura H. EPI64 functions as a Rab27-GTPase-activating protein in parotid acinar cells. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010年 7月 15日 バルセロナ(スペイン)
- ② Shimomura H, Imai A, Nashida T. Evidence of amylase release by CDK5 in rat parotid. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010年 7月 15日 バルセロナ (スペイン)
- ③ Sato R, Nashida T, Imai A, Shimomura H. Gene expression of the three major salivary glands. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010年 7月 16日 バルセロナ (スペイン)
- ④ Fukushima T, Nashida T, Mataga I. Gene expression of parotid glands in non-obese diabetic mouse. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010年 7月 14日 バルセロナ (スペイン)
- ⑤ 今井あかね, 吉江紀夫, 羽下麻衣子, 梨田智子, 下村浩巳. 耳下腺腺房細胞における Rab-GTPase 活性化タンパク質 (EPI64) の働き. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010年 9月 22日 タワーホール船堀 (千葉県)
- ⑥ 梨田智子, 吉江紀夫, 今井あかね, 羽下麻衣子, 下村浩巳. NODマウス耳下腺におけるアクアポリンファミリーの発現. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010年 9月 22日 タワーホール船堀 (千葉県)
- ⑦ 佐藤律子, 梨田智子, 今井あかね, 下村浩巳. Gene expression profiles of the three major salivary glands in rats. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010年 9月 22日 タワーホール船堀 (千葉県)
- ⑧ 福島琢士, 梨田智子, 又賀 泉. Gene expression of parotid glands in non-obese diabetic mouse. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010年 9月 22日 タワーホール船堀 (千葉県)
- ⑨ 石山巳喜夫, 三上正人, 岡 俊哉, 今井あかね, 下村浩巳, 大井田新一郎. エナメル小柱をもつ唯一の非哺乳類 *Uromastix* の歯胚構造とアメリロジェニン遺伝子. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010年 9月 22日 タワーホール船堀 (千葉県)
- ⑩ 今井あかね, 吉江紀夫, 石橋弘太郎, 福田光則, 羽下麻衣子, 梨田智子, 下村浩巳. イソプロテレノール刺激時の耳下腺腺房細胞における EPI64 の Rab27-GTPase-activating protein (Rab27-GAP) としての働きと発現について. 第 55 回日本唾液腺学会 2010年 12月 4日 文京学院大学 (東京都)
- ⑪ 今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳. ラット耳下腺腺房細胞の Exocyst メンバーの検索と開口分泌に対する関与. 第 83 回日本生化学会合同大会 (BMB2010), 2010年 12月 7日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑫ 梨田智子, 羽下麻衣子, 吉江紀夫, 今井あかね, 下村浩巳. NODマウス耳下腺におけるアクアポリン 8 の発現減少. 第 83

- 回日本生化学会合同大会 (BMB2010),
2010年12月10日 神戸ポートアイランド (兵庫
県)
- ⑬ 今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳: イソ
プロテレンール刺激による耳下腺腺房
細胞のSec6とSec8の相互作用について.
第51回歯科基礎医学会学術大会, 2009
年9月11日 朱鷺メッセ (新潟県)
- ⑭ 梨田智子, 吉江紀夫, 今井あかね, 下村
浩巳: ラット耳下腺トランスフェリンの
トランスサイトシスにおける細胞骨
格の役割. 第51回歯科基礎医学会学術
大会, 2009年9月11日 朱鷺メッセ (新
潟県)
- ⑮ 石山巳喜夫, 三上正人, 岡 俊哉, 今井
あかね, 下村浩巳, 大井田新一郎: 鯨類
アメリロジェニン遺伝子の分子生物学的
解析. 第51回歯科基礎医学会学術大会,
2009年9月11日 朱鷺メッセ (新潟県)
- ⑯ 今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳: ラッ
ト耳下腺腺房細胞におけるExocystメン
バーの検索と相互作用について. 第50
回歯科基礎医学会年会, 2008年9月25
日 TOC有明コンベンションホール (東京
都)
- ⑰ 梨田智子, 今井あかね, 下村浩巳, 吉江
紀夫: ラット耳下腺からのトランスフェ
リン非刺激分泌経路の解明. 第50回歯
科基礎医学会年会 2008年9月25
日 TOC有明コンベンションホール (東京
都)
- ⑱ 佐藤律子, 梨田智子, 今井あかね: 唾液
腺における転写因子Mist1 mRNAの発現.
第50回歯科基礎医学会年会, 2008年9
月25日 TOC有明コンベンションホール (東京
都)
- ⑲ 石山巳喜夫, 三上正人, 岡 俊哉, 今井
あかね, 下村浩巳, 大井田新一郎:
Uromastyxにおけるエナメル小柱の存
在とアメリロジェニン遺伝子発現の選択
的splicingとの関連. 第50回歯科基礎医
学会年会, 2008年9月25日 TOC有明コ
ンベンションホール (東京)
- ⑳ IMAI, A., YOSHIE, S., FUKUDA, M.,
YOKOSUKA, H., NASHIDA, T., SHIMOMURA,
H. : Isoproterenol-dependent
redistribution of Rab27, Slac2-c and
Slp4-a in parotid glands. 86' th
General Session of IADR, 2008年7月
4日 トロント (カナダ)
- ㉑ NASHIDA, T., YOSHIE, S., IMAI, A.,
SHIMOMURA, H., YOKOSUKA, H. : Secretion
of transferrin from rat parotid acinar
cells. 86' th General Session of IADR,
2008年7月4日 トロント (カナダ)
- ㉒ 今井あかね, 吉江紀夫, 福田光則, 梨田
智子, 下村浩巳: β 刺激後の耳下腺腺房
におけるRab27B, Slac2-cおよび Slp4-a
の細胞内局在について. 第81回生化学
会大会, 2008年12月10日 神戸ポ

ート (兵庫県)

- ㉓ NASHIDA, T., IMAI, A., SHIMOMURA, H.,
YOSHIE, S. : Secretary pathway of
transferrin in rat parotid acinar
cells. 第81回生化学会大会, 2008年
12月13日 神戸ポートアイランド (兵庫
県)

〔図書〕 (計1件)

- ① 石山巳喜夫, 三上正人, 今井あかね, 下
村浩巳: わかば出版, エナメル質比較発
生学懇話会著, アメリロジェニン蛋白の分
布から見たエナメル質の系統発生 エ
ナメル質 形成、構造、遺伝、再生、起
源と進化, 2009, 101-112.

〔その他〕

ホームページ等

- ① <http://www.ngt.ndu.ac.jp/guide/kouza/kiso04.html>
- ② <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jbiochem/magazine/82-02-05.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 あかね (IMAI AKNE)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 60180080

(2) 研究分担者

梨田 智子 (NASHIDA TOMOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 10133464

下村 浩巳 (SHIMOMURA HIROMI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号: 40139259

吉江 紀夫 (YOSHIE SUMIO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号: 30095278