

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791789

研究課題名（和文） 新規小胞輸送調節分子を介した唾液分泌機構の解明

研究課題名（英文） Modulation of salivary secretion by novel transport regulation factor

研究代表者

北山 友也（KITAYAMA TOMOYA）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60363082

研究成果の概要（和文）：唾液腺分泌機構の解明のために、より簡便なインスリン開口機構をモデルとして解析をおこなった。マウスβ細胞様細胞株である MIN6 に対して、siRNA 法を用いて新規輸送調節分子である PRIP の発現量を低下させた。この結果、インスリン分泌量は増加した。さらに、PRIP と結合する GABARAP 蛋白質とのクロストークの可能性について検討したところ同蛋白質が分泌機構に関与することを見出した。

研究成果の概要（英文）：PRIP (a novel transport regulation factor) was knocked down by siRNA in MIN6 cells (murine β cell line). We found that the down-regulation of PRIP induces a reduction of insulin secretion, the process of which is modulated by GABARAP, a PRIP binding protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：歯科薬理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：PRIP, 分泌, インスリン,

## 1. 研究開始当初の背景

正常な口腔機能を維持するためには、唾液腺からの唾液の分泌が必要であり、唾液分泌の減少は、様々な口腔疾患を引き起こすことは言うまでもない。しかしながら、その開口分泌がどのように制御されているか（分泌顆

粒が細胞膜近傍に輸送され→膜にドッキング→開口分泌→分泌顆粒の再利用 といった一連の過程の分子基盤や中枢神経系が調節する唾液分泌の制御機構）の詳細については、未解決の問題を残している。例えば、

・ James Rothman によって 1933 年に

SNARE 仮説が唱えられ、細胞膜近傍における分泌過程（プライミング→融合）はその分子基盤を含めて比較的よく研究されているものの、

①どのようにして分泌顆粒が顆粒貯蔵部位から膜へ輸送されて来るのか？

②この過程には、リン酸化・脱リン酸化反応が関わるとされるがその標的分子は何か？

③脱リン酸化に関わる分子基盤を構成している分子は何か？

などが不明である

- ・開口分泌のみならずアクアポリン・タイトジャンクションを介した唾液分泌は中枢神経系（副交感神経系・交感神経系を含む）により調節されている。副交感系支配は延髄の上唾液核と下唾液核の神経により調節を受け、それら唾液核には GABA 抑制性の介在ニューロンが多く存在している。しかしながら、これら抑制性の介在ニューロンの役割の詳細は不明である。

この様な研究背景の中、我々は新規の小胞輸送調節分子 PRIP（PLC-related Catalytically Inactive Protein）を見出し、この分子が仲介する開口分泌機構の解明を行なっている。

PRIP とは、イノシトール三リン酸 [Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] 結合性タンパク質として同定・クローニングした分子である (J. Biol. Chem., 1992; Biochem.J.1996)。我々は、PRIP ノックアウト (KO) マウスの解析から、インスリン分泌が亢進することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

PRIP KO マウスの解析から、PRIP は膵臓 β 細胞のインスリン分泌過程に関与することを見出している。インスリン分泌には第 1 相と第 2 相の 2 種の機構が存在する。このうち第 2 相は、分泌顆粒が貯蔵部位から膜へ輸送されて開口分泌を起こす一連の過程である。この過程では、チューブリンやアクチンといった細胞骨格系をレールにして分泌顆粒が輸送される。我々は、PRIP 結合蛋白質としてチューブリン結合蛋白質である GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein (GABARAP) という分子を見出しており、本研究では、まず PRIP-GABARAP 複合体が分泌顆粒を膜へ

輸送する分子基盤を明らかにする。同様に、マウス唾液腺における開口分泌（各種蛋白質および顆粒管における神経栄養因子）についても、インスリン開口分泌制御の分子基盤を基にして PRIP が仲介する機構を明らかにする。これらの過程には、蛋白質のリン酸化制御が関わるようである。PRIP は蛋白質脱リン酸化酵素と複合体を形成するが、この複合体による脱リン酸化制御が唾液分泌輸送調節機構をどのように調節するかも明らかにする。

延髄の唾液核には GABA 抑制性の介在ニューロンが数多く存在する。そこで、PRIP-KO マウスの解析をおこない、GABA<sub>A</sub> 受容体の膜発現量の異常についても検討を加える。

## 3. 研究の方法

PRIP KO マウスの解析から、分泌異常が認められるインスリン分泌をモデルに用いて解析をおこなった。マウス β 細胞様細胞株である MIN6 について、PRIP 蛋白質の発現量を減少させる目的で siRNA の設計および合成をおこなった。PRIP 分子には、2 種類の存在が確認されており、それぞれに対して以下の siRNA を合成した。

PRIP1-sense

siRNA#1,

5'-GGAAGAAAGUUCGAGAAUACACCAU-AG-3';

siRNA#2,

5'-GCGAGAAACUUAUACAGAAGCAC C-AG-3';

siRNA#3,

5'-GAUAGAGGGUUCACUGGUUUCACA G-AG-3';

PRIP2-sense

siRNA#1,

5'-GGACAAAGCUGGUACUGAAAUCAC A-AG-3';

siRNA#2,

5'-GCAGGAGCGUUGAAUAGAUGUGU G-AG-3';

siRNA#3,

5'-GCCGGAGCAGCAUCAUCAAGGAUG G-AG-3'.

それぞれの PRIP 分子について、3 種類の siRNA をトランスフェクトした。これら siRNA をトランスフェクトした PRIP

knock-down MIN6 細胞について、グルコース刺激をおこないインスリン分泌量を測定した。

次に、インスリン分泌機構のうち、第2相に注目し検討をおこなった。第2相は、分泌顆粒が貯蔵部位から膜へ輸送されて開口分泌を起こす一連の過程である。この過程において、PRIP およびチュブリン双方に結合する蛋白質として、GABARAP に注目して検討をおこなった。PRIP1 および GABARAP を合成精製した。さらに、GABARAP のチュブリン結合サイトである N 末端アミノ酸鎖を合成した。

#### GABARAP N1-22

1-MKFVYKEEHPFEKRRSEGEKIR

スクランブル

1-REKIEEHMKFPFSESEGVYKKRR

これら合成蛋白質あるいはペプチドを MIN6 細胞内に挿入し、グルコース刺激によるインスリン分泌に対する影響を検討した。

蛋白質のリン酸化については、knock-out 動物由来の初代培養ランゲルハンス島を用いた RI 実験をおこなった。<sup>32</sup>P 標識正リン酸による蛋白質リン酸化アッセイをグルコース刺激または無刺激の条件下で検討した。

神経系における GABA<sub>A</sub> 受容体の膜発現量に関する検討については、細胞膜画分を遠心分離法を用いて回収し、GABA<sub>A</sub> 受容体を構成するサブユニットの発現を検討した。

#### 4. 研究成果

PRIP に対する siRNA を用いて、細胞内に発現する PRIP 蛋白質の発現量を低下させる実験をおこなった結果、対照群である HVJ-エンペローブのみを添加した細胞群に比べて、PRIP に対する siRNA を添加した群では、標的蛋白質の発現量を半減させることが明らかとなった。また、スクランブル配列では、影響が認められなかったことから、特定配列の siRNA が有効であったと判断した。また、同処理が、MIN6 細胞においてインターフェロン反応を誘導していないことが推察された。

したがって、これら細胞を PRIP knock-down MIN6 細胞とし、グルコース刺激誘発性のインスリン分泌量を検討した。その結果、グルコース刺激に対して即時に应答する第1相の分泌過程では著変が認められなかったが、分泌顆粒が貯蔵部位から膜へ輸送

される過程を含む第2相の分泌では、インスリン分泌量の増加が認められた。

この結果から、分泌顆粒の輸送過程に PRIP 分子が関与する可能性が強く示唆された。そこで、PRIP 分子およびチュブリン双方に結合することが知られている GABARAP 分子について検討をおこなった。GABARAP 分子の N 末端 22 アミノ残基を合成し、細胞内に適応した。このアミノ酸残基は、GABARAP とチュブリンの結合を阻害するために用いた。その結果、グルコース刺激に対して即時に应答する第1相の分泌過程では著変が認められなかったが、第2相の分泌では、インスリン分泌量の減少が認められた。具体的には、第一相の分泌過程を含む、グルコース刺激後 30 分後までは、N 末端 22 アミノ残基の影響は認められなかった。その後、35 分から 40 分後の 5 分間におけるインスリン分泌量に有意差は認められなかったが、N 末端 22 アミノ残基による減少傾向が認められた(平均値で約 65%に減少)。その後、5 分間毎のインスリン分泌量は、N 末端 22 アミノ残基の適応により有意に減少しており、対照群である HVJ-E のみを適応した群に比べて、平均値で約 70-60%に減少していた。

次に GABARAP と PRIP 分子の関係について、検討を加えた。分泌顆粒は、チュブリンをレールとして、細胞膜表面まで輸送されるため、分泌顆粒のチュブリンへの結合は重要な意味を持つ。したがって、チュブリン、PRIP 蛋白質および GABARAP を合成し、細胞抽出物と反応させた。チュブリンにはビオチンを用いて標識をおこない、チュブリンに結合した物質を回収したところ、無添加群では、分泌顆粒上に発現しているとされている RAB27A 蛋白質の発現が認められた。このチュブリン結合性の RAB27A 蛋白質量は、GABARAP を添加することにより約 1.4 倍に増加した。しかしながら、この増加は PRIP 蛋白質を添加することにより、対照群レベルまで減少した。したがって、PRIP 分子は、GABARAP を介した分泌顆粒のチュブリンへの結合を阻害する可能性が示唆された。

分泌顆粒の輸送には、様々な蛋白質のリン酸化が関与していることが知られているため、<sup>32</sup>P 正リン酸を用いた検討をおこなったが、特定の蛋白質のリン酸の変動を検出することはできなかった。

GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニットの発現量に関

しては、*PRIP-KO* マウスの解析から幾つかのサブユニットで変動が認められた。特に顕著な物は、 $\beta 2/3$  サブユニットの増加と、 $\gamma 2$  サブユニットの減少である。これらの変動は、抑制性神経の神経伝達の変動する可能性と示唆するものである。

以上、これらの結果から、*PRIP* 分子は、*GABARAP* 分子を介して、分泌顆粒のチューブリンへの結合を制御することにより、分泌顆粒の細胞膜への輸送を制御する可能性が示唆された。また、*PRIP* 分子は *GABA<sub>A</sub>* 受容体サブユニット構成を制御することにより、分泌における中枢性の制御に影響を与える可能性が考えられる。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

##### 1. 北山友也、平田雅人、兼松隆

*GABARAP* および *PRIP* によるインスリン分泌調節. 抄録集 P241

P3J16-4 PS 115, suppl 1 272P

第 84 回日本薬理学会年会

2011 年 3 月 22-24 日, 横浜

##### 2. 兼松隆、北山友也 (2010)

インスリン分泌顆粒の輸送を調節する新しい分子. 抄録集 SS5-4

*J. Oral Biosciences* 52 Suppl. 87P, 2010.

第 52 回日本歯科基礎医学会学術大会ならびに総会

2010 年 9 月 20-22 日, 東京

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北山 友也 (KITAYAMA TOMOYA )

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 60363082

##### (2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号 :