

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792129

研究課題名(和文)唾液腺導管細胞における極性輸送機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of polarized transport mechanisms in salivary duct cells.

研究代表者

設楽 彰子 (SHITARA, Akiko)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：30508718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺の細胞において血液循環の方向へと輸送される分子であるナトリウムポンプにHaloタグを融合した分子を培養細胞に発現させた。無蛍光および蛍光リガンドを組み合わせることにより、一定期間に合成された分子の輸送動態をリアルタイム解析し、ナトリウムポンプの大部分はエンドソームを経由せずに細胞膜へ輸送されることを明らかにした。この分子をアデノウイルスベクターを用いて顎下腺の細胞に発現させたところ、基底側膜への発現が免疫染色により確認された。遺伝子導入した顎下腺から酵素処理にて細胞を取り出し、蛍光リガンドでラベルしたところ、細胞膜の特異的な染色が認められた。

研究成果の概要(英文)：Na⁺/K⁺ ATPase is one of the marker protein which is transported to the basolateral membrane in salivary gland. We made the plasmid vector which express Na⁺/K⁺ ATPase fused with Halo tag and transfected it to the HeLa cells.

We analyzed the transport dynamics of newly synthesized Halo tag fusing with Na⁺/K⁺ ATPase by using blocking ligand and fluorescence ligand, and we have shown that most of Na⁺/K⁺ ATPase are not transported via endosome. We made adeno virus which express Halo-tag Na⁺/K⁺ ATPase and transfected it to the submandibular gland, and we confirmed that molecules are expressed on the basolateral membrane of submandibular gland by immunostaining. Transfected submandibular gland was dispersed by digestive enzyme and stained with fluorescent ligands, and we could observe the specific staining of plasma membrane in living cells.

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：極性輸送 唾液腺 イメージング

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は外分泌腺として知られているが、一部のタンパク質を基底側に輸送して血液循環に分泌する、内分泌の経路ももつ。近年この経路を利用することにより、唾液腺に様々な疾患に対する治療用のタンパク質を発現させて、唾液腺を“治療用のタンパク質を血液循環へ供給する器官”として利用する試みが行われている。しかしタンパク質の分泌方向を制御することは難しく、発現させた治療用タンパク質はしばしば血中ではなく、唾液中に分泌され失われる。そのため唾液腺細胞が血中にタンパク質を輸送・分泌する仕組みが明らかにする必要がある。本研究では、唾液腺における基底側への輸送を制御する仕組みを明らかにし、治療用のタンパク質を効率的に血中に分泌させる手法を確立することを最終的な目標とする。

2. 研究の目的

本研究では唾液腺細胞における基底側方向への小胞輸送を解析して、唾液腺におけるタンパク質の輸送方向を制御するメカニズムを明らかにすることである。この研究を通して、唾液腺に発現させた治療用の外来タンパク質を効率的に全身循環に移行させるための基本的な知見を得ることを最終的な目的とする。

(1) ヒト唾液腺導管細胞由来培養細胞(HSY 細胞)における小胞輸送経路の解明

① 極性輸送のマーカートンパク質はどこで選別されるのか

② 選別された小胞が細胞膜に達するまでエンドソーム等を経由するか

(2) ラット顎下腺導管細胞における極性輸送経路の解明

アデノウイルスベクターを用いてラット唾液腺に *in vivo* で極性輸送のマーカートンパク質を発現させ、極性を持った導管細胞における細胞内輸送経路を調べる。

① 極性輸送のマーカートンパク質はどこで選別されるのか

② 選別された小胞が細胞膜に達するまでエンドソーム等を経由するか

③ 選別された小胞は直接標的膜まで輸送されるのか

(3) ラット顎下腺導管細胞における基底側への選別を制御する分子の同定

siRNA を用いてラット顎下腺導管細胞における基底側への選別に重要である AP-1B, AP-4, クラスリン等をノックダウンし、極性輸送に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

本研究では共有結合性タグを融合したタンパク質を用いて、タンパク質の極性輸送過程をイメージングにより解析する。

(1) 極性輸送のマーカートンパク質を発現するベクターを作成

(2) 唾液腺導管由来培養細胞における、極性輸送マーカートンパク質の細胞内輸送経路の解析

(3) *in vivo* でラット顎下腺導管細胞に極性輸送のマーカートンパク質を発現させ、酵素処理により調製した細胞を用いて、唾液腺導管細胞における極性輸送経路を解析

(4) siRNA を用いて、唾液腺細胞における基底側への選別を制御する分子を解明

4. 研究成果

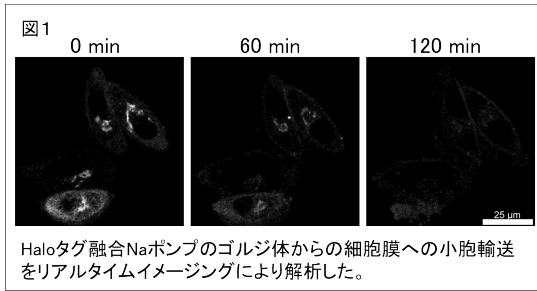
(1) 培養細胞における基底側輸送マーカートンパク質の小胞輸送経路の解析

① 共有結合性タグのスクリーニング

我々は基底側方向への小胞輸送を可視化するために、基底側への輸送マーカートンパク質である Na⁺/K⁺ ATPase に数種類の共有結合性のタグ (Halo tag, SNAP tag, FlAsH tag) を融合したベクターを作製して HeLa 細胞に発現させた。蛍光リガンドを用いてそれぞれのタグを融合した Na⁺/K⁺ ATPase を生細胞にてラベルした結果、Halo tag を融合した Na⁺/K⁺ ATPase において HaloTag® TMR Ligand にて細胞膜が特異的にラベルされた。一方 SNAP タグ、FlAsH タグを融合したものは、ミトコンドリア様の非特異的な染色が観察された。SNAP タグ融合 Na⁺/K⁺ ATPase は固定した細胞においては、細胞膜への特異的な染色が確認された。以上の結果から、Na⁺/K⁺ ATPase の輸送を解析するためには Halo tag が適していることが示された。

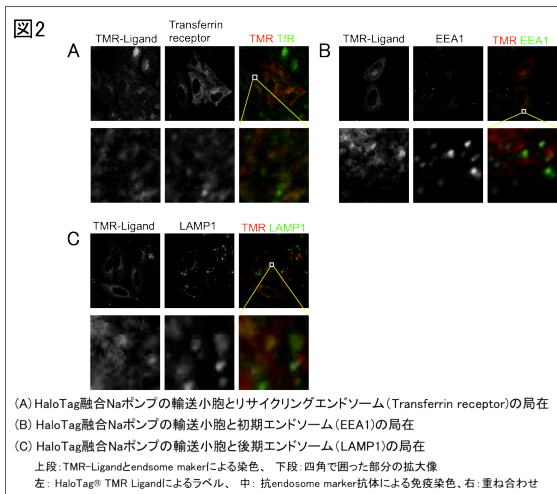
② Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase の小胞輸送のパルスチェイス解析

小胞輸送は常に平衡状態を保っているため、輸送を可視化するためには発現しているタンパク質をブロッキングして、新規に合成されたタンパク質の輸送を追跡する必要がある。そこで、Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase を発現した HeLa 細胞に HaloTag® Coumarin Ligand を添加して 37°C で 30 分インキュベートし、発現している分子をブロッキングした。その後 19°C で 2 時間インキュベートして HaloTag® TMR Ligand を添加することにより、新規に合成された Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase をゴルジ体へ集積させ、蛍光ラベルした。共焦点顕微鏡上に設置した温度制御装置を用いて温度を 31°C に保ちながら Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase の輸送を観察したところ、ゴルジ体へ集積した Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase が細胞膜へと輸送される様子をリアルタイムで観察することができた (図 1)。



③ Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase の小胞輸送の輸送経路の解析

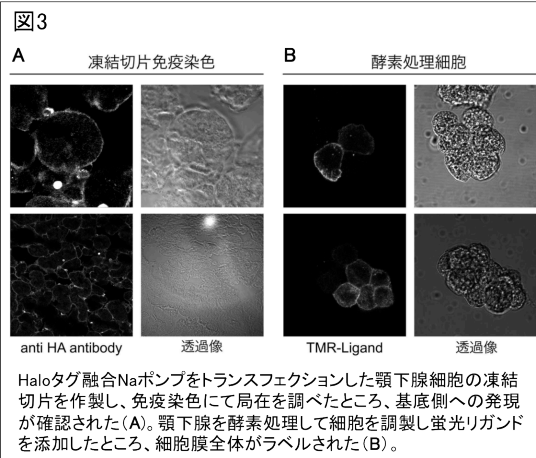
Na⁺/K⁺ ATPase の輸送小胞の輸送経路を調べるために、前述した方法で HaloTag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase をゴルジ体に集積させ、HaloTag® TMR Ligand でラベルした。さらに 31°C に温度を上昇させてして 30 分間輸送させた後、細胞を固定して early endosome, recycling endosome, late endosome に対する抗体で免疫染色した。その結果、Na⁺/K⁺ ATPase と各種エンドソームの共局在はほとんど観察されず、Na⁺/K⁺ ATPase はエンドソームを経由せずに細胞膜へ輸送されることが示唆された (図 2) (第 56 回歯科基礎医学会, 2012)。



(2) ラット顎下腺腺房細胞における極性輸送経路の解析

極性を有する唾液腺の細胞における基底側への輸送の仕組みを明らかにするために、Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase を発現するアデノウイルスベクターを作製した。アデノウイルスベクターをラットの顎下腺開口部から逆行性に注入し、導管を介して顎下腺細胞に遺伝子導入をした。2 日後に顎下腺を摘出して免疫染色にて Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase の発現を確認したところ、基底側へ特異的な発現が確認された。このことから、Halo tag 融合 Na⁺/K⁺ ATPase の強制発現により局在が変わらないことが示された。次に Halo tag

融合 Na⁺/K⁺ ATPase を発現させた顎下腺細胞を酵素処理し、細胞を調整した後、HaloTag® TMR Ligand を用いてラベルした。その結果、基底側だけではなく、腺腔側も含めた細胞膜全体へのラベルが観察された (図 3)。



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 7 件)

① Ito M, Arakawa T, Okayama M, Shitara A, Mizoguchi I, Takuma T. Gravity loading induces adenosine triphosphate release and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in human periodontal ligament cells. J Invest Clin Dent. 査読有、印刷中、2014
DOI: 10.1111/jicd.12049.

② Shitara A, Shibui T, Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I, Sakakura Y, Takuma T. VAMP4 is required to maintain the ribbon structure of the Golgi apparatus. Mol Cell Biochem. 査読有、380(1-2):11-21. 2013、doi: 10.1007/s11010-013-1652-4.

③ Takuma T, Shitara A, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I, Tajima Y. Isoproterenol stimulates transient SNAP23-VAMP2 interaction in rat parotid glands. FEBS Lett. 査読有、587(6):583-589. 2013、DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.039

④ Okayama M, Shitara A, Arakawa T, Tajima Y, Mizoguchi I, Takuma T. SNARE proteins are not excessive for the formation of post-Golgi SNARE complexes in HeLa cells. Mol Cell Biochem. 査読有、366(1-2):159-168
DOI: 10.1007/s11010-012-1293-z

⑤ Morita T, Tanimura A, Shitara A, Suzuki Y, Nezu A, Takuma T, Tojyo Y. Expression of functional Stim1-mK01 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector. Arch Oral Biol. 査読有、56(11)、2011、1356-1365
DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.06.001.

⑥ Shitara A, Tojyo Y, Tanimura A, Spontaneous oscillations in rat parotid ducts are associated with cell serlling. Journal of Oral Bioscience、査読有、53(4)、2011、304-311

⑦ Tanimura A, Shitara A, Tojyo Y, Diversity and Spatio-Temporal Properties of Calcium Responces in Salivary Ducts. Journal of Oral Bioscience、査読有、53(1)、2011、48-56

[学会発表] (計 6 件)

1. The 53rd Annual Meeting of Japan Association for Oral Biology, 2012.9. 14, Fukushima, Shitara A, Arakawa T, Takuma T, 共有結合性タグを用いた唾液腺細胞における小胞輸送の解析

2. The 53rd Annual Meeting of Japan Association for Oral Biology, 2011.10.2, Gifu, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I, Shitara A, Takuma T, ヒト歯根膜細胞のメカニカルストレスによる遺伝子発現

3. The 53rd Annual Meeting of Japan Association for Oral Biology, 2011.10. 1, Gifu, Shitara A, Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi T, Takuma T, ゴルジ体のリボン構造形成における VAMP4 の重要性

4. The 53rd Annual Meeting of Japan Association for Oral Biology, 2011.10.1, Gifu, Takuma T, Shitara A, Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi T, ラット顎下腺の調節性開口分泌に関わる SNAE 複合体

5. The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 2011.9. 23, Kyoto, Shitara A, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi T, Takuma T, ゴルジ体のリボン構造形成における VAMP4 の役割

6. Gordon Research Conferences Salivary Glands & Exocrine Biology, 2011.2, Garveston, USA, Morita T, Tanimura A, Shitara A, Suzuki Y, Nezu A, Takuma T, Tojyo Y, Expression of functional Stim1 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of

adenovirus.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

設楽 彰子 (SHITARA, Akiko)

北海道医療大学 歯学部・助教

研究者番号：30508718