

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：43107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592820

研究課題名(和文) 唾液腺腺房細胞の開口分泌に関わる分子の発現と動態解析

研究課題名(英文) Expression and behavior of related proteins to exocytosis in salivary acinar cells

研究代表者

今井 あかね (IMAI, Akane)

日本歯科大学新潟短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：60180080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTPaseであるRabはGAPとGEFの働きにより、GDP/GTPサイクルを巡って膜輸送に係わっている。本研究ではRab27がエフェクター分子群と共同して耳下腺腺房細胞の開口分泌に関与しているか、GDP/GTPサイクルにRab27-GAPおよびGDIが関わっているか、さらに不活性型Rab27(GDP型)を活性型(GTP型)にするRab27-GEFについて調べた。これにより開口分泌にはMADDがRab27に対して円滑にGDP型からGTP型に移行させることが重要であることが明らかとなった。耳下腺腺房細胞におけるRab27のGDP/GTPサイクルの全容を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We study about small GTPase Rab27 and its effectors regulate isoproterenol (IPR)-stimulated amylase release from rat parotid acinar cells. We investigated the possible involvement of MADD/DENN/Rab3GEP in amylase release from rat parotid acinar cells. mRNA and protein of MADD was expressed in parotid acinar cells. MADD protein was also expressed in the cytosolic fraction of parotid acinar cells. Introduction of an antibody against the C-terminal 150 amino acids of MADD (anti-MADD-C antibody) into streptolysin O-permeabilized parotid acinar cells caused not only inhibition of IPR-induced amylase release but also reduction in the amount of GTP-Rab27. Our findings indicated that MADD functions as a GEF for Rab27 in parotid acinar cells and that its Rab27-GEF activity, that is GDP/GTP cycle, is required for IPR-induced amylase release.

研究分野：口腔生化学

キーワード：耳下腺 Rabタンパク質 開口分泌

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、唾液分泌量の低下による口腔乾燥症を訴える患者が増加している。咀嚼、嚥下、会話、齶蝕予防、感染予防など、QOL(クオリティー・オブ・ライフ)を考える上では唾液分泌は重要な要素である。唾液の主成分は水であるが、1%弱の唾液タンパク質が唾液に多くの機能を持たせている。申請者らはこれまでにこの重要な機能を持つ唾液タンパク質を含む分泌顆粒の開口放出機構を研究し、低分子量 GTPase である Rab および Rab エフェクターをはじめとする多くのタンパク質を同定し、開口分泌への関与を明らかにしてきた [Arch Oral Biol, 46, 955-62 (2001); Arch Oral Biol, 48, 597-604 (2003); Arch Biochem Biophys, 422(2), 175-82 (2004); J Cell Sci, 117, 1945-53(2004); J Biol Chem, 280, 39175-84 (2005); 他, 研究業績参照]。申請者らは2004年に世界で初めて Rab27 が内分泌系だけでなく外分泌系にも関与していることを示し[J Cell Sci, 117, 1945-53(2004)], それ以来、耳下腺腺房細胞での Rab27 とそのエフェクターの働きを解明してきた。

## 2. 研究の目的

Rab は GTPase 活性を持ち、Rab に結合している GDP/GTP のサイクルによって制御されている。これにはいろいろな因子およびエフェクターとの相互作用が必要であるが、関係が十分に整理されていない。唾液腺腺房細胞においてはその特異的な性質からさらに未知の部分が多い。申請者らはこれまで得てきた知見を基に分子レベルの唾液分泌機構の研究を継続、発展、完成させたいと願っている。本研究では、Rab を中心としたネットワークの解析を進め、これまで同定されたタンパク質との相互作用も含め分泌過程を分かりやすい模式図で示すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 腺房細胞内への抗体またはタンパク質導入によるアミラーゼ分泌に対する影響解析した。Rab27 および Rab27 エフェクターの抗体・リコンビナントタンパク質を入手した。膜透過性腺房細胞を調製し、抗体およびリコンビナントタンパク質を導入してアミラーゼ分泌への影響を測定した。

(2) 経時的な各種 Rab とエフェクターとの相互作用解析を行った。免疫沈降法および pull down assay により相互作用解析を行った。

(3) 各種 Rab とエフェクターの細胞内局在の解析を行った。免疫組織化学的手法を用いて刺激前後の Rab と Rab/エフェクター複合体の挙動を観察した。腺房細胞を刺激後、経時的に細胞分画をし、定量的ウエスタンブロットティングにより細胞内局在を観察した。

(4) 経時的な Rab の GTP 型、GDP 型の割合変化を調べた。GTP または GDP 結合 Rab を特異的に結合できる解析ツールを用い pull down assay により GTP 型と GDP 型 Rab の割合を算出した。

(5) 唾液腺腺房細胞内に発現している Rab をサイクルさせるための因子、GDP/GTP 交換反応促進因子 (GEF)、GTPase 活性化タンパク質 (GAP)、GDP/GTP 交換反応抑制タンパク質 (GDI)、GDP 解離促進因子 (GDF) の同定を行った。RT-PCR、ウエスタンブロットティング、免疫組織化学を駆使して、腺房細胞内発現と局在、刺激後の挙動を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 耳下腺における分泌顆粒の開口分泌には腺腔側膜側でいろいろなステップ (繫留、ドッキング、結合、融合等) を踏むことが必要である。酵母や哺乳類細胞中に維持保存されている 8 つのサブユニット (*Sec3*, *Sec5*, *Sec6*, *Sec8*, *Sec10*, *Sec15*, *Exo70*, *Exo84*) から成る exocyst 複合体が開口分泌に至るまでの経緯の過程で形成されていると考えられている。けれども、今日まで唾液腺において 1 つも exocyst サブユニットは同定されていない。この研究において、我々はラット耳下腺腺房細胞中における exocyst サブユニットの発現と機能を調べた。まず、RT-PCR により耳下腺腺房細胞中に 8 つすべての exocyst サブユニットの mRNA を検出した。そして、*Sec6* と *Sec8* タンパク質が腺腔側の細胞膜上に存在することを突き止めた。イソプロテノール (IPR) により腺房細胞に 5 分間刺激をすると *Sec6* と *Sec8* が結合することを明らかにした。さらに、抗 *Sec6* と抗 *Sec8* 抗体をストレプトリジン O (SL0) 処理した膜透過性耳下腺腺房細胞に細胞内導入し、IPR でアミラーゼ分泌を誘導したところアミラーゼ分泌の抑制が観察された。これらの結果から 8 つのサブユニットからなる exocyst 複合体形成が耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に必要な段階であると示唆された。

(2) *Cst5* でコードされているシスタチン D は唾液中のタイプ シスタチンに分類される。我々はシスタチン D の新しい機能を探るため、ラットのシスタチン D タンパク質と mRNA の分布を明らかにして、シスタチン D の動態を調べた。耳下腺において *Cst5* とシスタチン D は同時に発現していた。しかし、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果からシスタチン D は腺房細胞だけでのみ、作られていた。生成されたシスタチン D は小さな顆粒に存在しており、第二分泌経路を通して尖端面から唾液中に、基底側面から細胞外に分泌されていた。我々は耳下腺中に *Cst5* を含まずシスタチン D を含んだ抗原提示細胞を見出した。シスタチン D はメガリン細胞と共存する血清および腎臓の細胞に検出された。す

なわち、シスタチンDは全身、腎臓での上昇を通して循環していると推察された。このように新しいシスタチンDの動態と抗原提示細胞の活性を制御している機能が示唆された。

(3) 低分子量 GTPase である Rab27 とそのエフェクターが IPR 刺激時の耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌を制御している。アミラーゼの放出には Rab27 の特異的な GEF が必要だと考えられるが、その活性化のメカニズムは知られていない。なぜなら Rab27-GEF は耳下腺では報告が全くなかった。この研究において、我々は最近メラノサイトにおいて Rab27-GEF として働いている MADD/DENN/Rab3GEP が耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に関わっている可能性を調べた。RT-PCR 分析により耳下腺腺房細胞において MADD を含む DENND ファミリーのメンバーの mRNA が検出された。MADD タンパク質も耳下腺腺房細胞の細胞質画分において検出された。SLO 処理した膜透過性耳下腺腺房細胞に C 末 150 アミノ酸残基の MADD に対する抗体(抗 MADD-C 抗体)を細胞内導入した場合 IPR 誘導アミラーゼ分泌を抑制した。また、GTP 型 Rab27 を細胞内導入した場合、分泌を抑制した。我々の結果から耳下腺腺房細胞において MADD は Rab27 の GEF として働いており、Rab27 の GDP/GTP サイクルが IPR 刺激時のアミラーゼ分泌に必要であることが示唆された。

(4) マウス耳下腺において我々は骨格筋アクチンタンパク質(actin- 1)と mRNA 発現を認めた。マウス耳下腺より筋上皮細胞を単離して actin- 1 発現を調べた。以前の研究では筋上皮細胞のマーカーとして平滑筋アクチン(actin- 2)が使われていた。我々が actin- 1 の発現を調べた結果により、糖尿病および Sjögren 症候群モデルマウス(NOD; NOD/ShiJcl)の糖尿病時では筋上皮細胞の減少と萎縮等の病的変化を見出した。

(5) Cysteine string proteins (CSPs) は分泌小胞のシャペロンタンパク質である。この研究において、我々はラット耳下腺腺房細胞における CSP1 の局在と耳下腺分泌における CSP1 の働きを評価した。RT-PCR とウエスタンブロッティングの結果、ラット耳下腺腺房細胞において CSP1 は Hsc70 と結合して存在していた。さらに CSP1 は先端細胞膜に syntaxin 3 ではなく、syntaxin 4 と結合していた。SLO 処理膜透過性腺房細胞に抗 CSP1 抗体を細胞内導入し IPR 刺激をしたところ、アミラーゼ分泌が上昇した。J-domain とその近隣 linker region の両方を含む GST-CSP11-112 リコンビナントタンパク質を細胞内導入しても、IPR 刺激時アミラーゼ分

泌が上昇した。けれども、J-domain だけの GST-CSP11-82 および linker region だけの GST-CSP183-112 リコンビナントタンパク質を細胞内導入しても、アミラーゼ分泌促進の現象を認めることができなかった。これらの結果は耳下腺腺房細胞の開口分泌には CSP1 の J-domain と linker domain の両方が必要であり、それらが重要な働きをしていることが明らかになった。

(6) アミラーゼは外分泌腺である耳下腺腺房細胞から典型的な開口分泌によって放出される。アミラーゼを含む分泌顆粒のエキソサイトーシスは分泌顆粒の形態形成、成熟、輸送といったいくつかのステップを経て起こる。これらのステップには低分子量 GTPase である Rab ファミリーが制御していると考えられている。我々は以前より Rab27 とそのエフェクターが耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌を制御していると報告してきたが、外分泌のエキソサイトーシスに機能的に関与している他の Rab タンパク質は全く知られていなかった。ここで我々は耳下腺腺房細胞からの IPR 刺激時のアミラーゼ分泌に Rab33A が関与しているかどうかを調べた。近年、Rab33A は海馬ニューロンや PC12 細胞において開口分泌を制御していることが示唆された。本研究において Rab33A は耳下腺腺房細胞内で発現しており、分泌顆粒とゴルジ体存在することが明らかになった。抗 Rab33A 抗体また dominant-negative Rab33A-T50N 変異体の細胞内導入による機能除去を行うと明らかに IPR 刺激時のアミラーゼ分泌が抑制された。我々の結果は Rab33A が IPR 刺激時のアミラーゼ分泌を制御する新たな一員であることを示唆した。

## 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 6 件)

Imai A, Yoshie S, Haga-Tsujimura M, Nashida T, Shimomura H. Exocyst subunits are involved in isoproterenol-induced amylase release from rat parotid acinar cells. *Eur J Oral Sci.* (査読有) 120(2),2012,123-31. doi: 10.1111/j.1600-0722.2012.00952.x.

Nashida T, Sato R, Haga-Tsujimura M, Yoshie S, Yoshimura K, Imai A, Shimomura H. Antigen-presenting cells in parotid glands contain cystatin D originating from acinar cells.*Arch Biochem Biophys.* (査読有) 530(1),2013,32-9. doi: 10.1016/j.abb.2012.12.009.

Imai A, Ishida M, Fukuda M, Nashida T,

Shimomura H. MADD/DENN/Rab3GEP functions as a guanine nucleotide exchange factor for Rab27 during granule exocytosis of rat parotid acinar cells. Arch Biochem Biophys. (査読有) 536(1), 2013, 31-7. doi: 10.1016/j.abb.2013.05.002.

Nashida T, Yoshie S, Haga-Tsujimura M, Imai A, Shimomura H. Atrophy of myoepithelial cells in parotid glands of diabetic mice; detection using skeletal muscle actin, a novel marker. FEBS Open Bio. (査読有) 3, 2013, 130-4. doi: 10.1016/j.fob.2013.01.009.

Shimomura H, Imai A, Nashida T. Characterization of cysteine string protein in rat parotid acinar cells. Arch Biochem Biophys. (査読有) 538(1), 2013, 1-5. doi: 10.1016/j.abb.2013.08.001.

Imai A, Tsujimura M, Yoshie S, Fukuda M. The small GTPase Rab33A participates in regulation of amylase release from parotid acinar cells. Biochem Biophys Res Commun. (査読有) 461, 2015, 469-74. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.022.

〔学会発表〕(計 19 件)

Imai A, Yoshie S, Haga-Tsujimura M, Nashida T, Shimomura H. Role of Exocyst subunits in parotid acinar cells. 90th General Session & Exhibition of the IADR, 2012 年 6 月 20~23 日「イグアスフォールズ(ブラジル)」

Nashida T, Imai A, Shimomura H. lincNAs in parotid acinar cells of Non-obese diabetic mouse. 90th General Session & Exhibition of the IADR, 2012 年 6 月 20~23 日「イグアスフォールズ(ブラジル)」

今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳, 耳下腺腺房細胞の開口分泌における Rab27 のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の関与, 第 54 回歯科基礎医学会学術会議 2012 年 9 月 14~16 日「奥羽大学(郡山・福島)」

梨田智子, 吉江紀夫, 羽下-辻村 麻衣子, 今井あかね, 下村浩巳, マウス耳下腺筋上皮細胞における骨格筋アクチンの発現, 第 54 回歯科基礎医学会学術会議, 2012 年 9 月 14~16 日「奥羽大学(郡山・福島)」

今井あかね, 石田森衛, 福田光則, 梨田智子, 下村浩巳, DENN/MADD/Rab3GEP は耳下腺腺房細胞において Rab27 の

GDP/GTP 交換因子(GEF)として機能する, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14~16 日「福岡国際会議場(福岡)」  
Imai A, Ishida M, Fukuda M, Nashida T, Shimomura H. Role of Rab27-GEF in Parotid Acinar Cell Exocytosis. 91th General Session & Exhibition of the IADR, 2013 年 3 月 20~23 日「シアトル(アメリカ)」

Shimomura H, Imai A, Nashida T. Identification and Characterization of CSP in Parotid Acinar Cells. 91th General Session & Exhibition of the IADR, 2013 年 3 月 20~23 日「シアトル(アメリカ)」

Nashida T, Yoshie S, Mizuhashi F, Sato R, Imai A, Shimomura H. Antibacterial Proteins in parotid acinar cells of non-obese diabetic mouse. IADR-APR 2013 年 8 月 18~20 日「バンコク(タイ)」

Sato R, Nashida T, Tsutida S, Susuga M, Kikuchi H, Harada S, Sato A, Miyazaki A, Takahashi A, Imai A, Suda T, Shimomura H. Relation of mRNA level histatine. IADR-APR 2013 年 8 月 18~20 日「バンコク(タイ)」

梨田智子, 吉江紀夫, 佐藤律子, 今井あかね, 下村浩巳, NOD マウス耳下腺腺房細胞における抗菌性タンパク質の発現, 第 55 回歯科基礎医学会学術会議, 2013 年 9 月 20~22 日「岡山コンベンションセンター(岡山)」

佐藤律子, 梨田智子, 三上正人, 今井あかね: 唾液ヒスタチン mRNA レベルと口腔環境衛生との相関性, 第 55 回歯科基礎医学会学術会議, 2013 年 9 月 20~22 日「岡山コンベンションセンター(岡山)」

今井あかね, 石田森衛, 吉江紀夫, 辻村麻衣子, 佐藤律子, 梨田智子, 福田光則, ラット耳下腺腺房細胞の開口分泌時における Rab27 の GDP/GTP 交換サイクル, 第 58 回日本唾液腺学会学術会議, 2013 年 12 月 14 日「文京学院大学(文京区・東京)」

今井あかね, 佐藤律子: QOL 維持に貢献する唾液~その働きと分泌機構~, 第 40 回歯科衛生研究会 2013 年 3 月 5 日「日本歯科大学新潟生命歯学部(新潟)」

今井あかね, 辻村麻衣子, 佐藤律子, 吉江紀夫, 耳下腺腺房細胞における Rab33A の局在と働き, 第 56 回歯科基礎医学会学術会議, 2014 年 9 月 25~27 日「福岡国際会議場(福岡)」

佐藤律子, 梨田智子, 今井あかね, バイオマーカー応用を目的とした唾液からの RNA 抽出法の評価, 第 56 回歯科基礎医学会学術会議, 2014 年 9 月 25~27 日

「福岡国際会議場（福岡）」  
今井あかね、佐藤律子、ラット耳下腺腺房細胞中の Rab27 と GDP/GTP 交換サイクルに關与する特異的エフェクターの働き、第 55 回新潟生化学懇話会、2014 年 6 月 28 日「長岡技術科学大学（長岡・新潟）」  
今井あかね、吉江紀夫、辻村麻衣子、福田光則、耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌に關与する Rab27 とそのサポーターたち、第 4 回新潟 4 解剖学教室合同セミナー、2014 年 7 月 11 日「日本歯科大学新潟生命歯学部（新潟）」  
五十嵐香織、今井あかね：口腔頰粘膜由来ゲノム DNA における Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) 遺伝子の同定、第 41 回歯科衛生研究会、2014 年 7 月 16 日「日本歯科大学新潟生命歯学部（新潟）」  
今井あかね、吉江紀夫、辻村麻衣子、ラット耳下腺腺房細胞の開口分泌に対する低分子量 G タンパク質 Rab33A の関わり、平成 27 年度歯学会大会、2015 年 6 月 6 日「日本歯科大学新潟生命歯学部（新潟）」

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井 あかね (IMAI Akane)  
日本歯科大学新潟短期大学・その他部局・教授  
研究者番号：6 0 1 8 0 0 8 0

### (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：1 0 1 3 3 4 6 4

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：3 0 0 9 5 2 7 8

辻村 麻衣子 (TSUJIMURA Maiko)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師  
研究者番号：6 0 5 3 5 2 1 9

### (3) 連携研究者

福田 光則 (FUKUDA Mitsunori)  
東北大学・生命研究科・教授  
研究者番号：5 0 3 1 1 3 6 1