

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462901

研究課題名(和文) 唾液腺における分泌タンパク質の選別輸送シグナルの同定

研究課題名(英文) Signals for selective transport of secretory proteins in salivary glands

研究代表者

吉垣 純子 (YOSHIGAKI, Junko)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：40256904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質が細胞外へ分泌される経路には、調節性と構成性の2つの経路が存在するが、その選別機構については不明な点が多い。我々は、リポータータンパク質であるHaloTagと様々な輸送先を持つタンパク質との融合遺伝子を作成し、耳下腺腺房細胞の初代培養細胞における輸送先および輸送効率の解析を行った。その結果、唾液タンパク質の1つであるシスタチンとの融合タンパク質が効率よく分泌顆粒へ輸送され、その輸送効率は、最も多い内在性唾液タンパク質であるアミラーゼと相関することが明らかになった。したがって、分泌顆粒内のタンパク質同士が相互作用することにより、効率良く分調節性分泌経路に輸送されることが予想された。

研究成果の概要(英文)：Secretory proteins are exocytosed via two pathways: regulated and constitutive secretory pathways. Secretory proteins may be separated into two pathways in the Golgi apparatus and the mechanism is unknown. To study the sorting mechanism in salivary glands, we have been using HaloTag, a reporter protein that was constructed to bind fluorescent ligands. We constructed HaloTag proteins fused with various proteins and examined their transport in primary culture of parotid acinar cells. As a result, cystatin, one of saliva proteins, fused with HaloTag was localized in the secretory granules and was released upon secretory stimulation. By fluorescent microscopy analysis, the signal intensity of HaloTag-fused cystatin is correlated with amylase. These results suggest that cystatin may interact with amylase in the Golgi apparatus which can promote sorting into regulated secretory pathway in parotid acinar cells.

研究分野：口腔生理学

キーワード：唾液腺 分泌顆粒 選別輸送 調節性分泌 構成性分泌 細胞極性

1. 研究開始当初の背景

糖尿病におけるインスリンのように、特定のタンパク質の減少によって起こる病気に対しては、そのタンパク質を発現する遺伝子の導入が決定的な治療法になる。タンパク質を大量に合成・分泌する能力があることから、遺伝子導入するターゲット候補となる臓器として、唾液腺が注目されている。しかし、有用タンパク質を発現させても、必要な場所へ正しく選別輸送されなければ効果は無い。外分泌的に口腔内・消化管内へ供給されることが必要なタンパク質と、内分泌的に血液に供給されることが必要なタンパク質が存在する。外分泌細胞の選別輸送機構については、これまで分泌顆粒や調節性分泌が痕跡程度にしか維持されていない培養細胞しか確立していなかったため、解析が難しかった。我々が確立した唾液腺初代培養法は、これまでの初代培養と比べて長時間、調節性分泌能を維持していた。外来遺伝子を導入し発現させるには十分な時間であるため、世界で始めて外分泌培養細胞において、外来分泌タンパク質の輸送を計測することに成功した。この系を利用することによって、外分泌腺の選別輸送機構を解明すれば、遺伝子治療法に有用な情報が得られると考えた。

2. 研究の目的

糖尿病や腎不全性貧血など特定のタンパク質を失って起こる疾病というのは少なくない。分泌タンパク質の輸送過程を明らかにすることは、このような疾患の遺伝子治療において欠かせないことであり、社会的に大きな意義があると考えている。本研究から得られた選別シグナルの情報は、*in vivo*での選別輸送解析にフィードバックされて、やがて目的タンパク質の分泌される方向性とタイミングを制御することが可能になると期待できる。

申請者は前課題研究において、唾液アミラーゼのシグナルペプチド配列を付加したレポータータンパク質 HaloTag (SS25H) が、唾液腺細胞において調節性分泌経路と構成性分泌経路両方に輸送されることを見いだした。シグナルペプチドは、小胞体で分泌タンパク質が合成されて膜を超える際に切断される。したがって、ゴルジ装置で選別を受ける時点ではSS25Hは単なるHaloTagタンパク質になっており、アミラーゼ由来の配列は含まれていない。SS25Hはゴルジ装置において特別な選別を受けないために、両方の経路へ輸送されたと予測した。それぞれの経路に

特異的に輸送されるには、何らかの選別シグナルの付加が必要であると考えられる。そこで本研究では、SS25Hを基準タンパク質として用い、新たに付加するタンパク質配列による輸送効率の変化を計測して、選別輸送シグナルを同定することとした。

3. 研究の方法

外分泌腺における選別輸送機構を明らかにするために、HaloTagと分泌タンパク質との融合タンパク質を作成し、調節性分泌経路と構成性分泌経路それぞれへの輸送効率を計測し、基準タンパク質となるSS25Hと比較した。

(1) 新たなレポーター輸送タンパク質の作成

新たな標的タンパク質として、異なる分泌パターンを示すと予想されるタンパク質のHaloTagとの融合タンパク質を作成した。調節性分泌への輸送効率が高いと予想されるタンパク質として内在性唾液タンパク質、構成性分泌へ輸送されることが予想されるタンパク質としてヒト erythropoietin (Epo) を選択した。さらに、リソソームに輸送されるタンパク質としてカテプシン B を使用した。

(2) レポーター輸送タンパク質の細胞内局在の解析

細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、画像解析ソフト IMARIS および ZEN (Karl Zeiss) を用いて画像の定量解析を行った。新規 HaloTag 融合タンパク質と内在性唾液タンパク質の局在効率を SS25H と比較した。

(3) レポーター輸送タンパク質の刺激依存的分泌効率の測定

アドレナリン受容体刺激であるイソプロテレノール非存在下および存在下における分泌量を測定し、刺激依存的な分泌効率を求めた。SS25H や内在性唾液タンパク質であるアミラーゼと比較することによって、分泌顆粒への輸送効率を測定した。

(4) レポーター輸送タンパク質と内在性唾液タンパク質アミラーゼとの相互作用の生化学的解析

HaloTag 融合タンパク質とアミラーゼの複合体形成および相互作用をブルーネイティブ PAGE により解析を行った。

HaloTag 融合タンパク質を発現した細胞に光反応性クロスリンカーを添加し、細胞内で

HaloTag 融合タンパク質がアミラーゼとクロスリンクされるかを解析した。

HaloTag 融合タンパク質を発現した細胞から分泌顆粒を精製し、その内容物を酸性条件でインキュベートし、その後遠心により沈殿するタンパク質量を測定した。

これらの方法により、HaloTag 融合タンパク質が効率よく分泌顆粒へ輸送されるメカニズムについて考察を行った。

4. 研究成果

(1) 新たなレポーター輸送タンパク質の作成

これまでの研究で、HaloTag に唾液タンパク質の 1 つであるアミラーゼのシグナルペプチド配列を付加した遺伝子(SS25H)をアデノウイルスに組み込み、輸送を調べてきた。しかし、アミラーゼの全長遺伝子は大きく、アデノウイルスに組み込むことができなかつたため、シグナル配列のみの効果とアミラーゼ全長タンパク質の効果を比較することが出来なかつた。そこで、選別を受けるタンパク質の候補として、唾液中に分泌されるタンパク質である Parotid secretory protein (PSP) やシスタチン D に注目した。これらはアミラーゼよりも分子量が小さく、全長をウイルスベクターに組み込むことが容易であると考えた。また、カテプシン B はタンパク質合成後、一度分泌顆粒に運ばれるが、顆粒の成熟に伴って排除され、リソゾームへ輸送されることが知られている。したがって、唾液タンパク質とは異なる影響がみられると考えた。そこで、PSP、シスタチン D、プロカテプシン B の遺伝子をクローニングし、HaloTag との融合遺伝子を作成し、アデノウイルスによる発現系を構築し、耳下腺初代培養細胞に感染・発現させた。いずれも高い感染効率を得た。

(2) レポーター輸送タンパク質の細胞内局在の解析

HaloTag 融合タンパク質の局在を、分泌顆粒マーカーであるアミラーゼと比較を行った。発現タンパク質を HaloTag リガンドでラベルし、リガンドの蛍光シグナルと抗アミラーゼ抗体によって検出されるシグナルを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、いずれもアミラーゼと局在が重なることから、分泌顆粒へ輸送されたと考えられる。しかし、融合させるタンパク質の種類によって、アミラーゼとの共局在の効率が異なることがわかった。そこで、共局在の定量的な解析として、HaloTag リガンドを含む顆粒のうちア

ミラーゼを含む割合、顆粒毎の 2 つのシグナル強度の分布、イメージのピクセルごとの 2 つのシグナルのオーバーラップ係数と相関係数、の 3 つの方法の解析を行った。その結果、シスタチン D との融合 HaloTag タンパク質 Cst5H は、3 つの解析法の指標において、SS25H よりもアミラーゼとの共局在率が高いことが明らかになった。

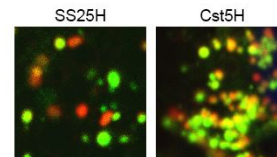


図 1 SS25H および Cst5H の細胞内局在の比較。

(赤：アミラーゼ，緑：HaloTag リガンド)

(3) レポーター輸送タンパク質の刺激依存的分泌効率の測定

分泌顆粒への輸送効率を測定する目的で、アドレナリン受容体刺激であるイソプロテレノール非存在下および存在下の分泌効率を測定した。in vivo における解析では血液へ内分泌されると報告されたエリスロポエチンでも分泌顆粒へ輸送されており、タンパク質のアミノ酸配列だけでは輸送先の決定には不足であることが予想された。形態観察においてアミラーゼとの共局在率の高かつた Cst5H は、刺激依存的に分泌され、さらに非刺激時の分泌がアミラーゼ同様に抑制されていた。すなわち、調節性分泌へ SS25H より特異的に輸送されたと考えられる。

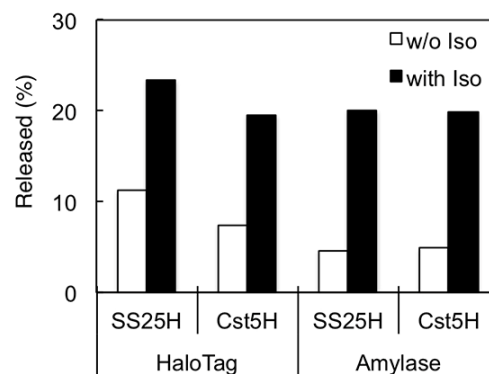


図 2 SS25H と Cst5H の刺激依存的な分泌効率。SS25H はイソプロテレノール(Iso)非存在下での分泌量がアミラーゼと比較して高いが、Cst5H の非刺激時の分泌量は低く抑えられている。

(4) レポーター輸送タンパク質と内在性唾液タンパク質アミラーゼとの相互作用の生化学的解析

形態学的解析より, Cst5H とアミラーゼの局在の間には正の相関が見られた。したがって, 2つのタンパク質の間になんらかの相互作用があることが予想された。アミラーゼは分泌顆粒内において高分子複合体を形成していることを我々は以前報告している。Cst5H はアミラーゼが形成している高分子複合体に参加しているために, 調節性分泌経路へ効率よく輸送されている可能性があると考えた。しかし, ブルーネイティブPAGEを用いて, 細胞抽出液中の非変性状態の複合体を解析したところ, アミラーゼ複合体に HaloTag 融合タンパク質は含まれていなかった。

また, 光反応性クロスリンカーを用いて細胞内におけるタンパク質同士のクロスリンクを試みたが, アミラーゼと HaloTag 融合タンパク質の架橋産物は検出されなかった。このことは, 大部分の分泌顆粒内ではアミラーゼと HaloTag 融合タンパク質との複合体は形成されていないことを示唆している。

耳下腺の分泌顆粒は, ゴルジ装置で形成される時には内部 pH が酸性に傾いているが, 成熟するにつれて中性に近づくとも報告されている。そこで, 酸性条件で SS25H または Cst5H 発現細胞から精製した分泌顆粒の内容物をインキュベートしたところ, Cst5H の方が SS25H よりも沈殿量が多くなった。このことから, ゴルジ装置における分泌顆粒形成時には pH の影響で複合体を形成している可能性がある。

これらのことから, 調節性分泌経路への輸送にはゴルジ装置におけるタンパク質の凝集能力が関わっていることが予想される。一方, アミラーゼとの相互作用がみられないタンパク質は分泌顆粒へ輸送されたことから, 構成性分泌経路に輸送されるためには, 分泌顆粒への輸送経路から積極的に排除される必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

「唾液腺初代培養細胞の可能性を探る」(2015) 吉垣純子 日本唾液腺学会誌 56巻 49-56(査読無し, 招待論文)

Secretory proteins without a transport signal are retained in secretory granules during maturation in rat parotid acinar cells. (2015) Katsumata-Kato O, Yokoyama M, Matsuki-Fukushima M, Narita T, Sugiya H, Fujita-Yoshigaki J. *Arch Oral Biol*, 60: 642-649 (査読有り)

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.01.006

The sorting mechanism underlying the separation of salivary proteins into secretory granules in parotid glands. (2014) Fujita-Yoshigaki J, Matsuki-Fukushima M, Yokoyama M, Katsumata-Kato O. *J Oral Biosci*, 56: 97-100 (査読有り)

DOI: 10.1016/j.job.2014.05.002

Sorting of a HaloTag protein that has only a signal peptide sequence into exocrine secretory granules without protein aggregation. (2013) Fujita-Yoshigaki J, Matsuki-Fukushima M, Yokoyama M, Katsumata-Kato O. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 305: G685-696 (査読有り)

DOI: 10.1152/ajpgl.00093.2013

〔学会発表〕(計6件)

ラット耳下腺分泌顆粒のタンパク質濃縮機構における膜ドメインの関与: 加藤治, 横山愛, 吉垣純子, 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015年9月13日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

耳下腺腺房細胞における分泌顆粒へのタンパク質選別輸送機構: 吉垣純子, 横山愛, 加藤治, 第57回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム, 2015年9月11日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

耳下腺における唾液タンパク質シスタチンDの調節性分泌への輸送機構: 吉垣純子, 横山愛, 加藤治, 第59回日本唾液腺学会総会, 2014年12月6日, 文京学院大学(東京文京区)

Sorting mechanism of proteins to secretory granules in salivary glands. Fujita-Yoshigaki J, Yokoyama M, Katsumata-Kato O. 92nd General Session and Exhibition of IADR, 2014年6月28日, Cape Town (South Africa)

Maintenance of secretory proteins during

granule maturation in parotid glands.
Katsumata-Kato O, Yokoyama M,
Fujita-Yoshigaki J. 92nd General Session and
Exhibition of IADR, 2014年6月28日, Cape
Town (South Africa)

耳下腺における唾液タンパク質の分泌顆
粒への輸送機構：吉垣純子，福島美和子，横
山愛，加藤治，第55回歯科基礎医学会学術
大会サテライトシンポジウム，2013年9月
20日，岡山コンベンションセンター（岡山県
岡山市）

6．研究組織

(1)研究代表者

吉垣 純子 (YOSHIGAKI, Junko)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号：40256904