

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592153

研究課題名（和文）唾液腺開口分泌に関する SNARE タンパク質の解明

研究課題名（英文）Identification of SNARE proteins for salivary exocytosis

研究代表者

田隈 泰信（TAKUMA TAISHIN）

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：40095336

研究成果の概要：本研究では、当初、仙台ウイルス（HVJ）・エンベロープ・ベクターを用い、分泌マーカー cDNA と分泌関連タンパク質の siRNA をラット顎下腺に導入し、唾液分泌機構の *in vivo* 解析を計画した。しかし、予期に反し、このエンベロープ・ベクターには遺伝子導入活性がなかったため、計画変更を迫られた。そこで、培養細胞に、分泌マーカーと SNARE タンパク質を別の色の蛍光タンパク質として発現し、二波長全反射蛍光顕微鏡観察法により、構成的分泌を調節する分泌関連タンパク質の同定を試みており、現在、siRNA の効果から対象が徐々にしぼられてきている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：口腔生化学

1. 研究開始当初の背景

（1）哺乳類の細胞には約 40 種類の SNARE タンパク質が存在し、分泌過程を制御している。他の分泌細胞と異なり、唾液腺を含む外分泌細胞には、実験モデルとなる適当な培養細胞が存在しないため、分泌に関する SNARE タンパク質の完全な同定には至っていない。

唾液腺の分泌を調節する SNARE タンパク質を同定するには、動物の唾液腺に直接、分泌マーカーとなる蛍光タンパク質の cDNA と分

泌を調節する SNARE の siRNA を導入し、*in vivo* で機能を解析する必要がある。

（2）本研究では、当初、ウイルスを使わず、プラスミドや siRNA を、安全に、かつ効率よく生体組織に導入することが可能と宣伝され、実際、ラット唾液腺への siRNA 導入に成功した仙台ウイルス（HVJ）・エンベロープ・ベクターの広範な利用を計画した。また、唾液腺にプラスミドや siRNA を導入するため、ラット唾液腺導管の開口部から、極めて細かいプラスチック・チューブを挿入し、薬液を注

入する訓練を受け、この手技をマスターした。

(3) しかし、誠に遺憾ながら、HVJ・エンベロープ・ベクターには、販売企業の宣伝文句や開発段階での報告論文に反し、プラスミドを唾液腺に導入・発現する活性は認められなかった。ウイルスゲノムを除去した後のエンベロープでは、siRNAのような比較的小型の分子を導入する能力は残存するものの、プラスミドのような大型の分子を細胞内に注入する能力は失われた可能性が高いと想像された。

2. 研究の目的

当初計画した研究方法が使えなくなったため、研究方法とともに研究目的にも一部変更を加え、新に二つの方向について検討することとした。

(1) HVJ・エンベロープ・ベクターが使えないため、唾液腺に導入するプラスミドをそれぞれのアデノウイルスベクターへと設計変更し、当初の予定通り in vivo での機能解析を継続する。

(2) 平行して、あらゆる細胞がもつ基本機能である構成的分泌に着目し、全反射蛍光顕微鏡観察法(TIRF-M)と siRNA を組合せることにより、構成的分泌に関与する SNARE タンパク質を同定する。

3. 研究の方法

(1) 分泌マーカーとしてこれまで用いてきた GFP 標識ヒト成長ホルモン(hGH-GFP)のアデノウイルス発現ベクターを設計した。同様に、唾液腺の分泌顆粒膜に v-SNARE として存在すると想像されている VAMP2 と VAMP8 の GFP 融合タンパク質のアデノウイルス発現ベクターを設計構築した。

これらの構築は、現在、ウイルス化の最終段階である HEK293 細胞への導入、感染を行っているが、残念ながら力価の高いウイルスはまだ得られていない。

(2) 構成的分泌のモデルとして、HeLa 細胞に hGH-GFP を導入し、安定発現細胞を確立した。同様に、構成的分泌を定量的に測定するためのモデル細胞として、HeLa 細胞にウミホタル・ルシフェラーゼの発現ベクターを導入し、この分泌型ルシフェラーゼ (CLuc) を安定に発現する細胞を樹立した。

(3) 分泌マーカーの hGH-GFP と同一の分泌

小胞に発現する v-SNARE を同定するため、哺乳類細胞で知られている 9 種類の VAMP ファミリータンパク質をクローニングし、それぞれの C 末端に赤色蛍光タンパク質である TagRFP を融合し、発現ベクターを構築した。

(4) GFP 融合タンパク質と TagRFP 融合タンパク質の開口分泌を同時に観察できる二波長全反射蛍光顕微鏡(TIRF-M)システムを組立てた。

(5) v-SNARE に対する siRNA を設計し、ウエスタンブロット法により 80%以上発現をノックダウンする siRNA 導入法を開発した。

4. 研究成果

(1) 分泌マーカーとして hGH-GFP、一方 v-SNARE として VAMP8-GFP を HeLa 細胞に導入し、全反射蛍光顕微鏡観察(TIRF-M)により、初めて hGH-GFP と VAMP8-GFP の開口分泌像を観察することに成功した。hGH-GFP の分泌では、分泌小胞が明るくスパークする場合と瞬間的に消える場合の二つのパターンが観察された。VAMP8-GFP の分泌では、分泌小胞の VAMP8-GFP が細胞膜へ完全に移行する”full-fusion”型と、分泌小胞が細胞膜と一時的に接触融合するが、細胞膜と一体化することなく再利用される”kiss-and-run”型が見られた。

(2) 構成的分泌に関与する SNARE タンパク質を網羅的に解析する目的で、HeLa 細胞にウミホタル(CLuc)の分泌型ルシフェラーゼを導入し、安定発現細胞を樹立した。CLuc の分泌はブレフェルディン A で阻害されることから、ゴルジ装置を経由する伝統的な分泌経路をたどることが示唆された。そこで、分泌経路に関わると想像される v-SNARE、t-SNARE および SNARE 関連タンパク質から 10 数種類の siRNA を設計し、分泌に対する効果を調べた。しかし、siRNA は対象となる SNARE タンパク質の発現を高率に(約 80%程度)抑制したが、CLuc の分泌に対する抑制効果は認められなかった。現在、より高感度の分泌評価法を検討している。

(3) hGH-GFP の安定発現細胞に、TagRFP 標識した 9 種類の VAMP ファミリータンパク質を導入し、二波長 TIRF-M で観察することにより、hGH-GFP を運ぶ分泌小胞に発現する v-SNARE を検索した。その結果、VAMP ファミリーの中で、これまで分泌小胞に発現するとは想像されなかったものでも小胞との共存が認められた。さらに、その siRNA を導入した細胞では、hGH-GFP が細胞内に蓄積する傾向が見られた。CLuc の分泌に関しては分泌抑

制が認められないことから、現在、さらに詳細な解析を進めているところである。

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 6件)

① Takeshima M, Saitoh M, Kusano K, Nagayasu H, Kurashige Y, Malsantha M, Arakawa T, Takuma T, Chiba I, Kaku T, Shibata T, Abiko Y. High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med.* 37(8):475-479. 2008 査読有り.

② Kurashige Y, Saitoh M, Nishimura M, Noro D, Kaku T, Igarashi S, Takuma T, Arakawa T, Inoue T, Abiko Y. Profiling of differentially expressed genes in porcine epithelial cells derived from periodontal ligament and gingiva by DNA microarray. *Arch Oral Biol.* 53(5):437-442. 2008.

③ Saitoh M, Kurashige Y, Yamazaki M, Nishimura M, Nakamura S, Noro D, Takeshima M, Arakawa T, Takuma T, Igarashi S, Kaku T, Inoue T, Abiko Y. Increased expression of beta-defensin-2 and -3 during the development of autoimmune sialoadenitis in MRL/lpr mice. *Med Mol Morphol.* 40(3):157-162. 2007 査読有り.

④ Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I, Tajima Y, Takuma T. SNAP-23 is not essential for constitutive exocytosis in HeLa cells. *FEBS Lett.* 581(24):4583-4588. 2007 査読有り.

⑤ 甲田尚央, 鳥谷奈保子, 荒川俊哉, 田隈泰信, 溝口到 成長期ラット顎関節円板における proteoglycan の mRNA 発現 北海道医療

大学歯学雑誌27巻2号 Page93-102 2008 査読有り.

⑥ 伊藤勝敏, 荒川俊哉, 村田勝, 田隈泰信, 有末真 ヒト歯髄組織における骨形成タンパク質の発現 *Journal of Hard Tissue Biology* 16巻4号 Page199-204 2007 査読有り.

[学会発表] (計 7件)

① 荒川俊哉, 安彦善裕, 岡山三紀, 溝口到, 田隈泰信 点特異的にDNAメチル基を持つベクターの構築法の開発とその応用 *Journal of Oral Biosciences* 50巻Suppl. Page198 2008.

② Takuma T, Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I. Direct evidence for the involvement of VAMP-8/endobrevin in constitutive exocytosis. *FEBS J.* vol 274 suppl. B2-6 2007.

③ 荒川俊哉, 安彦善裕, 岡山三紀, 溝口到, 田隈泰信 新しい点特異的メチル基導入ベクターの構築法(New method of constructing the vector with site-specific DNA methylation) 日本生化学会大会・日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集80回・30回 Page4T13-3 2007.

④ 田隈泰信, 岡山三紀, 荒川俊哉, 溝口到 構成性開口分泌におけるVAMP-8の役割に関するTIRF顕微鏡的エビデンス (TIRF microscopic evidence for the role of VAMP-8 in constitutive exocytosis) 日本生化学会大会・日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集80回・30回 Page2T9-7 2007.

⑤ 倉重圭史, 齋藤正人, 西村学子, 竹嶋麻衣子, 荒川俊哉, 田隈泰信, 賀来亨, 五十嵐清治, 井上孝, 安彦善裕 DNAマイクロアレイを用いたブタマラッセ上皮遺残由来細胞と口腔上皮由来細胞との発現様式の比較

Journal of Oral Biosciences 49 卷Suppl.
Page206 2007.

⑥ 荒川俊哉, 岡山三紀, 安彦善裕, 溝口到,
田隈泰信 重力負荷はMC3T3-E1 細胞において
2 つのシグナル経路を介してERKをリン酸化する
Journal of Oral Biosciences 49 卷
Suppl. Page154 2007.

⑦ 中村寿実子, 安彦善裕, 西村学子, 倉重
圭史, 竹嶋麻衣子, 山崎真美, 齋藤正人,
荒川俊哉, 田隈泰信, 賀来亨 ニコチンが
及ぼすβディフェンシンの発現変化の検索
北海道医療大学歯学雑誌26 卷 1 号 Page45
2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田隈 泰信 (TAKUMA TAISHIN)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：40095336

(2) 研究分担者

荒川 俊哉 (ARAKAWA TOSHIYA)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号：40306254
設楽 彰子 (SITARA AKIKO)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：30508718
岡山 三紀 (OKAYAMA MIKI)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：30382500