

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 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791803

研究課題名（和文） ラット耳下腺腺房細胞における分泌顆粒の可視化と、生細胞を用いた成熟過程の検討

研究課題名（英文） Visualization of secretory granules in rat parotid gland, and examination of mechanisms of granule maturation.

研究代表者

加藤 治（勝俣 治）（KATO OSAMU (KATSUMATA OSAMU)）

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：70349968

研究成果の概要（和文）：

本研究は耳下腺の分泌顆粒を可視化し、顆粒成熟過程を検討することを目的としている。ラットに分泌刺激を施した後、2時間後に耳下腺を摘出し、耳下腺細胞を色素含有液中にて3時間インキュベートした。色素の細胞内局在は形態的だけでなく、生化学的、機能的に検討することで分泌顆粒への色素の濃縮を確認した。さらに、2昼夜の培養により、色素を含んだ未成熟顆粒が大きく成熟したことは、成熟過程検討の可能性を期待させる結果であった。

研究成果の概要（英文）：

In order to visualize secretory granules in rat parotid acinar cells, we incubated the cells with a fluorescent dye for 3 hours after exocytosis. Intracellular localization of the dye into secretory granules was confirmed by morphological, biochemical and functional study. Moreover immature secretory granules including the dye matured to large after 2 days cell culture. These results expect that examination of mechanisms of granule maturation in rat parotid granules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯学，生理学，シグナル伝達，唾液腺，分泌顆粒

1. 研究開始当初の背景

耳下腺腺房細胞には直径 1 μm もある大きな分泌顆粒が充満している。この分泌顆粒は光学顕微鏡下でも観察可能なため、分泌機構の検討だけでなく、オルガネラの形成、成熟機構の検討にも非常に魅力的な研究材料で

ある。ところが分泌顆粒の成熟機構の検討は開口放出や細胞内シグナル伝達経路の解明と比較するとその解析は容易ではない。それは成熟過程を検討するには電子顕微鏡レベルでの形態学的評価が不可欠だからである。このため唾液腺における分泌顆粒の生成、成熟機構はこれまであまり解明されていない。

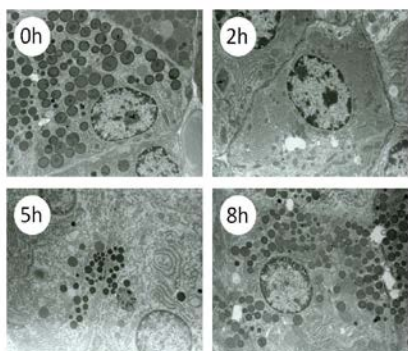


図 1

図 1 にアドレナリン β 受容体刺激薬であるイソプロテレノールをラット腹腔内に投与した後、耳下腺腺房細胞を電子顕微鏡で観察した結果を示した。刺激前、細胞内に充満していた分泌顆粒は刺激 2 時間後、開口放出により細胞内から消失した。さらに 5 時間後から再び分泌顆粒が観察されはじめ、8、12 時間後にはほぼ元の細胞の状態に戻っていた。この時の管腔の膜容量の変化を考えると、数多くの分泌顆粒の開口放出により増大した膜容量は、再び元の状態に戻るためには膜のリサイクリングが必要である。そこで、このエンドサイトーシス経路を利用して分泌顆粒の色素を取り込ませることができれば、分泌顆粒の成熟過程が検討できるのではと考えた。この研究は唾液腺の分泌機構の解明から、唾液分泌障害の治療法の解明への一端を担うものであると期待される。

2. 研究の目的

成熟機構を検討するにあたり、まず必要なのは分泌顆粒の可視化である。分泌顆粒の可視化の方法には様々あるが、最も一般的であるのは抗体による免疫組織染色である。しかしながら、この方法は試料を固定しなければならず、成熟過程のダイナミックな変化を検討するためにはあまり都合が良くない。また、分子生物学的手法を用いて生細胞に蛍光タンパク質を発現させる方法も試みたが、ゴルジ体と分泌顆粒の区別やその遺伝子導入効率の悪さ、さらには分泌顆粒を維持した培養細胞が確立されていないことがネックとなり思い通りにはいかなかった。そこで我々は電子顕微鏡による観察の結果から管腔側膜のリサイクリングと分泌顆粒の形成に関係があるのではないかと予想し、耳下腺腺房細胞に蛍光色素を取り込ませ、分泌顆粒を可視化しようと試みた。さらに、その細胞を用いて顆粒成熟機構の検討を試みた。

3. 研究の方法

(1) 動物：SD ラット (6~7 週齢) の腹腔内にイソプロテレノール (5.5 mg/kg) を注射投与した。各時間後に麻醉下 (ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg 腹腔内投与) にて耳下腺を摘出した。

(2) 耳下腺遊離腺房細胞の調製：耳下腺を鉗にてミンスした後、遠心 (200 g, 1 min) により得られた沈渣を 1.4 mg/ml コラゲナーゼ、0.2 mg/ml ヒアルロニダーゼ、0.2 mM ルシファーイエローを含むクレブス - リンゲル溶液に懸濁し、37°C で 1 時間、攪拌しながらインキュベートした。組織懸濁液を 8 層に重ねたナイロンメッシュに通し、結合組織を除去し、耳下腺遊離細胞を調製した。生存率は 95% 以上であることを確認した。

(3) 分泌顆粒の精製：摘出した耳下腺を緩衝液 (300 mM sucrose, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol (DTT), Complete, EDTA-free, and 20 mM MOPS-NaOH, pH 7.0) 中にてホモジナイズしたのち、核を遠心にて除いた。さらに上清を 57% パーコール濃度勾配遠心 (16,400 g, 30 min) し、緩衝液で 2 回洗浄することで分泌顆粒の精製を行った。分泌顆粒内画分は低張緩衝液中にて分泌顆粒を破壊したのち、遠心 (100,000 g, 60 min) にて膜画分を除く上清を分泌顆粒内画分として回収した。

(4) ペリフェュージョンシステム：耳下腺遊離細胞をゲル (Bio-Gel P-2) とともにカラムに充填し、クレブス - リンゲル溶液を還流 (1 ml/min) させた。フラクションコレクターを用いて 30 秒ごとに分画し、単位時間当たりのアミラーゼ活性を測定した。

(5) 共焦点レーザー顕微鏡観察：耳下腺腺房細胞は 10% ホルマリン液にて 60 min の固定を行った。0.2% TX-100 溶液にて可溶化後、ブロッキングは 1% BSA と 0.05% IgG を用いて行った。抗アミラーゼ抗体と Alexa-Fluor-568 or Alexa-Fluor-488 抗 IgG 抗体で分泌顆粒を、DiI で細胞膜を染めた後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) にて観察を行った。

(6) 電子顕微鏡観察：試料はカルノフスキー固定液 (2% パラフォルムアルデヒド, 2.5% グルタルアルデヒド) にて 60 min 固定を行った。1% 四酸化オスミウム溶液にて後固定を 60 min 行い。脱水、置換の後、EPON-812 に包埋した。観察には透過型電子顕微鏡 (JEOL,

JEM-1010) を用いた。

(7) ラット耳下腺初代培養：耳下腺腺房細胞を DMEM/F-12 培地 (1 mM ルシファーイエロー, 10% FBS, ITS-X supplement, 1 μ M ヒドロコルチゾン, 100 U/ml ペニシリン, 0.1 mg/ml ストレプトマイシン, 10 nM シスタチン含有) に懸濁した。コラーゲン I コートされたガラスボトムディッシュ上で1昼夜培養した翌日, ルシファーイエローを含まない DMEM/F-12 培地に交換し, さらに3日目に細胞を固定処理した。

4. 研究成果

(1) ラット耳下腺腺房細胞による蛍光色素の取り込み：イソプロテレノール投与後2時間の耳下腺を摘出し, 腺房細胞を蛍光色素ルシファーイエロー含有培養液にて3時間インキュベーションした。インキュベーション前後のアミラーゼ, ルシファーイエローおよび細胞膜の局在を示す (図2)。

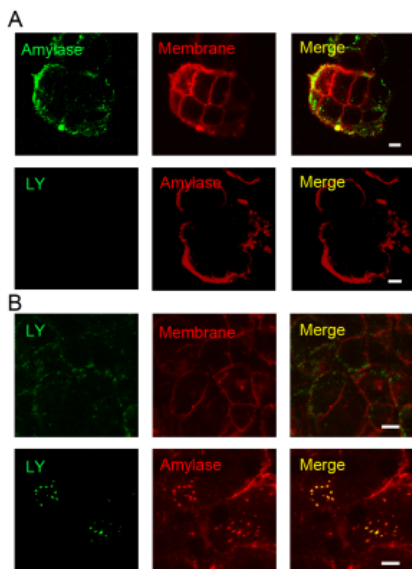


図2

(A) インキュベーション前, 抗アミラーゼ抗体によって染色される分泌顆粒は開口放出のため細胞内には検出されず, 細胞周囲が染色された。アミラーゼの局在は細胞膜とほぼ一致していた。ルシファーイエローの蛍光は検出されなかった。(B) 3時間のインキュベーション後, ルシファーイエローの蛍光は膜直下の細胞質領域に点状に観察され, アミラーゼと共局在していた。アミラーゼとの共局在はイソプロテレノール刺激後のみ観察され, 単にインキュベーションだけでは認められなかった。これらの結果は分泌顆粒の開口放出後の膜がエンドサイトーシ

スされていることを示唆している。今回使用したルシファーイエローは膜結合性がないことから, 非特異的なエンドサイトーシスであることが示唆された。

(2) 耳下腺細胞管腔膜マーカーAQP5の局在検討：水チャンネルの1つであるAQP5はラット耳下腺腺房細胞の管腔側膜のマーカーとして知られている。開口放出後の膜上に検出されるアミラーゼが管腔側膜上に存在するのかわ, 基底膜上であるのかを検討するため, インキュベーション前のAQP5の局在を検討した (図3)。

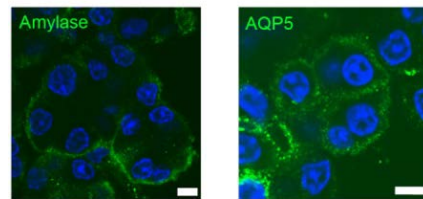


図3

AQP5は管腔側膜のマーカーであるのにも関わらず, コラゲナーゼ処理によって細胞接着部位だけでなく, 細胞周囲全体が染まっていた。これは酵素処理により耳下腺腺房細胞のタイトジャンクションが破壊された結果であると推測する。アミラーゼの局在はAQP5と類似していた。

(3) 精製分泌顆粒内からの蛍光色素の検出：細胞内に取り込まれた蛍光色素が分泌顆粒に局在しているかを確かめるため, パーコールド心法にて分泌顆粒を精製し, その内容物からルシファーイエローの蛍光が検出されるかどうかを検討した (図4)。

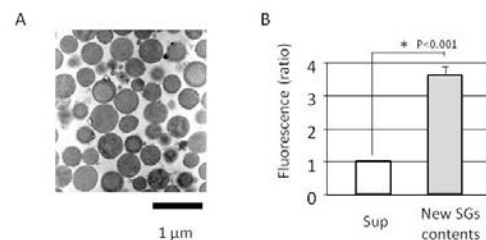


図4

これまで我々は57%パーコールド心法による分泌顆粒の精製法を確立している。そこで刺激後, 新規に形成された分泌顆粒においても同様の方法で精製されるかを確かめるため, イソプロテレノール刺激5時間後のラット耳下腺より分泌顆粒を精製し, 電子顕微鏡による観察を行った (A)。若干の膜のコンタミも見られるが, 分泌顆粒がきれいに観

察される。さらに大きさは成熟顆粒よりも小さい平均 500 nm ほどであった。(B) 刺激した耳下腺をさらに蛍光色素と共に 3 時間のインキュベートし、分泌顆粒をパーコール遠心法にて精製した。遠心にて上清を採取し、分泌顆粒のペレットを 0.1% TX-100 を含む低張バッファーにて再懸濁した。顆粒を破壊後、超遠心にて膜を取り除き、その上清を顆粒内容物とした。各上清の蛍光量を測定すると顆粒内容物から有意に蛍光が検出された。

(4) 刺激依存的な蛍光分泌の検討：分泌顆粒に蛍光色素が取り込まれたのであれば、イソプロテレノール刺激によりアミラーゼと共に開口放出される。そこで細胞懸濁液をカラムに充填し、灌流液を分画するペリフュージョンシステムにより刺激依存的な反応を検討した (図 5)。

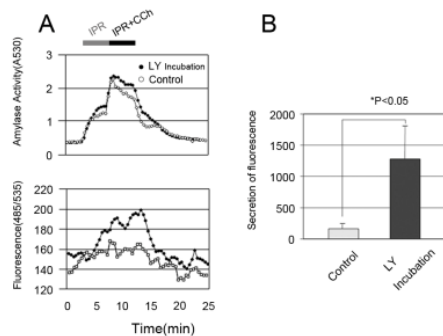


図 5

(A) 上のグラフに各分画のアミラーゼ活性を、蛍光量を下に示した。また、●は蛍光色素で 3 時間のインキュベーション後の細胞を、○はイソプロテレノール投与 5 時間後の細胞をコントロールとした。グラフ上部には刺激薬 (イソプロテレノール単独とカルバコールとの混合液) を灌流した時間を示した。刺激依存的なアミラーゼの分泌は典型的な応答をしており、細胞の活性が維持されていることも示している。同画分の蛍光量を測定すると、灌流液への希釈倍率が高いため、ベースラインのブレが大きいですが、3 時間のインキュベーションした細胞のみ刺激依存的なピークが検出された。(B) 刺激している間の画分を回収し、総蛍光量を比較すると両者に有意な差が検出された。これらの結果も分泌顆粒内に色素が取り込まれたことを示唆している。

(5) 電子顕微鏡観察による細胞内局在の検討：本実験に使用した蛍光色素ルシファーイエローは DAB 処理により不溶性の物質を産生する特徴を持ち、この特徴は電子顕微鏡観

察を可能にした。通常、耳下腺細胞を電子顕微鏡で観察する際、酢酸ウランと鉛による二重染色を行い、コントラストを上げる。すると図 1 に示したように染色後の分泌顆粒は濃染する。このため、二重染色を行った後ではルシファーイエローの局在を検討することはできない。そのため、二重染色なしにルシファーイエローの局在を検討した (図 6)。

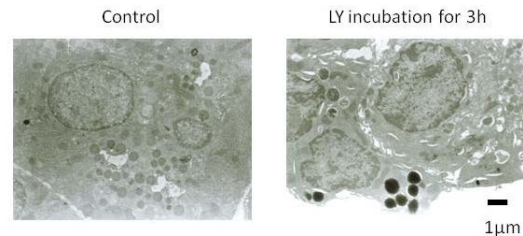


図 6

コントロールにイソプロテレノール投与 5 時間後の耳下腺腺房細胞の電子顕微鏡観察の結果を示した。二重染色を行っていないため、コントラストは非常に低いが、画像処理によりコントラストを強調させた。微絨毛をもつ管腔の近傍に新規に生成された小さい分泌顆粒が観察された。一方、ルシファーイエローで 3 時間のインキュベーション後は膜近傍にルシファーイエローの局在を示す濃染した構造物が観察された。濃染しているのは 1 μm 以下の丸い構造物で、耳下腺腺房細胞のオルガネラにおけるその特徴は分泌顆粒であることを示している。また、その他に濃染している構造物が観察されないことから、取り込まれた蛍光色素が分泌顆粒に濃縮していることが、電子顕微鏡観察により明らかとなった。

(6) 分泌顆粒の成熟過程の検討：これまでの結果により開口放出後の耳下腺細胞を蛍光色素で 3 時間インキュベートすると、蛍光色素が分泌顆粒内に濃縮することが明らかとなった。図 3 に示した電子顕微鏡観察や、図 2 に示された共焦点レーザー顕微鏡観察のように刺激後、新規に形成された分泌顆粒の直径は図 1 に示された成熟顆粒と比較して小さく、点状にしか観察されない。培養により顆粒が 1 μm の大きさに成熟すれば、共焦点レーザー顕微鏡においても球状に観察されるはずである。そこで、これまでに我々が確立したラット耳下腺腺房細胞の初代培養系を応用した。2 日間 (36 時間) の培養後のアミラーゼとルシファーイエローの局在を示した (図 7)。

新しい順に記載し、それぞれ通し番号を記載。

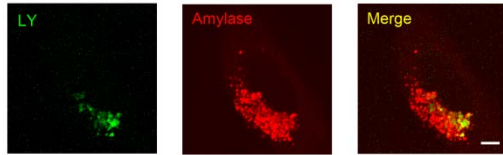


図 7

耳下腺腺房細胞内に抗アミラーゼ抗体に染まる分泌顆粒が充満し、共焦点レーザー顕微鏡下においても球形のそれと観察される。さらに、それらの一部はルシファーイエローの蛍光と一致していた。

(7) 結論：本研究はラット耳下腺腺房細胞の開口放出後のエンドサイトーシス経路を利用し、分泌顆粒を可視化することに成功した。使用した蛍光色素であるルシファーイエローは膜結合性がないことから非特異的なエンドサイトーシス経路であることが示され、色素が分泌顆粒へ濃縮したことから、顆粒が大きくなるという成熟過程の一端を垣間見られたことは、近い将来、成熟過程の解明を期待させる結果であった。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

① Osamu Katsumata-Kato, Junko Fujita-Yoshigaki, Takanori Narita, and Hiroshi Sugiya

Secretion of color dye from rat parotid secretory granules

IADR(88th)

2010,7,18 (Barcelona, Spain)

② Osamu Katsumata-Kato, Miwako Matsuki-Fukushima, Takanori Narita, Hiroshi Sugiya and Junko Fujita-Yoshigaki

Uptake of fluorescence dye into secretory granule of rat parotid acinar cells

Gordon Research Conference

2011,2,8 (Galveston,TX)

③ 吉垣純子, 福島美和子, 横山愛, 加藤治
耳下腺腺房細胞における分泌顆粒への輸送機構

第 53 回 歯科基礎医学会学術大会・総会

2011,9,30 (長良川国際会議場, 岐阜)

④ 加藤治, 福島美和子, 成田貴則, 杉谷博士, 吉垣純子

耳下腺腺房細胞の分泌顆粒形成におけるエンドサイトーシスの関与

第 56 回 日本唾液腺学会学術大会

2012,12,4 (文京学院大学, 東京)

⑤ 吉垣純子, 福島美和子, 横山愛, 加藤治
唾液腺におけるタンパク質の分泌顆粒への輸送機構

第 57 回 日本唾液腺学会学術大会

2012,12,1 (文京学院大学, 東京)

⑥ 加藤治, 横山愛, 福島美和子, 吉垣純子
ラット耳下腺腺房細胞への蛍光色素取り込み実験により明らかとなった分泌顆粒形成におけるエンドサイトーシス経路の寄与

第 90 回 日本生理学会大会

2013,3,28 (タワーホール船堀, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 治 (勝俣 治)

(KATO OSAMU (KATSUMATA OSAMU))

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：70349968