

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11973

研究課題名(和文) 顆粒膜の脂質MS解析からせまる, 分泌タンパク質の濃縮メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of secretory granule maturation by lipid analysis

研究代表者

加藤 治(勝俣治) (KATSUMATA-KATO, Osamu)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：70349968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：唾液を分泌する耳下腺腺房細胞にはアミラーゼを含む分泌顆粒が存在する。分泌顆粒はゴルジ体で生成され、顆粒同士の融合、膜リモデリングなどを経て成熟する。膜リモデリングによりVAMP2が顆粒膜に濃縮することから膜リモデリングは分泌顆粒の分泌能獲得のための準備であると考えられるが、その詳細は不明である。今回リソソームの分解酵素であるカテプシンBを指標とし、成熟過程において顆粒内タンパク質に輸送シグナルが不要であることを示した。さらに膜リモデリングの前の新規生成顆粒がすでに分泌能を有していることを明らかにすることで、膜リモデリングの意義について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓細胞の破壊を原因とする1型糖尿病の治療には遺伝子治療が望まれる。代償臓器の候補に挙げられる唾液腺の適応までには顆粒濃縮機構の解明、刺激依存的な内分泌経路の解明、そして唾液腺特異的な遺伝子発現法の開発という3つの大きな課題が残されている。本研究では『唾液腺の分泌顆粒にインスリンを濃縮させる。』という課題の1つである成熟機構の解明を目指した。顆粒成熟モデルの解明は神経や内分泌細胞といった他の分泌研究分野へ与える影響も強く、近い将来必ず行われるだろう遺伝子治療に向けた重要な基礎研究の1つに位置づけられると考えている。

研究成果の概要(英文)：Acinar cells of the parotid gland have amylase in their secretory granules (SGs). SGs generate at the Golgi apparatus and then they mature. Maturation processes of SG have fusion of granules and membrane remodeling. SGs in the parotid glands cause membrane remodeling within 3 hours after generation, and VAMP2, which is involved in exocytosis, is enriched in the granule membrane. It is considered that the membrane remodeling prepares for the exocytosis of SGs, but detail of the process is unknown. Cathepsin B is degradative enzyme that locates in lysosome. Mannose-6-phosphate (M6P) is added to pro-cathepsin B at Golgi apparatus to transport into lysosome. Pro-cathepsin B is transported to lysosomes via SGs in the parotid glands. Then, we postulated that non-M6P tagged pro-cathepsin B remains in SGs. In this study, it is confirmed that the secreted pro-cathepsin B has no M6P tagged. Our finding indicates that newly-formed SGs have capacity of secretion before membrane remodeling.

研究分野：口腔生理学

キーワード：唾液腺 耳下腺 分泌顆粒 成熟過程 カテプシンB

1. 研究開始当初の背景

糖尿病治療の第一選択としてインスリンの皮下注射が挙げられる。極細の注射針の開発により患者さんへの侵襲性は軽減されたものの、毎食前の注射といった煩わしさや、緊急時の対応など、今後の対策はまだ必要である。特に1型糖尿病は膵臓細胞の破壊を起こす原因不明の自己免疫疾患であり、小児期から発症することから遺伝子治療の早期適応が期待されている疾患である。遺伝子治療を行うにあたり、ネックとなるのが膵臓の解剖学的な位置である。さらに膵臓の破壊が激しい場合には、膵臓に代わりインスリンを分泌させる臓器が必要となる。その代償臓器の第一候補となるのが同じ分泌腺の唾液腺である。唾液腺は口腔内から導管を介して臓器へのアプローチが可能であり、血液側への内分泌も行われるという代償臓器としての利点を兼ね備えている。さらに唾液腺にインスリンを発現させることができれば、唾液分泌と同じように食事時にインスリンを血中に分泌させるという理想的な分泌コントロールが可能となり、1型糖尿病の代償臓器としては理想的な臓器と考えられる。耳下腺分泌顆粒の成熟過程の解明できれば、耳下腺へのインスリン濃縮顆粒の発現が可能になり、遺伝子治療の開発へ向けた一歩を踏み出すことができる。

2. 研究の目的

「唾液腺の分泌顆粒にインスリンを濃縮させる。」という課題の1つを研究目標に設定し、顆粒膜脂質である膜ドメインの解析から濃縮機構へのアプローチはこれまでとは違う側面からの検討であり、遺伝子治療の開発につながる新しい知見が得られる期待が高いと考えられた。しかしながら、COVID-19の影響を受け、共同研究によるMS解析による膜脂質分析を行ったが、明確な結果が得られなかった。そこでリソソームに局在する分解酵素であるカテプシンBを指標にし、成熟過程の検討を行った。カテプシンBの前駆体であるプロカテプシンBにはゴルジ体でリソソーム輸送シグナルであるマンノース6リン酸(M6P)が付加される。また耳下腺ではカテプシンBが分泌顆粒を経由してゴルジ体からリソソームへと輸送されることが明らかとなっている。そこで我々は非糖負荷型のプロカテプシンBは分泌顆粒に局在しているのではと予想し、耳下腺分泌顆粒にプロカテプシンBの局在と、刺激依存的な分泌を検討した。プロカテプシンBとアミラーゼという2種類の内在性のタンパク質を新規生成顆粒から検出し、それらを指標に新規生成顆粒から刺激依存的な非糖負荷型プロカテプシンBの分泌を明らかにした。今回の結果により膜のリモデリングの前の新規生成顆粒がすでに分泌能を有していることが示された。今後、他の多くの分泌細胞の複雑な機構を解明するために、耳下腺細胞の非常にシンプルな分泌機構の解明が近道になると期待される。

3. 研究の方法

SDラットに刺激薬であるイソプロテレノール(IPR)を腹腔内注射(5mg/kg)した。0, 2, 5時間後に三種混合麻酔下で耳下腺を摘出した。耳下腺の一部を形態観察用にKarnovsky's固定液に浸漬し、一部はLysateの調整に、残りはコラゲナーゼとヒアルロニダーゼで処理し、腺房細胞を調製した。腺房細胞を1 μ M IPRで10分間刺激し、フィルターでろ過し、上清を回収した。プロカテプシンBの検出のためにアミコンウルトラ[®]にて濃縮した。アミラーゼ抗体、およびカテプシン抗体を用いて、プロットニングにて検出した。バンドの濃度を計測し、有意差はT検定にて評価した。固定した耳下腺はEPON81にて重合し、1 μ mの切片はトルイジンブルー染色で光学顕微鏡観察に、0.1 μ mの超薄切片は電子染色後、透過型電子顕微鏡観察(JEM-1010)に使用した。分泌顆粒の精製はパーコール遠心法にて行った。

4. 研究成果

(1) 刺激によるプロカテプシンBの分泌

カテプシンBはリソソームに局在する分解酵素である。前駆体のプロカテプシンBはゴルジ体でリソソーム輸送シグナルであるマンノース6リン酸が付加されると、分泌顆粒を経由しリソソームへ輸送される。そこで糖鎖が付加されないプロカテプシンBは分泌顆粒に残留するのではないかと推測し、プロカテプシンBを分泌顆粒に局在するタンパク質の指標にして輸送シグナルと顆粒成熟との関係について検討した。耳下腺腺房細胞を調製し1 μ M IPRで刺激すると刺激依存的に上清中にアミラーゼが検出された(Fig.1A)。コントロールで5.9%であったアミラーゼ分泌量が、IPR刺激後では18.4%と優位に増加した。Fig.1BにIPR刺激による耳下腺の組織像を示した。酸性多糖類を染めるトルイジンブルー染色を行うと青く濃染した球状の構造物がコントロールの腺房細胞内に観察された。電子顕微鏡観察によりそれらが分泌顆粒であることが確認でき、矢頭で示した管腔近くから核周囲にまで分泌顆粒が細胞内に充満していた。1 μ M IPR 10min間処理後には管腔の拡大、および分泌顆粒の管腔側への集積が観察され、これらの所見は分泌顆粒の開口放出の反応を示唆している。

プロカテプシンBの検出のためにアミコン[®]ウルトラにて上清を濃縮した。抗カテプシン抗体により検出された3つのバンドのうち最も高分子量側のバンドがプロカテプシンBを示している(Fig.1C)。プロカテプシンBもコントロールで9.9%、刺激後に20.5%と有意な増加を認めた。

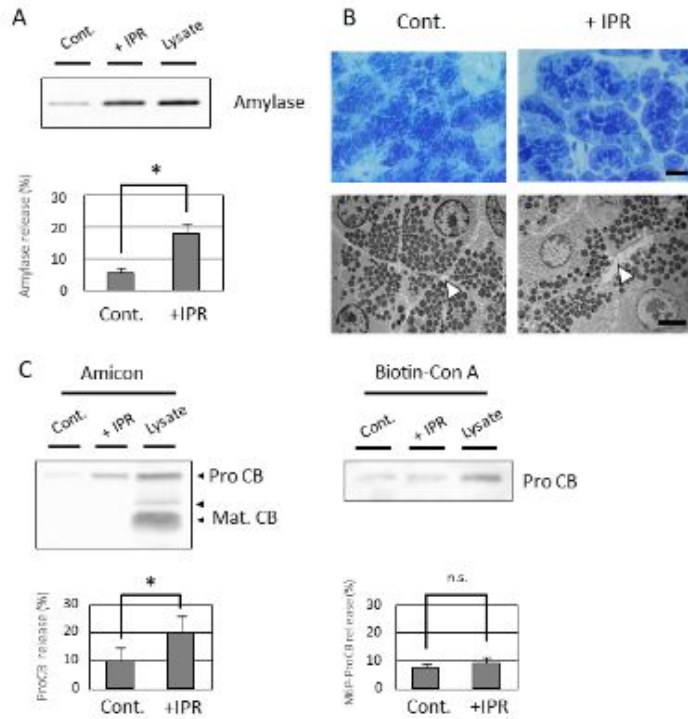


Fig.1 耳下腺腺房細胞からのプロカテプシンBの分泌

さらに、プロカテプシン B が M6P の糖鎖修飾を受けているかどうかを確認するために、上清から糖化タンパク質をビオチン-コンカナバリン A とストレプトアビジン-ビーズで回収し、抗カテプシン B 抗体で検出した。IPR 刺激後には弱いバンドを検出したが、刺激前後で有意な差はなかった。これらの結果は分泌したプロカテプシン B にはリソソーム輸送シグナルである M6P が付加されていないことを示唆している。

(2) 精製顆粒からのプロカテプシン B の検出

プロカテプシン B が分泌顆粒から分泌したかを確認するため、分泌顆粒を精製し、内容物からプロカテプシン B の検出を行った。安静状態 (0h) のラット耳下腺から精製した分泌顆粒の電子顕微鏡像を Fig. 2A 左に示す。弱拡大像 (上段) では均一な顆粒が広範囲に観察され、強拡大像 (下段) においてはコンタミがほとんど認められないことが確認できる。精製した分泌顆粒を低張バッファーで破壊すると顆粒内容物からアミラーゼとプロカテプシン B が検出されたが、成熟型のカテプシン B は検出されなかった (Fig. 2B)。

続いてラットに IPR を 5mg/kg で腹腔内注射し、新規分泌顆粒の誘導を行った。IPR 注射 5 時間後のラットから耳下腺を摘出し、パーコール遠心法にて分泌顆粒を精製すると、直径の小さい新規生成顆粒が観察された。WB によるアミラーゼ、およびプロカテプシン B の検出は成熟分泌顆粒とほぼ同じであり、アミラーゼに対するプロカテプシン B の比率を測定しても両顆粒間に有意差はなかった (Fig. 2C)。これらの結果はプロカテプシン B が新規生成顆粒から成熟過程中に残留していることを示唆している。

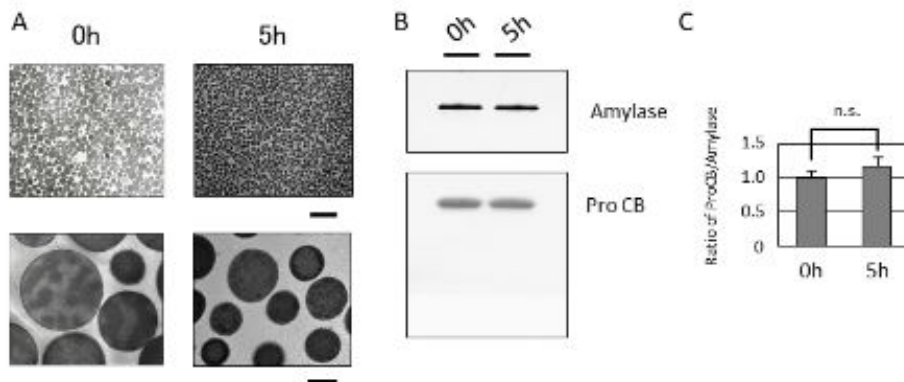


Fig.2 耳下腺分泌顆粒内からのプロカテプシンBの検出

(3) 新規生成顆粒の分泌応答

新規生成顆粒からプロカテプシン B が検出されたことにより、新規生成顆粒からの分泌と細胞の破壊による漏出とを区別することができる。ラット腹腔に IPR を注射し、5 時間後のラットから耳下腺を摘出した。腺房細胞を調製し、1 μM IPR の刺激を行った。上清中のアミラーゼとプロカテプシン B を検出した結果を示した (Fig. 3A, C)。アミラーゼだけでなく、プロカテプシン B も刺激に依存して優位に増加した。Fig. 3B には形態観察の結果を示す。光学顕微鏡像ではトルイジンブルーに染まる分泌顆粒は腺房の中心部に集積している様子が観察された (矢印)。電子顕微鏡観察では直系の小さい分泌顆粒が管腔 (矢頭) の近傍に集積している様子がはっきりと観察できた。さらに 1 μM IPR 刺激後ではトルイジンブルー染色による光学顕微鏡像でも、電子顕微鏡像からも分泌顆粒が腺房細胞から消失している様子が観察された。

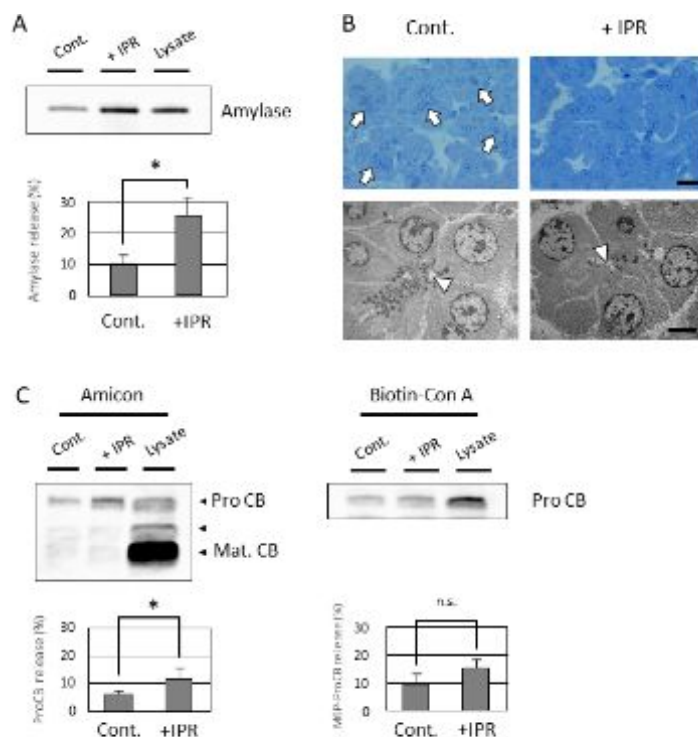


Fig.3 新規生成顆粒からのプロカテプシンBの分泌

(4) 分泌顆粒の新規生成の再チェック

新規生成顆粒を誘導した耳下腺腺房細胞において、刺激依存的に上清中からプロカテプシン B が検出された。このことは刺激による細胞からの漏出の影響は少なく、新規生成顆粒が分泌能を有していることを示唆している。しかしながら新規生成顆粒を誘導する IPR 腹腔内注射により完全に分泌顆粒が開口放出したかははっきりと断言できない。それは注射後に残存していた分泌顆粒が分泌刺激により開口放出した可能性が残っているからである。それを確認するためにラット腹腔へ IPR 注射を行い、2 時間後に耳下腺を摘出し、分泌刺激により残存している分泌顆粒の開口放出がどれくらい影響するか確認した。まず、注射 0, 2, 5 時間後の光学顕微鏡による耳下腺組織像を示した (Fig. 4A)。安静時 (0h) の腺房細胞内にはトルイジンブルーに濃染する分泌顆粒が充満していたが、注射 5 時間後では矢印で示すように腺房の中心部に分泌顆粒が集積していた。注射 2 時間後では分泌顆粒はほとんど観察されず、腺房細胞には核が観察されるだけであった。注射 2 時間後の耳下腺の透過型電子顕微鏡像 (TEM) を図右に示す。矢頭で示した管腔周囲にさえ顆粒は観察されず、腺房細胞内から分泌顆粒が枯渇していることがはっきりと観察できた。Fig. 4B に示したのは耳下腺腺房細胞あたりのアミラーゼ量を比較した結果である。腺房細胞の総タンパク質量は分泌顆粒の開口放出により大きな影響を受けるため、ここでは GAPDH を基準にしている。注射前を基準にすると、注射 5 時間後のアミラーゼ量には大きなバラツキを認めたが、注射 2 時間後の耳下腺腺房細胞にはごくわずかのアミラーゼしか検出できなかった。さらに 1 μM IPR で刺激しても、上清中からアミラーゼ (Fig. 4C) やプロカテプシン B (Fig. 4D) はほとんど検出されなかった。これらの結果は IPR の腹腔内注射 5 時間後に観察される分泌顆粒は新規生成された分泌顆粒であることを強く示している。

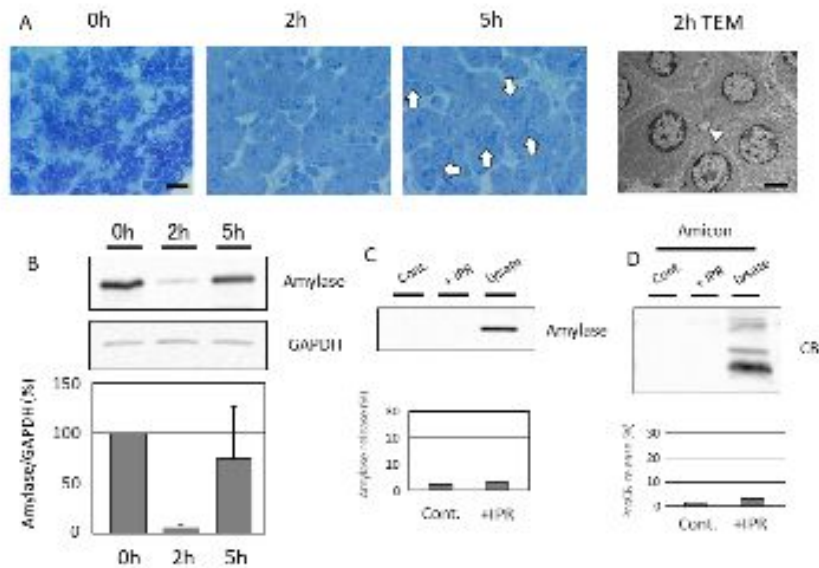


Fig.4 分泌顆粒の新規生成の経路

(5) 結論

耳下腺分泌顆粒の成熟機構を解明するために本研究では 2 つの事柄を明らかにする成果を得た。1 つ目は分泌顆粒に留まるための輸送シグナルは不要であることを内在性のタンパク質で明らかにしたこと。そしてもう 1 つは生成後の新規分泌顆粒は膜リモデリング前にすでに分泌能を有していることを明らかにしたことである。非常にシンプルな機能をもつ耳下腺腺房細胞を解明することは、今後、外分泌細胞、内分泌細胞そして神経細胞などの分泌過程基盤の解明につながると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Osamu Katsumata-Kato, Megumi Yokoyama, Junko Fujita-Yoshigaki
2. 発表標題 Secretion of amylase and procathepsin B from newly-formed secretory granules in rat parotid acinar cells
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osamu Katsumata-Kato, Megumi Yokoyama, Junko Fujita-Yoshigaki
2. 発表標題 Secretory proteins without transport signal are retained in the granules
3. 学会等名 97th general session & exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Katsumata-Kato, Megumi Yokoyama, Junko Fujita-Yoshigaki
2. 発表標題 Procathepsin B without mannose-6-phosphaste is released from secretory granules
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤治, 横山愛, 吉垣純子
2. 発表標題 ラット耳下腺未成熟顆粒におけるプロカテプシン B の輸送と分泌
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤治, 横山愛, 吉垣純子
2. 発表標題 ラット耳下腺分泌顆粒の成熟過程における膜のリモデリングと分泌能との関係
3. 学会等名 第62回日本唾液腺学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤治, 横山愛, 吉垣純子
2. 発表標題 ラット耳下腺の分泌顆粒 未成熟顆粒間の脂質解析
3. 学会等名 第17回 日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学松戸歯学部 公式HP http://www.mascad.nihon-u.ac.jp/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------