

平成21年 6月 8日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592154  
 研究課題名（和文） In vivo の唾液腺に発現させたシグナル分子の動態及び機能のリアルタイム解析  
 研究課題名（英文） Real-time analyses of localization and function of signaling molecules in salivary cells expressed in vivo  
 研究代表者  
 森田 貴雄（MORITA TAKAO）  
 北海道医療大学・歯学部・講師  
 研究者番号 20326549

## 研究成果の概要：

小胞体のカルシウムセンサーである Stim1 の欠損細胞に Stim1-mK01 を発現させ、その機能を解析し、容量性カルシウム流入とは異なる新しいカルシウム流入経路(B-SOC)を発見した。また、Stim1-mK01 並びに GFP-AQP5 を発現するアデノウイルスをラットの唾液腺開口部から逆行性に注入し、生きた動物の唾液腺にこれらの蛍光タンパク標識分子を発現させると共に、この動態をリアルタイムで解析することに成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯科薬理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：唾液腺、シグナル伝達、GFP、アデノウイルス、逆行性注入、Stim1、Ca<sup>2+</sup>流入

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 唾液腺腺房細胞からの水・電解質分泌は、主に細胞内カルシウムによって調節されている。耳下腺腺房細胞では、ムスカリン受容体の刺激により、イノシトール三リン酸受容体(IP<sub>3</sub>R)を介した細胞内ストアからのカルシウム放出がおこり、これが水・電解質分泌

の引き金となる。さらに細胞外からカルシウムが流入することにより、持続的な分泌が起こると考えられている。カルシウムはK<sup>+</sup>チャネルやCl<sup>-</sup>チャネル、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>トランスポーターなどを活性化することによって腺腔内へイオンを分泌し、これを駆動力として水の動きを調節すると考えられており、この水の

動きに水チャネルであるアクアポリン5(AQP-5)が関与することが示唆されている(Ma et al., J. Biol. Chem., 274, 20071-74, 1999)。

(2) これまで我々は、ラットから調整した唾液腺細胞を使ってイメージングによりカルシウム動態の解析を行ってきた。耳下腺腺房細胞をカルバコールで刺激すると、腺腔側から基底側へ広がるカルシウムウェーブが観察される(Tojyo et al., Cell Calcium, 22, 455-62, 1997; Nezu et al., Biochem. J., 363, 59-66, 2002)。また耳下腺導管には、カルバコールやエピネフリンなどそれぞれのアゴニストに特に高いカルシウム反応性を示す細胞が見られ、これらの細胞がそれぞれの生理的な刺激に対して中心的な役割を果たすと考えられる。

さらに、我々はIP<sub>3</sub>RやPKCなどカルシウムシグナルに関わる分子のGFP融合タンパク質を唾液腺由来細胞(HSY)に発現させ、その細胞内分布および動態をリアルタイムに解析し、これらのシグナル分子がダイナミックに動くことを明らかにしてきた(Morita et al., Cell Calcium, 31, 59-64, 2002; Tanimura et al., J. Biol. Chem., 277, 29054-29062, 2002)。これらのことから、培養細胞だけでなく、唾液腺細胞においてもシグナル分子がダイナミックな動きをすることが予想される。

(3) 最近、IP<sub>3</sub>Rの他に、Orail, TRPCといった細胞膜カルシウムチャネルが細胞内カルシウムの調節に関わっていることが報告されている。また、小胞体のカルシウムセンサーであるStim1や分泌に関与するSNARE分子もカルシウムシグナルの調節に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

さらに、これらの分子が唾液腺細胞においてもカルシウムシグナルや唾液分泌に重要な役割を果たしていることが報告されている(Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 17542-47, 2007; Cheng et al., J. Biol. Chem., 283, 12935-40, 2008)。しかし、これらの分子の動態や相互関係についてはまだ明らかになっていない。

(4) 以前より、唾液腺細胞を単離し、これに外来遺伝子を発現させる試みは行われていたが、その発現効率が低いことが問題であった。さらに、唾液腺腺房細胞を培養した場合、12時間程度でその極性や分泌機能が失われてしまうため、外来遺伝子発現による機能解析ができなかった。一方、アデノウイルスを唾液腺開口部から逆行性に注入し、唾液腺細胞に外来タンパク質を発現させる方法が、Bruceらにより報告されている。しかし、この方法を使った分子動態のリアルタイム解析はまだ例がない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、HSY細胞におけるシグナル分子の動態解析をさらに発展させ、唾液腺腺房細胞からの唾液分泌に関与するシグナル分子の動態をリアルタイムに解析し、これらの動態と分泌の分子メカニズムとの関係を明らかにすることを目的とする。本研究ではカルシウムシグナルを調節する分子としてIP<sub>3</sub>RとStim1、そして唾液分泌に重要な役割を持つSNAREタンパク質群やAQP-5に焦点を絞り、これらのGFP融合タンパク質を用いて動態解析を行う。

(2) 本研究では、アデノウイルスベクターを用いてこれらのGFP融合タンパク質をin vivoで唾液腺腺房細胞に発現させ、その唾液

腺細胞を用いて分泌刺激によるこれら分子の動態変化をリアルタイムに解析する。これにより、極性や分泌機能を保持した唾液腺細胞を用いてシグナル分子の動態や機能を解析することができ、唾液分泌の分子メカニズムの解明に結びつくことが期待できる。

### 3. 研究の方法

(1) 蛍光タンパク質標識したシグナル分子の作製およびその局在・機能解析

① 蛍光タンパク質 (YFP および mK01) 標識 Stim1 発現プラスミドベクターの作製

mK01 およびヒト Stim1 タンパクをコードする cDNA を PCR により増幅し、これらをつなげて Stim1-mK01 融合タンパク質を発現するプラスミドベクターを作製した。ヒト Stim1 cDNA は Origene 社、ER-mK01 プラスミドは Amargaam 社から購入した。YFP-Stim1 プラスミドは Tobias Meyer 博士 (Stanford 大学) から供与された。

② YFP-Stim1, Stim1-mK01 の局在・機能解析

Stim1 欠損 (Stim1-KO) DT40 細胞は黒崎知博 博士 (理研) から供与された。Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて、YFP-Stim1 あるいは Stim1-mK01 プラスミドを Stim1-KO 細胞に導入し、これらの融合タンパク質を発現させた。

ARGUS-HiSCA カルシウムイメージング装置 (浜松ホトニクス) を用いて、YFP-Stim1 および Stim1-mK01 発現細胞のカルシウム反応を解析した。YFP-Stim1 の動態解析は、TIRF illumination system (ニコン) を用いて行った。

③ GFP-AQP5 プラスミドベクターの作製及び局在解析

ヒトアクアポリン 5 (AQP5) タンパクをコ

ードする cDNA と GFP cDNA をつなげ、GFP-AQP5 融合タンパクを発現するプラスミドを作製した。AQP5 cDNA は Origene 社から購入した。

Lipofectamine2000 を用いて GFP-AQP5 プラスミドを HSY-EA1 細胞に導入し、発現させた。局在解析は、多光子レーザー顕微鏡 (Radiance 2100MP, Zeiss) を用いて行った。

(2) 蛍光タンパク質標識シグナル分子を発現するアデノウイルスの作製

Stim1-mK01 および GFP-AQP5 プラスミドから融合タンパク質をコードする cDNA 部分を切り出し、アデノウイルスベクターに組み込んだ。アデノウイルスベクター作製には、Invitrogen 社の ViraPower アデノウイルス発現キットを用いた。アデノウイルスベクターを増殖専用細胞 (HEK293A) に導入し、培養上清を回収することによりアデノウイルス粒子を調製した。

(3) 蛍光タンパク質標識分子の in vivo における発現とその局在解析

① アデノウイルスベクターの in vivo における遺伝子導入

Wistar 系雄性ラット (12-15 週齢) をソムノペンチル (40-45 mg/kg) で麻酔し、実体顕微鏡下でラットの顎下腺開口部にチューブを挿入した。そのチューブにシリンジを装着し、調製したアデノウイルス粒子を含んだ上清 100  $\mu$ l を逆行性に注入した。

② 蛍光標識分子の局在解析

注入 4-14 日後にラットから顎下腺を摘出し、蛍光実体顕微鏡 (KEYENCE) を用いて顎下腺組織全体での蛍光を観察した。さらに、酵素処理により顎下腺腺房及び導管細胞を調製し、多光子レーザー顕微鏡 (Radiance 2100MP) を用いて蛍光標識タンパク質の発現

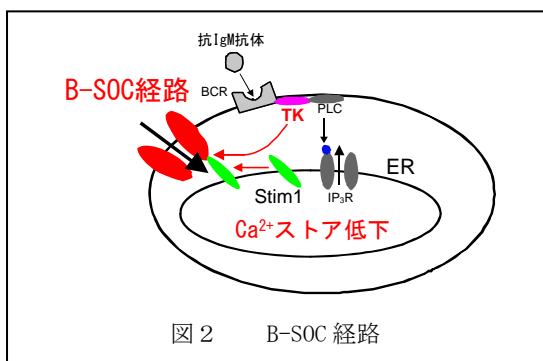
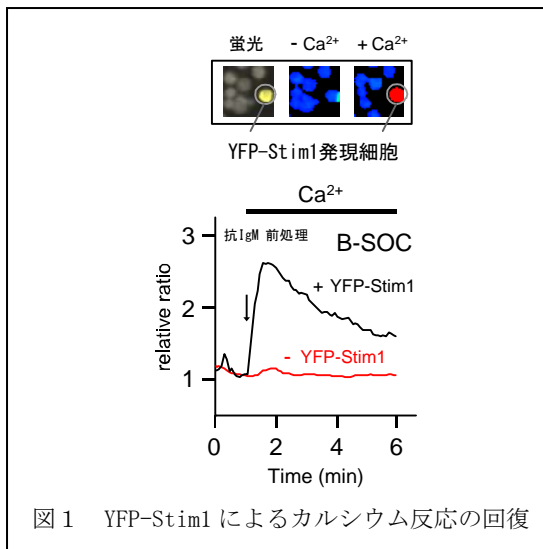
と細胞内局在のリアルタイム解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 蛍光タンパク質標識したシグナル分子の作製およびその局在・機能解析

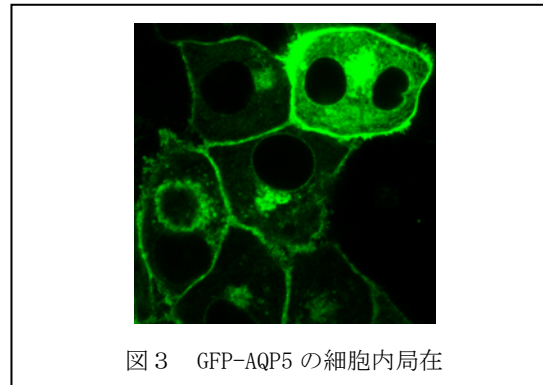
①YFP-Stim1およびStim1-mK01融合タンパク質の作製と機能解析

YFPおよびmK01 蛍光タンパク質で標識したYFP-Stim1、Stim1-mK01 発現プラスミドベクターを作製した。Stim1 欠損細胞にYFP-Stim1 およびStim1-mK01 を発現させると、カルシウム流入反応が回復したことから、これらの融合タンパク質が機能的であることが確認された(図1)。また、このStim1 依存性カルシウム流入の詳細な解析により、容量性カルシウム流入とは異なる新しいカルシウム流入経路 (BCR-mediated store-operated  $Ca^{2+}$  entry, B-SOC)を発見した(図2)。



②GFP-AQP5の細胞内局在解析

GFP-AQP5をHSY-EA1細胞に発現させ、細胞内局在を解析した。GFP-AQP5は主に細胞膜に発現していたが、ゴルジ体様部位にも蛍光が見られた(図3)。



(2) 蛍光タンパク質標識シグナル分子を発現するアデノウイルスの作製

Stim1-mK01、およびアクアポリン5(AQP5)にGFPを融合したGFP-AQP5融合タンパク質を発現するアデノウイルスベクターを作製し、このウイルス粒子を調整した。これらの力価は約 $1 \times 10^9$ 程度であった。

(3) 蛍光タンパク質標識分子のin vivoにおける発現とその局在解析

①Stim1-mK01のリアルタイム動態解析

ラット顎下腺開口部にチューブを挿入し、Stim1-mK01融合タンパク質を発現するウイルス粒子を逆行性に注入した。蛍光実体顕微鏡でウイルス注入5日後の顎下腺を観察すると、Stim1-mK01の蛍光は組織全体に散在していた(図4)。この発現は7日後には弱くなり、14日後ではほとんど見られなかった。Stim1-mK01の蛍光が隣接する舌下腺には見られなかったことから、この方法が顎下腺に特異的に遺伝子を導入できる方法であることが示された。次に酵素処理により調製した顎下腺細胞を多光子レーザー顕微鏡で観察したところ、Stim1-mK01は腺房および導管様

細胞に発現していることが確認された。さらにこの細胞内局在を解析したところ、Stim1-mK01 の発現は小胞体様構造に分布しており、報告されている Stim1 の発現分布と一致していた。また、この細胞をイオノマイシンで刺激すると、Stim1-mK01 の細胞膜付近への局在変化が観察された (図5)。

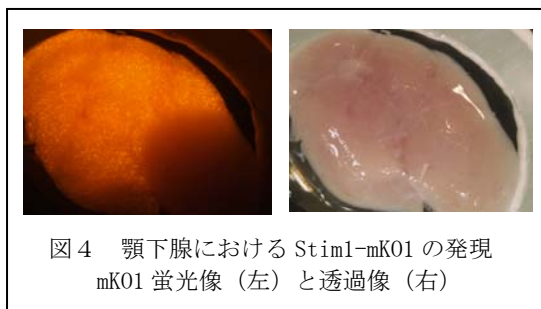


図4 顎下腺における Stim1-mK01 の発現 mK01 蛍光像 (左) と透過像 (右)

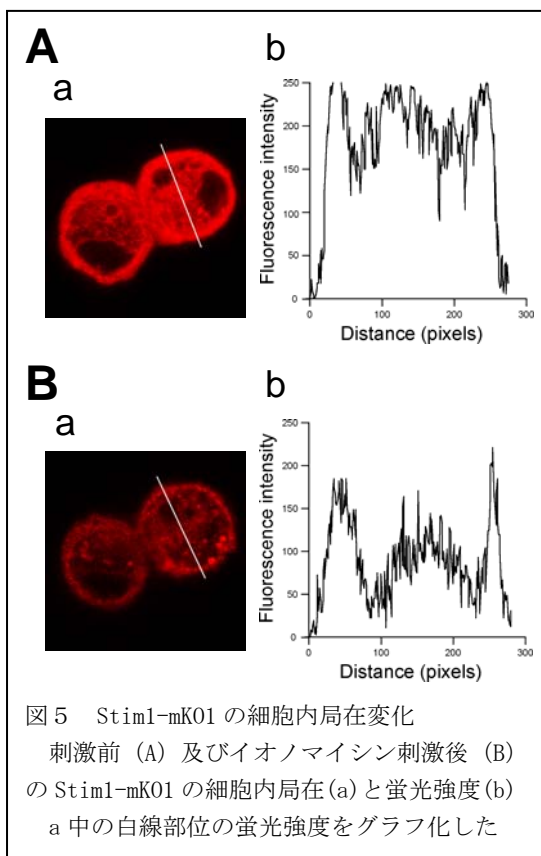


図5 Stim1-mK01 の細胞内局在変化  
刺激前 (A) 及びイオノマイシン刺激後 (B)  
の Stim1-mK01 の細胞内局在 (a) と蛍光強度 (b)  
a 中の白線部位の蛍光強度をグラフ化した

## ②GFP-AQP5 の発現と局在解析

Stim1-mK01 と同様の方法で、GFP-AQP5 発現アデノウイルスをラット顎下腺に注入した。蛍光実体顕微鏡でウイルス注入4日後の顎下腺を観察すると、GFP-AQP5 の蛍光は組織

全体に散在していた。この発現は7日後にはほとんど観察されなかった。次に酵素処理により調製した顎下腺細胞を多光子レーザー顕微鏡で観察したところ、GFP-AQP5 は腺房および導管様細胞に発現していることが確認された。さらにこの細胞内局在を解析したところ、GFP-AQP5 の蛍光は細胞質内のオルガネラ構造に比較的強く見られた (図6)。このオルガネラは分泌顆粒とは異なることが示唆されたが、その詳細については明らかではない。

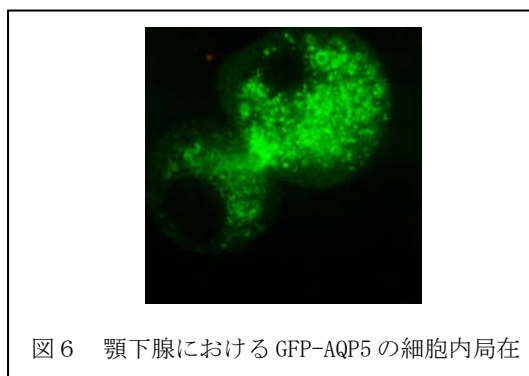


図6 顎下腺における GFP-AQP5 の細胞内局在

## 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 3 件)

Morita T., Tanimura A., Baba Y., Kurosaki T., Tojyo Y.

A Stim1-dependent, noncapacitative  $Ca^{2+}$ -entry pathway is activated by B-cell-receptor stimulation and depletion of  $Ca^{2+}$ .

Journal of Cell Science, 122, 1220-1228 (2009) 査読有り

Tojyo Y., Morita T., Nezu A., Tanimura A.

The clustering of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) receptors is triggered by  $IP_3$  binding and facilitated by depletion of the  $Ca^{2+}$  store.

Journal of Pharmacological Science 107, 138-150 (2008) 査読有り

Shitara, A., Tanimura A., Nezu A.,  
Morita T., Tojyo Y.  
Multi-photon microscopic imaging of rat  
parotid ducts demonstrates cellular  
heterogeneity in  $Ca^{2+}$  responsiveness.  
Archives of Oral Biology, 52, 1072-1078  
(2007) 査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

森田貴雄、谷村明彦、馬場義裕、黒崎知博、東城庸介  
BCR刺激とストア枯渇により活性化される  
Stim1依存性の新たな $Ca^{2+}$ 流入経路  
第82回日本薬理学会年会  
平成21年3月16日 横浜

森田貴雄、谷村明彦、馬場義裕、黒崎知博、東城庸介  
BCR刺激とストア枯渇の相互作用による  
新しいStim1依存性 $Ca^{2+}$ 流入経路  
第31回日本分子生物学会年会、第81  
回日本生化学会大会 合同大会  
平成20年12月9日 神戸

設楽彰子、谷村明彦、佐藤敦子、根津顕弘、森田貴雄、東城庸介  
ラット耳下腺導管細胞における自発的 $Ca^{2+}$ 反  
応の発生機構とその役割  
第50回歯科基礎医学会学術大会  
平成20年9月23日 東京

森田貴雄、谷村明彦、馬場義裕、黒崎知博、東城庸介  
Stim1の新たな役割: DT40細胞におけるBCR  
依存性 $Ca^{2+}$ 流入への関与  
第81回日本薬理学会年会  
平成20年3月17日 横浜

森田貴雄、谷村明彦、馬場義裕、黒崎知博、東城庸介  
Stim1を介する新しい $Ca^{2+}$ 流入経路  
第58回日本薬理学会北部会  
平成19年9月29日 札幌

森田貴雄、谷村明彦、東城庸介  
容量性および非容量性 $Ca^{2+}$ 流入における  
Stim1分子の役割  
第49回歯科基礎医学会学術大会  
平成19年8月31日 札幌

設楽彰子、谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、東城庸介  
ラット耳下腺導管細胞における $Ca^{2+}$ 反応と管  
腔の拡大におけるその役割  
第49回歯科基礎医学会学術大会  
平成19年8月30日 札幌

設楽彰子、谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、東城庸介  
ラット耳下腺導管細胞における $Ca^{2+}$ 反応と管  
腔拡大  
第21回北海道薬物作用談話会  
平成19年7月28日 札幌

〔その他〕

北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学  
分野ホームページ  
<http://www.hoku-iryu-u.ac.jp/~d-yakuri/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 貴雄 (MORITA TAKAO)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号 20326549

### (2) 研究分担者

谷村 明彦 (TANIMURA AKIHIKO)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号 70217149