

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791363  
 研究課題名（和文） アミラーゼ結合タンパク質によるラット耳下腺分泌顆粒の形成促進作用  
 研究課題名（英文） The effect of amylase-binding protein on formation of secretory granules in rat parotid gland.  
 研究代表者  
 加藤（勝俣） 治（KATO (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「耳下腺にはアミラーゼを管腔側から取り込む一時的な分泌顆粒形成機構が存在する。」という仮説の元、その検証をすすめた。研究期間内には分泌顆粒にエンドサイトーシスにより色素を取り込ませることができるか。また、その蛍光色素が刺激により分泌されるかについて検討した。本研究の結果はこれまで困難であった分泌顆粒の可視化を期待させるものであり、オルガネラの形成機構という視点から見ても新しい知見が得られたと考えている。

研究成果の概要（英文）：I hypothesized that rat parotid cell can take amylase from lumen to make secretory granule. I examined that whether parotid gland take color dye into granules by endocytosis, and that whether the dye can be detected in living cells. In this study, I succeeded in detection of fluorescence in immature granules. This result expects visualization of secretory granules. Next, I will examine granule maturation and exocytosis using that method.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

(1) ラット耳下腺腺房細胞は消化酵素であるアミラーゼを含んだ分泌顆粒が充満している。交感神経β受容体刺激薬であるイソプロテレノール（IPR）で細胞を刺激

すると、いっせいに分泌顆粒は開口放出を起こす。このとき管腔側の膜容量は分泌顆粒膜の癒合により急激に上昇し管腔は著しく膨大するが、数時間後には管腔側膜は刺激前の状態に戻っている（図1参照）。この数時間のうちに分泌顆粒の開口放出

により膨れ上がった管腔側膜はといったいどのように処理されるのか？これがラット耳下腺の電子顕微鏡観察を通して抱いた申請者の素朴な疑問である。

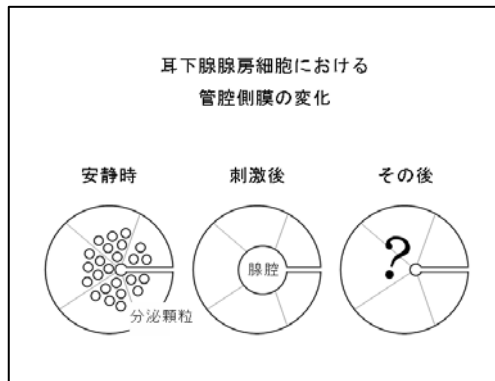


図 1

(2) これまで、申請者は耳下腺の分泌顆粒の形成・成熟過程の解明を目指して研究を進めてきた。刺激後の耳下腺を電子顕微鏡観察しているうちに気がついた現象がある。それはセントラルドグマでは新しいタンパク質は核から小胞体、ゴルジ体を經由して合成されるのにも関わらず、新しく形成される分泌顆粒は核周囲やゴルジ体近傍よりも、管腔側膜近くに多く観察されるという事実である (図2参照)。

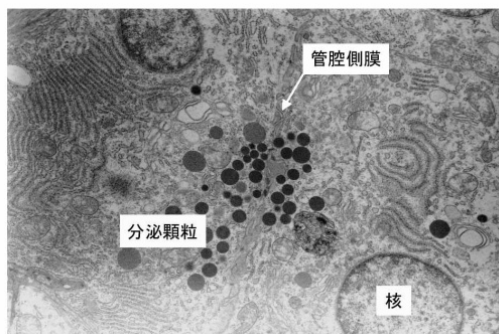


図 2 IPR 刺激 5 時間後のラット耳下腺

(3) 一方、我々はラット耳下腺の初代培養系の細胞において、分泌顆粒は単層に存在する細胞よりも細胞塊の中心部にいる細胞に維持されているという知見をすでに得ている [Cell Tissue Res, 329, 59-70 (2007)]。さらに、IPR 刺激 5 時間後のラット耳下腺から分泌顆粒を精製し、膜ドメイン画分を Triton-X 100 不溶性の低密度画分に分離すると、そこには抗アミラーゼ抗体により検出されるバンドが認められた。アミラーゼは分泌酵素であることから、このバンドはアミラーゼ結合タンパク質が分泌顆粒膜に存在していることを示唆している [BBRC, 357, 1071-1077 (2007)]。これらの知見より、開口放出されたアミラーゼのう

ち過剰に開口放出され細胞間隙に留まっているアミラーゼが、開口放出により管腔側に露出したアミラーゼ結合タンパク質により再び腺房細胞内に取り込まれ分泌顆粒を再形成するという仮説を導き出すに至った。

## 2. 研究の目的

唾液腺細胞は光学顕微鏡レベルで確認できるほど大きな分泌顆粒をもつにもかかわらず、培養細胞系が樹立されていないため、遺伝子操作を用いる研究には不向きである。培養細胞系がない理由として、分泌顆粒を維持した細胞が確立できない。つまり、分泌顆粒の形成・成熟機構がほとんどわかっていないというのが、一つの大きな要因であることが考えられる。では、分泌顆粒の形成・成熟機構を検討するためには何が必要であるのか？その一つとして分泌顆粒の可視化に生細胞で成功すれば、研究が非常に容易に遂行できると推測できる。そこで本研究では分泌顆粒の形成にエンドサイトーシスが関与しているのではないかという仮説の元、分泌顆粒の可視化を目標に検証を進めた。

## 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) 分泌顆粒の精製：摘出した耳下腺を緩衝液 (300 mM sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 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。分泌顆粒膜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) にて回収した。

(3) 耳下腺遊離腺房細胞の調製：耳下腺を鈹にてミンした後、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 ヒアルロニダーゼを含むクレブス-リングル溶液に懸濁し、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。

(4) リンの定量：脂質はクロロホルム・メタノール溶液 (2:1, 1:1, 1:2) にて、抽出した。リンの定量は過マンガン酸塩灰化法により行った。脂質抽出試料に硫酸および過マンガン酸塩を加え、沸騰液中で加熱し、構成成分であるリン酸を生じさせた。その後、モリブデン酸アンモニウムおよび還元剤を加え、その際生じるモリブデンブルーによる呈色状態を吸光度 (A830) によって計測した。

(5) ペリフ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。

(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mium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。

#### 4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡による分泌顆粒の形成過程の観察：IPR 腹腔内投与後の耳下腺腺房細胞の分泌顆粒の形成量を推測するため、刺激前と刺激後 2, 5, 8, 10, 12 時間後に灌流固定を行い、電子顕微鏡観察を行った (図 3A~F)。刺激前、耳下腺腺房細胞には直径約 1  $\mu\text{m}$  の分泌顆粒が充満していた。刺激 2 時間後、球状のミトコンドリアが観察されたが、分泌顆粒はほとんどの分泌顆粒は開口放出によって消失していた。刺激 5 時間後より、分泌顆粒様の球形の構造物が観察され始め、12 時間後には再び細胞内に充満するほどの分泌顆粒が観察された。

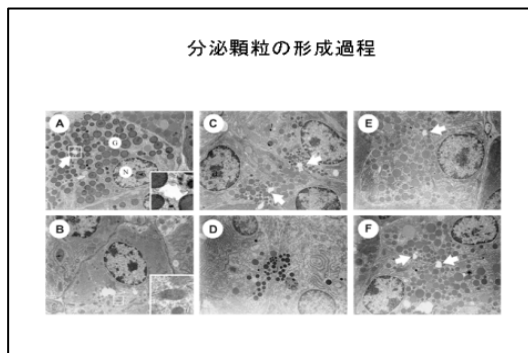


図 3

(2) 分泌顆粒の特徴：新たに形成された分泌顆粒を調査するため、刺激後 5, 8 時間の耳下腺から分泌顆粒を精製し、膜タンパク質、分泌顆粒の直径、顆粒濃縮度の検討を行った (図 4)。ウエスタンブロッティング法による膜タンパク質組成の検討では、刺激後新しくできる分泌顆粒膜上にはシンタキシン 6 と VAMP4 が濃縮していた。さらに分泌顆粒の直径を精製した分泌顆粒の電子顕微鏡写真により測定すると、刺激前の分泌顆粒に比べ刺激後の成熟顆粒の直径は約半分であった。これらの特徴はこれまで報告されている未成熟顆粒の組成と一致していた。続いて、膜の主な成分であるリン脂質量を膜表面積と相当であると仮定し、顆粒の直径から体積を計算し、含まれるアミラーゼの量を分泌顆粒の濃縮度として検討した。ところがこの条件下では、未成熟顆粒と成熟顆粒に大きな差は認められなかった。

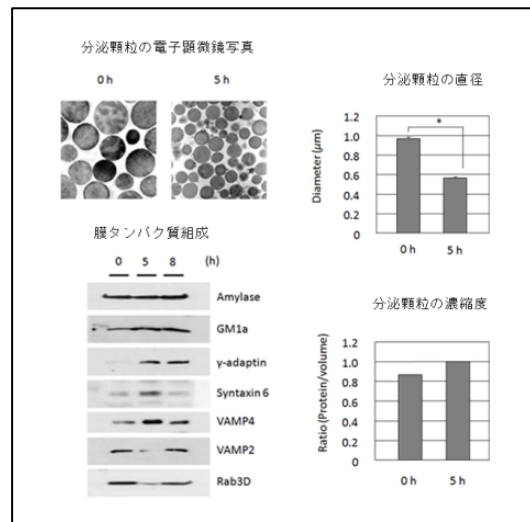


図 4

(3) 顆粒形成におけるエンドサイトーシスの関与：未成熟顆粒が核やゴルジ体周囲ではなく、管腔側膜付近に観察されることから、未成熟顆粒が管腔側膜を利用して形成されるのではないかと仮説を建て、エンドサイトーシスの関与を検討した (図 5)。刺激 2 時間後の耳下腺を摘出し、色素 (0.2 mM ルシファーイエロー) を含んだ溶液中にてさらに 5 時間培養した。培養後、遊離腺房細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると、色素は分泌顆粒様構造物と重複して検出されたが、未成熟顆粒の直径が小さいため二重染色を施すまでには至らなかった。そこで、培養後の耳下腺から分泌顆粒を精製し、内容物から色素の検出を試みた。その結果、未成熟顆粒の内容物から蛍光色素が検出された。

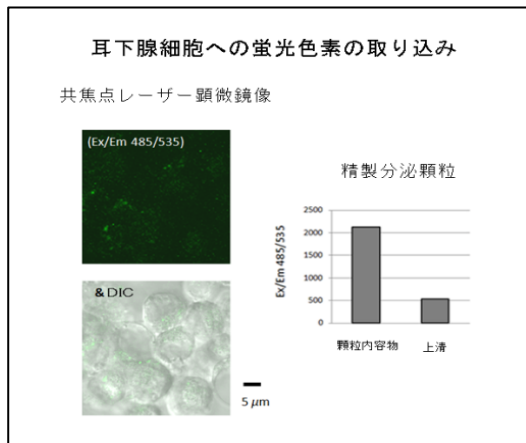


図 5

(4) 耳下腺腺房細胞からの蛍光色素の分泌：分泌顆粒内にきちんと蛍光色素が取り込まれているかを確認するため、刺激により蛍光色素がアミラーゼとともに分泌するかどうかを検討した。分泌の検討にはペリフュージョンシステムを用いた。このシステムは遊離腺房細胞をカラム内で灌流させることで、単位時間当たりのアミラーゼの分泌量を測定でき、時間分解能が非常に良好なシステムである。このシステムを用いて蛍光色素を取り込ませた耳下腺遊離腺房細胞に分泌刺激を行い、分泌されるアミラーゼの活性と蛍光量を測定した(図6)。刺激依存的なアミラーゼ活性の上昇が測定され、同フラクションからは蛍光色素も検出された。

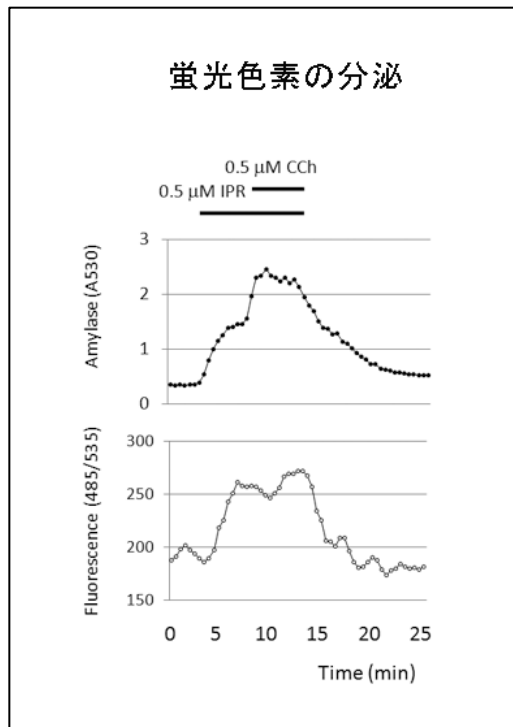


図 6

(5) 結論：本研究の結果は分泌刺激後の未成熟顆粒の形成にエンドサイトーシスが関与していることを示唆しており、さらにエンドサイトーシスによる分泌顆粒内への色素の取り込みは分泌顆粒の可視化を期待させるものである。ところが、未成熟顆粒を持つ刺激後の耳下腺細胞の総アミラーゼ活性は刺激前の約 10 分の 1 であるのにも関わらず、ペリフュージョンシステムにより検出されたアミラーゼ活性の総和には著しい違いが認められなかった。このことは IPR 注射後に耳下腺内に分泌されずに残っている成熟顆粒の影響も考えられ、今後の課題である。そこで現在、本当に未成熟顆粒が開口放出を起こしたのかについて詳細な検討を進めている。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 加藤治, 吉垣純子, 成田貴則, 杉谷博士  
ラット耳下腺におけるエンドサイトーシスを介した未成熟顆粒の形成  
第 51 回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2009, 9, 9-11, (新潟)
- ② Osamu Katsumata-Kato, Junko Fujita-Yoshigaki, Keitaro Satoh, Takanori Narita and Hiroshi Sugiya  
Separation of immature granules containing color dye from the rat parotid gland  
The 11th International Symposium on Exocrine Secretion  
2009, 7, 23-25, (徳島)
- ③ Osamu Katsumata-Kato, Junko Fujita-Yoshigaki, Keitaro Satoh, Takanori Narita and Hiroshi Sugiya  
Immature granule formation by endocytosis in the rat parotid gland  
Gordon Research Conference  
2009, 2, 8-13, (Galveston, TX)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 (勝俣) 治 (KATSUMATA-KATO OSAMU)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号：7 0 3 4 9 9 6 8