

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：32665
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659875
 研究課題名（和文） 蛍光リガンド結合タンパク質の発現による分泌顆粒の形成・成熟・開口放出過程の可視化
 研究課題名（英文） Visualization of the process from generation to exocytosis of secretory granules by expression of fluorescent dye-binding proteins
 研究代表者
 吉垣 純子（YOSHIGAKI JUNKO）
 日本大学・松戸歯学部・教授
 研究者番号：40256904

研究成果の概要（和文）：分泌顆粒の形成から開口放出までの過程を可視化することを目指して、蛍光リガンド結合タンパク質である HaloTag を耳下腺腺房細胞に発現させる系を立ち上げた。分泌タンパク質であるアミラーゼのシグナルペプチド配列のみを結合した HaloTag は分泌顆粒へ輸送された。蛍光リガンドでラベルした後刺激すると、顆粒状蛍光の消失がリアルタイムに観察され、刺激依存的な開口放出のライブイメージングに成功した。

研究成果の概要（英文）：To visualize the process from generation to exocytosis of secretory granules, we established an expression system of the fluorescent dye-binding protein HaloTag in salivary gland cells. We found that a HaloTag protein having only a signal peptide sequence was sorted into secretory granules of salivary glands. We succeeded in live imaging experiments of stimulus-dependent exocytosis by labeling secretory granules with fluorescent HaloTag ligands.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：口腔生理学，ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

分泌顆粒は、ゴルジ体で分泌タンパク質が積み込まれることによって形成されるが、形成された顆粒がそのまま分泌されるのではなく、内容物の濃縮という成熟過程を経た後、開口放出されると考えられている。申請者らは、これまで唾液腺分泌顆粒の形成機構について解析を行い、顆粒の成熟に伴って顆粒膜タンパク質の分布が著しく変化することやその選別に膜ドメインが関与することを明らかにしてきた。しかし、ゴルジ体における分泌タンパク質の顆粒への輸送機構や顆粒の成熟機構について多くの疑問が残されており、生細胞におけるリアルタイムイメージングが疑問解決に有効であると考えた。特に、

唾液腺においては、分泌顆粒を維持する培養細胞が存在しない、唾液腺細胞への遺伝子導入効率が著しく低い等の問題点から、解析は遅れてきた。

しかし、申請者は、分泌顆粒を少なくとも3日は維持する初代培養系を確立しており、外来遺伝子を一過的に発現させるには十分の長さが確保された。また、申請者はアデノウイルスによる遺伝子導入法を習得しており、すでに、GFP 遺伝子を持つウイルスを作成し、唾液腺初代培養細胞に他の方法と比較して効率よく（～30%）GFP 発現がみられることを確認している。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入により解析に十分な導入効率を確保できると考えた。

分泌顆粒へ輸送されるタンパク質は多種多様であり、特別なシグナルが存在するかどうか不明であった。本研究において、分泌顆粒輸送に必要な十分なシグナル配列の同定が可能になると考えた。さらに、同様の手法を他の分泌タンパク質へ応用することによって、分泌顆粒へ貯留される特異的なシグナルを同定することが期待される。

2. 研究の目的

分泌顆粒には多くの種類があるが、ほとんどの細胞の分泌顆粒は小さいため、可視光での観察は限界に近く、形態的に他のオルガネラとの区別が付きにくい。本研究では、他の顆粒と比較して、非常に大きな顆粒（直径 1 μm ）を持つ唾液腺細胞に HaloTag 融合タンパク質を発現させ、顆粒の可視化を目的とした。低分子の蛍光リガンドを結合するタンパク質である HaloTag を顆粒内に発現させることにより、生きた細胞の顆粒を蛍光リガンドで標識することが可能になる。GFP などの蛍光タンパク質では単色の染色しかできないが、HaloTag を融合した分泌タンパク質を発現させることによって、様々な種類のリガンドを用いることができる。波長の異なる蛍光色素で染め分けることや、pH 依存性色素リガンドにより顆粒内の pH 変化を追うことにより、分泌顆粒の成熟過程を詳細に追えると考えた。さらに、 Ca^{2+} インジケーターなど、様々な蛍光色素のリガンドの開発が可能であり、成熟や開口放出に伴う顆粒内の環境変化をリアルタイムに観察できるようになると期待される。

これまで唾液腺の分泌顆粒の形成から分泌に至る過程についてリアルタイムに解析する手段は非常に少なかった。本研究によって開発される手法を用いれば、分泌顆粒への選別シグナルや顆粒の成熟機構が明らかになると期待できる。唾液腺は口腔内という比較的アクセスしやすい部位に開口部を持つ。このことを利用して、特定のホルモンやサイトカインが不足する疾患（糖尿病におけるインスリンなど）の治療のために、唾液腺に外来遺伝子を導入し、口腔内や血管に有用タンパク質を分泌させようという試みがある。そのためには、有用タンパク質の輸送経路や分泌制御機構が明らかになることが必要である。したがって本研究は、唾液腺を利用した遺伝子治療法の開発にも重要な情報を与えることが予想される。

3. 研究の方法

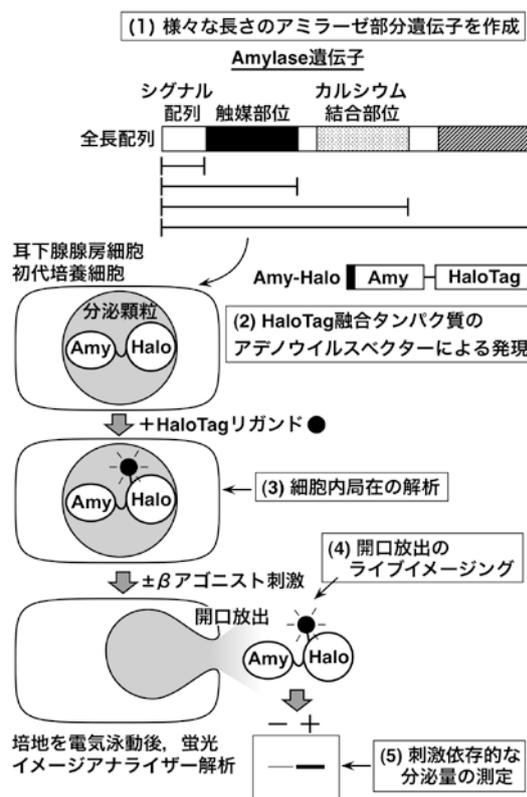


図1 実験の流れ

(1) HaloTag 融合アミラーゼ遺伝子の作成

分泌顆粒へ輸送されることがわかっているタンパク質は複数あるが、最も動態が解析されているアミラーゼを第一候補とした。アミラーゼ遺伝子のどの部位が分泌顆粒への輸送シグナルを含んでいるかは明らかでなかったため、耳下腺から抽出した RNA を鋳型にして、異なる長さのアミラーゼ遺伝子部分配列を得た。

(2) HaloTag 融合アミラーゼ遺伝子のアデノウイルスベクターによる唾液腺細胞における発現

アミラーゼ部分遺伝子と HaloTag の融合遺伝子を作成し、アデノウイルスベクターに組み込んだ。唾液腺細胞の初代培養を行い、HaloTag 融合アミラーゼ遺伝子を持つウイルスを感染させた。

(3) 唾液腺細胞における HaloTag 融合アミラーゼの細胞内局在の観察

感染 2 日後、HaloTag 蛍光リガンドでラベルし、分泌顆粒マーカーであるアミラーゼ、エンドゾームマーカーである EEA1、リソゾームマーカーである LAMP1、ミトコンドリア

アマーカである complexII に対する抗体で蛍光染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 LSM-510 を用いた観察により、HaloTag タンパク質の局在を細胞内小器官マーカーと比較した。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡と灌流システムによる分泌顆粒の開口放出の解析

分泌顆粒に輸送されたタンパク質は、 β アドレナリン受容体刺激であるイソプロテレノール添加により開口放出される。これを確認するために、ライブイメージングによる開口放出の観察を行った。HaloTag タンパク質が分泌顆粒へ輸送されれば、開口放出は蛍光ラベルされた顆粒の消失でカウントできる。画像解析ソフト Imaris を用いて観察できる全顆粒数に対する消失数をカウントし、開口放出の刺激依存性を定量化した。

(5) ゲルイメージングによる刺激依存的開口放出の定量化

TMR ラベルした細胞をイソプロテレノール刺激下および非刺激下でインキュベートした後、分泌された培地と残った細胞を回収した。それぞれを電気泳動後、イメージアナライザー Typhoon Trio で TMR の蛍光を検出して定量化し、刺激依存性の開口放出の効率をアミラーゼと比較した。

(6) BlueNative PAGE による複合体解析

分泌顆粒内における HaloTag タンパク質の状態を知るために、HaloTag 発現細胞を回収し、BlueNative PAGE を行った。SDS 存在下および非存在下で電気泳動し、抗アミラーゼ抗体および抗 HaloTag 抗体によるイムノブロットを行った。

4. 研究成果

(1) HaloTag タンパク質と蛍光リガンドを利用した分泌顆粒の可視化

蛍光リガンド結合タンパク質である HaloTag を耳下腺腺房細胞の初代培養細胞に発現させる系を立ち上げた。耳下腺の分泌タンパク質であるアミラーゼ遺伝子の部分配列と HaloTag との融合遺伝子を作成し、アデノウイルスベクターに組み込んで、腺房細胞に導入した。その結果、HaloTag は細胞に効率よく発現し、HaloTag リガンドである TMR 蛍光試薬によりラベルされ、生細胞での観察が可能になった。作成した融合遺伝子のうち、アミラーゼ由来の遺伝子を何も付加していない HaloTag が細胞質に観察されたのに対して、アミラーゼのシグナルペプチド配列のみ

を結合した HaloTag (ssHalo) が、アミラーゼと細胞内局在が一致していた (図 2A)。ミトコンドリアやエンドソーム、リソソームなど、他の細胞内小器官のマーカーとは局在が重ならず、分泌顆粒に特異的に局在していることが確認された。また、 β アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノール (Iso) 非存在下と存在下における分泌量を比較したところ、イソプロテレノール依存的に分泌量が増加したことから、ssHalo が分泌顆粒へ輸送されたことが確認できた (図 2B)。

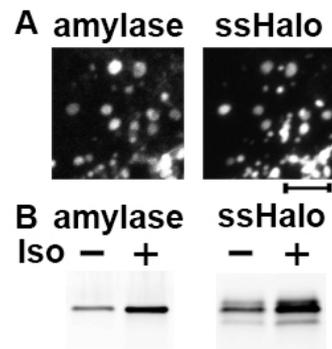


図 2 シグナルペプチド配列を付加した HaloTag タンパク質 (ssHalo) の唾液腺における輸送。A、唾液腺細胞におけるアミラーゼと ssHalo の局在。B、アミラーゼと ssHalo の β アドレナリン受容体アゴニスト刺激による分泌量の比較。イソプロテレノール (Iso) 存在下及び非存在下で 15 分インキュベートした後、培地を回収した。培地中に含まれるアミラーゼと ssHalo の量を抗アミラーゼ抗体によるイムノブロットと、TMR の蛍光で検出、定量化した。2つのタンパク質は、局在・分泌効率ともよく一致している。

共焦点レーザー顕微鏡に設置した培地灌流装置を利用して、TMR 蛍光ラベルした後、生きた細胞をタイムラプスで観察を行った。すると、顆粒状蛍光の消失がリアルタイムに観察された。イソプロテレノールを含んだ培地に交換すると、蛍光の消失数が増加した。時間ごとの蛍光の消失をカウントし、グラフ化したところ、生化学的な解析で得られたアミラーゼ分泌速度の時間変化とよく一致しており、刺激依存的な開口放出のライブイメージングに成功したと考えられる (図 3)。

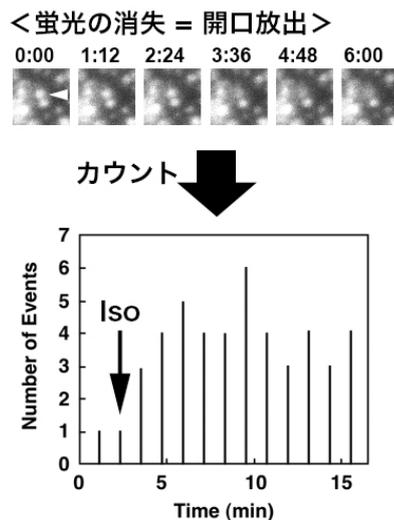


図3 ssHalo を用いた開口放出のライブイメージング。TMR 蛍光リガンドでラベルすると顆粒状の蛍光がみられるが、矢頭で示した蛍光の粒子が消失するのが観察される。時間ごとの蛍光の消失をグラフにまとめた。観察開始してから2分後にイソプロテレノール (Iso) を含む培地に交換した。

(2) 分泌顆粒へのタンパク質の輸送メカニズム

どのようなメカニズムにより、ssHalo が分泌顆粒へ輸送されるかを解析するために、アミラーゼと ssHalo の相互作用について解析した。1つの分泌顆粒中に含まれるアミラーゼと ssHalo の量を蛍光強度で比較したところ、2つの量の間に関連はみられず、それぞれのタンパク質は独立に分泌顆粒に積み込まれていることが明らかになった。したがって、ゴルジ装置に存在すると考えられるソーティングマシナリーは、アミラーゼと ssHalo を区別する機構を持たないことがわかった。

次に、分泌顆粒内のタンパク質の複合体形成を調べるために、BlueNative PAGE を行った。すると、アミラーゼは単量体では 50kDa なのに対して、非変性状態では約 200kDa のバンドが検出され、多量体を形成していることが予想された。一方、ssHalo は非変性状態でも分子量は小さく、単量体で存在していることが確認できた。

これまで、唾液腺において分泌タンパク質の輸送経路がどのように制御されているかは不明であった。何らかの輸送シグナルの存在や、分泌タンパク質の複合体形成が顆粒への輸送に必須であるという意見がある。しかし今回の結果から、分泌顆粒への輸送には特別なシグナルは必要なく、小胞体において膜を超えるためのシグナルペプチド配列があれば、分泌顆粒へ受動的に輸送されることが

予想された。また、分泌顆粒内で ssHalo が単量体であり、アミラーゼとも複合体を形成していないことから、分泌タンパク質の複合体形成も、分泌顆粒への輸送は必要ないと考えられる。本研究により、唾液腺における分泌タンパク質の顆粒への輸送には、特別な輸送シグナルも、複合体形成も必要でないことが示唆された。

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3件)

① Yokoyama M, Haruki M, Matsuki-Fukushima M, Fuse-Nagai M, Fukumoto M, Narita K, Okabayashi K, Sugiya H, Katsumata-Kato O, Fujita-Yoshigaki J. Effects of [6]-gingerol on dedifferentiation of salivary acinar cells. *International Journal of Oral-Medical Sciences*, 22: 315-319 (2013)
doi:10.5466/ijoms.11.315

② Matsuki-Fukushima M, Fujita-Yoshigaki J, Murakami M., Katsumata-Kato O, Yokoyama M, Sugiya H. Involvement of AQP6 in the Mercury-Sensitive Osmotic Lysis of Rat Parotid Secretory Granules. *Journal of Membrane Biology*, 査読有, 246: 209-214 (2012)
doi:10.1007/s00232-012-9522-7

③ Matsuki-Fukushima M, Fujita-Yoshigaki J, Katsumata-Kato O, Sugiya H. Role of AQP6 in rat secretory granules. *Journal of Oral Biosciences*, 査読有, 53: 312-317 (2011)
doi:10.2330/joralbiosci.53.312

[学会発表] (計4件)

① Katsumata-Kato O, Yokoyama M, Matsuki-Fukushima M, Fujita-Yoshigaki J: Involvement of the endocytosis pathway in secretory granule formation as revealed by fluorescent dye-uptake into rat parotid acinar cells. 第90回日本生理学会大会, 2013年3月28日, タワーホール船堀(東京都)

② Matsuki-Fukushima M, Katsumata-Kato O, Yokoyama M, Fujita-Yoshigaki J: Development of secretory granule-specific pH indicator in rat parotid acinar cells. 第90回日本生理学会大会, 2013年3月28日, タワーホール船堀(東京都)

③ 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 年 12 月 1 日, 文京学院大学 (東京都)

④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, 2011 年 10 月
1 日, 長良川国際会議場 (岐阜県)

[図書] (計 1 件)

木村光孝監修: クインテッセンス出版株式
会社「新装板 子供の歯に強くなる本」2012,
390 (p. 40-42, p. 48-49 分担)

[その他]

日本大学松戸歯学部公開講座「唾液でお口の
健康を守ろう」(平成 23 年 10 月 22 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉垣 純子 (YOSHIGAKI JUNKO)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号: 4 0 2 5 6 9 0 4