

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580433

研究課題名(和文)cAMP依存性外分泌におけるRhoファミリーの役割

研究課題名(英文)Role of Rho family in cAMP-dependent exocrine secretion

研究代表者

杉谷 博士(SUGIYA, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20050114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット耳下腺腺房細胞において、 β -アドレナリン受容体刺激は細胞内cAMP濃度を増加し、結果として糖質分解酵素アミラーゼが開口分泌される。このcAMP依存性のアミラーゼ分泌における低分子量GTP結合タンパク質の1つであるRhoの役割を検討したところ、 β -受容体刺激によりRhoAが活性化されGTP型となり、それがcAMPリン酸化酵素の活性化の下流に存在すること、RhoAの活性化後にRhoキナーゼが活性化され、F-アクチンの動態に関与することが認められ、ラット耳下腺腺房細胞において、RhoAがcAMP依存性のアミラーゼ開口分泌に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In rat parotid acinar cells, stimulation of β -adrenergic receptors provokes an increase in intracellular cAMP level, resulting in amylase release. We studied involvement of Rho family, a member of Ras superfamily proteins, in the amylase release. A protein band ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 (C3), an inhibitor of the function via ADP-ribosylation of Rho, was detected in the cells. The same protein band was cross-reacted with anti-RhoA antibody. RhoA was activated by the β -agonist isoproterenol (IPR). C3 blocked the cAMP-induced amylase release in permeabilized cells. The IPR-induced RhoA activation was inhibited by a PKA inhibitor. The Rho kinase inhibitor Y-27632 partially inhibited the IPR-induced and dibutyryl cAMP-induced amylase release. In the cells treated with Y-27632, IPR-induced distribution of cortical F-actin was disturbed. These results suggest that RhoA/ROCK signaling is involved in cAMP-dependent amylase release in rat parotid acinar cells.

研究分野：農学

キーワード：生理・細胞機能 耳下腺 開口分泌 cAMP Rho Rhoキナーゼ アクチン

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)サイクリックAMP(cAMP)依存性開口分泌:外分泌細胞においては、合成された分泌蛋白質は分泌顆粒内において濃縮・貯留され、分泌顆粒が腺腔側膜と融合し、刺激に伴って開口することにより腺腔へ放出される一連の開口分泌過程が存在する。神経系の細胞や内分泌腺細胞における開口分泌においては、細胞内シグナルとしてカルシウムイオン(Ca^{2+})動態が必須である。一方、外分泌腺における蛋白質の開口分泌に関しては、 Ca^{2+} 動態を伴わないメカニズムが存在する。cAMP依存性の開口分泌はその1つである。申請者は唾液腺の耳下腺細胞を外分泌細胞のモデルとして使用し、cAMP依存性開口分泌の分子機構を明らかにする検討を行ってきた。実際に、耳下腺細胞においては、 β アドレナリン受容体刺激が三量体GTP結合タンパク質を介し、アデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内cAMPレベルを増加する。これがcAMP依存性リン酸化酵素の活性化を介して、消化酵素のアミラーゼを開口分泌する(Tumer & Sugiya, Oral Dis, 2001)。

(2)唾液腺開口分泌に関わる蛋白質:近年、耳下腺腺房細胞における開口放出関連蛋白質としては低分子量GTP結合蛋白質の1つであるRab27の役割が報告され、さらにそのエフェクター蛋白質の関与も示唆されている(Imai et al., J Cell Sci, 2004; Archs Biochem Biophys, 2006; Fukuda et al., J Biol Chem, 2005)。しかし、一方で、 Ca^{2+} 依存性の開口分泌に他の低分子量GTP結合蛋白質の関与や細胞骨格系の関与が示唆されており、唾液腺における他の低分子量GTP結合蛋白質が開口分泌制御因子として細胞骨格系を制御する可能性は高い。

(3)申請者の研究成果との関連:今までに外分泌腺モデルである耳下腺細胞におけるこの開口分泌機序を中心に研究を進めており、開口分泌に関連する蛋白質として、分泌顆粒膜にVAMP2の存在を認め、cAMP依存性開口放出への関与を報告した(J Biol Chem, 1996)。さらに、その作用には少なくとも細胞質に存在する因子と分泌顆粒膜に存在する因子の相互作用が必要であることを報告し、細胞質因子は、cAMP依存性にリン酸化を引き起こす可能性を示唆した(J Biol Chem, 1999)。このことから、cAMP依存性リン酸化酵素の下流における制御因子の存在が示唆された。

また、唾液腺の開口放出には分泌顆粒の形成が大きな意味を持つが、申請者は、耳下腺分泌顆粒の成熟に関して検討し、VAMP2やシンタキシン6がその過程に関わる可能性を示唆した(Biochem Biophys Res Commun, 2006)。また、分泌顆粒の形成には糖脂質に富む膜ドメインであるラフトが分泌顆粒膜に存在し、形成に関与することを示唆した(Biochem Biophys Res Commun, 2007)。

さらに、申請者は、cAMP依存性の開口分泌にMARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate)のリン酸化を介すること、MARCKSのリン酸化にはプロテインキナーゼC (PKC) の1つPKC δ の活性化が必要なことを明らかにした(Am J Physiol Gastrointestinal Physiol, 2009; Jap Dental Sci Rev, 2009)。MARCKSのリン酸化は細胞骨格系のアクチンの動態制御に関与することが示唆されている(Hartwig et al., Nature, 1992; Wornslund et al., J Biol Chem, 2000)。さらに、外分泌細胞の Ca^{2+} 依存性開口分泌にRhoやRacといった低分子量GTP結合蛋白質も関与することが報告されている(Williams et al., Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009; Sabbatini et al., Am J Physiol Cell Physiol, 2010)ことから、cAMP依存性開口分泌におけるRhoファミリーとアクチン制御の役割を検討するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究においては、開口分泌に関わるとされる細胞骨格系の動態と、その調節因子としての低分子量GTP結合蛋白質 Rho の役割を検討し、耳下腺腺房細胞におけるcAMP依存性開口分泌機構の一端を明らかにすることを目的とした。

(1)ラット耳下腺腺房細胞におけるRhoの発現を明らかにするとともに、cAMP依存性のアゴニストによりRhoの活性化を明らかにする。

(2)ボツリヌス菌体外酵素C3はRhoをADPリボシル化するとともに機能を阻害することから、C3を用いてcAMP依存性のアミラーゼ分泌への効果を検討することによりRhoの外分泌機能への効果を明らかにする。

(3)耳下腺細胞におけるアミラーゼの開口分泌には細胞骨格系が関与することが示唆されていることから、Rhoの細胞骨格系の機能を検討し、cAMP

依存性開口分泌との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)細胞調整：従来より申請者が用いている方法 (Am J Physiol Gastrointestinal Physiol, 2009)であるラット耳下腺をトリプシンおよびコラゲナーゼ処理することにより遊離腺房細胞を調整し実験に用いた。可透過性細胞の使用にあっては、streptolysin O を用いて腺房細胞を処理して可透過性にした。

(2)開口分泌測定：分泌刺激薬であるβアゴニストで細胞を刺激し、メジウム中に分泌されたアミラーゼの活性を測定し (Methods Enzymol, 1955)、それを指標にした。

(3)ADP リボシル化： $[^{32}\text{P}]\text{NAD}$ を基質として、耳下腺腺房細胞の lysate におけるボツリヌス菌体外酵素 C3 による ADP リボシル化を検討した。

(4)Rho の発現：Rho タンパク質の発現の検討には、抗 RhoA 抗体を用い、ウエスタンブロット法にて検出した。

(5)Rho の活性化の検討：Rho の活性型である GTP 型 Rho) の検出は、GTP 型 Rho 結合タンパク質である rhotekin を用いて pull-down を行い、抗 Rho 抗体を用いたウエスタンブロットにより行った。

(6)アクチンの動態：phalloidin を用いて F-アクチンの動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1)RhoA の発現：ボツリヌス菌体外酵素 C3 は ADP リボシルトランスフェラーゼであり、Rho の 41 番目のアスパラギンを ADP リボシル化し、不活性化することが知られている。 $[^{32}\text{P}]\text{NAD}$ を基質として、耳下腺腺房細胞の lysate における菌体外酵素 C3 による ADP リボシル化を検討したところ、SDS-PAGE により約 23 kDa に ADP リボシル化のバンドが認められた。ADP リボシル化が認められたゲルからニトロセルロース膜に転写を行い、ウエスタンブロット法にて Rho タンパク質の検出を行ったところ、ADP リボシル化されたタンパク質に抗 RhoA 抗体が反応したことから、耳下腺腺房細胞に RhoA の存在が認められた。

房細胞に RhoA の存在が認められた。

(2)RhoA の活性化：β受容体刺激薬 isoproterenol (IPR) で細胞を刺激するとアミラーゼの開口放出が引き起こされるので、次にこの IPR 刺激による RhoA の活性化を検討した。GTP 型 Rho 結合タンパク質である rhotekin を用いた pull-down assay により GTP 型 RhoA の検討を行ったところ、IPR 刺激後に時間依存性の GTP-RhoA が検出され、分泌刺激に対応して RhoA が活性化されることが示された。

(3)C3 菌体外酵素による cAMP 依存性アミラーゼ放出の阻害：IPR によるアミラーゼ放出は cAMP 依存性の開口放出であることから、cAMP によるアミラーゼ放出に対する C3 菌体外酵素の効果を検討した。腺房細胞を streptolysin O により可透過性にした後、cAMP で刺激をするとアミラーゼ放出が認められたが、C3 菌体外酵素により処理をした細胞においては cAMP 依存性の放出は抑制された。

(4)A キナーゼ阻害剤による RhoA 活性化の阻害：cAMP の下流には cAMP 依存性リン酸化酵素 (A キナーゼ) の活性化が存在する。そこで次に IPR 刺激による RhoA の活性化に対する A キナーゼ阻害剤である H89 の効果を検討したところ、H89 の存在下において RhoA の活性化は抑制された。このことから、RhoA の活性化に A キナーゼの活性化が必要であることが示唆された。

(5)Rho キナーゼによる cAMP 依存性アミラーゼ放出の阻害：RhoA の標的として Rho キナーゼの活性化が考えられていることから、アミラーゼ放出における Rho キナーゼの関与を検討した。Rho キナーゼ阻害剤である Y27632 の効果を検討したところ、Y27632 存在下において IPR によるアミラーゼ放出は部分的に抑制された。また、cAMP の細胞膜可透過性誘導体である dibutyl cAMP によってもアミラーゼ分泌が引き起こされるが、この分泌も Y27632 存在下では部分的に抑制された。

(6)アクチン動態における Rho キナーゼ阻害剤の効果：Rho ファミリーは細胞骨格系の機能制御に関わることが報告されていることから、耳下腺腺房

細胞の開口放出における細胞骨格系への関与を考えた。アクチン阻害剤である cytochalasin D や latrunculin A は isoproterenol 刺激によるアミラーゼ放出を阻害することから, Y27632 のアクチンの動態に関しての効果を検討した。phalloidin による F-アクチンの動態を観察したところ, IPR 刺激では分泌顆粒の周囲に集束する動きが認められた。しかし, Y27632 の存在下では, F-アクチンの動態は, コントロールに比べて希薄な状態であった。このことから, アクチン動態への関与が示唆された。

以上のことから, ラット耳下腺腺房細胞においては, 細胞内 cAMP 濃度増加に続く A キナーゼの活性化を介して RhoA-Rho キナーゼ系が活性化され, 調節性アミラーゼ開口放出に関与することが明らかとなった。また, RhoA-Rho キナーゼ系はアクチン動態に関与して開口放出に関わることが示唆された。しかし, Rho キナーゼ阻害剤の効果が部分的であったことから, RhoA には異なったエフェクターも存在し, 開口放出に関わると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

Katsumata-Kato O, Yokoyama M, Matsuki-Fukushima M, Narita T, Sugiyama H, Fujita-Yoshigaki J. Secretory proteins without a transport signal are retained in secretory granules during maturation in rat parotid acinar cells. Arch Oral Biol. 2015 60(4): 642-649, 2015.
doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.01.006. 査読有

Nakano R, Edamura K, Nakayama T, Teshima K, Asano K, Narita T, Okabayashi K, Sugiyama H. Differentiation of canine bone marrow stromal cells into voltage- and glutamate-responsive neuron-like cells by basic fibroblast growth factor. J Vet Med Sci. 77(1): 27-35, 2015.
doi: 10.1292/jvms.14-0284. 査読有

Keitaro Satoh, Hidenobu Senpuku, Hiroshi Sugiyama. Involvement of E2f1 deficiency in salivary gland hypofunction: A review of studies of E2f1-deficient NOD/SCID mice. J Oral Biosci. 56: 77-80, 2014.
doi.org/10.1016/j.job.2014.04.003 査読有

Keitaro Satoh, Takanori Narita, Miwako Matsuki-Fukushima, Ken Okabayashi, Fumie Yamazaki, Toshiaki Arai, Tatsuro Ito, Hidenobu Senpuku, Hiroshi Sugiyama. A novel animal model for

dry mouth: E2f1-deficient NOD/SCID mice. J Oral Biosci. 56: 18-22, 2014.
doi:10.1016/j.job.2013.0.004 査読有

Yamaya Y, Sugiyama H, Watari T. Tobacco exposure increased airway limitation in dogs with chronic cough. Vet Rec. 174(1):18. 2014.
doi: 10.1136/vr.101810. 査読有

Nakano R, Edamura K, Sugiyama H, Narita T, Okabayashi K, Moritomo T, Teshima K, Asano K, Nakayama T. Evaluation of mRNA expression levels and electrophysiological function of neuron-like cells derived from canine bone marrow stromal cells. Am J Vet Res. 74(10):1311-1320, 2013.
doi: 10.2460/ajvr.74.10.1311. 査読有

Saitoh M, Shirakihara T, Fukasawa A, Horiguchi K, Sakamoto K, Sugiyama H, Beppu H, Fujita Y, Morita I, Miyazono K, Miyazawa K. Basolateral BMP signaling in polarized epithelial cells. PLoS One. 8(5): e62659, 2013.
doi: 10.1371/journal.pone.0062659. 査読有

Matsuki-Fukushima M, Fujita-Yoshigaki J, Murakami M, Katsumata-Kato O, Yokoyama M, Sugiyama H. Involvement of AQP6 in the mercury-sensitive osmotic lysis of rat parotid secretory granules. J Membr Biol. 246(3): 209-214, 2013.
doi: 10.1007/s00232-012-9522-7. 査読有

Nara T, Yasui T, Gomi H, Sugiyama H, Fujimori O, Meyer W, Tsukise A. Cytochemistry of sialoglycoconjugates and lysozyme in canine anal glands as studied by electron microscopic methods. Acta Histochem. 115(3): 226-233, 2013.
doi: 10.1016/j.acthis.2012.06.011. 査読有

Satoh K, Narita T, Matsuki-Fukushima M, Okabayashi K, Ito T, Senpuku H, Sugiyama H. E2F1-deficient NOD/SCID mice have dry mouth due to a change of acinar/duct structure and the down-regulation of AQP5 in the salivary gland. Pflüger Arch. 265 (2): 271-281, 2013.
doi: 10.1007/s00424-012-1183-y. 査読有

Fukui K, Yasui T, Gomi H, Sugiyama H, Fujimori O, Meyer W, Tsukise A. Cytochemistry of sialoglycoconjugates, lysozyme, and β -defensin in eccrine glands of porcine snout skin as studied by electron microscopy. Microsc Res Tech. 76(1): 12-19, 2013.
doi: 10.1002/jemt.22129. 査読有

Fukui K, Yasui T, Gomi H, Sugiya H, Fujimori O, Meyer W, Tsukise A. Histochemical distribution of sialic acids and antimicrobial substances in porcine carpal glands. *Arch Dermatol Res.* 304(8): 599-607, 2012.
doi: 10.1007/s00403-012-1226-4. 査読有

Matsuki-Fukushima M, Hashimoto S, Murakami M, Ogata Y, Fujita-Yoshigaki J, Narita T, Sugiya H. The actin-specific reagent jasplakinolide induces apoptosis in primary rat parotid acinar cells. *Archs Oral Biol.* 57(5): 567-576, 2012.
doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.014. 査読有

Muromachi K, Kamio N, Narita T, Annen-Kamio M, Sugiya H, Matsushima K. MMP-3 provokes CTGF/CCN2 production independently of protease activity and dependently on dynamin-related endocytosis, which contributes to human dental pulp cell migration. *J Cell Biochem.* 113 (4): 1348-1458, 2012.
doi: 10.1002/jcb.24007. 査読有

[学会発表] (計18件)

佐藤慶太郎, 成田貴則, 加藤治, 杉谷博士. 耳下腺腺房細胞における脂質ラフと局在 MARCKS リン酸化のアミラーゼ分泌への関与. 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 21 ~ 23 日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

福田美津紀, 福島美和子, 岡林堅, 成田貴則, 杉谷博士. 唾液腺におけるブチルコリンエステラーゼ活性と局在. 第 59 回日本唾液腺学会学術集会, 2014 年 12 月 6 日, 文京学院大学本郷キャンパス(東京)

成田貴則, 富田六郎太, 岡林堅, 杉谷博士. マウスアクアポリン 6 の 5' 末端の解析. 第 59 回日本唾液腺学会学術集会, 2014 年 12 月 6 日, 文京学院大学本郷キャンパス(東京)

杉谷博士. 唾液分泌低下機序解明へのアプローチ. 第 3 回日本総合口腔医療学会学術大会, 2014 年 11 月 23 日, 神奈川県歯科医師会館(神奈川県横浜市)

佐藤慶太郎, 成田貴則, 杉谷博士. 耳下腺および腭外分泌腺アミラーゼ開口分泌における MARCKS シグナリングの関与. 第 56 回歯科基礎医学会学術集会, 2014 年 9 月 25 日福岡国際会議場(福岡県福岡市)

岡田純一, 牛尾昌史, 福田美津紀, 藤田麻衣, 岡林堅, 成田貴則, 杉谷博士. 唾液腺 AQP5 タンパク質の修飾に対するバナジウム酸の効果. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014 年 9 月 9 ~ 12 日, 北海道大学高等教育推進機構(北海道札幌市)

Narita T, Okabayashi K, Murakami M, Sugiya H. Post-stimulated effect of pilocarpine on salivary fluid secretion in isolated rat submandibular glands. SPS Annual Meeting, Aug 22-24, 2014, Stockholm (Sweden)

佐藤慶太郎, 成田貴則, 杉谷博士, 瀬尾芳輝. ラット腭外分泌腺腺房細胞アミラーゼ分泌における PKC δ による MARCKS リン酸化の関与. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16 ~ 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

佐藤慶太郎, 成田貴則, 岡林堅, 福島美和子, 荒井俊明, 伊藤龍朗, 泉福英信, 杉谷博士. 唾液分泌低下を呈する E2f1 欠損型 NOD/SCID マウスにおける AQP5 の発現レベル低下. 第 58 回日本唾液腺学会学術集会, 2013 年 12 月 14 日, 文京学院大学本郷キャンパス(東京)

Narita T, Konno T, Tsuchiya H, Sugiya H. Covalent modification of AQP5 protein in the rat submandibular gland. 2nd Meeting of IADR-APR, Aug 21-23, 2013, Bangkok (Thailand)

杉谷博士. 唾液腺の機能と分泌機能不全. 第 2 回日本総合口腔医療学会学術大会, 2013 年 7 月 7 日, 神奈川県歯科医師会館(神奈川県横浜市)

Nakano R, Edamura K, Teshima K, Asano K, Nakayama T, Narita T, Okabayashi K, Sugiya H. Basic Fibroblast growth factor-induces functional

neuronal differentiation of canine bone marrow stromal cells. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting. June 12~15, 2013, Boston (USA)

魏飛, 成田貴則, 杉谷博士, 村上政隆. ラット顎下腺細胞内カルシウムに対する丹参成分 salivanolic acid B の効果. 第 90 回日本生理学会大会, 2013 年 3 月 27~29 日, タワーホール船堀 (東京)

Narita T, Tsuchiya H, Konno T, Sugiya H. RhoA/Rho kinase signaling is involved in cAMP-regulated amylase release in rat parotid acinar cells. ASCB Annual Meeting 2012. Dec 15-19, 2012, San Francisco (USA)

成田 貴則, 祁兵, 村上 政隆, 杉谷 博士. 顎下腺水分分泌に対するピロカルピンの効果. 第 57 回日本唾液腺学会学術大会, 2012 年 12 月 1 日, 文京学院大学本郷キャンパス (東京)

杉谷博士. 唾液の役割と分泌機序. 第 25 回日本口腔診断学会・第 22 回日本口腔内科学会合同学術大会, 2012 年 9 月 14 日, 学術総合センター (東京)

成田 貴則, 市川 秀樹, 澁川 義幸, 佐原 資謹, 岡林 堅, 杉谷 博士. マウス耳下腺におけるアクアポリン 6 の機能. 第 154 回日本獣医学会学術集会, 2012 年 9 月 14~16 日, 岩手大学 (岩手県盛岡市)

佐藤 慶太郎, 成田 貴則, 岡林 堅, 福島 美和子, 伊藤 龍郎, 泉福 英信. E2f1 欠損型 NOD/SCID マウスにおける唾液分泌低下. 第 154 回日本獣医学会学術集会, 2012 年 9 月 14~16 日, 岩手大学 (岩手県盛岡市)

[図書] (計2件)

杉谷博士, 吉垣純子, 福島美和子. 学建書院, ビジュアル生理学・口腔生理学 第 3 版, 2014 年, 352 頁 (pp.286-296)

佐原資謹, 田崎雅和, 村上政隆, 杉谷博士. 南江堂, 生理学実習書, 2013 年, 296 頁 (pp.209-219)

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉谷 博士 (SUGIYA, Hiroshi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 20050114

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

成田 貴則 (NARITA, Takanori)
日本大学・生物資源科学部・専任講師
研究者番号: 70453884

岡林 堅 (OKABAYASHI, Ken)
日本大学・生物資源科学部・専任講師
研究者番号: 20409072