

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791986

研究課題名(和文)未成熟分泌顆粒の酸性pH維持に伴う陰イオン流入はアクアポリン6が行うか？

研究課題名(英文) Does aquaporin-6 influx anion in immature secretory granules during maintenance of acidic pH?

研究代表者

福島 美和子 (Miwako, Fukushima)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90548273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸感受性・陰イオン透過性チャネルaquaporin-6(AQP6)が未成熟分泌顆粒に局在し、陰イオンを流入することで内部酸性環境の維持を行うと考えた。未成熟分泌顆粒を識別するための唾液腺分泌顆粒特異的pHインジケータを合成し、生きた状態で分泌顆粒内のpHを解析することに成功した。予想に反して内部pHが酸性の顆粒は検出出来ず、未成熟分泌顆粒は識別できなかった。一方、耳下腺から精製した低密度(未成熟)および高密度(成熟)分泌顆粒の膜を解析した結果、未成熟分泌顆粒により多くのAQP6が存在することを認め、AQP6が唾液腺分泌顆粒の成熟過程に重要な役割を果たす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin-6(AQP6) is an acid-activated, anion permeated member of aquaporin water channel family. We hypothesized that AQP6 is activated in immature secretory granules of salivary gland acinar cells which is maintained with acidic condition while becoming mature state. To determine this hypothesis, we synthesized secretory granules-specific pH indicator and applied to primary salivary gland cells. Newly synthesized pH indicator clearly showed inside pH of salivary secretory granules, however, acidic granules were not shown with pH indicator. On the other hand, AQP6 was accumulated in immature granule membranes rather than mature granule membranes detected with Western blotting of isolated salivary granule membranes. These result suggest that AQP6 might important role of maturation in salivary gland cells.

研究分野：唾液腺の分泌機能

キーワード：唾液腺 分泌顆粒 分泌顆粒成熟 酸性オルガネラ 陰イオンチャネル アクアポリン

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、水透過性チャネルファミリーであるアクアポリン(AQP)が唾液腺のタンパク質分泌に果たす役割について研究する過程で、水チャネルメンバーでありながら酸感受性陰イオンチャネルの活性を持つ AQP6 がラット耳下腺の分泌顆粒膜上で陰イオンを透過することを発見した(Cell Tissue Res, 2008)。このチャネル特性から、AQP6 が分泌顆粒内部の酸性化に伴って活性化すると考えられた。分泌顆粒はゴルジ体から出芽によって細胞質側へと形成される。ゴルジ体から出芽したタンパク質密度の低い分泌顆粒は未成熟分泌顆粒と呼ばれ、腺腔側に集まるタンパク質密度の高い成熟分泌顆粒と区別される。分泌顆粒は未成熟の時期に、小胞輸送によりタンパク質の除去と添加が行われ、分泌タンパク質および顆粒膜タンパク質の選別が行われたのち、成熟分泌顆粒が完成する。外分泌腺の未成熟分泌顆粒の pH は 5.5 と酸性であるが、成熟すると中性に近い pH6.8 になる。唾液腺においては H⁺イオノフォアで顆粒膜に H⁺選択性の小孔をあけると、未成熟分泌顆粒の内部タンパク質が喪失し、さらにタンパク質分泌が基底側からの分泌、いわゆる「構成性分泌様経路」へと変化することが報告されている。この結果から、未成熟分泌顆粒を酸性に維持することは、タンパク質の保持と選別に重要だと考えられる。通常酸性オルガネラの pH 維持には、H⁺の流入と共に陰イオンの流入が必要であるが、未成熟分泌顆粒における陰イオン流入が何を介して行われているかは不明である。また、酸性オルガネラは H⁺を単独で透過するだけでは内部を酸性化出来ず、陰イオンの流入を伴うことで内部 pH の低下を達成できることが脳神経シナプス小胞、オートファゴソーム、内分泌腺の研究結果から指摘されている。陰イオン流入が必要となる意義はまだ明らかにされていないが、H⁺流入に伴ってオルガネラ内部に生じる電気化学的ポテンシャルの調節に働くと考えられている。申請者は、AQP6 のチャネル特性から、未成熟分泌顆粒の酸性 pH 維持に際し、AQP6 が陰イオン流入を行うのではないかとこの着想に至った。AQP6 の機能が消失すると、H⁺イオノフォア処理したときと同様に耳下腺タンパク質の保持と選別に影響が生じると考えられる。そこで、「AQP6 を介して未成熟な耳下腺分泌顆粒の内部を酸性に保てないと、内部タンパク質が喪失するとともに、タンパク質が構成性分泌様経路によって基底側から分泌されてしまう」かどうかを検証し、AQP6 の役割を決定することとした。

2. 研究の目的

耳下腺の分泌顆粒は未成熟な時期があり、内部は酸性に維持されている。遺伝子サイレン

シングにより AQP6 の発現を抑制し、AQP6 が未成熟分泌顆粒の酸性化に伴う陰イオン流入経路であることを証明する。

3. 研究の方法

概略: 耳下腺分泌顆粒の内部 pH の描出に最適な pH インジケータの条件検討を行った。また、分泌顆粒特異的なレポーターベクターを応用した分泌顆粒特異的な pH インジケーター・SNARF-O2 の作製を行った。アデノウイルスベクターをラット耳下腺に感染・導入するシステムの構築を行った。耳下腺の未成熟分泌顆粒における AQP6 タンパク質量の解析を行った。

耳下腺分泌顆粒の内部 pH の描出に最適な pH インジケータの条件検討:

深麻酔下にラット耳下腺を摘出し、コラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼ酵素消化により腺房細胞を調製した。腺房細胞のラベリングには、低毒性、安価、2 波長励起が可能な pH インジケータであるアクリジンオレンジ(AO)および、中性付近に pH 分解能を有する 1 励起 2 波長蛍光物質の SNARF-1 を用いた。AO および SNARF-1 はともに分離腺房細胞へ 10⁻⁶M、30 分間のラベリングを行った。ラベルした細胞はカールツァイス社製共焦点レーザー顕微鏡 LSM5Exciter を用いて検出した。AO ラベルした細胞に生じる pH 依存性の蛍光には FITC 波長および Rhodamine 波長による励起および検出を行った。SNARF-1 ラベルした細胞は 514nm のレーザー波長で励起し、530-580nm バンドパスフィルターおよび 630nm ロングパスフィルターで検出後、2 つの蛍光強度の比を解析した。

アデノウイルスベクターのラット耳下腺への導入

アデノウイルスベクターは Agilent 社製 pShuttle-IRES-hrGFP-1 コントロールベクターを用いた。HEK293T 細胞を用いて調製したウイルスは Bio Miga 精製キットで濃縮し、グリセロール懸濁後 -80 度で保存した。実験には無血清 DMEM 培地に再懸濁したウイルス液および、濃縮前の培地内に浮遊するウイルスを遠心分離により濃縮したインタクトなウイルス液を用いた。ラットは 6 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、深麻酔科に処置を行った。導入には、1)皮膚を切開し、目視下にウイルス液を 29G 針付きツベルクリンシリンジでラット耳下腺の被膜下に複数回注入した。2)ラットを仰臥位で固定し、ペアンで下顎前歯を把持・固定し、開口状態を維持した。解剖学的開口部といわれる部分から Exron 社製の極細シリコンチューブによりウイルス液を注入した。3)ラットの皮膚を切開後、耳下腺導管の基部を露出し、耳下腺の導管から Exron 社製の極細シリコンチューブを挿入し、目視下での逆行性注入を検討した。

耳下腺の未成熟分泌顆粒における AQP6 タンパク質量の解析

未成熟および成熟分泌顆粒は Arvan らの方法(Trends Cell Biol, 1992)に従い、Percollによる密度勾配で分離精製した。得られた分泌顆粒は低張液中でホモジナイズし、超遠心分離により膜画分を調製した。

4. 研究成果

蛍光 pH インジケータの条件検討では、結果的に新規蛍光 pH インジケータの開発に成功した。最初に分泌顆粒のラベリングに使用する予定だったアクリジンオレンジ(AO)を用いてラット耳下腺分離腺房細胞をラベルし、共焦点レーザー顕微鏡により検出を行った。結果、AO は腺房細胞に取り込まれ、細胞質に蛍光発色を示した。しかし AO は分泌顆粒内に移行せず、結果的に分泌顆粒が細胞内で球形の影になって描出された。AO の濃度を変えても検出される結果は変化しなかった。次に、SNARF-1 を用いた検討を行った。SNARF-1 succinimidyl estel(SE)で細胞をラベルした結果、SNARF-1-SE は AO と同じく細胞内に取り込まれ、蛍光を発色し、分泌顆粒は細胞内で球形の影になって描出された。また解析の結果、細胞質の pH は 7.2 付近だった。以上のことから SNARF-1-SE は耳下腺腺房細胞をラベルし、細胞内の pH を検出できることが明らかとなった。次に、この SNARF-1 と Halo Tag リガンドを合成し、新規インジケータの SNARF-O2 を得た。共同研究により、耳下腺分泌顆粒を HaloTag レポータータンパク質で検出する方法を開発済みである(Am J Physiol, 2013)。HaloTag は細胞外から別途導入出来るリガンドと共有結合する性質があり、任意のタイミングで検出可能である。この HaloTag リガンドのうち、O2 アミンリガンドを SNARF-1-SE と DMF 存在下で合成し、イオンカラムを用いて濃縮し、SNARF-O2 リガンドを作製した。SNARF-O2 は、分泌顆粒特異的 Halo Tag レポータータンパク質を発現した耳下腺初代培養細胞内において、分泌顆粒に特異的な局在を示し、かつ蛍光を観察することが出来た(図1)。

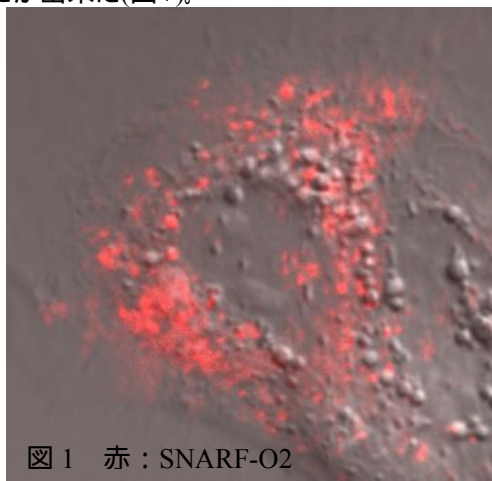


図1 赤：SNARF-O2

次に、開発した分泌顆粒特異的な蛍光 pH インジケータ・SNARF-O2 を用い、ラット耳

下腺初代培養細胞における未成熟・成熟分泌顆粒の局在を検討した。まず、ラット耳下腺初代培養細胞に、分泌顆粒に特異的な HaloTag レポータータンパク質(SS25H)を発現させた。次いで、SNARF-O2 で SS25H をラベルした。最後に、同細胞を塩化アンモニウム含有 Hank's 緩衝液で処理し、顆粒内部の pH をアルカリにシフトさせ、pH への応答性を検討した。得られた蛍光強度の差から顆粒内 pH を半定量的に解析した。結果、多くの分泌顆粒は内部が pH6.8 だった。また、アルカリシフトには強い抵抗性を示し、顆粒内部の pH はほとんどシフトしなかった。これらのことから、先行研究の示すとおり、分泌顆粒内部は pH6.8 付近に維持され、かつ内部には強い緩衝作用が働くことが示唆された。従って、SNARF-O2 は現時点では未成熟分泌顆粒の識別には使用できないことが考えられた。

ラット耳下腺に対するウイルスベクターの逆行性注入法の確立および in vivo での分泌顆粒内部 pH の検討：

アデノウイルスベクターをラット耳下腺に導入するシステムを構築する予定であった。まずラットの皮膚を切開後に耳下腺被膜下にウイルスを注入する方法を選択したが、ウイルスの定着を示す GFP 蛍光は検出できなかった。次に、ラット口腔内の耳下腺開口部からウイルス液を逆行性注入した。しかし、やはりウイルスの定着を示す GFP 蛍光は検出できなかった。従って、既知の手法ではウイルスベクターの導入が出来ないと判断した。さらに、外科的に耳下腺の導管を開放し、目視による逆行性注入を検討した。しかしながらウイルスベクターの導入を示す GFP の発現は認められなかった。

したがって、AQP6 をの RNAi によりタンパク質が構成性分泌様経路によって基底側から分泌されてしまうことを証明する方法としてのラットの使用には限界があり、別の手段を選択する必要があると考えられた。現在、細胞極性及び分泌顆粒生成能の両方を有する唾液腺培養細胞の検索を行っている。

ラット耳下腺分泌顆粒の成熟過程における AQP6 量の解析

これらのことから SNARF-O2 による分泌顆粒内 pH の検出に成功した一方で、アデノウイルスベクターを唾液腺に導入することは出来なかった。また、SNARF-O2 を用いて分泌顆粒内部の pH を測定したところ、SNARF-O2 の結合した分泌顆粒の内部 pH は全て中性付近であり、酸性を示す顆粒は見られなかった。これらの結果から、耳下腺分泌顆粒では未成熟と成熟とで分泌顆粒の pH に変化がない可能性が考えられた。酸性オルガネラの pH は通常 V 型プロトンポンプによる H⁺流入により内部酸性環境が維持されており、耳下腺と性質が類似すると言われている膵臓酵素源顆粒(内部 pH5.5)においても V 型プロトンポンプが顆粒膜に存在することが報告されている。また、ラット耳下腺の分泌顆粒を比重により未成熟および成熟分泌顆粒に精製分離する方法を共

同開発し、報告している(BBA, 2006)。そこで、未成熟および成熟分泌顆粒を精製分離し、顆粒膜のV型プロトンポンプおよびAQP6を抗V型プロトンポンプ抗体および抗AQP6抗体ウエスタンブロット法で検出した。結果、顆粒膜上に抗V型プロトンポンプ抗体が反応する膜サブユニットを示す100kDaのバンドを認めた。予想に反し、顆粒膜のV型プロトンポンプは未成熟より成熟分泌顆粒に2倍以上のバンド濃度を示した。この結果から、耳下腺の分泌顆粒は未成熟状態ではV型プロトンポンプを介さないH⁺流入を行う可能性が考えられた。さらに、同じ膜に対する抗AQP6抗体は未成熟分泌顆粒に強いバンド濃度を示した。以上のことからAQP6は未成熟分泌顆粒により多く存在することが示された。

この結果から、AQP6は耳下腺の未成熟分泌顆粒で陰イオンを透過する役目を担う可能性が示された。

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 5件)

1: Matsuki-Fukushima M、Hashimoto S、Murakami M、Ogata Y、Fujita-Yoshigaki J、Narita T、Sugiya H、Arch Oral Biol、査読有り、Vol.57、No.5、2012、pp.567-76、doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.014.

2: Satoh K、Seo Y、Matsuo S、Karabasil MR、Matsuki-Fukushima M、Nakahari T、Hosoi K、Pflugers Arch.、査読有り、Vol.464、No.4、2012、pp.375-89、doi: 10.1007/s00424-012-1141-8

3: Satoh K、Narita T、Matsuki-Fukushima M、Okabayashi K、Ito T、Senpuku H、Sugiya H、Pflugers Arch.、査読有り、Vol.465、No.2、2013、pp.271-81、doi: 10.1007/s00424-012-1183-y

4: Matsuki-Fukushima M、Fujita-Yoshigaki J、Murakami M、Katsumata-Kato O、Yokoyama M、Sugiya H、J Membr Biol、査読有り、Vol.246、No.3、2013、pp.209-14、doi: 10.1007/s00232-012-9522-7

5: Fujita-Yoshigaki J、Matsuki-Fukushima M、Yokoyama M、Katsumata-Kato O、Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol、査読有り、Vol.305、No.10、2013、pp.G685-96、doi: 10.1152/ajpgi.00093.2013.

[学会発表](計 4件)

Matsuki-Fukushima M、Katsumata-Kato O、Yokoyama M、Fujita-Yoshigaki J、第90回日本生理学会・総会、東京、2013年3月

Matsuki-Fukushima M、Murakami M、Fujita-Yoshigaki J、Katsumata-Kato O、Yokoyama M、Sugiya H、67th Annual Meeting and Symposium of SGP、Massachusetts、USA、2013、September

福島美和子、加藤治、横山愛、吉垣純子、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山、2013年9月

福島美和子、加藤治、横山愛、美島健二、吉垣純子、第59回日本唾液腺学会学術集会、東京、2014年12月

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
福島美和子 (FUKUSHIMA Miwako)
昭和大学歯学部口腔病態診断科学講座口腔病理学部門・助教
研究者番号：90548273

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：