

られていた大腸菌の RecF 経路も二本鎖切断を効率良く修復できることが示されたことで、このメデイエーター経路が相同組換えの生物共通の機構と考えてよいと思われる。この過程は、二本鎖切断点からの二本鎖 DNA の修飾（リセクション）、メデイエータータンパク質(群)による RecA 様タンパク質の一本鎖 DNA 部分へのローディング、および RecA 様タンパク質による相同鎖の対合に分けることができる。さらに真核生物でも、この過程に関与する多くのタンパク質が報告されているが<sup>9)</sup>、それらをひとまとめにして反応させることができるようになれば、ここで紹介した大腸菌の RecF 経路と似ていることが明らかにされるであろう。

### 謝辞

ここで紹介した研究は、カリフォルニア大学デービス校の Steve Kowalczykowski 博士の研究室で、森松克実博士と共同で行ったものです。またブランダイス大学の Susan Lovett 博士には RecJ タンパク質を供与していただきました。この場をお借りして感謝いたします。

- 1) Mimitou, E.P. & Symington, L.S. (2008) *Nature*, 455, 770–774.
- 2) Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., & Ira, G. (2008) *Cell*, 134, 981–994.
- 3) Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., & Jackson, S.P. (2008) *Genes Dev.*, 22, 2767–2772.
- 4) Hopkins, B.B. & Paull, T.T. (2008) *Cell*, 135, 250–260.
- 5) Nimonkar, A.V., Ozsoy, A.Z., Genschel, J., Modrich, P., & Kowalczykowski, S.C. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 16906–16911.
- 6) 春田(高橋)奈美, 岩崎博史 (2007) 生化学, 79, 449–453.
- 7) Handa, N., Morimatsu, K., Lovett, S.T., & Kowalczykowski, S. C. (2009) *Genes Dev.*, 23, 1234–1245.
- 8) Kuzminov, A. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 751–813.
- 9) Corrette-Bennett, S.E. & Lovett, S.T. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 6881–6885.
- 10) Sung, P. & Klein, H. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 739–750.
- 11) Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., & Sehorn, M.G. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 42729–42732.
- 12) Kantake, N., Madiraju, M.V., Sugiyama, T., & Kowalczykowski, S.C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15327–15332.
- 13) Koroleva, O., Makharashvili, N., Courcelle, C.T., Courcelle, J., & Korolev, S. (2007) *EMBO J.*, 26, 867–877.
- 14) Rocha, E.P., Cornet, E., & Michel, B. (2005) *PLoS Genet.*, 1, e15.

半田 直史

(東京大学大学院新領域創成科学研究科  
メデイカルゲノム専攻バイオ医療知財分野)

Resection, as an important step of homologous recombination  
Naofumi Handa (Laboratory of Social Genome Sciences, Department of Medical Genome Sciences, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

## 耳下腺腺房細胞における唾液分泌メカニズム

### 1. はじめに

ヒトは1日に0.5~1.5リットルもの唾液を分泌する。このように大量の唾液を口腔内に放出していることより唾液腺は極めて活発に機能していると考えられる。超高齢社会を迎え、唾液分泌量の低下による口腔乾燥を訴える患者が増加している。唾液分泌が低い状況下では、口腔内粘膜が乾き口の中がヒリヒリする、スムーズに話をする事ができない、食事が不味くうまく飲み込めない、感染症に罹り易く虫歯になり易い等々、口腔機能の著しい低下が予測される。高齢者のQOL(クオリティーオブライフ)を考える上で唾液分泌は口腔機能確保に重要な要素となっている。唾液の主な成分は99%以上を占める水分であるが、残り1%弱の大部分を占める唾液タンパク質が唾液に多くの機能を持たせている。唾液タンパク質は極性を持つ腺房細胞の分泌顆粒に貯蔵され(図1A)腺腔内に開口分泌される。その後、チャンネルや輸送体を通して放出される水や各種イオンと共に原唾液を構成し、介在部導管、線条部導管、排泄導管を通り唾液となって口腔内へ放出される。

唾液タンパク質の分泌経路には三つの経路が知られている<sup>1)</sup>(図1B)。刺激による分泌である調節性分泌経路(図1B, I)、刺激とは無関係の小胞による構成性分泌経路(図1B, II)、および未成熟分泌顆粒が成熟する過程で派生してくる小胞による構成性様分泌経路(図1B, III)である。主なタンパク質分泌は刺激を受けて開口放出を行う調節性分泌経路であるのに対し、刺激のない状態でも残り二つの経路を経て僅かずつ唾液は分泌され続ける。

筆者らは唾液腺の開口分泌機構解明を目的として耳下腺

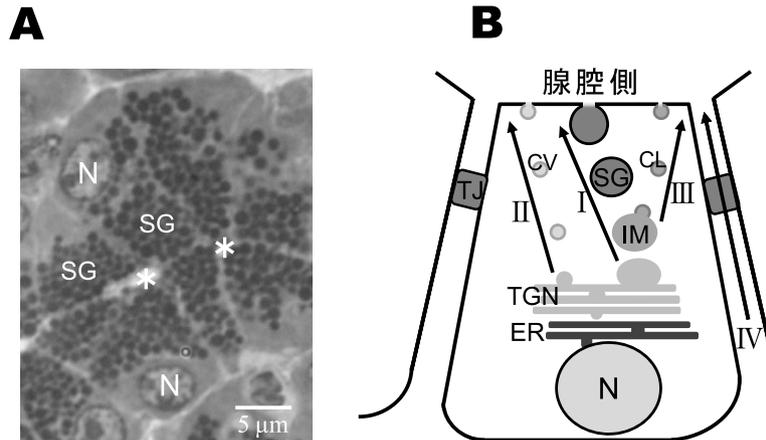


図1 耳下腺腺房細胞

(A) トルイジンブルー染色による耳下腺腺房の顕微鏡写真

N; 核, SG; 分泌顆粒, \*; 腺腔. 腺腔を中心に腺房細胞内に分泌顆粒がびっしりと詰まっている.

(B) 腺房細胞の唾液タンパク質および水の分泌経路

I; 調節性分泌経路, II; 構成性分泌経路, III; 構成性様分泌経路, IV; 傍細胞輸送経路. N; 核, TGN; トランスゴルジネットワーク, SG; 分泌顆粒, IM; 未成熟分泌顆粒, CV; 構成性分泌小胞, CL; 構成性様分泌小胞, TJ; 密着結合. I~IIIは主に唾液タンパク質を輸送する経路であるのに対し, IVは密着結合を介して $\text{Na}^+$ と水を分泌する経路である.  $\beta$ 刺激を受けて分泌に向かうのがIの調節性分泌経路である. ここでできる分泌顆粒(SG)が(A)で見られるように腺房細胞内に貯蔵されている.

の腺房細胞を用いて研究を進めている. 耳下腺は名前の通り両耳の下にあり顎下腺に次いで大きな唾液腺で, 多くのアミラーゼを分泌する腺である. 多数の人が小学校の理科の時間でデンプンに唾液をかけヨウ素デンプン反応を観察する唾液アミラーゼの実験をした経験があるのではないだろうか. 最近のめざましい生化学実験の技術とは裏腹に, 筆者は長い間, 開口分泌で放出される唾液タンパク質の指標として耳下腺腺房細胞から分泌されるアミラーゼと格闘(?)してきた. 本稿では, これまでに筆者が得た耳下腺腺房細胞の開口分泌に関する知見と他の唾液腺研究者の素晴らしい成果とを合わせて紹介する.

## 2. 交感・副交感神経刺激による唾液分泌

唾液腺に対する交感・副交感神経刺激は分泌を促進する. 交感神経が興奮すると終末部からノルアドレナリンが放出され, 筋上皮細胞や血管を収縮させる. その結果, 水分の少ないタンパク質に富んだ粘稠性唾液が分泌される. また, 副交感神経の活性化は多量な水分やイオンを分泌する. 緊張やストレスにより交感神経が興奮し, 副交感神経が抑制されると口の中が渇いたように感じるのはこのためである. 一方, 食事中には両神経の刺激により安静時の

20~30倍もの唾液が分泌される.

唾液腺の水分分泌に特に重要なのは腺房細胞の基底側膜に存在するM3ムスカリン性アセチルコリン受容体や $\alpha 1$ -アドレナリン受容体で, これらを活性化するとホスホリパーゼCの働きによりイノシトール1,4,5-三リン酸( $\text{IP}_3$ )が生成され, 細胞内ストアから $\text{Ca}^{2+}$ 放出が起こる. これが引き金となりチャンネルや輸送体を活性化する. その結果, 腺腔側で $\text{Cl}^-$ 濃度が上昇し電氣的勾配により $\text{Na}^+$ が細胞間隙を通過して腺腔内に移動し, 浸透圧勾配によって水が密着結合を介して腺腔内に引き込まれる(図1B, IV)<sup>2)</sup>. また, ムスカリンや $\alpha 1$ 作動薬による刺激は, 水チャンネルであるアクアポリン5を介して水分分泌を起こす<sup>3)</sup>.

多くの分泌細胞において細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が分泌小胞や分泌顆粒の開口放出を惹起するのに対して, 唾液腺腺房細胞では必ずしも $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇を要求しない<sup>2,4)</sup>. 耳下腺腺房細胞を $\beta$ 作動薬であるイソプロテレノール(IPR)で刺激すると細胞内cAMP濃度が上昇し, アミラーゼの開口分泌が惹起される. また, カルバコールとIPRで同時に刺激するとアミラーゼ分泌が相乗的に増強することにより, 両者の経路は連関していると推定される.

耳下腺腺房細胞内のcAMP濃度上昇には三量体GTP結

合タンパク質によるアデニル酸シクラーゼの共役が示されている<sup>3)</sup>。これを受けて開口分泌は cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) による細胞内基質タンパク質のリン酸化反応を経て起こると考えられている<sup>4)</sup>。膜透過性耳下腺腺房細胞に PKA の触媒サブユニットを導入するとアミラーゼ分泌の上昇が観察される<sup>5)</sup>。PKA の基質タンパク質については多くの候補が報告され、カスケード様の経路が想定され、プロテインキナーゼ C (PKC) や cGMP 依存性プロテインキナーゼとの関わりも示唆されている<sup>3)</sup>。最近では PKA 非依存性の cAMP を介するアミラーゼ分泌、例えば、Epac (cAMP 調節性グアニンヌクレオチド交換因子) の関与なども報告されている<sup>4,6)</sup>。しかし、耳下腺腺房細胞では Epac 以降のシグナルタンパク質の存在が確認できず不明な点が多い。

### 3. 特異的 SNARE タンパク質の関与

耳下腺腺房細胞の開口分泌も例外ではなく細胞内小胞輸送の機構が存在するため、SNARE [soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein (SNAP) receptor] 仮説が提唱されている<sup>4,7)</sup>。耳下腺腺房細胞の SNARE タンパク質は神経細胞のそれと違い特異性がある。神経細胞や内分泌細胞では、形質膜上の標的となる *t*-SNARE としてシンタキシン 1, SNAP-25, 輸送小胞膜上の *v*-SNARE としてはシナプトブレビン/VAMP (vesicle-associated membrane protein)-1 および VAMP-2 が知られており、これらの複合体を介して神経伝達物質やホルモンを含む小胞の開口分泌が起こる。一方、耳下腺腺房細胞では分泌顆粒膜上に VAMP-2 が存在し、シンタキシン 1 や SNAP-25 に代わるものとしてシンタキシン 2 および 3, 4, SNAP-23 が腺腔側の尖端膜 (開口分泌が起こる場所) に発現している<sup>7,8)</sup>。実際、神経細胞以外の分泌機構にこれらの SNARE タンパク質が関わっているが、耳下腺腺房細胞中では VAMP-2 と結合する SNARE の本体は未だ確認されていない。刺激以前の腺房細胞では VAMP-8・シンタキシン 3, シンタキシン 4・SNAP-23 などの 2 種類のタンパク質複合体は検出されている<sup>8)</sup>が、ヘテロ三量体となる複合体は観察されていない。刺激後の一過性の結合であるため捕まえることができないのか興味を持たれる。

筆者は耳下腺腺房細胞の細胞膜上にシンタキシン 4 と Munc18/Sec1 ファミリーである Munc18-3/Munc18c とが複合体を形成しており、Munc18-3 がリン酸化されることにより解離することを明らかにした<sup>9)</sup>。典型的な SNARE 仮説によれば分泌小胞と形質膜とのドッキング前にはシンタ

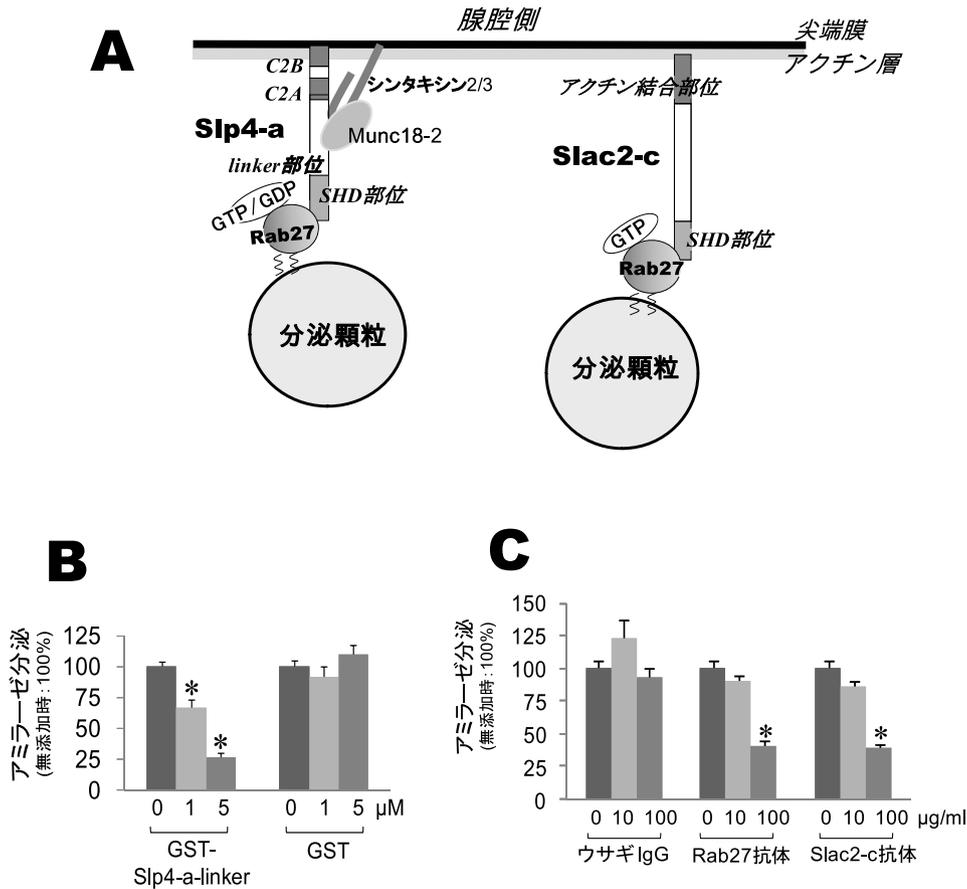
キシン 1 と Munc18-1/Munc18a/Sec1 とが結合状態にあり、Ca<sup>2+</sup> 依存的な引き金によりシンタキシン 1 は Munc18-1 から解離してオープン型となり、SNAP-25 および VAMP-2 と共に三量体の SNARE 複合体を形成する。耳下腺では Munc18-1 とシンタキシン 1 の両者は発現しておらず、Munc18-3 とシンタキシン 4 が同様の挙動を示していると考えられる。Munc18-3 は PKC でリン酸化されるとシンタキシン 4 から解離して細胞膜から細胞質へと移動する。その後シンタキシン 4 が SNARE 複合体を形成し開口分泌に関わっているものとみられる<sup>9)</sup>。

### 4. Munc18 と Slp4-a/granuphilin-a との関係

Munc18 ファミリーである Munc18-2/Munc18b が腺房細胞の尖端膜に発現しており、クローズ型のシンタキシン 2 または 3 および低分子量 GTP 結合タンパク質である Rab のエフェクターである Slp (synaptotagmin-like protein) 4-a/granuphilin-a と結合している<sup>10)</sup>。面白いことに COS-7 細胞に各タンパク質を発現させ結合を調べると、Slp4-a とシンタキシン 2 または 3, あるいは Slp4-a と Munc18-2 の各々二つのタンパク質を発現させただけでは結合しなかったのに対して、三つのタンパク質を発現させると結合した。すなわち、Munc18-2 依存的にシンタキシン 2 または 3 と Slp4-a は複合体を形成している (図 2A 左)。この複合体は分泌顆粒と尖端膜との繋ぎとめに働いており、開口分泌には必須であると考えられる。Slp4-a は SHD (Slp homologue domain) 部位と C2 ドメインの間の linker 部位においてシンタキシン 3 および Munc18-2 と結合する。この部位の GST 融合タンパク質 (GST-Slp4-a-linker) をストレプトリジン O 処理された膜透過性耳下腺腺房細胞に導入すると、β 刺激によるアミラーゼ分泌の抑制が観察された (図 2B)。刺激後、Munc18-2・シンタキシン・Slp4-a 複合体 (図 2A 左) は解離し、シンタキシンは SNARE 複合体形成に移行するが、外から過剰に加えた GST-Slp4-a-linker がヘテロ三量体のままの状態に保ち、シンタキシンのオープン型形成を阻害するのではないかと考えられる。

### 5. Rab タンパク質とエフェクターとの関与

細胞内膜輸送に低分子量 GTP 結合タンパク質である Rab ファミリーが関わっている (詳細は総説<sup>11)</sup>を参照いただきたい)。耳下腺腺房細胞に発現している Rab タンパク質は Rab3D, Rab4, Rab26, Rab27 (A および B) である<sup>13)</sup>。このうち直接開口分泌に関与しているものは Rab26 および Rab27 である。これらの Rab タンパク質は分泌顆粒の



**図2** アミラーゼ分泌に対する Slp4-a, Slac2-c および Rab27 の働き  
 (A) Slp4-a と Slac2-c の分泌顆粒繫留模式図。Slp4-a は SHD 部位で GTP/GDP 型 Rab27 と結合して C2B ドメインで先端膜のリン脂質に結合していると考えられる。また、Munc18-2 およびクローズ型シタキシン 2 または 3 と linker 部位に結合している。Slac2-c の SHD 部位と分泌顆粒膜上の GTP 型 Rab27 が結合し、また Slac2-c は先端膜直下のアクチン層と結合することにより分泌顆粒を繫留している。  
 (B) 膜透過性腺房細胞に GST-Slp4-a-linker を導入するとアミラーゼ分泌が阻害される。棒グラフは平均値 ± 標準誤差 (n=5) を示し、有意差検定を行った (\*, p<0.01)。  
 (C) 膜透過性腺房細胞に Rab27 抗体または Slac2-c 抗体を導入するとアミラーゼ分泌が阻害される。棒グラフは平均値 ± 標準誤差 (n=5) を示し、有意差検定を行った (\*, p<0.01)。

成熟に伴って分泌顆粒膜上に濃縮される。一方、耳下腺腺房細胞では Rab27 のエフェクターとして知られている 13 種のタンパク質のうち、Slac2 (Slp homologue lacking C2 domains)-c, Slp4-a, Noc2 (no C2 domain), Munc13-4 の 4 種が発現している<sup>11)</sup>。

膜透過性腺房細胞に Rab27 抗体および Slac2-c 抗体を導入して IPR で刺激するとアミラーゼ分泌が抗体濃度依存的に抑制された (図 2C)。この開口分泌には Rab27 と Slac2-c の結合 (図 2A 右) が必要である<sup>12)</sup>。

耳下腺腺房細胞における Rab27 および Slac2-c, Slp4-a

の β 刺激による時間的局在およびサイクルはよく知られていなかった。筆者らは IPR を用いて、5 分および 30 分刺激後のこれらの局在を調べ、分子の動きを予測した<sup>13)</sup> (図 3)。その結果、Slp4-a は先端膜に存在し、刺激後の局在変化は観察できなかった。Slac2-c は開口分泌が盛んになる刺激 5 分後には先端膜直下に集積した。その後、開口分泌がほぼ終了する 30 分後にはカルパインのような Ca<sup>2+</sup> 依存性プロテアーゼにより速やかに消化された。顆粒輸送および開口分泌のカギを握る Rab27 は分泌顆粒上に存在し、刺激前から一部が Slp4-a や Slac2-c, Noc2 と結合して

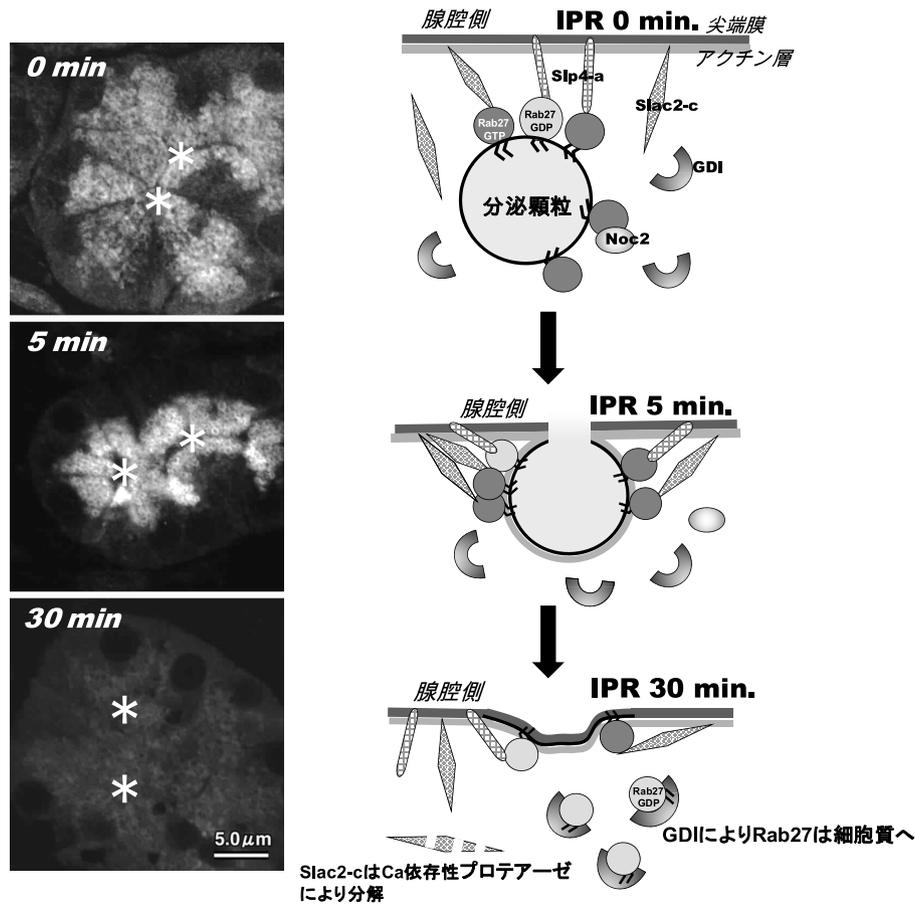


図3 耳下腺腺房細胞内でのRab27の挙動

左は耳下腺腺房細胞をイソプロテレノール (IPR) で刺激をした時のRab27の免疫組織化学。\*は腺腔を示す。Rab27は分泌顆粒膜上に観察される。刺激前(0 min)では腺腔を中心として腺房細胞内に溜まった状態であるが、刺激5分後(5 min)には腺腔側に凝集して開口分泌が始まる。刺激30分後(30 min)にはRab27の凝集はなくなり細胞質全体が薄く染色された。右はIPR刺激後の分泌顆粒の状態の模式図。

分泌顆粒の先端膜への繫留に寄与しており、IPR刺激後ではよりGTP型が増加し腺腔側付近に凝集する。そして30分後にはRab27のGTPアーゼが働き不活性型のGDP結合型が増加し、GDI(GDP解離抑制因子)と複合体を形成して細胞質に移動することが明らかになった<sup>13)</sup>。一方、Noc2は分泌顆粒膜上でRab27と結合しているが先端膜への繫ぎとめには関わっておらず、刺激を受けると速やかに解離した。Noc2のその後の挙動は不明だが、膜透過性細胞にNoc2-RBD(Rab binding domain)抗体を導入した場合、アミラーゼ分泌が抑制されることから開口分泌に関わっていると考えられる。

## 6. 唾液分泌研究の問題点とこれからの展望

唾液・唾液腺がなくても直接生命に関わることは少なく、残念ながら興味を持つ研究者は多くない。しかし、唾液分泌の低下はQOLの著しい障害となることから、分泌回復や唾液腺の再生に関する研究は今後重要になるといえる。けれども、外分泌細胞は機能を保持したままの培養細胞系が確立できないことから、研究分野としてかなり遅れている感がある。腺房細胞に遺伝子発現させる方法は再現性が低く、RNAiや特定の遺伝子導入による機能解析も難しい。筆者らは実験の度ごとに耳下腺より腺房細胞を分離し、膜透過性細胞を調製して試薬や抗体、リコンビナントタンパク質などを導入してアミラーゼ分泌を測定してい

る。近年、日本大学松戸歯学部吉垣先生らのグループは機能を保持した細胞培養の開発に精力的に挑んでおり、めざましい成果を上げている<sup>14)</sup>。外分泌の機能を維持したままの培養細胞系が確立できれば開口分泌のメカニズム解明はもとより、唾液腺の機能回復においても飛躍的に研究が進むものと思われる。

## 謝辞

本研究に協力してくださいました東北大学大学院生命科学研究所の福田光則教授、並びに日本歯科大学新潟生命歯学部生化学講座の皆様をはじめとする共同研究者の方々に深くお礼申し上げます。

- 1) Gorr, S.-U., Venkatesh, S.G., & Darling, D.S. (2005) *J. Dent. Res.*, **84**, 500-509.
- 2) 谷村明彦, 東城庸介 (2006) 日薬理誌, **127**, 249-255.
- 3) Ishikawa, Y., Cho, G., Yuan, Z., Skowronski, M.T., Pan, Y., & Ishida, H. (2006) *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 495-512.
- 4) Seino, S. & Shibasaki, T. (2005) *Physiol. Rev.*, **85**, 1303-1342.
- 5) Takuma, T. & Ichida, T. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 22124-22128.
- 6) Shimomura, H., Imai, A., & Nashida, T. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **431**, 124-128.
- 7) Fujita-Yoshigaki, J. (1998) *Cell Signal.*, **10**, 371-375.
- 8) Imai, A., Nashida, T., Yoshie, S., & Shimomura, H. (2003) *Arch. Oral Biol.*, **48**, 597-604.
- 9) Imai, A., Nashida, T., & Shimomura, H. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **422**, 175-182.
- 10) Fukuda, M., Imai, A., Nashida, T., & Shimomura, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 39175-39184.
- 11) Fukuda, M. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2801-2813.
- 12) Imai, A., Yoshie, S., Nashida, T., Shimomura, H., & Fukuda, M. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 1945-1953.
- 13) Imai, A., Yoshie, S., Nashida, T., Fukuda, M., & Shimomura, H. (2009) *Eur. J. Oral Sci.*, **117**, 224-230.
- 14) Fujita-Yoshigaki, J., Matsuki-Fukushima, M., & Sugiya, H. (2008) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**, C774-C785.

今井 あかね

(日本歯科大学新潟生命歯学部生化学講座)

Mechanisms of salivary secretion from parotid acinar cells  
Akane Imai (Department of Biochemistry, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University, 1-8 Hamaura-cho, Chuo-ku, Niigata 951-8580, Japan)

## ミトコンドリア外膜上でのウイルス免疫制御機構

### はじめに

真核細胞内では核をはじめ、ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリア、リソソーム、ペルオキシソーム等の様々な細胞小器官(オルガネラ)が独自の機能を有し、それぞれに生体運営に関わっている。なかでもミトコンドリアは、細胞内におけるエネルギー工場とも呼ばれ、その特有の構造及び機能の両面から今日に至るまで研究対象となってきた。ミトコンドリアは、好気性細菌の一種、 $\alpha$ -プロテオバクテリアが真核細胞の前身となる細胞に感染し、その後の進化の過程で共生する選択肢をとり、現在では細胞の生存に不可欠のオルガネラとして獲得されたものと考えられている(細胞内共生説)。ミトコンドリア内に独自のDNAが存在し、他のオルガネラとは異なる二重膜構造になっていることはその名残とも考えられている。ミトコンドリアの細胞内における主な生理的役割は、アデノシン三リン酸(ATP)の産生である。ところが、ミトコンドリアの役割は細胞内のエネルギー代謝にとどまらず、細胞死(アポトーシス)、老化、神経変性疾患、発がん等の様々な現象とも密接に関連していることが知られるようになってきた。さらに近年の研究から、ウイルスに対する細胞内自然免疫応答とも関係していることが次第に明らかになってきた<sup>1)</sup>。本稿では、細胞内における抗ウイルス自然免疫機構、特にミトコンドリア外膜上での負の制御機構に関して概説する。

### 1. ウイルス自然免疫とミトコンドリア

哺乳動物のRNAウイルスに対する自然免疫機構は、二つの異なるシグナル伝達経路により巧妙に制御されている(図1)。そのひとつは、Toll様受容体(TLR-3)を介した経路であり(TLR経路)、エンドサイトーシスにより侵入したウイルスの核酸(RNA)を、主にエンドソーム内に発現しているTLR-3が認識し、インターフェロン調節因子(IRF-3/7)とNF- $\kappa$ B転写因子の活性化を引き起こす。その後、各々に活性化された転写因子の働きにより、抗ウイルス活性の中心的な役割を担っているI型インターフェロン(複数のIFN- $\alpha$ 及び1種類のIFN- $\beta$ )及び炎症性サイトカインが産生誘導され、ウイルスに対する第一線の生体防御を行っている<sup>2)</sup>。一方、TLR-3非依存的に進行する別