

# 第21回 唾液腺談話会

第49回 歯科基礎医学会サテライトシンポジウム

「唾液腺研究の最近の進歩-ヒトから分子まで-」

平成19年8月29日（水）13：00～

北海道大学百年記念会館会議室

世話人

北海道医療大学歯学部口腔生物学生理学 和泉博之

北海道医療大学看護福祉学部生命基礎科学 倉橋昌司

## 第21回唾液腺談話会プログラム

13:00－13:05 開会挨拶

13:05－13:30

- ①「2つの唾液ムチンは2つの異なる唾液物性に関与する」  
小野堅太郎（九州歯科大学・生命科学）

13:30－13:55

- ②「行動学的にみた咀嚼唾液反射の神経機構」  
小橋美由紀（岡山大学大学院・医歯薬総合・口腔生理学）

13:55－14:20

- ③「ラット耳下腺における非刺激アミラーゼ分泌」  
梨田智子（日本歯科大学・新潟生命歯・生化学）

14:20－14:30 休憩

14:30－14:55

- ④「唾液腺障害と再生における細胞増殖とアポトーシス」  
高橋 茂（北海道大学大学院・歯・口腔健康科学）

14:55－15:20

- ⑤「唾液腺におけるCl<sup>-</sup>チャネル関連分子CLCAの細胞内局在と機能」  
山崎 純（福岡歯科大学・細胞分子生物学）

15:20－15:45

- ⑥「唾液腺のNa-K-2Cl共輸送体—共輸送体タンパク質発現に重要なシグナルモチーフの検索」  
根津顕弘（北海道医療大学・歯・口腔生物学・薬理学）

16:00－17:45

サテライトシンポジウムⅧ「口腔機能の中樞制御—電気生理学的アプローチ」

18:00－19:30 合同懇親会（百年記念会館きゃら亭）

① 2つの唾液ムチンは2つの異なる唾液物性に関与する

小野堅太郎、井上弘子、増田渉、稲永清敏  
九州歯科大学生命科学講座

唾液における粘性や曳糸性のような物性に関してどのような因子が絡んでいるかについてはまだよく分かっていない。そこで本研究では各唾液パラメーターやムチン（MUC5B と MUC7、それぞれ古くは MG1 と MG2 と呼ばれていた）レベルと唾液物性（粘性や曳糸性）との関係について調べた。健康な若い男女において無刺激並びに咀嚼刺激全唾液の粘性と曳糸性、分泌速度、総タンパク質濃度、アミラーゼ活性を調べた。MUC5B と MUC7 の唾液レベルに関しては、電気泳動後に Stains-All 染色して調べられた。無刺激並びに咀嚼刺激全唾液ともに粘性は総タンパク質濃度と性の相関を持ち、咀嚼刺激全唾液において粘性は分泌速度と負の相関をもっていた。一方、曳糸性はどのパラメーターとも有意な相関は示さなかった。ムチンの唾液レベルに関しては、無刺激並びに咀嚼刺激全唾液共通に、粘性は MUC5B レベルに依存して増加し、曳糸性は MUC7 レベルに依存して増加していた。これらの結果は、MUC5B は粘性に、MUC7 は曳糸性にそれぞれ独立して寄与することが示唆された。

## ② 行動学的にみた咀嚼唾液反射の神経機構

小橋美由紀, 藤田雅子, 松尾龍二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔生理学分野

【目的】摂食行動、特に咀嚼中には多量の唾液分泌が誘発される。従来、咀嚼時の唾液分泌は、味覚刺激、粘膜、歯周組織の機械的刺激等の感覚入力により、反射的に分泌されることが報告されている。これは、一般的に咀嚼唾液反射と呼ばれている。しかし、その詳細な神経機構は、未だ明確にされていない。そこで我々は、自由行動下のラットで様々な性状の飼料摂取時の顎下腺の唾液分泌を慢性的に測定し、その分泌動態について検索した。また、摂食中枢（視床下部外側野）を破壊し、その影響を検索した。

【方法】ラットを測定箱の中で自由に摂食、飲水するように訓練した。訓練したラットについて、麻酔下で顎下腺カニューレ、両側咀嚼筋電図用電極を装着した。摂食中枢（視床下部外側野）の破壊は、金属電極を介する直流通電（0.1～0.2mA, 20秒間）による電気凝固である。麻酔回復後、水と飼料を与えて測定実験を行なった。飼料は固形飼料、ペースト状飼料、粉末飼料である。

【結果と考察】 1) 唾液分泌量と咬筋活動量の間には優位な相関関係はなく、唾液分泌量は単に顎運動や歯根膜感覚量に比例して生じないと考えられた。 2) 水分含有量の多い飼料ほど、単位時間あたり（3分間）の摂食量が多かった。逆に唾液分泌量は水分含有量の少ない飼料ほど多く、飼料の水分含有量が分泌量に影響することがわかった。 3) 同側の摂食中枢を破壊すると、どの性状の飼料を摂取したときも、唾液分泌量は1/5から1/10に減少した。反対側の摂食中枢の破壊では、唾液分泌量は約1/2に減少した。よって顎下腺の唾液分泌量は同側の摂食中枢から大きな影響を受けていると考えられる。 4) 咬筋活動量、咀嚼回数、摂食量は正常動物と摂食中枢破壊動物との間で著しい差は認められなかった。このことから、片側の摂食中枢を破壊しても摂食量や顎運動量には大きな影響はなかったと考えられる。

【結論】摂食中枢は、咀嚼時の唾液分泌に強く影響し、摂食中の咀嚼唾液反射の重要な神経回路を構成していることが示唆された。

### ③ ラット耳下腺における非刺激アミラーゼ分泌

梨田智子<sup>a</sup>, 今井あかね<sup>a</sup>, 吉江紀夫<sup>b</sup>, 下村浩巳<sup>a</sup>

日本歯科大学・新潟生命歯学部・<sup>a</sup>生化学講座・<sup>b</sup>解剖学Ⅱ講座

ラット耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌は、 $\beta$ -adrenergic あるいは muscarinic 刺激による調節分泌 (regulated secretion) のほかに、非刺激下でも行われている。これまで、耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ非刺激分泌は、分泌顆粒からの unstimulated granule exocytosis, 分泌小胞からの constitutive secretion, constitutive-like secretion などが存在する可能性が報告されているが、不明な部分が多い。

今回、アミラーゼの非刺激分泌について、これまでに得た知見を報告する。

#### 非刺激分泌アミラーゼの起源

分泌小胞内のアミラーゼのみが標識されるように、短時間 (5 分間) のインキュベートによる <sup>35</sup>S-アミノ酸標識を行った。この条件で合成されたアミラーゼは分泌顆粒には移行しなかった。標識アミラーゼは非刺激下のインキュベートにより腺房細胞から分泌され、イソプロテレノール (IPR; 10<sup>-6</sup>M) 刺激によつては分泌に変化がなかった。

また、分泌顆粒内にプロテオグリカン (chondroitin sulfate proteoglycan; CSPG) が存在することが報告されているが、他の細胞内小胞画分の可溶画分には含まれていなかった。CSPG は IPR 刺激により分泌されたが、非刺激下では分泌されなかった。

#### p-Nitrophenyl $\beta$ -xyloside 処理

プロテオグリカン合成阻害剤の p-nitrophenyl  $\beta$ -xyloside ( $\beta$ -xyloside) はゴルジからの分泌顆粒の形成を阻害するとされている。<sup>35</sup>S-アミノ酸標識アミラーゼの非刺激下における分泌は、 $\beta$ -xyloside 処理によりほぼ完全に抑制された。

#### 抗アミラーゼ抗体による免疫染色

腺房細胞を IPR 処理 (10<sup>-6</sup>M, 30 分間) により無顆粒状態にした後、抗アミラーゼ抗体で免疫染色したところ、細胞内の抗アミラーゼ免疫反応は消失した。IPR を除くと、少数の分泌顆粒の出現と同時に、小胞状の細胞質内アミラーゼ免疫反応が出現した。これらの免疫活性の出現は  $\beta$ -xyloside で前処理することにより阻害された。

#### 結論

- ① 非刺激分泌されるアミラーゼは、分泌小胞に由来し、早期に合成されたアミラーゼがこの経路で分泌されていた。
- ②  $\beta$ -xyloside 処理により非刺激アミラーゼの分泌は完全に阻害された。
- ③ 分泌小胞と分泌顆粒は、その形成過程が関連していると考えられる。

#### ④ 唾液腺障害と再生における細胞増殖とアポトーシス

高橋 茂

北海道大学 院歯 口腔健康科学講座

唾液腺は唾石症や唾液腺炎などにより障害を受けると退行性変化を示し、萎縮する。萎縮唾液腺は機能低下し、口腔内に種々の影響を及ぼすことが知られている。このようなことから、唾液腺の障害と再生に関しては、唾液腺導管の結紮・解除動物実験モデルを用いた研究が比較的古くから行われてきた。

導管結紮により唾液腺が萎縮すると腺実質では腺房の消失と導管の増生が認められ、続いて結紮を解除すると唾液腺組織はほぼ元の状態まで再生する。これまでの報告では、萎縮における組織学的変化は腺房細胞が休止状態となり、導管細胞へ脱分化したことによるのであり、結紮解除後の再生においては脱分化していた細胞が再び腺房細胞へ分化することによると解釈されてきた。しかし、ラット顎下腺を用いた近年の我々の研究などにより、萎縮顎下腺では腺房細胞はアポトーシスによって消失する一方で導管細胞は分裂・増殖していること、再生過程では再生腺房細胞は残存導管から分化して生じるだけでなく、分化間もない腺房細胞も活発に分裂・増殖していることが明らかとなった。さらには、再生過程においてもアポトーシスにより消失していく腺房細胞も認められた。このように萎縮や再生の過程においては、細胞増殖とアポトーシスは重要な役割を担っていると考えられる。

本シンポジウムでは、初めに唾液腺障害と再生における細胞増殖とアポトーシスについて顎下腺を例に概説し、次に顎下腺とは組織構造の大きく異なる舌下腺の障害や再生についても述べてみたい。

## ⑤ 唾液腺における Cl<sup>-</sup> チャネル関連分子 CLCA の局在と機能

山崎 純

福岡歯科大学 細胞分子生物学講座

イオン輸送機能を担う分子が他の機能を有する場合は報告されている。唾液腺上皮細胞は増殖・分化の過程において多機能性分子が持つ機能から1つを選び出すことができるかも知れない。私は当初、唾液生成に重要な口腔内 Cl<sup>-</sup> 輸送機能に関与する分子を明らかにする目的で、ラットからクローニングした CLCA (rCLCA、903 アミノ酸) の組織局在と機能を調べ、タンパクの性質を強制発現系にて検討した。rCLCA cDNA を導入した HEK293 細胞の可溶性膜画分から、N型糖鎖が付加された 120 kDa と 86 kDa のタンパク (後者は翻訳後修飾による) がイムノブロット法によって検出された。免疫細胞染色やビオチンによる膜表面標識法により、86 kDa タンパクの細胞膜での局在が明らかになった。また、細胞内の Rab5 や Rab11 で標識されるエンドソームにも存在することが示され、rCLCA の局在と膜リサイクリングの関連が示唆された。rCLCA 発現細胞は、niflumic acid 感受性の Ca<sup>2+</sup> 活性化 Cl<sup>-</sup> 透過機能を有した。rCLCA が顎下腺導管上皮細胞に局在するという免疫組織染色結果と、rCLCA 遺伝子のサイレンシングによる唾液イオン組成変化の結果を合わせると、rCLCA は唾液腺導管上皮細胞での Cl<sup>-</sup> 再吸収に関与すると考えられた。他方、rCLCA が他の機能を持つ分子であることもわかってきた。スプライシングの違い (exon9-) によって rCLCA truncated isoform (rCLCA-t、514 アミノ酸) がラット顎下腺で合成されることが見出された。rCLCA-t は顎下腺排泄管基底細胞の核周囲に限局するが、完全長の rCLCA は基底細胞には検出されず、分化した表面の上皮細胞のみに局在した。強制発現系では rCLCA-t は可溶性膜画分に検出されるが、主として核近傍に局在し、Ca<sup>2+</sup> 活性化 Cl<sup>-</sup> 透過機能を持たなかった。興味深いことに、rCLCA-t の発現によって Ca<sup>2+</sup> 依存的に  $\beta_1$ -integrin の核周囲への移行や細胞接着能の低下が起これ、特異的抗体によって  $\beta_1$ -integrin を活性化させることで接着能が回復した。以上から、細胞外マトリックスとの integrin 依存的な細胞接着に rCLCA-t が抑制的に働くと考えられた。これらの結果から、細胞依存的な rCLCA のスプライシングによって、異なる機能 (イオン輸送と細胞接着) が上皮細胞に賦与されている可能性が示唆された。

## ⑥ 唾液腺のNa-K-2Cl共輸送体-共輸送体タンパク質の発現に重要なシグナルモチーフの検索

根津 顕弘

北海道医療大学・歯学部・口腔生物学系・薬理学分野

Na-K-2Cl 共輸送体(NKCC1)は、ほ乳類の唾液腺において Na、K および Cl イオンの取り込みと水の輸送に重要な膜タンパク質である。膜タンパク質がその機能を発揮するためには、小胞体で合成されたタンパク質が適切に膜へ移行する事が極めて重要である。近年、dileucine 配列(LL 配列)などの特異的なアミノ酸配列がタンパク質の細胞膜への輸送に大きな役割を果たす事が報告され、輸送に重要なシグナルモチーフが存在する事が明らかとなった。NKCC1 では、このようなシグナルモチーフの有無やその役割について全く調べられていない。今回我々は、NKCC1 においてタンパク質の発現や輸送、あるいは機能に重要なシグナルモチーフが存在するか否か明らかにするため、アミノ酸配列を任意に置換した変異体を作成し検索を行った。

野生型 NKCC1 および変異体発現プラスミドを HEK-293 細胞に導入し、野生型および変異型タンパク質の発現を NKCC1 の特異抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。野生型は複合体糖鎖が修飾された約 170 kDa の非常に強いバンドとコア糖鎖修飾された約 130 kDa の弱いバンドの発現を示した。一方、NKCC1 の C 末端近傍に存在する LL 配列を含む4つの疎水性アミノ酸配列(Isoleucine-Leucine-Leucine-Valine; ILLV)を Alanine(A)に置換した変異体では、その発現パターンおよび発現量に大きな違いが認められた。特に AAAA 変異体では 170 kDa のバンドは全く観察されず、130 kDa 付近のバンドのみが観察された。またその発現量は野生型と比べ極めて低下していた。他の共輸送体ファミリーでよく保存されているアミノ酸を置換した変異体では、その発現パターンに大きな違いは認められなかった。これらの結果は、ILLV 配列が NKCC1 のタンパク質発現パターンと発現量に大きく関係することを強く示唆する。

AAAA 変異体タンパク質の糖鎖修飾の状態を調べたところ、130 kDa のタンパク質はコア糖鎖修飾されていることが確かめられた。さらに野生型と ILLV 配列の変異体タンパク質の機能を  $^{86}\text{Rb}$  取り込み実験により解析した。野生型発現細胞では、空ベクター導入細胞と比べ有意な  $^{86}\text{Rb}$  の取り込みが観察されたが、AAAA および類似変異体では有意な  $^{86}\text{Rb}$  の取り込みは認められなかった。野生型および AAAA 変異体の細胞内分布を免疫染色法により観察した。野生型はそのほとんどが細胞膜に発現していた。一方、AAAA 変異体では細胞膜での発現は認められず、この分布は小胞体の分布とよく一致した。これらの結果は、AAAA 変異体が小胞体に留まっている事を示唆する。

本研究によって、NKCC1 のタンパク質発現に大きな影響を与える4つの疎水性アミノ酸配列 ILLV の存在が明らかになった。この配列の変異により、変異体タンパク質が小胞体に留まっていること、発現量が大きく減少することから、この配列は小胞体でのタンパク質の折り畳みに重要なモチーフであると考えられた。