

〔総説〕

## サイクリックAMPと唾液分泌の謎

田隈 泰信

北海道医療大学歯学部生化学分野

## The enigma of cyclic AMP mediated salivary exocytosis

Taishin TAKUMA

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

## Abstract

Cyclic AMP is a classical signal transduction molecule that covers a wide variety of organisms including bacteria, cellular slime molds, and mammals. In this review I focus the role of cAMP in the mechanism of the salivary protein exocytosis. The mechanism still remains an enigma, and I have evaluated it trying to an-

swer 4 different questions, 1) is the final exocytic stimulus  $Ca^{2+}$  or cAMP? 2) Is protein phosphorylation necessary? 3) What mechanisms are involved in Epac and PKA in insulin and amylase secretion? And 4) what SNAREs are involved in salivary exocytosis?

## はじめに：情報伝達分子としてのcAMP

シグナル伝達分子としてのサイクリックAMP (cAMP) は、細菌や細胞性粘菌から哺乳類まで、生命進化を広範にカバーし、多様な役割を果たしている (表1, cAMPの構造は図3をご参照ください)。細菌では、栄養源として最も利用しやすいブドウ糖が“枯渇”したとき、代わりに乳糖が利用できるようにするため、ラクトース・オペロンの転写を促進するシグナルとしてcAMPは登場する。

アメーバーに似た単細胞生物として生活する細胞性粘菌では、餌の細菌が枯渇して“飢餓状態”に陥ったと

き、危機的状況を周囲のアメーバー達に知らせるため、走化性因子としてcAMPが放出される。この場合、cAMPは細胞内に情報を伝える“セカンド”メッセンジャーではなく、細胞間で情報を交換する“ファースト”メッセンジャーとして機能している。

哺乳類を含む高等生物では、cAMPは“飢餓シグナル”の役回りから解放され、細胞内でセカンドメッセンジャーの役割を果たすようになる。その代表的な例は鼻粘膜に存在する嗅細胞である。嗅細胞には嗅覚受容体が発現しており、ここに匂い分子が結合するとcAMPが合成される。cAMPは細胞膜に存在する特殊な陽イオンチャンネルに結合してこれを開き、その電気信号は中枢へ

表1 cAMPの多様なシグナル伝達機構

細胞	cAMPの結合相手	機能
細菌	CAP*	ラクトース・オペロンの転写促進
細胞性粘菌	細胞膜のcAMP受容体	細胞の走化性因子
嗅細胞, ほか	陽イオンチャンネル	チャンネルを開く (脱分極)
唾液腺細胞, ほか	PKA*	タンパク質リン酸化
	Epac*	Rap 1, Rap 2*の活性化など

CAP: Catabolite Activator Protein.

PKA: Protein Kinase A (cAMP-dependent protein kinase).

Epac: Exchange Proteins directly Activated by cAMP.

Rap1, Rap2: 低分子量Gタンパク質. EpacによりGDPがGTPに置き換わり活性化.

と伝達され、脳で匂いが識別される。生物が嗅覚をいかに重視しているかは、嗅覚受容体の遺伝子を数えると理解できる。その数、ヒトで約400、犬で800、アフリカゾウではなんと2000に達し、これだけで全遺伝子の数%~10%を占めるといわれている (Niimura et al., 2014)。

細菌から嗅細胞までのcAMPのシグナル伝達機構は、専門分野でないせいもあって、スッキリと疑問の余地なく解明されているような印象を受ける。最後に登場するPKAとEpacは、cAMPによって調節される生体機能の大部分に関わっていると推察されるが、作用機構がスッキリと解明されている分野は、私の知る限り必ずしも多くない。私が30年余り関わってきた唾液分泌における役割も、いまだ深い謎に包まれている。これを4つの謎に分けて解説しようというのが本稿の目的である。

### 1. 第1の謎：cAMPかCaイオンか？

1984年、米国NIH留学から当別町に戻り、私が唾液分泌機構の研究を始めたころ、世はまさにカルシウム・ブームの真っただ中であつた。前年、イノシトール1,4,5トリスリン酸 (IP<sub>3</sub>) による細胞内Ca<sup>2+</sup>動員実験の成功がNature誌に報じられ (Streb et al., 1983)、この結果と、神戸大学の西塚泰美教授が発見したプロテインキナーゼC (PKC) の偉大な研究成果が、この年Berridgeによって美事に統合された (Berridge, 1984)。すなわち、Ca<sup>2+</sup>動員性のホルモンによって活性化されたホスホリパーゼCは、細胞膜のイノシトールリン脂質を加水分解してIP<sub>3</sub>とジアシルグリセロール (DAG) を生成する。IP<sub>3</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアである小胞体からCa<sup>2+</sup>を遊離し、DAGは遊離したCa<sup>2+</sup>とともにPKCを活性化する。現在あらゆる生命科学の教科書に記載されている理論である。そして、翌1985年、札幌医科大学の竹村晴夫博士は、カルバコール刺激によって引き起こされる唾液腺細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度変化を、世界で初めて、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬Quin2を用いて測定した (Takemura, 1985)。この強烈な衝撃波は当別町を直撃した。驚いた私は図書館を飛び出し、直後に竹村先生の研究室を訪問して実験を見せて頂いたことを思い出す。この間の状況は東城庸介教授の総説に詳しい (東城, 2014)。

留学期間の後半、私は主としてパーコール密度勾配遠心法を用いて耳下腺の基底側細胞膜を精製し、Na<sup>+</sup>濃度勾配と共役したアミノ酸とCa<sup>2+</sup>の輸送を研究していた (Takuma et al., 1984; Takuma & Baum, 1985; Takuma et al., 1985; Helman et al., 1986)。帰国後、私はカルシウム・ブームに乗り遅れまいと、耳下腺細胞からアミラーゼ分泌を促進するセカンドメッセンジャーがcAMPか

Ca<sup>2+</sup>かという、今でも時々幽霊のように現れる“未解決”の問題に取り組むことにした (Messenger et al., 2014)。研究はButcherとPutneyの有名な総説 (Butcher & Putney, 1980) の精読から始まった。この総説には、1980年以前の唾液腺分泌機構研究のエッセンスが凝縮されている。ラット耳下腺のアミラーゼ分泌は、Schrammらによって1960年代からcAMP研究の実験モデルとして盛んに利用されていた。しかし、総説ではcAMPよりもむしろ勃興し始めたカルシウム・イオンの役割が強調されている。唾液タンパク質の分泌は、表面的にはcAMPが調節しているように見える。しかし、神経分泌や内分泌ばかりでなく、耳下腺とよく似た膵臓の外分泌でさえ、分泌シグナルの主役は明らかにCa<sup>2+</sup>である。BucherやPutneyらは、cAMPは(1)細胞内のCa<sup>2+</sup>を動員し、(2)Ca<sup>2+</sup>にたいする感受性を高めることによって、間接的に作用しているのであり、分泌に直接関与しているのは唾液腺においてもCa<sup>2+</sup>であると考えていた。他方、SchrammやQuissellらは、EGTAで長時間Ca<sup>2+</sup>を除去してもcAMPによるアミラーゼ分泌が残存することから、Ca<sup>2+</sup>の役割は必須ではないと主張していた。

この論争に一石を投ずべく、私は売り出されたばかりの極めて高価なIP<sub>3</sub>をシグマ社から購入し、実験を開始した。50 µg/mlのサポニンで細胞膜に“穴をあけた”耳下腺細胞にMg-ATPを添加するとCa<sup>2+</sup>ポンプが動きだし、小胞体に放射性のカルシウムイオン (<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>) が汲み上げられる。ここに10 µMのIP<sub>3</sub>を投入すると小胞体から<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>が明瞭に放出されるが、100 µMのcAMPでは全く放出されないことを1986年に証明することができた (図1) (Takuma & Ichida, 1986a)。同時に、プロテインキナーゼC (PKC) を直接活性化するフォルボールエステルを用い、PKCが耳下腺アミラーゼ分泌を促進することを明らかにすることができた (Takuma & Ichida, 1986b)。一方、東城先生のグループは、最新の蛍光分光光度計と改良されたCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬Fura2を用い、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を高感度にリアルタイム測定する実験系を確立し、βアゴニストのイソプロテレノールがCa<sup>2+</sup>濃度を上昇させずに分泌促進することを、疑問の余地なく証明した (Tojyo & Matsumoto, 1990; Tojyo et al., 1998)。これらの研究から、耳下腺細胞では、cAMPにCa<sup>2+</sup>動員作用がないことは明らかとなったが、cAMPが“Ca<sup>2+</sup>にたいする感受性を高める”ことによって分泌を促進するという説は、完全には否定されていない。

### 穴あき細胞の利用

IP<sub>3</sub>の実験で、私は細胞膜を透過できないIP<sub>3</sub>を耳下腺

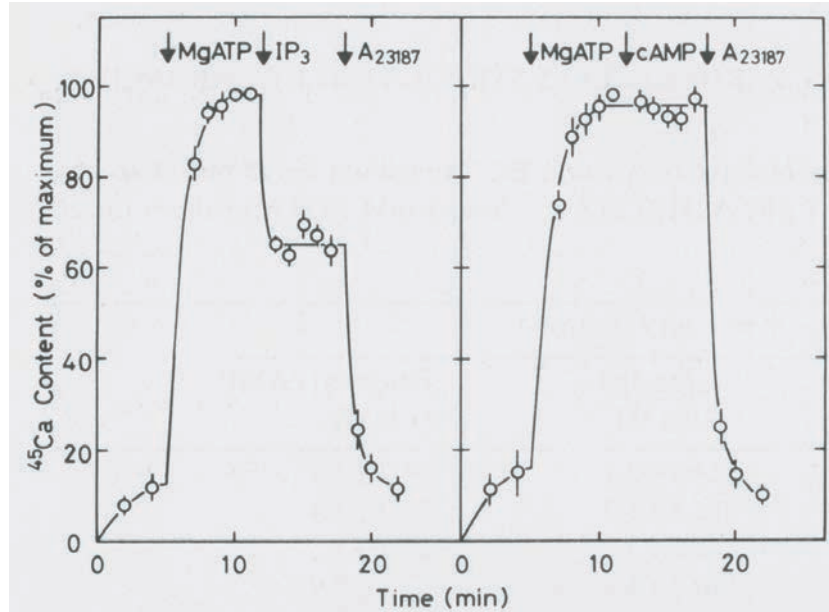


図1 サポニン (50 μg/ml) で細胞膜を透過性とした耳下腺細胞の小胞体に, Mg-ATPで放射性カルシウムイオン (<sup>45</sup>Ca) を取り込ませた後, IP<sub>3</sub> (10 μM), cAMP (100 μM), A23187 (5 μM) を加え, 細胞の<sup>45</sup>Caを迅速濾過法で測定した.

細胞内に導入するため, サポニンを用いた. サポニンは細胞膜のコレステロールと結合してミセルを形成し, 細胞膜に直径約10 nmの細孔をあけることが知られている. その後の7年間, 私はこの“穴あき細胞”を用いて耳下腺アミラーゼ分泌におけるcAMPとPKA (cAMP依存性プロテインキナーゼ) の役割を研究した (図2) (Takuma & Ichida, 1988).

“穴あき細胞”の利点をあげると,

1) EGTA存在下, Ca<sup>2+</sup>無添加でもcAMPによるアミ

ラーゼ分泌が誘導されることから, Ca<sup>2+</sup>とは無関係にcAMPによる分泌機構を研究できる.

2) 無傷細胞の場合, 膜透過性のcAMP誘導體でも, アミラーゼ分泌にはmMオーダーの非生理的な濃度を必要とする. しかし, “穴あき細胞”ではホスホジエステラーゼ阻害剤を共存させると, 1 μMという生理的な濃度から分泌が認められる.

3) 無傷細胞でタンパク質リン酸化を検出するには, 細胞を極めて高濃度の放射性無機リン酸<sup>32</sup>Pとともに長時

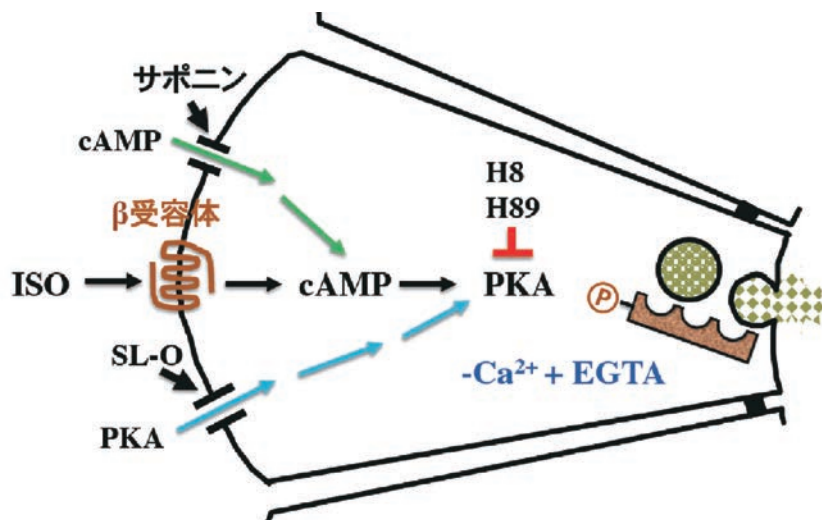


図2 “穴あき”耳下腺細胞を用いたアミラーゼ分泌機構研究の概要. サポニンやストレプトリシン-O (SL-O) を用いて調製した“穴あき細胞”に, イソプロテロール (ISO) などのβ作動薬が受容体に結合した後に合成され, 活性化される分子, または, それらの阻害分子を導入し, アミラーゼ分泌が再現できるかどうかを調べた. cAMPによる分泌は, Ca<sup>2+</sup>非存在下 (+EGTA) でも問題なく起こることが確認された. H8, H89はPKA阻害剤.

間インキュベートし、細胞内のATPを $^{32}\text{P}$ でプレラベルする必要がある。しかし、“穴あき細胞”では直接 $^{32}\text{P}$ -ATPを導入することができる。

4) 細胞膜を透過しないPKA特異的阻害ペプチド (PKI) を導入することが可能であり、また膜透過性の化学合成阻害剤を使用する場合でも、無傷細胞より低濃度で効果が得られる。

このような“穴あき細胞”の特性を利用し、様々なcAMP誘導体の導入実験を計画した。cAMP誘導体は、当時既に600種類以上も合成されていたが、新たにcAMPアンタゴニストと呼ばれるユニークな誘導体が登場した(図3)。サイクリックAMPには名前の由来となった環状構造を形成するリン酸基がある。このリン酸基の酸素原子を1箇所、硫黄原子Sに置換した誘導体(cAMPS)で、Sの置換位置によってSp-cAMPSとRp-cAMPSという2種類の異性体が生じる。このうちSp-cAMPSは元のcAMPと同様にPKAを活性化するが、Rp-cAMPSはPKAの調節サブユニットに結合するものの触媒サブユニットを遊離しないため、競合阻害分子として機能する(cAMPアンタゴニスト)。これらの誘導体は元のcAMPより細胞膜透過性が高く、肝細胞では無傷細胞でもアンタゴニスト効果が確認された。しかし、唾液腺の細胞膜はRp-cAMPSを透過せず、サポニン処理細胞を用いることによって始めて、Sp-cAMPSによるアミラーゼ分泌をRp-cAMPSが競合的に阻害することを証明することができた(図4)(Takuma & Ichida, 1991a)。実

験では、cAMPによるアミラーゼ分泌とタンパク質リン酸化は大変よく相関し、アミラーゼ分泌にPKAが関与していることを強く支持した。

## 2. 第2の謎：PKAによるリン酸化は必要か？

cAMPはPKAの調節サブユニットに結合し、タンパク質リン酸化活性をもつ触媒サブユニットを解放することによってPKAを活性化する。しかし、細胞にはPKAとは無関係にリン酸化されるタンパク質が数多く存在するため、PKAによるリン酸化を検出するには、分泌刺激後の細胞にひと手間かける必要があった。私は、タンパク質リン酸化研究のパイオニアの一人である愛知学院大学の金森孝雄先生にお電話し、検出方法を伝授して頂いた(Kanamori et al., 1974)。教わった通り、耳下腺細胞をホモジナイザーで破碎後、遠心分離機で膜画分を分画・濃縮することにより、cAMP依存性のタンパク質リン酸化を検出することができた。

当時、名古屋大学の日高弘義教授は、それまでのものより強力でしかも特異性の高いプロテインキナーゼ阻害剤を次々と開発し、脚光を浴びていた。私は、アミラーゼ分泌におけるPKAの役割を確立するため、日高研究室で1984年に開発されたH8と呼ばれるPKA阻害剤(Hidaka et al., 1984)を、おそらく世界で初めて分泌実験に使用した。H8は耳下腺細胞の上清と膜画分のPKA活性を濃度依存性に阻害した。また、H8は $\beta$ アゴニストであるイソプロテレノール(ISO)による21 kDaと26 kDaの

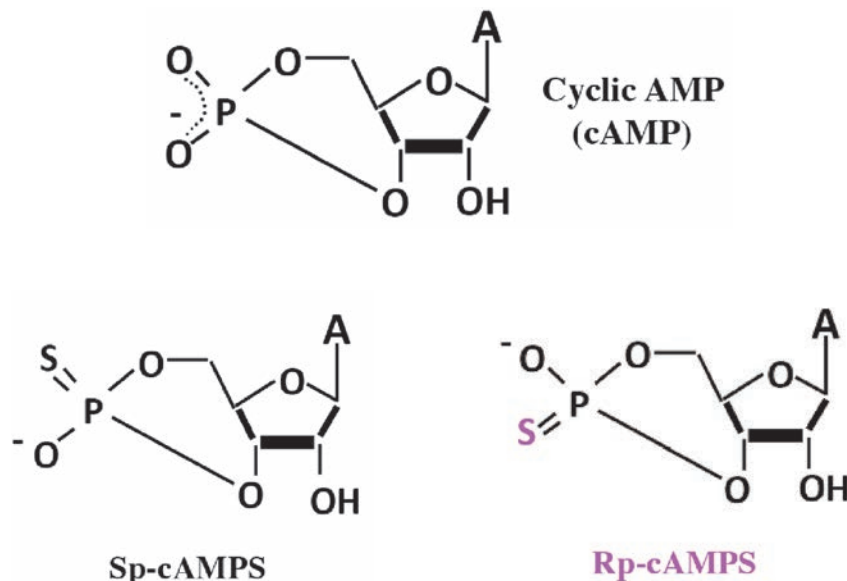


図3 cAMPとcAMPアンタゴニストの構造。サイクリックAMPの環状構造を形成するリン酸基の酸素原子を1箇所、硫黄原子に置換したもの。Sp-cAMPSの作用は元のcAMPと変わらないが、Rp-cAMPSはPKAの調節サブユニットに結合するものの触媒サブユニットを遊離しないため、cAMPの作用を競合阻害する。Aはアデニン塩基。



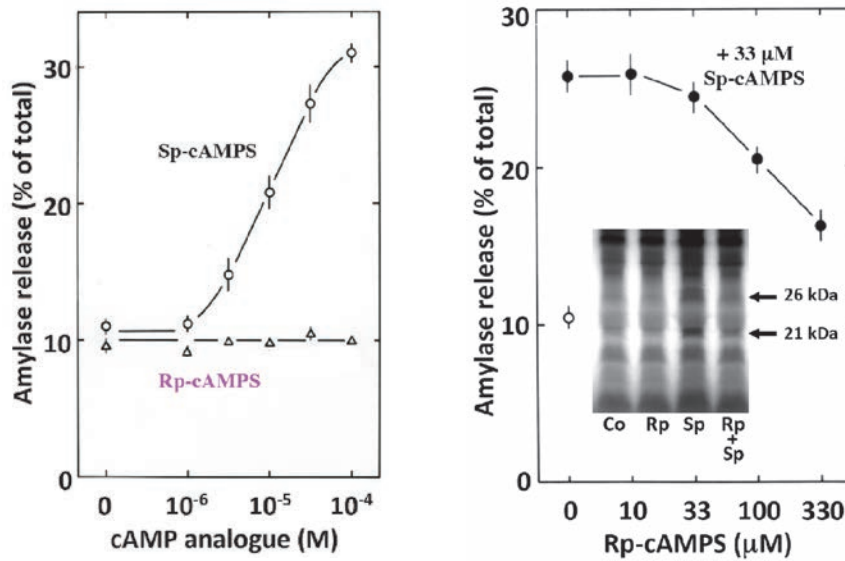


図4 Sp-cAMPSは“穴あき”耳下腺細胞からアミラーゼ分泌を促進するが、Rp-cAMPSには分泌促進作用がない。Rp-cAMPSは、Sp-cAMPS (33 μM) によるアミラーゼ分泌と21、26 kDa膜タンパク質のリン酸化を濃度依存性に阻害した。

膜タンパク質のリン酸化を強く阻害した。しかし、大変驚いたことに、H8はISOやcAMPによるアミラーゼ分泌を全く阻害しなかった(図5)。これは、cAMPによるアミラーゼ分泌にPKAによるタンパク質リン酸化が必要ないことを示す想定外の結果であった。私はこの結果を1987年、東日本学園大学が主管した第29回歯科基礎医学学会学術大会の前日、現在のサテライトシンポジウムのような形で開催された第1回唾液腺談話会で、「cAMPによるアミラーゼ分泌にセントラルドグマは有効か?」という、今から思うと随分と気負った題をつけて発表したものである。当時の私には、タンパク質リン酸化を介さないcAMPの作用は“セントラルドグマの否定”のよう

に感じられたのである(Takuma, 1988)。1988年夏、カナダのモントリオールで開催された第4回国際細胞生物学会に参加する旅の途中、私は米国NIHのDr. Baumの研究室とコロラド州デンバーのDr. Quissellの研究室でも講演した(図6)。Quissellは、βアゴニストやアンタゴニストによるアミラーゼ分泌の増減と、26 kDa膜タンパク質のリン酸化レベルの消長がよく相関することから、この膜タンパク質がアミラーゼ分泌に関与することを示唆する論文をPNAS誌に発表していた(Quissell et al., 1985)。今から思うとDr. Quissellには大変気の毒なことをしたが、私の講演は彼の主張を正面から否定する内容であった。

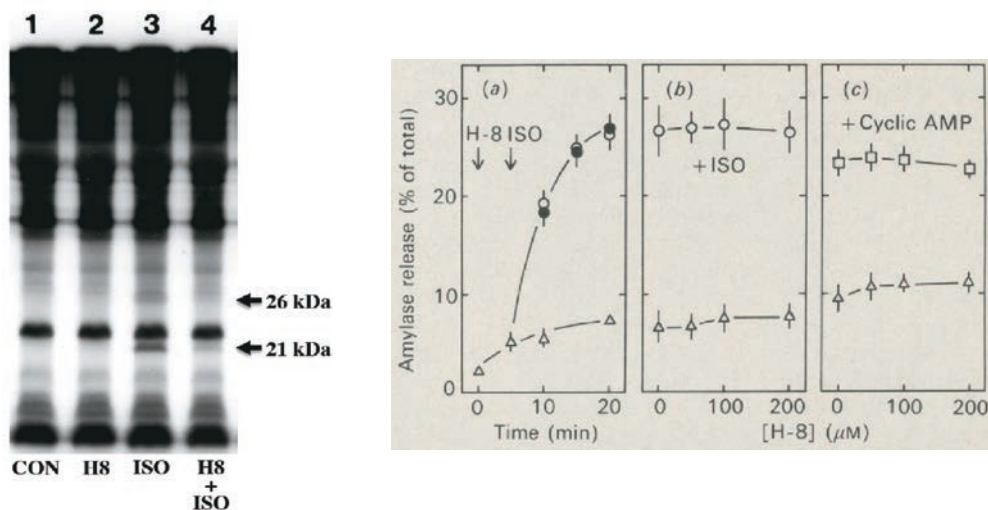


図5 PKA阻害剤のH8は、イソプロテレノール (ISO) 刺激によるタンパク質リン酸化を強く阻害したが、驚いたことに、ISOとcAMPによるアミラーゼ分泌を全く阻害しなかった。H8はISOまたはcAMPを加える5分前に添加した。



図6 1988年、モントリオールで開催された第4回国際細胞生物学会に参加する旅の途中、東城先生、瀬川先生とベセスダのNIHに立ち寄り講演した。筆者の隣はDr. Bruce Baum。背後の壁面には、当時の研究所の名称National Institute of Dental Researchと書かれている。

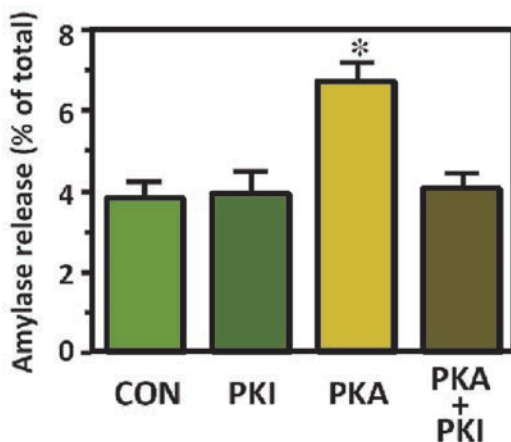
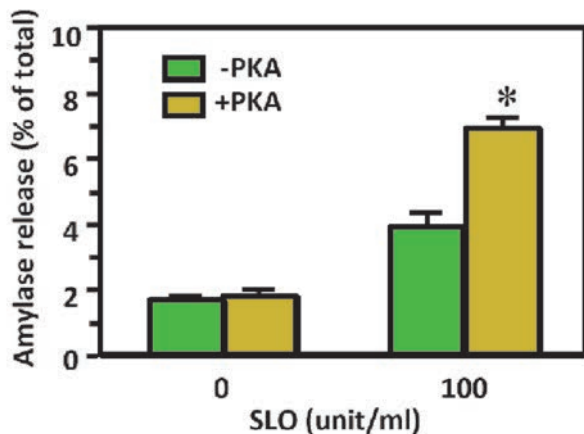


図7 サポニンより一回り大きい穴をあけるストレプトリシン-O (SLO) を用い、PKAの触媒サブユニット (分子量38 kDa) を耳下腺細胞に導入し、分泌の割合は低いが統計的に有意な分泌促進効果を確認した。触媒サブユニットによる分泌はSLOの存在下でしか起こらず、また、PKAの阻害ペプチド (PKI) によって完全に阻害された。

上述の実験結果は、その後、400  $\mu$ MのH8で15分間前処理した耳下腺細胞でも確認された (Takuma & Ichida, 1994b)。さらに、 $^{32}$ Pを使わず、転写因子CREBに対する抗リン酸化抗体を用いて、PKA活性をよりリアルタイムに近い条件でモニターしたところ、400  $\mu$ MのH8は、現在PKA阻害剤のスタンダードとなっているH89 (10  $\mu$ M) よりも強いPKA阻害効果を示した (Takuma et al., 1997b)。

### オカダ酸の効果

PKAはタンパク質のセリンまたはスレオニン残基をリン酸化することでその活性や機能を調節する。リン酸化されたタンパク質は、細胞内に存在するプロテイン・ホスファターゼによって脱リン酸化され、その活性は元のレベルに戻る。従って、プロテイン・ホスファターゼ活性を阻害するとタンパク質リン酸化レベルが上昇し、アミラーゼ分泌が誘導されることが予想された。当時、強力なプロテイン・ホスファターゼ阻害物質が日本人の手でクロイソカイメンから抽出され、オカダ酸と命名された。私は、市販される前のオカダ酸を藤沢薬品の築谷康桓博士から譲り受け、その効果を調べた (Takuma & Ichida, 1991b)。耳下腺細胞をオカダ酸で処理すると、タンパク質のリン酸化レベルは確かに上昇するが、アミラーゼ分泌は上昇せず、逆にcAMPによるアミラーゼ分泌を阻害した。同様の阻害効果は、オカダ酸とは全く構造の異なるカリクリンAというプロテイン・ホスファターゼ阻害剤によっても確認された (Takuma et al., 1993)。タンパク質リン酸化レベルの非特異的な上昇は、分泌を促進するどころかむしろ阻害することから、cAMPによる分泌促進にタンパク質リン酸化は必要ないか、あるいは極めて特異性の高いリン酸化が必要と考えられた。

### PKA触媒サブユニットの導入

アミラーゼ分泌におけるPKAの役割を確立するには、PKAの触媒サブユニット (分子量38 kDa) を直接耳下腺細胞に導入するのが最も確実である。1990年代に入り、サポニンよりひと回り大きい直径約15 nmの穴を細胞膜にあけるストレプトリシン-O (SL-O) を使い、細胞内に高分子物質を導入する論文をしばしば見かけるようになった。しかし、論文で使用されているウエルカム社製のSL-Oは日本では手に入らない。私は、カタログを徹底的に調べ、数社のSL-Oを取り寄せ、細胞膜穿孔活性を調べた。その結果、GIBCO社製のSL-Oに良好な穿孔活性が認められた。ただし、耳下腺細胞膜の穿孔に必要な

なSL-Oの溶血単位は、論文に報告されているウエルカム社の値より二桁も高かった。

次に、市販されているPKAの品定めを行った。S社の製品は、酵素の安定化剤とともに凍結乾燥されており、安定化剤が分泌顆粒に悪影響を及ぼした。他方、プロメガ社のPKAは極めて純度が高く、安定化剤を含んでいなかった。GIBCO社製のSL-Oとプロメガ社製のPKA触媒サブユニットを組合せ、高価な試薬を節約するため液量を下げる実験系を工夫した。その結果、サポニン処理細胞にcAMPを導入した実験と比べアミラーゼ分泌の割合は明らかに低いが、統計的に有意な分泌促進効果が認められた(図7)。分泌は、熱変性したPKAやPKA阻害ペプチドで前処理したPKAでは起こらないことから、PKAの触媒活性、すなわちタンパク質リン酸化に依存していることが証明された。この研究成果は1994年のJBCに発表され(Takuma & Ichida, 1994a)、日本唾液腺学会の奨励賞を受賞した。日本歯科大学新潟生命歯学部の中井あかね先生は、SL-Oで穿孔した耳下腺細胞にRab27とその関連因子の特異抗体を導入し、アミラーゼ分泌におけるそれら調節因子の役割を次々と明らかにしている(Imai et al., 2004a; Imai et al., 2004b; Imai et al., 2006; Imai et al., 2011; Imai et al., 2012; Imai et al., 2013)。

これまで述べてきたように、PKA阻害剤のH8はタンパク質リン酸化を強く阻害するにもかかわらず、アミラーゼ分泌は全く抑制せず、また、H8より25倍強力といわれるH89によっても、分泌は部分的にしか阻害されなかった(Takuma & Ichida, 1994b)。H89はアミラーゼ分泌を確かに阻害するが、高濃度のH89には明らかに副作用が認められた。他方、耳下腺細胞に導入したPKAの触媒サブユニットはその触媒活性、すなわちタンパク質リン酸化活性に依存して分泌を惹起した。これらの実験結果は明らかに矛盾する。しかし、次章で述べるように、PKAに依存しないcAMPの新たなシグナル伝達分子Epacの発見により、部分的ではあるが、この矛盾は説明可能となった。

### 3. 第3の謎：PKAかEpacか？

情報ネットワークの研究が、生命活動の隅々まで急速に広がり、膨大かつ精密な情報が集積するにつれ、最古参のシグナル伝達系であるcAMP/PKAの研究は、過去の遺物と見なされ、陽の当たらない片隅に追いやられた。cAMPにふたたび光が当たるのは、1998年PKAを介さない新たな作用機構としてEpac (exchange proteins directly activated by cAMP) が発見されたこと(de Rooij et al., 1998)(Kawasaki et al., 1998)、そして、消化管ホルモン

のインクレチンによるインスリン分泌増強機構の研究が目覚ましく進展したおかげと言っても過言でない(Seino & Shibasaki, 2005)。

血糖が上昇すると膵臓のβ細胞からインスリンが分泌される。これは、グルコース代謝の亢進によって増加したATPがATP依存性Kチャンネルを閉鎖し、その結果、膜電位依存性のCa<sup>2+</sup>チャンネルが開き、β細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度が上昇するためと考えられている。実際、β細胞の培養液を低グルコースから高グルコースへと“瞬時に”切り換えると、インスリン分泌は確かに増加する。しかし、培養液のグルコース濃度を生体内のように、ゆっくり時間をかけて徐々に上昇させると、驚いたことに、インスリン分泌はほとんど起こらない。この様な状況で、消化管細胞から分泌される2種類のインクレチン、すなわちグルカゴン様ペプチド(GLP1)とグルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチド(GIP)は、β細胞のcAMP濃度を上昇させ、PKA系とEpac系の両ルートを通じて、Ca<sup>2+</sup>依存性のインスリン分泌を増強すると考えられている。インクレチンやcAMPは、血糖上昇がなければインスリン分泌を促進しないため、異常な低血糖を引き起こさない安全な糖尿病治療薬の開発を目指して、活発な研究が展開している。

### Epacによるインスリン分泌増強機構

Epacは、別名cAMP-GEFともよばれ、低分子量Gタンパク質の一種RapをGDPと結合した不活性型からGTPと結合した活性型へと転換するGDP/GTP交換因子として働く。cAMPはEpacの調節ドメインに結合し、GDP/GTP交換作用をもつ触媒ドメインを露出させることでEpacを活性化する。Epacによるインスリン分泌増強機構として、以下のメカニズムが提唱されている(Shibasaki et al., 2014)。

1) cAMPによって活性化したEpacは、上述のRap1を活性化し、即分泌可能な分泌顆粒のプール(readily releasable pool: RRP)を増大させる。

2) EpacはCa<sup>2+</sup>動員に関わるIP<sub>3</sub>受容体とリアノジン受容体に働き、Ca<sup>2+</sup>誘導性のCa<sup>2+</sup>遊離(Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release: CICR)機構を活性化し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させる。CICRの活性化には、Epacとは別にPKAによるタンパク質リン酸化も関与すると考えられている。

3) より複雑なところでは、Epacと結合しインスリン分泌を促進するRim2αの作用機構が、神戸大学の清野進教授のグループにより詳細に解析されている(Yasuda et al., 2010)。RimはRab3-interacting moleculeを意味し、もともとRab3を結合するタンパク質として同定された。



しかし、その後Rab3に加え、図8に示すような分泌に関わる多くのタンパク質と相互作用し、いわゆる足場（スキヤフォールド）タンパク質として機能することが明らかとなった。Rim2 $\alpha$ と結合したRab3Aは分泌顆粒のドッキングに関わり、Munc13-1とSNAREはプライミングを促進し、さらにATP依存性KチャンネルのSUR-1やCa<sup>2+</sup>センサーのPiccolo、そして図には示されていない膜電位依存性のCa<sup>2+</sup>チャンネルを調節し、膜融合を誘導すると考えられている。詳細なメカニズムは不明だが、cAMPと結合したEpacは、足場タンパク質Rim2 $\alpha$ の働きをオーケストラの指揮者のように巧妙に組織化し、Ca<sup>2+</sup>によるインスリン分泌を増強していると推察される。

### PKAによるインスリン分泌増強機構

Epacの躍進に刺激されて、PKAによるリン酸化を介して分泌増強するタンパク質もいくつか発見されている（Brozzi et al., 2012 ; Song et al., 2011）。図8に示すMyRIPは、分泌顆粒の輸送に関わるミオシン、およびRab27と結合するタンパク質として同定された（Myosin-Rab27-interacting protein）。その後、PKAと結合してPKAの細胞内局在を規定するPKA anchoring proteinファミ

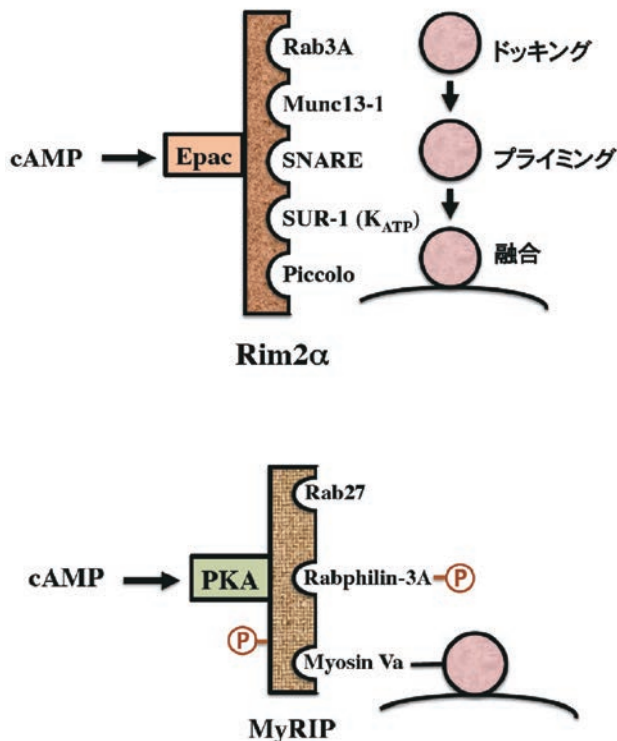


図8 インスリン分泌では、消化管ホルモンのインクレチンにより、EpacとPKAの2つのルートを通じて、Ca<sup>2+</sup>依存性の分泌が増強される。cAMP/Epacが結合するRim2 $\alpha$ とPKAがリン酸化するMyRIPは、ともに足場（スキヤフォールド）タンパク質であり、多くの分泌関連因子が結合し、それらの相互作用が効率化されることによってCa<sup>2+</sup>依存性の分泌が増強すると考えられている。

リーに属する“足場タンパク質”でもあることが明らかとなった（Goehring et al., 2007）。PKAと結合しリン酸化されたMyRIPは、分泌顆粒を連結したMyosin Vaとの結合が可能となり、引き続きPKAによるRabphilin-3Aのリン酸化を促進する（Brozzi et al., 2012）。上述したRim2 $\alpha$ と同様に、MyRIPは多数の分泌関連因子と結合する足場タンパク質であり、PKAによるリン酸化を介して、複合体を構成する各構成員の働きを効率化し、Ca<sup>2+</sup>によるインスリン分泌を増強すると考えられている。

日本歯科大学新潟生命歯学部の新井先生は、耳下腺にもMyRIP（別名Slac2-c）が発現しており、分泌顆粒の上でSlac2-cとRab27Bが複合体を形成していることを明らかにした（Imai et al., 2004b）。PKAによるリン酸化については検討されていないが、Slac2-cとRab27Bの複合体を壊す特殊な抗体をSL-Oで穿孔した耳下腺細胞に導入し、イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌が阻害されるのを確認している。

### Epacによる耳下腺アミラーゼ分泌

耳下腺アミラーゼ分泌におけるEpacの関与は、Epacに選択的に結合するcAMP誘導体を用いて調べられた。PKAへの結合にはcAMPのリボースの2'位がOHである必要があるため、この部位をメチル化（O-Me）したcAMP誘導体（8-pCPT-2'-O-Me-cAMP）はEpacを選択的に活性化する。日本歯科大学新潟生命歯学部の下村浩巳教授は、このEpac選択的誘導体が、cAMPの約30%程度ではあるが耳下腺アミラーゼ分泌を誘導すること、しかもPKA阻害剤のH89がこの分泌を阻害しないことを明らかにした（Shimomura et al., 2004）。耳下腺にはEpac1とRim2が発現しており、これらがPKA非依存性のアミラーゼ分泌に関与していると想像される。他方、cAMPのアデニン塩基のN6を修飾した誘導体は、PKAを選択的に活性化する。我々の過去の実験で、N6ベンゾイルcAMPはアミラーゼ分泌を強力に促進しており（Takuma, 1990）、耳下腺アミラーゼ分泌ではPKA系の役割がEpac系よりも大きいかも知れない。唾液腺におけるEpacの研究は、まだ端緒についたばかりである。

これまで見てきたように、アミラーゼ分泌とインスリン分泌におけるcAMPの役割には顕著な違いが認められる。PKA系とEpac系のいずれを介するにせよ、cAMPは単独でもアミラーゼ分泌を惹起できるのに対し、cAMP単独ではインスリン分泌を誘導できない点である。この違いを全く無視して、耳下腺アミラーゼ分泌においても、インスリン分泌と同様に、分泌に直接関与するのはCa<sup>2+</sup>であり、cAMPはCa<sup>2+</sup>による分泌を増強しているだ



けと解釈することに、私は強い違和感を禁じ得ない (Messenger et al., 2014).

#### 4. 第4の謎：唾液分泌に関与するSNAREは何か？

2013年のノーベル医学生理学賞は、神経分泌と細胞内小胞輸送における「SNARE仮説」(Sollner et al., 1993)の確立に貢献した3人の研究者、Rothman, Scheckman, Sudhofに授与された。SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) とは、細胞内の小胞輸送において、小胞膜とその輸送先の標的膜を融合させる過程に働く1群の膜タンパク質をさし、ヒトでは約40種類のSNARE遺伝子が知られている (図9) (Hong, 2005)。最も研究の進んでいる神経細胞では、神経伝達物質を含むシナプス小胞膜にv-SNARE (vesicle-SNARE) としてVAMP2、標的となるシナプス前膜にはt-SNARE (target-SNARE) としてSyntaxin1とSNAP25が存在する。各SNAREには、SNAREモチーフと呼ばれる約70アミノ酸からなる $\alpha$ ヘリックス構造が存在し、適切な組合せのv-SNAREとt-SNAREでは、互いのSNAREモチーフ同士がしめ縄のように巻き付いてコイルドコイル構造を形成する (Qa,b,c + Rの法則)。このSNARE複合体形成により、ジッパーが閉じられるようにシナプス小胞とシナプス前膜が接触し、融合すると考えられている (Jahn & Scheller, 2006)。一般的な分泌タンパク質の場合、粗面小胞体で合成されたタンパク質を含む小胞はゴルジ装置に輸送され、ゴルジ装置での選別濃縮をへて分泌小胞となった後、細胞膜の特定領域と融合し細胞外へ放出される。複雑に入り組んだ細胞内物流において、SNAREは“お届け先”と“配達時刻”

を厳密に指定する“伝票”の役割を果たしている。

遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いた研究により、唾液タンパク質の開口分泌に関わることが確立しているSNAREは、今のところVAMP8だけである (Wang et al., 2004)。VAMP8 KOマウスの腭外分泌細胞には分泌低下による分泌顆粒の異常な蓄積が認められたが、2007年の続報で、唾液腺を含む他の外分泌腺にも同様の影響が確認された (Wang et al., 2007)。VAMP8はアミラーゼやムチンを含む分泌顆粒膜に発現するv-SNAREであるが、VAMP8が唾液腺におけるv-SNAREの主役かどうか、結論はまだ出ていない。実際、VAMP8をKOしてもアミラーゼ分泌は完全には停止しない。膵臓では、VAMP8は異常に強い分泌刺激により分泌顆粒同士が次々と数珠つなぎに融合する複合分泌や、アルコール性膵炎の際、分泌顆粒が正常な分泌とは逆方向の基底膜と融合する病的な分泌に関与することが知られている (Cosen-Binker et al., 2008 ; Gaisano, 2001 ; Lam et al., 2007)。

それでは正常な分泌に関わるv-SNAREは何であろうか。VAMP2がその有力候補と考えられている。日本大学松戸歯学部の吉垣純子先生は、SL-Oで細胞膜に穴をあけた耳下腺細胞に、VAMP2を特異的に加水分解するボツリヌス毒素Bを導入し、VAMP2の分解レベルに相当するアミラーゼ分泌の低下を観察している (Fujita-Yoshigaki et al., 1996)。他方、膵外分泌細胞にはVAMP2とVAMP8を個別に発現する2種類の分泌顆粒が存在するという報告もある (Weng et al., 2007)。VAMP2とVAMP8のどちらが主要なv-SNAREか、結論はまだ出ていない。

名称	細胞内局在	アミノ酸	SNAREモチーフ	タイプ
Syntaxin1	PM	288	202-254	Qa
Syntaxin2	PM	288	201-253	Qa
Syntaxin3	PM	289	201-253	Qa
Syntaxin4	PM	297	210-262	Qa
Syntaxin5	Go	301	219-271	Qa
Syntaxin6	TGN, End	255	173-225	Qc
Syntaxin7	EE, LE	261	175-227	Qa
Syntaxin8	EE, I.F.	236	155-207	Qc
Syntaxin10	TGN	249	167-219	Qc
Syntaxin11	TGN, LE	287	214-266	Qa
Syntaxin13	EE	276	188-240	Qa
Syntaxin16	TGN	325	240-292	Qa
Syntaxin17	ER	302	172-224	Qa
Syntaxin18	ER	335	253-305	Qa
SNAP-23	PM	211	24-76, 156-208	Qb, Qc
SNAP-25	PM	206	29-81, 150-202	Qb, Qc
SNAP-29	Go, End	258	60-112, 206-258	Qb, Qc
VAMP1	SV	118	34-86	R
VAMP2	SV	116	32-84	R
VAMP3	EE, RE	100	15-67	R
VAMP4	TGN, EE	141	53-105	R
VAMP5	PM	116	6-58	R
VAMP7	LE, Ly, PM	220	126-178	R
VAMP8	EE, LE	100	13-65	R

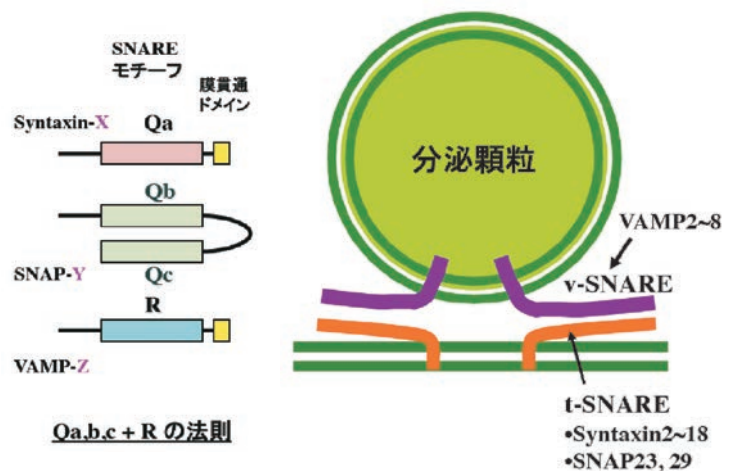


図9 SNARE仮説とおもなSNAREタンパク質。ヒトでは輸送小胞と輸送先となる膜系に約40種類のSNAREタンパク質が発現しており、SNAREモチーフがQa, b, c + Rとなる組み合わせで複合体が形成され、膜融合が起こると考えられている。

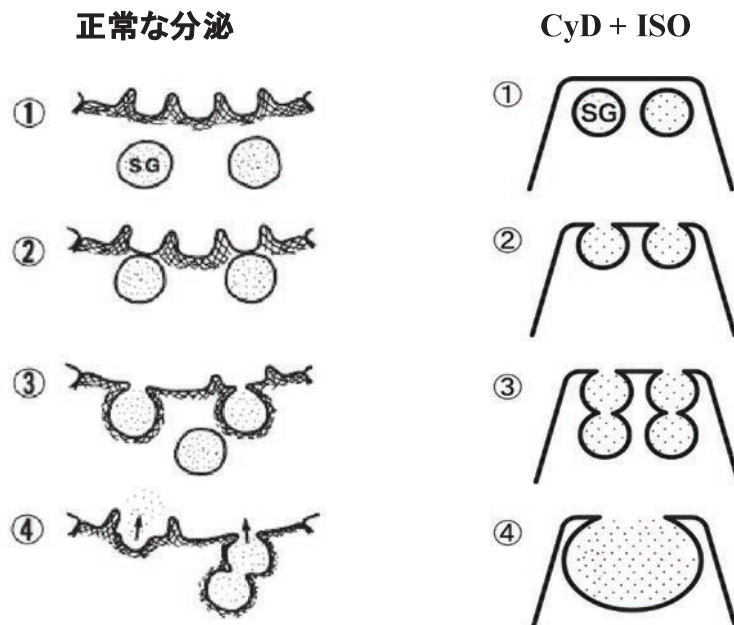
## 唾液腺のSNARE複合体

1997年の論文で、私はラットの耳下腺にVAMP2とNSF、 $\alpha$ SNAPを含む何らかのSNARE複合体が存在することを報告した (Takuma et al., 1997a). また2000年の論文では、免疫沈降によりSNAP23とSyntaxin4のt-SNARE同士の複合体は検出できるが、t-SNAREと分泌顆粒膜のv-SNAREが結合した“トランス型のSNARE複合体” (分泌顆粒膜と細胞膜の膜融合時に形成され、分泌後は解体・リサイクルされる複合体) は検出できないことを報告した (Takuma et al., 2000).

その後、SNAREの免疫沈降に使える良い抗体が多数作られ、またウエスタンブロット法に用いる化学発光液と検出装置の感度が格段に上昇した。これらの技術的進歩のおかげで、2012年、私達はHeLa細胞においてt-SNAREとv-SNAREが結合したトランス型複合体を検出することに成功した (Okayama et al., 2012). トランス型複合体を検出するには、複合体の解体・リサイクルに関わるNSFの働きを止めるため、N-エチルマレイミドという試薬を用い、細胞を低温で処理する必要があった。この方法を応用し、私は10年余り前に挫折した耳下腺細胞のトランス型複合体の検出に再チャレンジすることにした。

優秀な抗体のおかげで、耳下腺細胞に存在する多様なSNARE複合体を検出することができた。その中にはアミラーゼ分泌に関わるトランス型複合体の候補も含まれていたが、残念なことにN-エチルマレイミドで処理した耳下腺をISOで分泌刺激しても、SNARE複合体の増加は認められなかった。そこで、私はアクチン線維を脱重合するサイトカラシンD (CyD) の使用を思いついた。CyDのことは、10年間、夢のなかでずっと考えていたような気がする。過去の研究で、CyDは管腔側細胞膜直下のアクチン線維を脱重合することにより、分泌顆粒と細胞膜の接近を促進すること、また、融合した分泌顆粒膜の回収をストップすることにより、管腔側細胞膜を膨大させることが知られていた (図10) (Segawa & Yamashina, 1989; Tojyo et al., 1989; Okumura et al., 1990). CyDにより、私は分泌顆粒膜の回収・再利用系がストップすると同時に、SNARE複合体の解体・再利用系もストップするのではないかと考えたのである。

CyDの存在下、アミラーゼ分泌を促進するISOで耳下腺を刺激し、様々な抗体を用いてSNAREタンパク質を免疫沈降した。その結果、abcam社製のSNAP23抗体を使って免疫沈降し、長時間露光した時、それまでの一般的な露光時間では検出できなかった極めて微量のVAMP2を検出することに成功した。しかも、このSNAP23-



Segawa & Yamashina 1989

### 膜とSNAREのリサイクル停止?

図10 唾液腺の管腔側細胞膜の直下に存在するアクチン線維層は、分泌刺激がない場合、分泌顆粒と細胞膜の接近を妨げるバリアーとして機能しているが、ひとたび分泌が刺激されると、分泌物の排出と融合した分泌顆粒膜の迅速な回収・リサイクルに関与すると考えられている。アクチン線維を脱重合するサイトカラシンD (CyD) は、アクチン線維層を破壊するため、分泌物の排出と分泌顆粒膜の回収がストップし、管腔が膨大する。

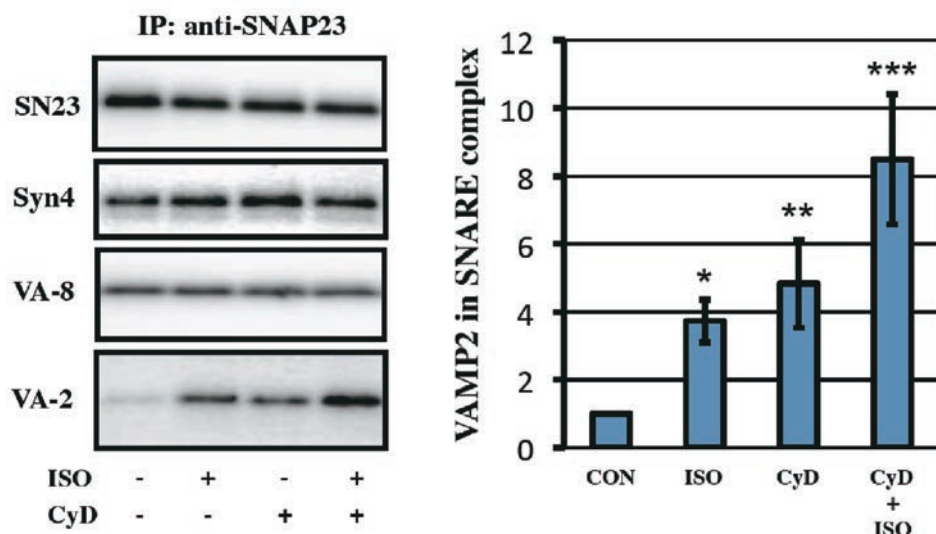


図11 サイトカラシンD (CyD) 存在下, 耳下腺をイソプロテレノール (ISO) で分泌刺激すると, 通常はほとんど検出できないSNAP23 (SN23) とVAMP2 (VA-2) のトランス型SNARE複合体が有意に増加し, 検出可能となる. Syn4, Syntaxin4; VA-8, VAMP8.

VAMP2複合体は, ISOとCyDの単独処理によりそれぞれ明瞭に増加し, 両者の同時刺激によってさらに相加的な増加が認められた (図11) (Takuma et al., 2013). 私は, この微量の複合体こそ, 分泌時に細胞膜上で一過性に形成されるが, その後の解体・再利用が極めてすみやかに行われるため, 正常な唾液腺では存在量が非常に少ない“トランス型SNARE複合体”ではないかと考えている.

この実験により, 細胞膜に存在するt-SNAREのSNAP23と分泌顆粒膜に存在するv-SNAREのVAMP2が唾液アミラーゼ分泌に関与している可能性が強く示唆されたが, 未解決の問題が2点残った. 第1に, トランス型SNARE複合体のもう一つのt-SNAREであるSyntaxinが何か不明であること. 第2に, VAMP8の役割を示唆する結果が得られなかったことである.

### 唾液分泌に関わるSyntaxinは何か?

分泌方向が厳密に規定されている外分泌細胞では, 主として基底側細胞膜に発現するSyntaxin4が正常な分泌におけるSyntaxinの候補から外されるのは仕方のないことである. 腺外分泌では, 管腔側細胞膜に発現するSyntaxin2と分泌顆粒膜に発現するSyntaxin3が有力候補に想定されているが, 確実な証拠はない (Pickett et al., 2007; Weng et al., 2007).

3種類の分泌顆粒 ( $\alpha$ 顆粒, 有芯小胞, リソソーム顆粒) を含む血小板では, v-SNAREとしてVAMP8が主要な役割を果たし, VAMP2とVAMP3が補助的な役割を果たしている. 他方t-SNAREとしてはSNAP23に加えて, 中和抗体の導入実験からSyntaxin2またはSyntaxin4の関

与が想像されていた. ところが, 最近, 家族性血球貪食症候群 (familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL) という遺伝病の解析と, Syntaxin2, Syntaxin4のKO細胞を用いた解析から, 血小板分泌におけるSyntaxin2とSyntaxin4の役割は完全に否定され, Syntaxin11が必須の役割を果たしていることが証明された (Ye et al., 2012). Syntaxin11は, ほとんどの組織に発現しており, 膜貫通ドメインをもたないものの大部分膜画分に存在し, SNAP23と複合体を形成する. Syntaxin11は, 過去に外分泌への関与が想定されたことがなく, 唾液腺での研究が待たれる.

### SNAP23のリン酸化による調節

副腎髄質のクロマフィン細胞では, SNAP23と遺伝子的に近いSNAP25がPKAによってリン酸化されることにより, 即分泌可能な分泌顆粒のプール (readily releasable pool: RRP) が増大するといわれている (Nagy et al., 2004). インスリン分泌細胞では, SNAP25の結合タンパク質であるsnapinをPKAがリン酸化し, その結果, SNAP25とVAMP2の相互作用が促進され, 分泌が増強すると考えられている (Song et al., 2011). SNAP23はSNAP25のユビキタスなホモログであり, PKAによってリン酸化されるかどうか大変興味深い. 実際, SNAP23のリン酸化が分泌を促進している証拠がある. ただし, リン酸化を触媒する酵素はPKAではなくIkBキナーゼ (IKK) であり, 分泌促進が確認されているのは肥満細胞と血小板である (Karim et al., 2013; Suzuki & Verma, 2008). IKK遺伝子のコンディショナル・ノックアウト



と薬物による阻害により、SNAP23の95番目のセリンまたは120番目のセリンのリン酸化がブロックされた肥満細胞と血小板では、分泌が著しく低下し、出血時間の延長が見られた。今の所、SNAP23のセリンがPKAによってもリン酸化されるかどうか、またIKKシグナルの上流にcAMPやPKAの関与があるかどうかは知られていない。前半で述べたISOによってリン酸化される26 kDa膜タンパク質とSNAP23の異同も、大変気になる所である。

### おわりに

長年研究対象としてきたcAMPによる唾液タンパク質の分泌機構について、直接関わることできたわずかばかりの研究成果と背後に残された未解明の謎について述べてきた。最大の謎、PKAと開口分泌をつなぐPKAの基質は何かという課題は、唾液腺の分泌機構だけに留まらず、広く生物学的普遍性をもった課題と考えられるが、謎のまま埃をかむり、記憶の底に沈む可能性もある。日進月歩の生命科学研究が、副産物のような形であっても、この課題を解き明かす日が来ることを楽しみに待ちたいと思う。

### 謝 辞

総説執筆を許可して下さった石井久淑編集長に感謝申し上げます。総説の中にお名前を記させて頂いた諸先生と、紙幅の都合でお名前を割愛せざるを得なかった諸先生には、研究を進める上で大変お世話になりました。心から感謝申し上げます。また、研究についてディスカッションし、アドバイスを頂いた唾液腺ゼミの諸先生のご親切に感謝申し上げます。最後に、これまで長い間実験をサポートしてくれた生化学分野の荒川俊哉准教授、歯科矯正学分野の岡山三紀助教、そして旧教室員の設楽彰子博士に心から感謝致します。

### 文 献

- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220 : 345–360, 1984.
- Brozzi F, Lajus S, Diraison F, Rajatileka S, Hayward K, Regazzi R, Molnar E & Varadi A. MyRIP interaction with MyoVa on secretory granules is controlled by the cAMP–PKA pathway. *Mol. Biol. Cell* 23 : 4444–4455, 2012.
- Butcher FR & Putney JW, Jr.. Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13 : 215–249, 1980.
- Cosen–Binker LI, Binker MG, Wang CC, Hong W & Gaisano HY. VAMP8 is the v–SNARE that mediates basolateral exocytosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *J. Clin. Invest.* 118 : 2535–2551, 2008.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A & Bos JL. Epac is a Rap1 guanine–nucleotide–exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396 : 474–477, 1998.
- Fujita–Yoshigaki J, Dohke Y, Hara–Yokoyama M, Kamata Y, Kozaki S, Furuyama S & Sugiya H. Vesicle–associated membrane protein 2 is essential for cAMP–regulated exocytosis in rat parotid acinar cells. The inhibition of cAMP–dependent amylase release by botulinum neurotoxin B. *J. Biol. Chem.* 271 : 13130–13134, 1996.
- Gaisano HY. Supramaximal cholecystokinin displaces Munc18c from the pancreatic acinar basal surface, redirecting apical exocytosis to the basal membrane. *J. Clin. Invest.* 108 : 1597–1611, 2001.
- Goehring AS, Pedroja BS, Hinke SA, Langeberg LK & Scott JD. MyRIP anchors protein kinase A to the exocyst complex. *J. Biol. Chem.* 282 : 33155–33167, 2007.
- Helman J, Kuyatt BL, Takuma T, Seligmann B & Baum BJ. ATP–dependent calcium transport in rat parotid basolateral membrane vesicles. Modulation by agents which elevate cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 261 : 8919–8923, 1986.
- Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S & Sasaki Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23 : 5036–5041, 1984.
- Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1744 : 120–144, 2005.
- Imai A, Nashida T & Shimomura H. Roles of Munc18–3 in amylase release from rat parotid acinar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 422 : 175–182, 2004a.
- Imai A, Yoshie S, Nashida T, Shimomura H & Fukuda M. The small GTPase Rab27B regulates amylase release from rat parotid acinar cells. *J. Cell Sci.* 117 : 1945–1953, 2004 b.
- Imai A, Yoshie S, Nashida T, Shimomura H & Fukuda M. Functional involvement of Noc2, a Rab27 effector, in rat parotid acinar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 455 : 127–135, 2006.
- Imai A, Yoshie S, Ishibashi K, Haga–Tsujimura M, Nashida T, Shimomura H & Fukuda M. EPI64 protein

- functions as a physiological GTPase-activating protein for Rab27 protein and regulates amylase release in rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* 286 : 33854–33862, 2011.
- Imai A, Yoshie S, Haga-Tsujimura M, Nashida T & Shimomura H. Exocyst subunits are involved in isoproterenol-induced amylase release from rat parotid acinar cells. *Eur. J. Oral Sci.* 120 : 123–131, 2012.
- Imai A, Ishida M, Fukuda M, Nashida T & Shimomura H. MADD/DENN/Rab3GEP functions as a guanine nucleotide exchange factor for Rab27 during granule exocytosis of rat parotid acinar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 536 : 31–37, 2013.
- Jahn R & Scheller RH. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 : 631–643, 2006.
- Kanamori T, Hayakawa T & Nagatsu T. Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase and amylase secretion from rat parotid gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57 : 394–398, 1974.
- Karim ZA, Zhang J, Banerjee M, Chicka MC, Al Hawas R, Hamilton TR, Roche PA & Whiteheart SW. IkappaB kinase phosphorylation of SNAP-23 controls platelet secretion. *Blood* 121 : 4567–4574, 2013.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE & Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282 : 2275–2279, 1998.
- Lam PP, Cosen Binker LI, Lugea A, Pandol SJ & Gaisano HY. Alcohol redirects CCK-mediated apical exocytosis to the acinar basolateral membrane in alcoholic pancreatitis. *Traffic* 8 : 605–617, 2007.
- Messenger SW, Falkowski MA & Groblewski GE. Ca(2+)-regulated secretory granule exocytosis in pancreatic and parotid acinar cells. *Cell Calcium* 55 : 369–375, 2014.
- Nagy G, Reim K, Matti U, Brose N, Binz T, Rettig J, Nehler E & Sorensen JB. Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41 : 417–429, 2004.
- Niimura Y, Matsui A & Touhara K. Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. *Genome Res.* 24 : 1485–1496, 2014.
- Okayama M, Shitara A, Arakawa T, Tajima Y, Mizoguchi I & Takuma T. SNARE proteins are not excessive for the formation of post-Golgi SNARE complexes in HeLa cells. *Mol. Cell Biochem.* 366 : 159–168, 2012.
- Okumura K, Tojo Y & Kanazawa M. Changes in microfilament distribution during amylase exocytosis in rat parotid salivary glands in vitro. *Arch. Oral Biol.* 35 : 677–679, 1990.
- Pickett JA, Campos-Toimil M, Thomas P, Edwardson JM (2007). Identification of SNAREs that mediate zymogen granule exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 359 (3) : 599–603.
- Quissell DO, Deisher LM & Barzen KA. The rate-determining step in cAMP-mediated exocytosis in the rat parotid and submandibular glands appears to involve analogous 26-kDa integral membrane phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 3237–3241, 1985.
- Segawa A & Yamashina S. Roles of microfilaments in exocytosis : a new hypothesis. *Cell Struct. Funct.* 14 : 531–544, 1989.
- Seino S & Shibasaki T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol. Rev.* 85 : 1303–1342, 2005.
- Shibasaki T, Takahashi T, Takahashi H & Seino S. Cooperation between cAMP signalling and sulfonylurea in insulin secretion. *Diabetes Obes. Metab.* 16 Suppl. 1 : 118–125, 2014.
- Shimomura H, Imai A & Nashida T. Evidence for the involvement of cAMP-GEF (Epac) pathway in amylase release from the rat parotid gland. *Arch. Biochem. Biophys.* 431 : 124–128, 2004.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P & Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362 : 318–324, 1993.
- Song WJ, Seshadri M, Ashraf U, Mdluli T, Mondal P, Keil M, Azevedo M, Kirschner LS, Stratakis CA & Hussain MA. Snapin mediates incretin action and augments glucose-dependent insulin secretion. *Cell Metab.* 13 : 308–319, 2011.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ & Schulz I. Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306 : 67–69, 1983.
- Suzuki K & Verma IM. Phosphorylation of SNAP-23 by IkappaB kinase 2 regulates mast cell degranulation. *Cell* 134 : 485–495, 2008.
- Takemura H. Changes in cytosolic free calcium concentra-

- tion in isolated rat parotid cells by cholinergic and beta-adrenergic agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131 : 1048–1055, 1985.
- Takuma T, Kuyatt BL & Baum BJ. Alpha 1-adrenergic inhibition of protein synthesis in rat submandibular cells. *Am. J. Physiol.* 247 : G284–289, 1984.
- Takuma T & Baum BJ. Na<sup>+</sup>-dependent transport of alpha-aminoisobutyrate in isolated basolateral membrane vesicles from rat parotid glands. *Biochim. Biophys. Acta* 812 : 453–459, 1985.
- Takuma T, Kuyatt BL & Baum BJ. Calcium transport mechanisms in basolateral plasma membrane-enriched vesicles from rat parotid gland. *Biochem. J.* 227 : 239–245, 1985.
- Takuma T & Ichida T. Does cyclic AMP mobilize Ca<sup>2+</sup> for amylase secretion from rat parotid cells? *Biochim. Biophys. Acta* 887 : 113–117, 1986a.
- Takuma T & Ichida T. Phorbol ester stimulates amylase secretion from rat parotid cells. *FEBS lett.* 199 : 53–56, 1986b.
- Takuma T. Evidence against direct involvement of cyclic AMP-dependent protein phosphorylation in the exocytosis of amylase. *Biochem. J.* 256 : 867–871, 1988.
- Takuma T & Ichida T. Amylase secretion from saponin-permeabilized parotid cells evoked by cyclic AMP. *J. Biochem.* 103 : 95–98, 1988.
- Takuma T. Evidence for the involvement of cAMP-dependent protein kinase in the exocytosis of amylase from parotid acinar cells. *J. Biochem.* 108 : 99–102, 1990.
- Takuma T & Ichida T. Cyclic AMP antagonist Rp-cAMPS inhibits amylase exocytosis from saponin-permeabilized parotid acini. *J. Biochem.* 110 : 292–294, 1991a.
- Takuma T & Ichida T. Okadaic acid inhibits amylase exocytosis from parotid acini stimulated by cyclic AMP. *FEBS lett.* 285 : 124–126, 1991b.
- Takuma T, Ichida T, Okumura K & Kanazawa M. Protein phosphatase inhibitor calyculin A induces hyperphosphorylation of cytokeratins and inhibits amylase exocytosis in the rat parotid acini. *FEBS lett.* 323 : 145–150, 1993.
- Takuma T & Ichida T. Catalytic subunit of protein kinase A induces amylase release from streptolysin O-permeabilized parotid acini. *J. Biol. Chem.* 269 : 22124–22128, 1994a.
- Takuma T & Ichida T. Evidence for the involvement of protein phosphorylation in cyclic AMP-mediated amylase exocytosis from parotid acinar cells. *FEBS lett.* 340 : 29–33, 1994b.
- Takuma T, Tagaya M & Ichida T. Evidence for the putative docking/fusion complex of exocytosis in parotid acinar cells. *FEBS lett.* 404 : 34–36, 1997a.
- Takuma T, Tajima Y & Ichida T. Regulation of CREB phosphorylation by cAMP and Ca<sup>2+</sup> in parotid acinar cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43 : 563–570, 1997b.
- Takuma T, Arakawa T & Tajima Y. Interaction of SNARE proteins in rat parotid acinar cells. *Arch. Oral Biol.* 45 : 369–375, 2000.
- Takuma T, Shitara A, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I & Tajima Y. Isoproterenol stimulates transient SNAP23-VAMP2 interaction in rat parotid glands. *FEBS Lett.* 587 : 583–589, 2013.
- 東城庸介. 蛍光指示薬を用いた唾液腺カルシウム動態の研究. その回顧と展望. *日唾誌* 55 : 59–68, 2014.
- Tojyo Y, Okumura K, Kanazawa M & Matsumoto Y. Effect of cytochalasin D on acinar cell structure and secretion in rat parotid salivary glands in vitro. *Arch. Oral Biol.* 34 : 847–855, 1989.
- Tojyo Y & Matsumoto Y. Inhibitory effects of loading with the calcium-chelator 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) on amylase release and cellular ATP level in rat parotid cells. *Biochem. Pharmacol.* 39 : 1775–1779, 1990.
- Tojyo Y, Tanimura A, Nezu A & Matsumoto Y. Activation of beta-adrenoceptors does not cause any change in cytosolic Ca<sup>2+</sup> distribution in rat parotid acinar cells. *Eur. J. Pharmacol.* 360 : 73–79, 1998.
- Wang CC, Ng CP, Lu L, Atlashkin V, Zhang W, Seet LF & Hong W. A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Dev. Cell* 7 : 359–371, 2004.
- Wang CC, Shi H, Guo K, Ng CP, Li J, Gan BQ, Chien Liew H, Leinonen J, Rajaniemi H, Zhou ZH, Zeng Q & Hong W. VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. *Mol. Biol. Cell* 18 : 1056–1063, 2007.
- Weng N, Thomas DD & Groblewski GE. Pancreatic acinar cells express vesicle-associated membrane protein 2- and 8-specific populations of zymogen granules with distinct and overlapping roles in secretion. *J. Biol. Chem.* 282 : 9635–9645, 2007.



Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, Numata T, Mori Y, Miyazaki J, Miki T & Seino S. Rim2alpha determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metab.* 12 : 117–129, 2010.

Ye S, Karim ZA, Al Hawas R, Pessin JE, Filipovich AH & Whiteheart SW. Syntaxin–11, but not syntaxin–2 or syntaxin–4, is required for platelet secretion. *Blood* 120 : 2484–2492, 2012.



田隈 泰信

昭和49年 3月 北海道大学理学部生物学科 卒業  
 昭和49年 4月 城西歯科大学口腔解剖学第1講座（久米川 正好 教授）助手  
 昭和55年12月 北海道大学 理学博士  
 昭和56年 4月 東日本学園大学歯学部口腔生化学講座（市田 篤郎 教授）講師  
 昭和58年 3月 米国NIH（Dr. Bruce Baum）留学  
 平成10年 6月 北海道医療大医学歯学部生化学分野 教授