

平成21年 4月15日現在

研究種目：基盤研究(B)	
研究期間：2006～2008	
課題番号：18390493	
研究課題名(和文)	外分泌腺における水チャネル、特にアクアポリン5の発現と機能調節の分子機構
研究課題名(英文)	Molecular mechanism of expression and regulation of the water channel, aquaporin 5 in the exocrine gland
研究代表者	細井 和雄(HOSOI KAZUO) 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授 研究者番号:10049413

## 研究成果の概要：

ラット唾液腺の腺房に発現しているアクアポリン5(AQP5)は副交感神経(鼓索神経)の支配を受け、その蛋白質の細胞膜における発現はリソゾームにより制御されていること、ラットにおいて、自然発生AQP5変異体を見出し(G103D, <sup>103</sup>Gly><sup>103</sup>Asp)、この分子では水透過活性には影響は無く、トラフィッキングが低下していること、培養胎生ラット顎下腺組織の分枝形成およびAQP5発現がサチライシン様プロ蛋白質変換酵素、PACE4/SPC4により活性化される成長因子により制御されていることなどを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,500,000	0	6,500,000
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	2,700,000	18,200,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：(1)アクアポリン(2)唾液腺(3)カテプシン(4)副交感神経(5)塩酸セビメリン(6)MDCK細胞(7)トラフィッキング(8)GFP-AQP5キメラ分子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) AQP5の内分泌ホルモンによる調節については国内外において多くの報告が認められるが、神経系によるAQP5発現レベルの調節に関する研究は皆無である。AQPの神経系による調節については本研究により始めて明らかになる。(2) 自然発生AQP5変異遺伝子およびその蛋白質産物の機能研究に関する報告は皆無で、私たちの研究(Murdiastuti et al., *Pflug. Arch.-Eur J Physiol.*, 2002; Murdiastuti et al. *Am J. Physiol.* in submission)があるのみである。AQP5のノ

ックアウトマウスはMa T.ら(1999)により作製され、唾液分泌の低下と唾液の粘性が高くなることが報告され、唾液分泌へのAQP5の関与は明らかにされた。したがって、本研究はヒトの口腔乾燥症、唾液分泌低下症の病因究明ならびに治療の基礎研究になり、また有用な実験モデルとなると考えられる。(3) Maらにより報告されたAQP5ノックアウトマウスによる研究から唾液分泌へのAQP5の関与は明らかであるが、最も本質的な問題である唾液腺腺房細胞でのAQP5の発現制御機構は依然不明である。また、シェーグレ

ン症候群の患者唾液腺で AQP5 の局在異常が報告され (Steinfeld S., *et al. Lab. Invest.* 81, 143, 2001)、AQP5 と口腔乾燥症等の疾患との関連が示唆されている。しかし局在異常のメカニズムは依然不明である。本研究により唾液腺腺房細胞の分化成熟と AQP5 発現の制御機構を解明することで、正常唾液の産生・分泌のメカニズム等を明らかにし、歯科領域、及び関連研究分野の発展に貢献する。

## 2. 研究の目的

アクアポリン (AQP) は微生物から動植物まで広く分布するセルペンチン型膜蛋白質、水チャネルである。最初の AQP、AQP1 は Peter Agre らにより始めてクローニングされた。生体膜を隔てた水移動 (水輸送) は AQP により浸透圧勾配依存的に行われる。また、哺乳動物ではこれまでに 13 種の AQP がクローニングされ、構造上の相同性からこれらはファミリーであることが知られている。唾液腺をはじめとする外分泌腺の最も重要な生理機能のひとつは水の分泌であり、そのメカニズム解明は歯科領域ならびに一般医科生理学分野において重要な課題である。さらに、唾液腺の分泌障害は口腔衛生上極めて重要な問題である。そこで本研究においては下記のプロジェクトを推進し、唾液腺をはじめとする外分泌腺における AQP5 および関連 AQPs の発現調節と機能調節の分子機構を究明し、これにより外分泌腺における水分分泌の生理機構の一端を明らかにする。

(1) 唾液腺 AQP5 発現の神経系による調節  
(2) 自然発生 AQP5 変異遺伝子およびその蛋白質産物の機能研究 (3) 唾液腺腺房細胞分化成熟過程における AQP5 発現制御機構の解析

## 3. 研究の方法

(1) 唾液腺 AQP5 発現の神経系による調節: ラットを実験動物に用い、ネンブタール麻酔下右側上頸神経又は左鼓索神経あるいは両側鼓索神経を切断し、3-4 週間後に M3 ムスカリンアゴニストであるセビメリン、ピロカルピンなどを 7 日間投与する。顎下腺細胞膜分画を調製し、ウェスタン分析によって AQP1 および AQP5 のレベルを測定する。また総 RNA を同組織から調製し、ノザン分析によって AQP1 および AQP5 の mRNA レベルを測定する。さらに、リゾゾーム分画、細胞質分画を調製し、蛋白質代謝の関与するカテプシン D/E 活性およびプロテアソーム活性を測定する。

(2) 自然発生 AQP5 変異遺伝子およびその

蛋白質産物の機能研究: 正常およびミュータント AQP5 cDNA およびその GFP 融合遺伝子ならびに PKA 標的配列に人為的変異を作成した AQP5 遺伝子を作成した。これらに遺伝子を①腺腔・基底側極性を有する MDCK 細胞等に遺伝子導入し膜への発現に対するポイントミューテーションのおよぼす影響を調べた。②正常およびミュータントラットの顎下腺より腺房細胞を分離し不死化した。これら細胞へ正常およびミュータント GFP-AQP5 を遺伝子導入し膜への発現に対する影響を調べる。これにより、細胞側に発現を低下させる因子が存在するか変異遺伝子のために発現が低下するかが明らかになる。③正常およびミュータント AQP5 cDNA より cRNA を作成し、*Xenopus oocyte* に注入・発現させる。これらの遺伝子産物の水輸送活性を測定した。

(3) 唾液腺腺房細胞分化成熟過程における AQP5 発現制御機構の解析: ラット胎児より顎下腺を摘出し *in vitro* にて器官培養した。唾液腺の発生に対する PACE4/SPC4 の影響を調べるため、siRNA、タンパク質分解酵素阻害剤等を用いて PACE4/SPC4 機能を阻害した。発生の指標として、分枝形成および AQP5 mRNA 発現を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 唾液腺における水チャネル、アクアポリン 5 (AQP5) の神経系による制御の研究において、顎下腺の AQP5 は顎下腺を支配している自律神経の内、副交感神経切除によってその発現レベルは減少した。この減少は mRNA の現象に基づくものではなく、AQP5 のリゾゾーム系酵素による分解の促進または分解系の活性化により起こることが明らかとなった。またムスカリン受容体アゴニストであるセビメリンを用いた実験から、この副交感神経支配は M3 ムスカリン受容体を介するものであることを明らかにした。

(2) ラットにおいて、自然発生 AQP5 変異体を見出した (G103D, <sup>103</sup>Gly > <sup>103</sup>Asp)。このラット顎下腺の AQP5 の動態を調べ以下の事柄を明らかにした。顎下腺における AQP5 蛋白質発現はきわめて低かった。*Xenopus oocytes* を用いて測定したこの分子の水透過活性は野生型と変らなかつた。この変異体遺伝子に GFP を結合させ、MDCKII 細胞に遺伝子導入し蛋白質を発現させた。この細胞をタブシガルギン等で刺激し、トラフィッキングを惹起した場合、変異体分子は野生型に比べて移動が遅かった。この変異体の顎下腺腺房細胞内に認められる LAMP2 陽性構造に

AQP5は局在した。これらのことから、変異体分子は発現後、野生型に比べ速やかにリソゾーム系分解経路へ輸送され、細胞膜における発現はほとんど見られなくなるものと考えられた。

AQP5 traffickingにおけるリン酸化部位、<sup>152</sup>SRRTSの働きに関して以下の成果を得た。AQP5分子にはループDに蛋白質リン酸化酵素A(PKA)の標的配列、<sup>152</sup>SRRTS、がある。この配列中、2個のセリンおよびスレオニンをそれぞれアラニン、バリンに変異させた蛋白質産物を与える遺伝子を構築した。この遺伝子の5'側にさらにGFP遺伝子を繋いだ。このPKAコンセンサス配列がリン酸化されないGFP標識分子をMDCK-II細胞に発現させ、非リン酸化分子の細胞膜側への trafficking を調べた。その結果、リン酸化を抑制することにより、細胞内から細胞膜への trafficking は促進されることが分かった。

(3) 胎生ラット唾液腺におけるサチライシン様プロテオソーム変換酵素、PACE4/SPC4の役割について調べ、以下の結果を得た。

胎児組織培養顎下腺において siRNA をもちいて PACE4/SPC4 mRNA を抑制すると、唾液腺の分枝形成および AQP5 発現が著明に抑制された。PACE4/SPC4 は唾液腺発生に関与する成長因子を活性化するものと考えられた。

#### 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 7件)

1. Karabasil, M.R., T.Hasegawa, A.Azlina, N.Purwanti, J.Purevjav, C.Yao, T.Akamatsu and K.Hosoi, "Trafficking of GFP-AQP5 chimeric proteins conferred with unphosphorylated amino acids at their PKA-target motif (152SRRTS) in MDCK-II cells", *The Journal of Medical Investigation*, 56(1,2), 55-63, 2009, February, 査読あり
2. Akamatsu, T., A.Azlina, N.Purwanti, M.R.Karabasil, T.Hasegawa, C.Yao, and K.Hosoi, "Inhibition and transcriptional silencing of a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4/SPC4, reduces the branching morphogenesis of and AQP5 expression in rat embryonic submandibular gland", *Developmental Biology*, 325(2), 434-443, 2009, January, 査読あり.
3. Li X., A. Azlina, M.R.Karabasil, N.Purwanti, T.Hasegawa, C.Yao, T.Akamatsu, and K.Hosoi, "Degradation of submandibular gland AQP5 by parasympathetic denervation of chorda tympani and its recovery by cevimeline, an M3 muscarinic receptor agonist", *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(1), G112-G123, 2008, July, 査読あり.
4. Akamatsu, T., N.Purwanti, M.R.Karabasil, X.Li, C.Yao, N.Kanamori, and K.Hosoi, "Temporally regulated expression of subtilisin-like proprotein convertase PACE4 (SPC4) during development of the rat submandibular gland", *Developmental Dynamics*, 236(1), 314-320, 2007, January, 査読あり.
5. Murdiastuti, K., N.Purwanti, M.R.Karabasil, X.Li, C.Yao, T.Akamatsu, N.Kanamori, and K.Hosoi, "A naturally occurring point mutation in the rat aquaporin 5 gene, influencing its protein production by and secretion of water from salivary glands", *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(6), G1081-G1088, 2006, December, 査読あり.
6. Kosugi-Tanaka, C., X.Li, C.Yao, T.Akamatsu, N.Kanamori, and K.Hosoi, "Protein kinase A-regulated membrane trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 5 chimera in MDCK cells", *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research*, 1763(4), 337-344, 2006, April, 査読あり
7. Murakami, M., K.Murdiastuti, K.Hosoi, and A.E.Hil, "AQP and the control of fluid transport in a salivary gland", *Journal of Membrane Biology*, 210(2), 91-103, 2006, March, 査読あり

[学会発表] (計 16件)

1. プルワンティ ヌヌク, Involvement of IL-6-STAT3-Sca-1 system in the proliferation of duct cells in the ligated mouse submandibular gland., 第 50 回 歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 23-25 日, 東京
2. 姚 陳娟, 唾液腺 AQP5 の LPS による down-regulation の機構, 第 50 回 歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 23-25 日, 東京
3. アズリナ アハマド, Down regulation of submandibular gland AQP5 by chorda tympany denervation., 第 50 回 歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 23-25 日, 東京
4. カラバシル ミレーバ, An AQP5 G103D mutant found in SD rats shows normal water permeability but reduced membrane trafficking., 第 50 回 歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 23-25 日, 東京
5. Mileva R. Karabasil, Analyses of rat AQP5 G103D mutant expressed in MDCK-II cells and Xenopus oocytes., The International Symposium on Oral Sciences to Improve the Quality of Life (Tokushima), September 6, 2008, Tokushima
6. Ahmad Azlina, Is AQP5 down-regulated *via* autophagic pathway following chorda tympani denervation?, The International Symposium on Oral Sciences to Improve the Quality of Life (Tokushima), September 6, 2008, Tokushima
7. 姚 陳娟, 唾液腺 AQP5 および AQP1 発現の LPS による down-regulation, 第 49 回 歯科基礎医学会学術大会並びに総会, 2007 年 8 月 29-31 日, 札幌
8. 赤松徹也, 唾液腺腺房細胞の分化と AQP5 発現, 第 49 回 歯科基礎医学会学術大会並びに総会, 2007 年 8 月 29-31 日, 札幌
9. カラバシルミレーバ, Analyses of function of rat mutant AQP5 expressed in MDCK II cells, 第 49 回 歯科基礎医学会学術大会並びに総会, 2007 年 8 月 29-31 日, 札幌
10. アズリナアハマド, Regulation of submandibular gland AQP5 protein expression by lysosomal system, 第 49 回 歯科基礎医学会学術大会並びに総会, 2007 年 8 月 29-31 日, 札幌
11. プルワンティヌヌク, Transient increase in IL-6 by duct ligation leading to continuous elevation of Sca-1, a stem cells marker, in the mouse submandibular gland, 第 49 回 歯科基礎医学会学術大会並びに総会, 2007 年 8 月 29-31 日, 札幌
12. Nunuk Purwanti, Alterations of AQP5, Cellular Markers of Duct, and Sca-1 Expressions in the Duct-ligated Mouse Submandibular Gland, The 5th International Conference of Aquaporin, July 13-16, 2007, Nara, Japan
13. Mileva R. Karabasil, A Naturally Occurring Point Mutation in Rat AQP5 Influencing its Membrane Trafficking in and Water Secretion from Salivary Gland, The 5th International Conference of Aquaporin, July 13-16, 2007, Nara, Japan
14. Azlina Ahmad, Effects of Autonomic Denervation and Administration of M3 Muscarinic Receptor Agonist on the AQP5 Expression in the Rat Submandibular Gland, The 5th International Conference of Aquaporin, July 13-16, 2007, Nara, Japan
15. Chenjuan Yao, LPS Induces Down-regulation of AQP5 and AQP1 *via* Nf- $\kappa$ B and MAPK Pathways in the Mouse Parotid Gland, The 5th International Conference of Aquaporin, July 13-16, 2007, Nara, Japan
16. Tetsuya Akamatsu, Prenatal Expression of Rat Salivary AQP5 is Dependent on the Submandibular Gland Development Mediated by a Subtilisin-like Proprotein Convertase PACE4, The 5th International Conference of Aquaporin, July 13-16, 2007, Nara, Japan

〔図書〕 (計 3 件)

1. 細井和雄 赤松徹也 他 (分担執筆), 口腔生物学-各論 唾液腺 (天野 修、

草間 薫編集), 学建書院(東京), 2006年, 総頁数144

2. 細井和雄 他(分担執筆), なるほど現代歯塾(徳島大学編), 医歯薬出版(東京), 2007年, 総頁数136
3. 細井和雄 他(分担執筆), 基礎歯科生理学(森本俊文、山田好秋編)第5版, 医歯薬出版, 2008年, 総頁数466

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

[その他]

特筆すべき事柄はなし。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

細井 和雄(HOSOI KAZUO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授 研究者番号:10049413

### (2)研究分担者

金森 憲雄(KANAMORI NORIO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教授 研究者番号:90064865

赤松 徹也(AKAMATSU TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教 研究者番号:80294700

姚 陳娟(YAO CHENJUAN)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教 研究者番号:20432750

長谷川 敬展(HASEGAWA TAKAHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教 研究者番号:50447273

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

李 雪飛

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・大学院生

Nunuk Purwanti

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・大学院生

Mileva Ratko Karabasil

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・大学院生

Azlina Ahmad

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・大学院生

Javkhlan Purevjav.

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・大学院生