

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791353
 研究課題名 (和文) NF- κ B シグナリングを介した LPS による唾液腺 AQP5 のダウンレギュレーション
 研究課題名 (英文) Down-regulation of salivary glands AQP5 by LPS *via* NF- κ B signaling
 研究代表者
 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

研究成果の概要：

アクアポリン 5 (AQP5) の発現は内毒素 (LPS) によりダウンレギュレーションされ、これに NF- κ B 及び MAPK の 2 つの経路が関係していることを見出した。更に、AQP5 遺伝子のプロモーターに 2 つの NF- κ B 応答配列は重要なことが明らかになった。免疫系細胞、RAW264.7 細胞でも免疫沈降による解析から NF- κ B (p65) と AP1 (p-c-Jun と c-Fos) が LPS による cross-coupling にされることも証明された。今後、c-Fos の高発現細胞を用い、LPS による AQP5 のダウンレギュレーションのメカニズムを追究する。

研究成果の概要：

Our results indicated that LPS induced potential down-regulation of expression of AQP5 is mediated *via* a complex(es) of these 2 classes of transcription factors, NF- κ B and p-c-Jun/c-Fos. The two NF- κ B binding sites in the AQP5 promoter played very important roles in the LPS-induced down-regulation. By co-immunoprecipitation analysis, the physical association of these transcription factors was shown in RAW264.7 cell line after LPS treatment. The mechanism of the down-regulation of AQP5 by LPS will be identified using c-Fos stable overexpression cell lines in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：口腔生理学

1. 研究開始当初の背景

(1) アクアポリン (AQP) はセルペンチン型膜蛋白質水チャネルで、微生物から動植物まで広く分布する。AQP は 1993 年、Peter Agre

らにより始めてクローニングされ、その後、哺乳類では 13 種 (AQP0-12) 存在することが明らかにされている。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。

(2) 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一つは水の分泌である。唾液腺に多量発現する AQP5 をノックアウトした遺伝子改変マウスが作成・解析され、AQP5 null マウスでは唾液の分泌量の低下（正常の 50%）と粘性の上昇が報告された。更に、口腔乾燥症を呈する自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の患者では AQP1 の減少及び一部の患者で AQP5 の局在異常が認められ、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。特に、唾液腺の分泌障害は口腔衛生上重要な問題である。

(3) 他方、肺において炎症性サイトカインである TNF- α が AQP5 発現を down-regulation することを Towne らは初めて報告した (*J. Biol. Chem.*, 276, 18657, 2001)。最近になって Nagai らは肺由来細胞である MLE-12 細胞で NO は AQP5 の発現を抑制することを示した。一方、脳においてもっとも多量に存在し、脳浮腫の生理・病理学に深く関わっている AQP4 は星状細胞および脳室上皮に発現している。そして、血液脳関門を破壊する LPS の脳室内投与により脳ミクログリア細胞において AQP4 が誘導されることが報告されている。

(4) 申請者はこれまでに LPS が唾液腺等外分泌腺において炎症性サイトカインを誘導することを明らかにした (Yao C., et al, *Immunology*, 116, 213, 2005; Yao C., et al, *J. Biol. Chem.*, 281, 7968, 2006)。また、本申請に至る独自の研究において、申請者は LPS 投与が唾液腺における AQP5 発現を down-regulation し、唾液の分泌を低下させることを見出した。つづいて、マウス唾液腺における AQP5 の LPS による制御とそのシグナル伝達経路について各種シグナル伝達系阻害剤を用いて検討した。その結果、LPS による AQP5 mRNA の down-regulation には NF- κ B、c-Jun、c-Fos の 3 種すべての転写因子が深く関与していることを明らかにした。(Yao C., et al, *A. J. Patho. in revision*)

(5) さらに NF- κ B と c-Jun/c-Fos の経路はいずれを阻害しても LPS による down-regulation は完全に回復したことから、これら 2 つの経路は独立していないことが考えられた。Stein らは c-Jun/c-Fos の b-ZIP 構造と NF- κ B p65 の Rel homology domain は結合し、これら 2 つの転写因子は cross-coupling することを報告した (*EMBO J.*, 12, 3879, 1993)。なお、ゲルシフトアッセイによる解析から耳下腺抽出液の NF- κ B 応答配列への結合活性は LPS 処理により上昇し

たが、AP1/c-Jun/c-Fos 応答配列への結合活性の上昇は認められなかった。従って、LPS 投与による AQP5 の顕著な down-regulation は上記 cross-coupling の結果出現した可能性が考えられた。

2. 研究の目的

唾液腺機能の一つは水分泌であり、水チャネル AQP5 がこの過程に深く関与している。本研究では耳下腺において NF- κ B p65 と c-Jun/c-Fos が複合体を形成し AQP5 転写の制御を行っている可能性を検証し、これにより自然免疫系の制御が外分泌腺機能に与える役割を明らかにする。具体的には、c-Jun/c-Fos と NF- κ B の耳下腺における cross-coupling の可能性をルシフェラーゼアッセイおよびゲルシフトアッセイにより実験的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) C3H/HeN マウス耳下腺から genome DNA を抽出し、これを template として AQP5 遺伝子のプロモーター (2100-500 bp それぞれ 7 種類プロモーター) をクローニングし、レポータープラスミド pGL4 (Promega) のホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に結合させた。構築したプラスミドを AQP5 が発現する MLE-12 細胞及び AQP5 が発現しない HSG 細胞 (顎下腺由来)、CHO、RAW264.7 細胞に導入し、Dual-Luciferase Reporter Assay System によりそれぞれ 7 種類 pGL4 レポータープラスミド活性を測定した。

(2) MLE-12 細胞を用いて、免疫染色により LPS を刺激し、p65、p-c-Jun と c-Fos の発現及び LPS 刺激によりこれら転写因子は核に局在が増加するかどうかを調べた。さらに、Western blotting 解析により核抽出からこれら転写因子の発現も LPS 刺激により調べた。

(3) RAW264.7 細胞を用いて、免疫染色および Western blotting 解析により LPS を刺激し、p65、p-c-Jun と c-Fos の発現を調べた。さらに、RAW264.7 細胞を用い、免疫沈降解析により LPS を刺激し、p65、p-c-Jun と c-Fos の複合体形成を調べた。

(4) c-Fos の高発現細胞を作成する。

4. 研究成果

(1) MLE-12、HSG、CHO および RAW264.7 細胞に構築した 7 種類の pGL4 プラスミドを導入した。Dual-Luciferase Reporter Assay System により活性を測定した結果、いずれも 2 つの NF- κ B 応答配列を含むプロモーターのプラスミドの活性が一番高いことが明らかになった。さらに、MLE-12 と RAW264.7 細胞を用い、Western blotting および免疫染色から LPS 刺激により、p65 と p-c-Jun の核にお

ける局が増加することが明らかになった。

(2) LPS 刺激により、Dual-Luciferase 活性は LPS 投与量依存的に減少することを見出した。さらに、RAW264.7 細胞も免疫沈降による解析から NF- κ B(p65) と AP1(p-c-Jun と c-Fos) が LPS による複合体になることも証明された。

(3) C3H/HeN マウス耳下腺から genome DNA を template として c-Fos 遺伝子を MLE-12 及び RAW264.7 細胞に導入し、c-Fos の高発現細胞を作成する。今後、これら細胞を用い、LPS による AQP5 のダウンレギュレーションのメカニズムを追究する。

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 10 件)

- ① Wang, C., Chen G., Jiang J., Qiu L., Li X., Ding S., Hosoi K., and Yao C., "Aqua-glyceroporins in arsenite bio-transportation across gastrointestinal tract membranes" J Med Invest, 査読有, 56 巻, 2009, 241-246
- ② Azlina, A., Li X., Purevjav J., Hasegawa T., Yao C., Akamatsu T., and Hosoi K., "Down-regulation of submandibular gland AQP5 following parasympathetic denervation in rats" J Med Invest, 査読有, 56 巻, 2009, 287-289
- ③ Karabasil, M.R., Murdiastuti K., Purwanti N., Azlina A., Purevjav J., Hasegawa T., Yao C., Akamatsu T., and Hosoi K., "Effects of natural point mutation of rat aquaporin 5 expressed *in vitro* on its capacity of water permeability and membrane trafficking" J Med Invest, 査読有, 56 巻, 2009, 398-400
- ④ Akamatsu, T., Azlina A., Purevjav J., Hasegawa T., Akamatsu T., Yao C., and Hosoi K., "Salivary gland development: its mediation by a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4" J Med Invest, 査読有, 56 巻, 2009, 241-246
- ⑤ Purwanti, N., Azlina A., Karabasil M.R., Hasegawa T., Yao C., Akamatsu T., and Hosoi K., "Involvement of the IL-6/STAT3/Sca-1 system in

proliferation of duct cells following duct ligation in the submandibular gland of mice" J Med Invest, 査読有, 56 巻, 2009, 273-276

- ⑥ Purevjav, J., Hiroshima Y., Azlina A., Hasegawa T., Yao C., Akamatsu T., Nagata T., and Hosoi K., "Induction of calprotectin mRNAs by lipopolysaccharide in the salivary gland of mice" J Med Invest, 査読有, 56 巻, 2009, 343-346
- ⑦ Karabasil M.R., Hasegawa T., Azlina A., Purwanti N., Purevjav J., Yao C., Akamatsu T., Hosoi K., "Trafficking of GFP-AQP5 chimeric proteins conferred with unphosphorylated amino acids at their PKA-target motif ((152)SRRTS) in MDCK-II cells" 査読有, 56 巻, 2009, 55-63
- ⑧ Akamatsu T., Azlina A., Purwanti N., Karabasil M.R., Hasegawa T., Yao C., Hosoi K., "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" Dev Biol, 査読有, 325 巻, 2009, 434-443
- ⑨ Kurabuchi S., Gresik E.W., Yao C., Hosoi K., "Hypophysectomy and hormonal therapy modulate mK1-immunoreactive duct cells in the mice sublingual glands" J Mol Histol, 査読有, 39 巻, 2008, 499-507
- ⑩ Li X., Azlina A., Karabasil M.R., Purwanti N., Hasegawa T., Yao C., Akamatsu T., Hosoi K., "Degradation of submandibular gland AQP5 by parasympathetic denervation of chorda tympani and its recovery by cevimeline, an M3 muscarinic receptor agonist" Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 査読有, 56 巻, 2008, G112-G123

[学会発表] (計 20 件)

国際学会

- ① Chenjuan Yao, Potential down-regulation of parotid gland AQP5 by LPS *via* cross-coupling of NF- κ B/AP1, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, Tokushima 09 Exocrine Secretion-Mechanism and Disease, July 23-25, 2009, Tokushima

- ② Tetsuya Akamatsu, Salivary gland development: its mediation by a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, Tokushima 09 Exocrine Secretion-Mechanism and Disease, July 23-25, 2009, Tokushima
- ③ Chun Wang, Aquaglyceroporins in arsenite bio-transportation across gastrointestinal tract membranes, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, Tokushima 09 Exocrine Secretion-Mechanism and Disease, July 23-25, 2009, Tokushima
- ④ Nunuku Purwanti, Involvement of the IL-6/STAT3/Sca-1 system in proliferation of duct cells following duct ligation in the submandibular gland of mice, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, Tokushima 09 Exocrine Secretion-Mechanism and Disease, July 23-25, 2009, Tokushima
- ⑤ Ahamad Azlina, Down-regulation of submandibular gland AQP5 following parasympathetic denervation in rats, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, Tokushima 09 Exocrine Secretion-Mechanism and Disease, July 23-25, 2009, Tokushima
- ⑥ Javkhlan Purevjav, Induction of calprotectin mRNAs by lipopolysaccharide in the salivary gland of mice, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, Tokushima 09 Exocrine Secretion-Mechanism and Disease, July 23-25, 2009, Tokushima
- ⑦ Mileva R. Karabasil, Effects of natural point mutation of rat aquaporin 5 expressed *in vitro* on its capacity of water permeability and membrane trafficking, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion, Tokushima 09 Exocrine Secretion-Mechanism and Disease, July 23-25, 2009, Tokushima
- ⑧ Ahamad 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
- ⑨ 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
- 国内学会
- ⑩ 姚陳娟, NF- κ B/AP-1 の複合体を介した耳下腺 AQP5 の LPS による down-regulation, 第 51 回歯科医学会学術大会、2009 年 9 月 9-11 日、新潟
- ⑪ アズリナ アハマド, AQP5 down-regulation *via* autophagy following parasympathetic in the insular cortex of a model of temporal lobe epilepsy, 第 51 回歯科医学会学術大会、2009 年 9 月 9-11 日、新潟
- ⑫ アズリナ アハマド, AQP5 degradation *via* autophagy following parasympathetic denervation in the rat SMG, 第 51 回歯科医学会学術大会、2009 年 9 月 9-11 日、新潟
- ⑬ フルジャフ ジャフラン, Calprotectin induction by lipopolysaccharide in the salivary gland of mice, 第 51 回歯科医学会学術大会、2009 年 9 月 9-11 日、新潟
- ⑭ 長谷川敬展, A role of aquaporin 5 ubiquitylation in the intracellular membrane transport, 第 51 回歯科医学会学術大会、2009 年 9 月 9-11 日、新潟
- ⑮ 赤松徹也, Development and cytodifferentiation of salivary gland, 第 51 回歯科医学会学術大会、2009 年 9 月 9-11 日、新潟
- ⑯ 姚陳娟, 唾液腺における水チャネル AQP5 の LPS による down-regulation の機構, 第 53 回日本唾液腺学会, 2008 年 12 月 6 日、東京
- ⑰ 姚陳娟, 唾液腺 AQP5 の LPS による down-regulation の機構, 第 50 回歯科医学会学術大会、2008 年 9 月 23-25 日、東京
- ⑱ 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 回歯科医学会学術大会、2008 年 9 月
23-25 日、東京

- ⑱ カラバシル R. ミレーバ, An AQP5
G103 mutant found in SD rats shows
normal water permeability but reduced
membrane trafficking, 第 50 回歯科医学
会学術大会、2008 年 9 月 23-25 日、東京
- ⑳ アズリナ アハマド, Down-regulation
of submandibular gland AQP5 by chorda
tympani denervation, 第 50 回歯科医学
会学術大会、2008 年 9 月 23-25 日、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姚 陳娟 (YAO CHENJUAN)

徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・

助教

研究者番号: 20432750

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

