

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592738

研究課題名(和文)唾液腺における水チャネルの細胞核移行機序の解明、新機能の探索と新機能による創薬

研究課題名(英文) A study of mechanisms underlying M3 muscarinic agonist-induced trafficking of AQP5 to nuclei, functions of AQP5 located in nuclear membrane and a development of a drug for age-dependent xerostomia

研究代表者

石川 康子 (ISHIKAWA, Yasuko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：40144985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：耳下腺のM3ムスカリン受容体や $\alpha$ 1アドレナリン受容体が刺激を受容すると、水チャネル・アクアポリン5(AQP5)は細胞核と管腔膜へ移動する。AQP5の細胞核への移動機序とその意義の一部を解明した。セビメリンでムスカリン受容体を刺激3分後の核膜では、AQP5とRab5増量と共沈殿が認められた。その増量は界面活性剤可溶性画分でも不溶性画分でも認められたが、核膜に局在するAQP5の蔗糖密度勾配による浮揚性は少なかった。刺激3分後の核の直径は約60%に低下した。加齢とともに核膜へのAQP5の移動は低下するが、私共が開発した人工唾液(特願2013-022555)により解消された。

研究成果の概要(英文)：Activation of M3 muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) or  $\alpha$ 1 adrenoceptor induces the increase in the amount of aquaporin-5 (AQP) in nuclear membrane and apical plasma membrane of rat parotid glands. We investigated the mechanisms underlying cevimeline (mAChR agonist)-induced trafficking of AQP5 to nuclei. Co-immunoprecipitation of AQP5 and Rab5 was detected in nuclear membrane 3 min after cevimeline-injection. We visualized the distribution of AQP5 and Rab5 in parotid nuclei in response to cevimeline. AQP5 was increased in 1% Triton X-soluble- and -insoluble-nuclear membrane fractions 3 min after cevimeline-injection. Very few AQP5 of nuclear membrane were floated in sucrose density gradient. Under control conditions, the diameter of nuclei was 5.5  $\mu$ m. The diameter was decreased to 3.5  $\mu$ m 3 min after cevimeline treatment. Administration of artificial saliva (patent no. 2013-022555) prevented age-dependent decreases of AQP5 trafficking to nuclei.

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：水チャネル アクアポリン-5 唾液腺 耳下腺 細胞核 脂質ラフト 国際情報交換

### 1. 研究開始当初の背景

口腔は運動系機能と感覚系機能とが相互に影響を及ぼしあって統合され、咀嚼、嚥下、発声のみならず味覚や温覚の受容など高度で複雑な機能を営む器官である。この二つの機能の統合に中心的役割を果たしているのが唾液である。唾液の構成成分の99%は水であることから、唾液腺からの水分分泌は口腔機能に極めて重要である。

水を選択的に通す水輸送蛋白質である水チャネルが広く動植物界で発見され、ヒトでは13個の水チャネル遺伝子が見つかった。水を特異的に輸送するアキュアポリン(AQP)(AQP0,1,2,4,5,6,8)群、水のみならずグリセリンもよく輸送するアキュアグリセロポリン(AQP3,7,9,10)群、水をあまり通過させないスーパーアキュアポリン(AQP11,12)群に分類されている(Mamm.Genome 18,452-462,2007)。唾液腺にはAQP1,3,4,5,6,8,11が存在する。なかでもAQP5が唾液分泌には重要である(J.Biol.Chem.274,20071-20074,1999)。私共は、唾液腺に局在するAQPの機能発現・制御の神経性調節機構や口腔乾燥症の発症機序および唾液分泌促進薬について研究している。無刺激時にAQP5の90%は管腔膜側の細胞質のラフト画分に存在し、唾液腺のM3-ムスカリン受容体や1-アドレナリン受容体が刺激を受容すると、その70%が管腔膜へ脂質・ラフトと共に細胞内移動し、唾液として水分分泌機能を果たした後、その一部は管腔膜にてラフト画分からノンラフト画分へ移行した(Am.J.Physiol.Cell Physiol.289,C1303-C1311,2005. BBRC 265,94-100,1999. ibid.245,835-840,1998)。そして、管腔膜上でノンラフト画分へ移行したAQP5の一部は唾液中へ遊離され、ラフト画分のAQP5の一部は内在化する(BBA,1790,49-56,2009)こと等を明らかにしてきた。しかも、唾液中のAQP5量は口腔乾燥症の指標として使えることも報告した(J.Med.Invest,56,350-353,2009)。

ところで、この一連のAQP5の管腔膜への細胞内移動を研究中に、耳下腺のM3-ムスカリン受容体や1-アドレナリン受容体が刺激を受容すると、AQP5は核へも移動することを見つけた(第51回歯科基礎医学会・サテライトシンポジウム)。

### 2. 研究の目的

唾液腺のM3-ムスカリン受容体刺激による水チャネル・AQP5の核膜への移動機序の解明、核膜でのAQP5の機能の解明、そして、得られた新知見を用いた創薬を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 無刺激・刺激動物の作成と唾液腺におけるAQP5やAQP5の基盤分子の細胞内局在解析  
成熟(12週齢)の雄性ラットの尾静脈より生理的食塩水又はセビメリン(5mg/kg)を投与して経時的に耳下腺・顎下腺を摘出して液

体室素にて凍結後、切片を作製する。前報(Am.J.Physiol.Cell Physiol. 289,C1303-C1311,2005)に従って、抗AQP5抗体、ラフトのマーカー(Flotillin-2, GM1)や核膜のマーカー(ラミンB受容体)の抗体と反応させる。反応後二次抗体、Alexa Fluor488および568を用いて免疫染色し、励起波長488nmおよび568nmにて共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

### (2) 電子顕微鏡による微細構造解析

摘出した唾液腺をパラホルムアルデヒドとカコジル酸緩衝液で固定後切片を調製し、抗AQP5抗体と反応させ、コロイド金結合抗IgG抗体で可視化し、電子顕微鏡で半定量解析する。

### (3) 無刺激・刺激動物の耳下腺の単離核の調製とAQP5やAQP5の基盤分子の核内局在解析

(1)と同様の方法で生理的食塩水又はセビメリン(5mg/kg)を投与して経時的に耳下腺を摘出し1mM Dithiothreitol, 3mM MgCl<sub>2</sub>を含む2.2M Sucroseでホモゲナイズする。スィングローターで24,000rpm, 90分間遠心し、得られた沈渣を2回洗浄しRNA/DNAが0.25以下を確認して使用する。免疫染色は1)の方法で、抗AQP5抗体や抗ガングリオシドGM1抗体、抗Flotillin-2抗体と共にフィブリン(核小体)、SC35(核スペckル)、PML(PMLボディ)、p80コイリン(Cajalボディ)、hnRNPI/PTB(傍核小体コンパートメント)の抗体を用いて行う。

### (4) AQP5の核移行機序への低分子量GTPase Rab, Ran関与の解明、定常置へ誘導する因子の検索

セビメリンを投与した野生型ラットより経時的に唾液腺を摘出し、管腔膜、細胞質、核膜、核質に分画する。各画分のAQP5を免疫沈降法により回収し、SDS-PAGEと各種抗体を用いたウェスタンブロッティング法からAQP5と複合体を形成している分子を解析し、刺激に応答してAQP5を細胞内の各定常置へ誘導する因子の解析を行う。

### (5) 核へ移動したAQP5がヌクレオポリン核膜孔複合体蛋白質の構成一員となるか別の核膜孔を形成するかの検討

(1)や(3)で調製した組織切片や単離核標本をヌクレオポリンを構成する蛋白質・Nup93, Nup107/160の抗体やラミン受容体の抗体と抗AQP5抗体を用いて二重染色し、1)2)の方法で局在をみる。共局在が見られた場合は、Nup93やNup107/160の抗体を用いて免疫沈降物を得、抗AQP5抗体を用いてウェスタンブロッティングし確認する。

### (6) AQP5が核膜で輸送する水以外の物質の解明

(3)で調製したAQP5が核膜に凝集した核、核膜にほとんど無局在核の外液に蛍光標識

のアデニン、ウラシル、5-フルオロウラシル等を加え低張に3分間保ち、核内の標識化合物の量を測定する。ヌクレオポリンの阻害薬・レプトマイシンBの存在下でも測定する。

(7) AQP5 が核膜上の脂質・ラフトで機能を発揮するのか、ノンラフトで機能を発揮するのかの解明

コレステロールを除去してラフトを崩壊させる薬物 Methyl-cyclodextrin, Filipin を核外溶液に添加して(6)と同様の実験を行い、ラフト崩壊薬の存在下でも同様の結果が得るか検討する。一方、ラフト崩壊薬で処理した核を2)の方法で免疫染色し、共焦点顕微鏡から解析する。水輸送機能も検討する。また、1% Triton X-100 で核膜のホモジネートを調製して遠心チューブの底に入れ、45%, 35%, 5%の蔗糖溶液を積層、240,000xg, 18 時間スウィングロータにて遠心し、各フラクションの AQP5 やマーカーをウェスタンブロッティングで解析する。

(8) AQP5 の核移行を正常化する薬の創薬

成熟(12 週齢)と(18 ヶ月齢)の雄性ラットに人工唾液(経口アンチエイジング剤として私共が開発した)(特許、特願 2013- 022555)または水道水を3週間飲用させ、上述(1)(3)の解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 無刺激・刺激動物の作成と唾液腺における AQP5 や AQP5 の基盤分子の細胞内局在解析

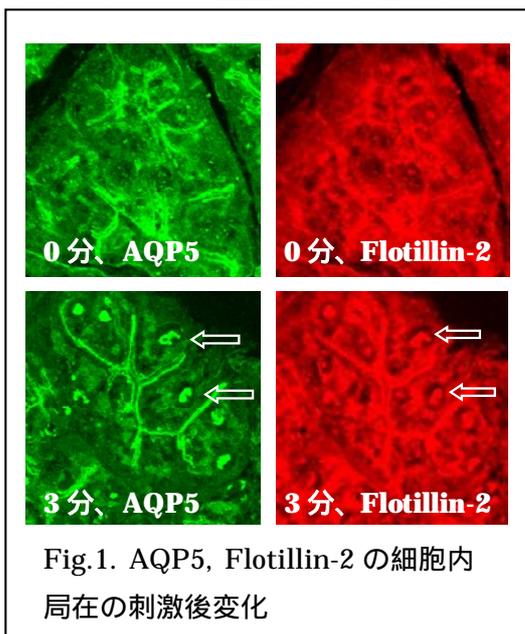


Fig.1 には、セピメリン投与後0分と3分の共焦点顕微鏡写真を示したが、0分(無刺激・AQP5は細胞質に局在), 1.5分(AQP5は核膜に局在), 3分(AQP5は核膜、核内に局在), 4.5分(AQP5は核膜に局在), 10分(AQP5は管腔膜に集積), 60分(AQP5は細胞質に分散)が認められた。

脂質ラフトのマーカーである Flotillin-2,

GM1 も同様に、共局在が認められた。

(2) 電子顕微鏡による微細構造解析

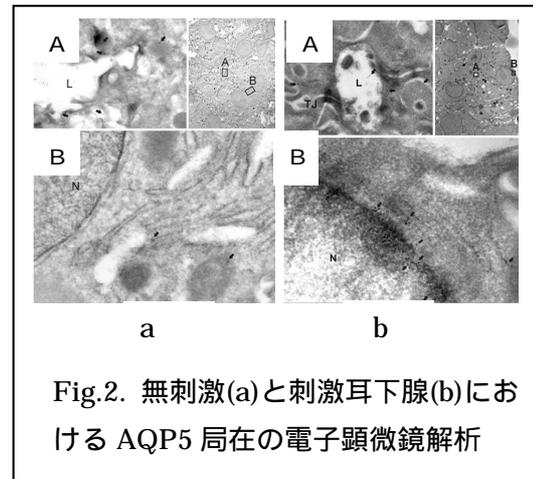


Fig.2 には、セピメリン投与後0分(a)と3分(b)の AQP5 局在の電子顕微鏡写真を示した。0分(a)では細胞質に AQP5 の局在が認められ(a-B)、3分(b)では核膜に AQP5 の局在が認められた(b-B)。

(3) 無刺激・刺激動物の耳下腺の単離核の調製と AQP5 や AQP5 の基盤分子の核内局在解析

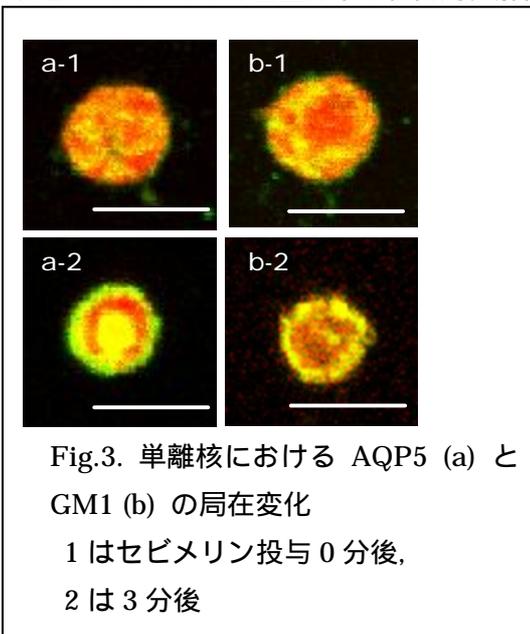


Fig.3 に示すように、セピメリン投与3分後、核膜と核内での AQP5 と GM1 の分布増加が認められた。

(4) AQP5 の核移行機序への低分子量 GTPase Rab, Ran 関与の解明、定常置へ誘導する因子の検索

セピメリン投与0分と3分後の耳下腺から核膜を調製し、抗 AQP5 抗体を用いた免疫沈降実験を行うと、0分の核膜に局在する AQP5 の Rab5 との共沈は認められなかったが、3分の AQP5 は Rab5 との共沈が認められた。

共焦点顕微鏡による免疫染色でも、3分後の核膜で Rab5 の増加が認められ、耳下腺の

M3-ムスカリン受容体が刺激を受容すると、AQP5 は核へと誘導する因子は、Rab5 である可能性が示唆された。

(5)核へ移動した AQP5 がヌクレオポリン核膜孔複合体蛋白質の構成一員となるか別の核膜孔を形成するかの検討

Nup93, Nup107/160 の抗体やラミン受容体と AQP5 を免疫染色して共焦点顕微鏡で観察すると、共同在が認められるが、免疫沈降実験では必ずしも共沈しないので、近い位置で存在しているが、ヌクレオポリン核膜孔複合体蛋白質の一員ではないと推察された。

(6)AQP5 が核膜で輸送する水以外の物質の解明

セビメリン投与 0 分と 3 分に調製した単離核の外液へ蛍光標識のアデニン、ウラシル、5-フルオロウラシル等を加え、核内への蛍光物質の取り込みを見たところ優位の変化はみとめられなかった。また、レプトマイシン B の存在下でも優位の変化は認められなかった。一方、単離核を高張の蔗糖液に 1 分間曝すと、Fig.3 でも認められるように、セビメリン処理 3 分間の単離核の直径が 0 分後のその約 60%にまで減少していた。即ち、AQP5 が核膜に凝集した単離核では、高張にすると、核質から細胞質への水移動が認められた。

(7)AQP5 が核膜上の脂質・ラフトで機能を発揮するのか、ノンラフトで機能を発揮するのかの解明

Methyl-cyclodextrin, Filipin を核外溶液に添加して(6)と同様の実験を行った。ラフト崩壊薬の存在下でも同様の結果が得られた。即ち、ラフト崩壊薬は、核膜での水の移動に影響を及ぼさなかった。

そこで、AQP5 が存在する核膜の脂質の性質を 1% Triton X-100 で核膜をホモジネートし、その浮揚性を検討することから調べた。管腔膜の AQP5 は浮揚性の高い脂質ラフトに存在していたのに対し、Fig.4 に示すように、核膜の AQP5 は浮揚性の低い界面活性剤不溶性

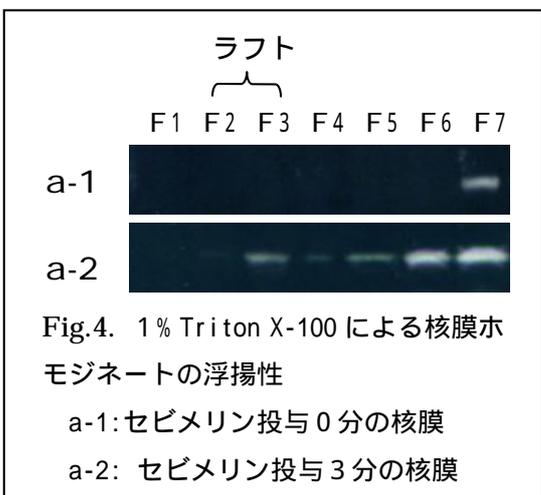


Fig.4. 1% Triton X-100 による核膜ホモジネートの浮揚性

a-1: セビメリン投与 0 分の核膜

a-2: セビメリン投与 3 分の核膜

および可溶性画分に存在していた。

但し、Fig.4 の F1 と F2 は 5%蔗糖液画分、F3 と F4 は 35%蔗糖液画分、F5 と F6 は 45%蔗糖液画分、F7 は沈殿画分を示す。

即ち、核膜には管腔膜をはじめとする細胞膜で認められるようなラフトは極めて少なく、ラフトとは性質を異にする 1% Triton X-100 不溶性画分と可溶性画分に存在して機能した。

(8) AQP5 の核移行を誘導する薬の創薬

成熟ラットでは、水道水を飲水させて飼育しても人工唾液(特許、特願 2013-022555、経口アンチエイジング剤)を飲用させて飼育してもセビメリン刺激による AQP5 の核への移行に差は認められなかった。しかし、老齢ラットでは水道水を飲水していると、セビメリン刺激による AQP5 の核への移行が低下した。しかし、人工唾液を 3 週間飲用させると、刺激に伴う移動の加齢による低下が解消された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Ishikawa Y, Pieczonka T, Bragiel A. Salivary aquaporin, ion channels and carriers as new disease biomarkers, Journal of Oral Biosciences, 査読有、2014, 56(3), 印刷中.

石川康子、バイオマーカーと唾液中膜輸送タンパク質、日本薬理学雑誌、査読有、2013 141(6):302-5. PMID: 23749068.

Wang D, Yuan Z, Inoue N, Cho G, Shono M, Ishikawa Y, Abnormal subcellular localization of AQP5 and downregulated AQP5 protein in parotid glands of streptozotocin-induced diabetic rats. Biochim Biophys Acta. 査読有 2011 ;1810(5): 543-54. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.01.013.

[学会発表](計 11 件)

Bragiel A.M., Pieczonka T.D., 石川康子、食塩感受性および非感受性高血圧診断用バイオマーカーとしての唾液中イオンチャンネル、第 55 回歯科基礎医学学会学術大会、2013 年 09 月 21 日 岡山コンベンションセンター(岡山県)

Pieczonka T.D., Bragiel A.M., 石川康子、唾液腺の老性萎縮や老性遺伝子発現変化に及ぼすホエーの効果、第 55 回歯科

基礎医学会学術大会、2013年09月21日  
岡山コンベンションセンター(岡山県)  
石川康子、Pieczonka T.D., Bragiel A.M.,  
唾液中のエキソソームと病気診断 - 水チャネル・アクアポリン - 5 を中心にして  
- 第 55 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム・第 27 回唾液腺談話会、2013年09月20日岡山コンベンションセンター(岡山県)  
Pieczonka T.D., 王由真、石川康子、Salivary ion channels as a biomarker of hypertension, 第 86 回日本薬理学会年会、2013年03月21日 福岡国際会議場(福岡県)  
Pieczonka T.D., 張剛太、Skowronski M.T., 石川康子, Trafficking of aquaporin-5 to nuclei upon activation of M3-muscarinic receptors in rat parotid glands. 第 122 回日本薬理学会近畿部会、2012年11月16日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府)  
王由真、庄野正行、石川康子、糖尿病による口腔乾燥症発症機序のマイクロアレイ解析、第 85 回日本薬理学会年会、2012年03月15日 国立京都国際会館(京都府)  
石川康子、唾液中の膜輸送蛋白質のストレス誘発性口腔乾燥症診断マーカーとしての評価、(シンポジウム) 第 85 回日本薬理学会年会、2012年03月16日 国立京都国際会館(京都府)  
王由真、石川康子、1型糖尿病による口腔乾燥症の唾液腺マイクロアレイ法による解析、第 53 回歯科基礎医学会 2011年10月2日 長良川国際会議場(岐阜県)  
王由真、石川康子、1型糖尿病ラットの耳下腺のマイクロアレイ解析による口腔乾燥症の発症機序の網羅的解析、第 31 回日本歯科薬物療法学会 2011年06月25日 幕張メッセ国際会議場(千葉県)  
王由真、石川康子、1型糖尿病の口腔乾燥症の発症機序の解明とセビメリンの効果 - 水チャネル・アクアポリンを中心にして、第 31 回日本歯科薬物療法学会 2011年06月25日 幕張メッセ国際会議場(千葉県)  
石川康子、唾液中の水チャネル・アクアポリン5を用いた口腔乾燥症の診断法、第 31 回日本歯科薬物療法学会 (招待講演) 2011年06月26日 幕張メッセ国際会議場(千葉県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：経口アンチエイジング剤

発明者：石川康子、吉岡昌美、福田佳奈

権利者：国立大学法人徳島大学、株アプロサイエンス

種類：特許

番号：特願 2013-022555

出願年月日：2013年02月07日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 康子 (ISHIKAWA, Yasuko )

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・准教授

研究者番号：40144985

(2) 研究分担者

庄野 正行 (SHONO, Masayuki )

徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研

究部・技術職員

研究者番号：60380101