

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460223

研究課題名(和文) アクアポリンが関与する尿崩症機序解明とアクアポリンの機能制御化合物の探索

研究課題名(英文) Aquaporins involved with diabetes insipidus and the investigation of natural compounds controlling the function of aquaporins

研究代表者

臼井 茂之 (Usui, Shigeyuki)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40176665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アクアポリンは、細胞膜に存在するタンパク質であり、水及びグリセロール等の小分子を透過させる働きを有する。しかし、細胞内に発現しているアクアポリンが、全て細胞膜に存在しているのではなく、必要に応じて細胞膜と細胞内を行き来し、分子の透過を制御している。著者らは、この行き来に関するメカニズムの解明を行い、プロテインキナーゼCとプロテインキナーゼB(Akt)が関与することを新たに見出した。

アクアポリンの細胞内移動を制御する天然物由来成分の探索を行い、生薬シンイに含まれるオイゲノールが、アクアポリン3の細胞内から細胞膜への移動を促進することを認めた。

研究成果の概要(英文)：Aquaporins which are intrinsic membrane proteins functioning as a water channel permeable to water and glycerol. All aquaporin molecules expressing in cells do not always exist in a cell membrane, but the trafficking of aquaporins in a cell are controlled to move between the cell membrane and inside the cell as necessary. We found that the movement of aquaporin 3 from inside to membrane was regulated by protein kinase C and that from membrane to inside was done by protein kinase B (Akt). Phosphorylation of Thr237 and Ser275 in aquaporin 3 was confirmed to be necessary to move from inside the cell to cell membrane.

We investigated natural compounds which triggered the trafficking of aquaporins. Eugenol which is a component of magnolia flower derived from *Magnolia salicifolia* was found to promote the trafficking of aquaporin 3 from inside to membrane accompanying the phosphorylation of protein kinase C.

研究分野：薬学 細胞生物学

キーワード：アクアポリン 細胞膜移行 細胞質移行 プロテインキナーゼC アクチン 微小管 Akt

### 1. 研究開始当初の背景

人体の約 60~70%は水であり、例えば脳の水分含量は約 80%にもなる。生命にとって水は必須の物質であり、その輸送は生命維持に重要な役割を果たしている。生体における水の輸送経路には、細胞間隙を通る細胞間輸送路と、細胞自体を通る経細胞輸送路が主な経路と考えられてきた。その内、経細胞輸送路での水の輸送は、水分子が細胞膜を形成する脂質二重層を受動拡散により透過すると考えられてきた。しかし、赤血球や腎臓の尿細管上皮細胞など、大量の水輸送が行われている部位では、受動拡散だけでは説明できない程の高い水透過性があることが知られており、分子病態が明らかになる以前から、水チャネルと呼ばれる特異的な膜タンパク質が存在するに違いないと考えられていた。この水輸送を支える膜タンパク質として、赤血球の水チャネルがクローニングされ、水の(aqua)穴のあるタンパク質(porin)にちなんでアクアポリン(aquaporin: AQP)と名付けられた。クローニングされたタンパク質のアミノ酸配列は、その相同性から major intrinsic protein(MIP)ファミリーと呼ばれる膜タンパク質に属することが判明した。この MIP ファミリーのうち、機能発現実験により水チャネルであることが確認されたものに AQP の名前が付けられている。AQP の形成する孔は常に開いていて高い特異性を持っていることが広く知られている。ヒトの AQP は AQP0~12 の 13 種類のサブタイプの存在が知られており、多種類のファミリーメンバーが全身の臓器に分布している。AQP は透過する分子の違いによって、水のみを透過する分子種と、水分子以外にグリセロールや尿素のような低分子溶質も透過させる分子種の 2 グループに分類される。とくに後者はアクアグリセロポリンと総称され、ヒトでは AQP3、7、9、10 が属している。

AQP3 は、主に腎臓、腸管(回腸、結腸)、赤血球、脳、表皮などに存在するアクアグリセロポリンの一種である。ヒトの表皮では、AQP ファミリーのうち AQP3 が最も多く発現しており、皮膚疾患との関連が報告されている。皮膚炎症部位において AQP3 の発現の著明な低下が種々の皮膚疾患に伴う乾燥症状の形成に関与すると示唆されており、AQP3 ノックアウトマウスにおいてドライスキンが観察されたことなどから、AQP3 が皮膚の水分保持に関与していることが想定されている。さらに、AQP3 には細胞の遊走、創傷治癒などへの関与が示唆されている。したがって、AQP3 の発現を上昇させる、もしくは、AQP3 の細胞膜移行を促進する物質は皮膚保湿剤や創傷治癒剤としての応用が期待される。これまでに、セッコウやケイガイが皮膚の AQP3 発現を促進して保湿機能を示す生薬として報告されている。

AQP9 は、主に肝臓や脳、白血球、精巣に

発現しているアクアグリセロポリンである。近年、AQP9 ノックアウトマウスの解析結果から、グリセロール代謝異常や血中トリグリセリド値の上昇が確認され、肝臓のグリセロール代謝に AQP9 が関与している可能性が報告されている。空腹時、脂肪細胞に発現する AQP7 と肝細胞の AQP9 の発現は上昇し、これによって脂肪分解で産生されたグリセロールが脂肪細胞に局在する AQP7 によって血中に放出され、この血中のグリセロールが AQP9 によって肝臓に取り込まれ、糖新生を経てグルコースを新たに産生することが示唆された。すなわち、AQP9 が肝臓での糖新生や脂質合成の基質となるグリセロールの供給路としての役割を果たしている可能性を示唆しており、肝臓の AQP9 発現を抑制することは糖新生や脂質合成の抑制に繋がることが考えられる。

細胞内小胞やミクロソームに取り込まれている膜タンパク質の輸送(移行)は、タンパク質の生理機能を制御する上で非常に重要であり、特に細胞膜への移行は、細胞膜の維持や細胞の機能調節に関わっている。上皮細胞における多くのチャネルタンパクの膜輸送が制御されることにより、電解質や細胞容積の恒常性を維持し、シグナル伝達に应答可能になる。近年、腎集合管主細胞において、AQP2 膜移行がバソプレシンにより cAMP カスケードを介して厳密に制御され、体内水分量を維持していることが報告された。脂肪細胞における AQP7 タンパクはエピネフリンによって膜移行が促進され、血中へのグリセロール放出の増加が推察された。AQP1 や AQP5 でもホルモンによる G タンパク活性化に伴った AQP の細胞膜への移行が確認されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、アクアポリン類による水の出入りが細胞における水の貯留に関与することから、アクアポリンの移行に着目し、その制御機構について検討すると共に、移行を制御する天然物由来成分の探索を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験材料

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は、和光純薬工業(株)より購入した。ウシ胎児血清(FCS)は、Bioscience 社、Bovine serum albumin(BSA) は和光純薬工業(株)、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution、トリプシンはナカライテスク(株)、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)およびダルベッコ phosphate-buffered saline(PBS(-))は日水製薬(株)より購入した。Opti-MEM は invitrogen 社より購入した。組織培養用 75 cm<sup>2</sup> フラスコ、Lab-Tek<sup>TM</sup> Chamber Slide<sup>TM</sup> および 15mL、50mL 遠沈管は nunc 社、35mm シャーレおよび 10cm シャーレは Greiner bio-one 社より購入した。

NEPA キュベット電極(EC-002)はネッパージーン社より購入した。

pAcGFP-C1 vector は Clontech 社、QIAGEN® Plasmid Midi Kit は QIAGEN 社より購入した。TaKaRa Ex Taq™、Kpn、Sac は タカラバイオ(株)、T4 DNA Ligase は invitrogen 社より購入した。Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit は Beckman Coulter 社より購入した。Phalloidin-tetramethyl rhodamine B isothiocyanate (TRITC) は Sigma-Aldrich 社より購入した。Phospho-PKC (pan) (gamma Thr514) Antibody #9379、Phospho-PKC (pan) (I1 Ser660) Antibody #9371 は Cell Signaling 社より購入したものをを用いた。

ヒトインスリン(組み換え体)、cytochalasin B は Sigma-Aldrich 社、cytochalasin D は 和光純薬工業(株)、TWS119、jasplakinolide は Santa Cruz、Forskolin #3238 は Cell Signaling Technology より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

#### (2) 共焦点レーザー顕微鏡による測定

細胞を PBS (-) で洗浄後、4% paraformaldehyde を含む PBS を加えて室温にて 30 分間放置した後、固定し、更に 0.1% Triton X-100 を加えて室温にて 10 分間放置した。1% BSA 含有の PBS で 20 分間ブロッキングした後、TRITC ラベル化 phalloidin を 1% BSA 含有 PBS で希釈し(1:1000)、室温にて遮光条件下 40 分間放置し、細胞骨格を構成する F-actin で染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡(LSM700、Zeiss 社)を用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) アクアポリン移行制御の解明

GFP-AQP9 の trafficking に及ぼす PMA と insulin の影響

通常時、無処理(control)では、AQP9 は細胞質細胞膜に普遍的に存在しているが、PKC 活性化剤である PMA で 30 分間処理し、GFP-AQP9 タンパクの細胞内局在性の変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。HepG2 細胞を 100 nM PMA 存在下で、30 分間培養することにより GFP-AQP9 タンパクが細胞質から細胞膜へ移行することが観察された。

Akt/PI3K 活性化剤である Insulin の GFP-AQP9 タンパクの細胞内局在性の変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。PMA により GFP-AQP9 を細胞膜に移行させた後、1µM Insulin の処理を行った。その結果、PMA により細胞膜に移行していた GFP-AQP9 は、その後の Insulin 処理により細胞質へと移動した(Fig. 1)。

微小管とアクチンの GRP-AQP9 Trafficking に及ぼす影響

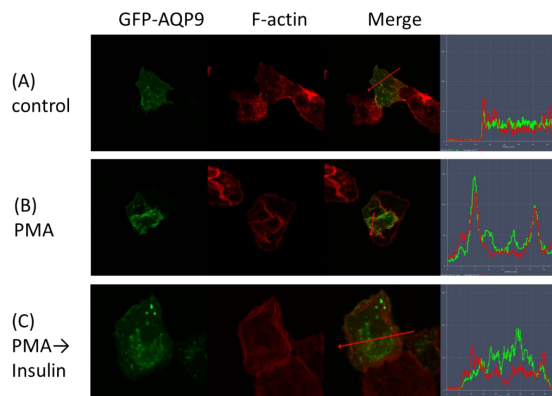
AQP2 においてはアクチン線維が障壁を形成し、PKA による AQP2 リン酸化がアクチンを

脱重合させ細胞膜への移行を可能にさせるという報告がある。一方、HEK293 細胞においては AQP1 が PKC と微小管を介して Trafficking 制御を行っていることが報告されている。そこで、AQP9 における Trafficking 制御に対する細胞骨格の関与はまだ明らかになっていないため、検討を行った。細胞骨格として微小管が関与しているかを解明するために、微小管脱重合阻害剤である demecolcine で前処理し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。Demecolcine の前処理により PMA による GFP-AQP9 の細胞膜移行は阻害されなかったが、insulin による細胞質移行は阻害された。

細胞骨格のアクチンに関してアクチン重合阻害剤である cytochalasin B と cytochalasin D、アクチン脱重合阻害剤である jasplakinolide についても検討を行った。Jasplakinolide の実験においてアクチンの染色に用いた Phalloidin-TRITC の結合部位に Jasplakinolide が競合的に結合したため、赤色蛍光は消失している。

アクチン重合阻害剤 cytochalasin B、cytochalasin D は GFP-AQP9 の Trafficking に影響を及ぼさなかった。しかし、アクチン脱重合阻害剤 demecolcine では、PMA による GFP-AQP9 の細胞膜への移行が阻害された。よって AQP9 の細胞膜移行にはアクチン重合が関与していることが示唆された。

#### Fig.1. Externalization of GFP-AQP9 by PMA



#### and internalization by insulin in HepG2 cells.

#### (2) アクアポリン 3 のリン酸化による局在性制御

AQP3 リン酸化部位変異体の移行に及ぼす PMA の影響

PKC による AQP3 のリン酸化部位であると予想された Thr52, 107, 237 Ser275 の四箇所のリン酸化部位欠損体についての観察を行った(Fig. 2)。

通常の培養状態では、いずれのリン酸化部位欠損体も通常の GFP-AQP3 と同様に細胞膜、細胞質ともに GFP-AQP3 の緑色蛍光が観察された。また PMA を 50 nM の濃度で 30 分間処理したところ、T52A, T107A では通常の GFP-AQP3 と同様に蛍光の細胞膜移行が観察されたが、T237A, S275A では PMA による緑色蛍光の細胞膜移行が観察されなかった。

変異体 T52A と T107A の移行に及ぼす PKC 阻害剤と Akt 阻害剤の影響

T52A, T107A はともに通常の GFP-AQP3 と同様に PMA により細胞膜移行、insulin により細胞質移行がそれぞれ観察された。calphostinC を 100 nM で 1 時間前処理し、その後、PMA を 30 分間処理したところ、PMA による細胞膜移行は通常の GFP-AQP3 同様に観察されなかった。Akt 1/2 kinase inhibitor を 1  $\mu$ M で 1 時間前処理を行い、その後 PMA を加えて 30 分間処理したところ、阻害剤なしのものとは変化は見られなかったが、PMA で 30 分間処理した後に、Insulin 1  $\mu$ M 処理したところ細胞質移行が観察されず PKC 阻害剤と同様に通常の GFP-AQP3 と同じ結果になった。

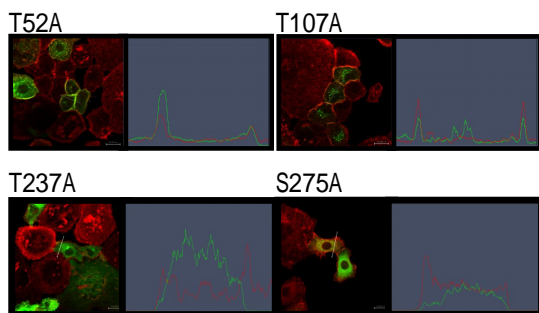


Fig. 2. Trafficking of mutated AQP3 stimulated by PMA.

(3) オイゲノールによる AQP3 膜移行の促進

$\beta$ -シトステロールおよび o-オイゲノールによる AQP3 の細胞内局在性の影響

$\beta$ -シトステロールおよび o-オイゲノールをそれぞれ 10  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1 mM の濃度で培地に添加し、30 分後に GFP-AQP3 の細胞内局在を観察した。その結果、 $\beta$ -シトステロールは全ての濃度において AQP3 の膜移行が確認されなかったが、o-オイゲノールでは 1 mM において AQP3 の膜移行が確認された (Fig. 3)。

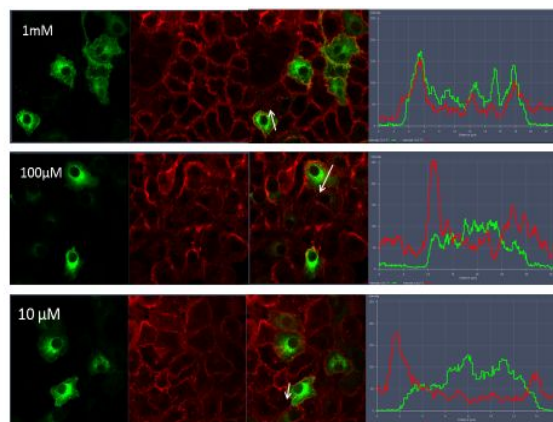


Fig. 3. Effect of o-eugenol on GFP-AQP3 trafficking on HKA-1 cells.

o-オイゲノールによる PKC の活性化

o-オイゲノールによる PKC の発現量およびリン酸化 PKC 量をウエスタンブロットにて確認した。一次抗体として、抗 PKC 抗体、抗 Thr514 リン酸化 PKC 抗体、抗 Ser660 リン酸化 PKC 抗体を使用し、PMA および o-オイゲノールを添加あるいは未添加 (control) した HKA-1 細胞の全細胞抽出液で検討した。なお、PMA は 50 nM で、o-オイゲノールは 1 mM の濃度で 30 分間曝露した。

抗 PKC 抗体を用いた結果より、PKC 発現量は PMA および o-オイゲノールの添加に関わらず変化しなかった。また、抗 Thr514 リン酸化 PKC 抗体の結果より、Thr514 リン酸化 PKC 量も変化しなかった。しかし、抗 Ser660 リン酸化 PKC 抗体の結果より、Ser660 リン酸化 PKC 量は、コントロールと比べ PMA および o-オイゲノールの添加により Ser660 のリン酸化を促進して増加したことが確認された。以上の結果より、o-オイゲノールは PKC を活性化することが示唆された。

(4) 考察

アクアポリン移行制御の解明

本項では、AQP9 の機能調節機序の解明のために、trafficking の動力となりうる細胞骨格アクチン・微小管について検討を行った。AQP2 においては、通常はアクチンフィラメントが障壁を形成することにより膜移行を制御している。それによれば、AQP2 のリン酸化により、アクチンを安定化していたタンパク質 Tropomyosin 5b との親和性が変化し、アクチンが脱重合により解離することで障壁が無くなり、AQP2 が膜移行できるようになる。また、HEK293 細胞において AQP1 は微小管と PKC を介して trafficking が制御されていると報告されている。今回、アクチン脱重合阻害剤 jasplakinolide、重合阻害剤 cytochalasinB および D の比較検討の結果から、AQP9 においても AQP2 と同様に、アクチンフィラメントが AQP9 の細胞膜移行の制御に関与する事が示唆された。

アクアポリン 3 のリン酸化による局在性制御

4 つのリン酸化部位変異体に対し、PKC 活性化による細胞膜移行への影響について観察を行った。T52A、T107A の二つの変異体では通常の GFP-AQP3 と同様の変化が確認された。そして T237A、S275A の二つの変異体では PMA を処理しても細胞膜への緑色蛍光の移動が観察されなかった。このことから Thr237、S275 の二箇所が AQP3 のリン酸化部位であることが示唆された。多くの膜たんぱく質はリン酸化により制御を受けている。そして必ずしも一箇所のアミノ酸残基がリン酸化、脱リン酸化されてその機能が調節されているのではなく、複数のアミノ酸残基のリン酸化が必要である場合もある。AQP2 では複数のセリン残基のリン酸化、脱リン酸化がエンドサイ



トーシス、エキソサイトーシスに影響を与えること、また、腎臓において AQP1 は 2 箇所  
の Thr 残基がリン酸化されることにより浸透  
圧に対する水の調節を行うことが報告され  
ている。このように他の AQP は複数のリン酸  
化により制御されている。本実験で見出され  
た Thr237, Ser275 の 2 つのリン酸化部位は  
どちらも AQP3 の細胞膜移行に重要であるこ  
とが考えられる。

#### オイゲノールによる AQP3 膜移行の促進

AQP3 は細胞の水分調節に重要であるが、そ  
の局在が変化することが細胞の水分保持機  
能に極めて重要であると考えられる。本研究  
では、HKA-1 細胞中で GFP と融合した AQP3 を  
発現させ、GFP の緑色蛍光を共焦点レーザ  
顕微鏡を用いて観察することにより、AQP3 の  
細胞内局在性を評価する系を用い、複数の生  
薬抽出物が AQP3 の細胞内局在に及ぼす影響  
を検討した。その結果、ジオウ、シンイ、ク  
リプトカリア・フェレアの 3 種類が AQP3 を  
細胞膜に移行させることを明らかにした。さ  
らにこれら生薬の成分の解析の結果、シンイ  
に含まれる o-オイゲノールが AQP3 を細胞膜  
に移行させることを明らかにした。

また、o-オイゲノールにより Ser660 リン  
酸化 PKC 量が PMA と同様に増加することを示  
し、PKC 阻害剤である calpostin C により、  
AQP3 の細胞膜移行が阻害されたことから、o-  
オイゲノールによる AQP3 の細胞膜移行には  
PKC が関与することが示唆された。o-オイゲ  
ノールは PKC の活性化を介して AQP3 の細胞  
膜移行を引き起こすことが示唆された。しか  
し、Thr514 リン酸化 PKC 量は PMA も o-オイ  
ゲノールもコントロールと差は見られなか  
った。したがって、Ser660 は、PMA および o-  
オイゲノールによりリン酸化される PKC の部  
位であることが示唆された。だが、今回は PMA  
および o-オイゲノールを添加後 30 分後に測  
定を行っているので、短時間または長時間の  
o-オイゲノールの添加では Thr514 リン酸化  
PKC 量が変化し、PKC リン酸化に影響を及ぼ  
す可能性は否定できない。なお、PKC は現在  
までに哺乳類において 11 種類のアイソザイ  
ムが同定されている。また、PKC は一次構造、  
細胞内分布、基質特異性、活性化様式に基  
づいて 3 つに分類されている。本研究で PKC の  
活性化剤として用いた PMA は天然の PKC リガ  
ンドであるジアシルグリセロールのミミック  
であり、PKC サブタイプのグループ A (  $\alpha$ ,  
 $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), グループ B (  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  ) を  
特異的に活性化する。さらに PKC 抗体、リン  
酸化 PKC 抗体も PKC 汎用の抗体であり、サブ  
タイプに特異性はない。よって、サブタイプ  
の関与については、更なる検討を行う必要で  
あると思われる。

#### 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 3 件)

Kazuhiro Iguchi, Maki Hashimoto,  
Masafumi Kubota, Shuji Yamashita,  
Mitsuhiro Nakamura, Shigeyuki Usui,  
Tadashi Sugiyama, and Kazuyuki Hirano.  
Effects of 14 frequently used drugs on  
prostate-specific antigen expression in  
prostate cancer LNCaP cells. *Oncol.  
Lett.*, 7, 1665-1668 (2016).

Toshinobu Shakui, Kazuhiro Iguchi,  
Tetsuro Ito, Misako Baba, Shigeyuki Usui,  
Masayoshi Oyama, Hideki Tosa, Munekazu  
Iinuma, and Kazuyuki Hirano.  
Anti-androgenic activity of  
hydroxyxanthenes in prostate cancer LNCaP  
cells. *Fitoterapia*, 92, 9-15 (2016).

Yoko Miura, Masayoshi Oyama, Kazuhiro  
Iguchi, Tetsuro Ito, Misako Baba, Yuji  
Shikama, Shigeyuki Usui, Kazuyuki Hirano,  
Munekazu Iinuma, Hiroshige Mikamo.  
Anti-Androgenic Activity of Icarisid II  
from Epimedium Herb in Prostate Cancer  
LNCaP Cells. *J Nutr Sci Vitaminol*, 61(2),  
201-204 (2015).

#### 〔学会発表〕(計 1 件)

四元珠湖、曾田翠、北市清幸、臼井茂之  
オイゲノールによる AQP3 の細胞内局在  
性変化、日本薬学会第 136 年会、2016 年  
3 月、横浜

#### 〔図書〕(計 0 件)

#### 〔産業財産権〕なし

#### 出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

#### 取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

#### 〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

臼井茂之 (USUI SHIGEYUKI)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40176665

(2)研究分担者

大山雅義 (OYAMA MASAYOSHI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30381718

(3)連携研究者 なし

( )

研究者番号：

(4)研究協力者 なし

( )