

機関番号：23701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19590150

研究課題名（和文） インスリンによるアクアグリセロポリンの発現調節機序解析とグリセロール代謝調節

研究課題名（英文） Studies on mechanism of the expression of aquaglyceroporins by insulin and contribution of aquaglyceroporins to glycerol metabolism

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

研究成果の概要（和文）：ヒト大腸癌由来 Caco-2 細胞を用いてアクアポリン（AQP）3 の発現調節機構並びに機能調節機構の解明を行った。インスリンによる AQP3 の発現抑制には、転写調節因子 Foxa2 が関与することを明らかにした。制酸剤に含まれるマグネシウム（イオン）による AQP3 の発現亢進には、アデニル酸シクラーゼの活性化とそれに続くシグナル伝達因子 PKA、MEK1/2、MSK1 の活性化、更に転写調節因子 CREB が関与することを示した。また、エピネフリンによる AQP3 の膜移行促進は、PKC の活性化に基づくことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Expression and functional mechanisms of aquaporin (AQP) 3 was investigated using human colon carcinoma cell line (Caco-2). Forkhead box a2 (Foxa2) was suggested to be one of the transcriptional regulators for AQP3 gene expression mediated by insulin. Signal transducers, adenylyl cyclase, protein kinase A, mitogen-activated protein kinase kinase 1/2, and mitogen- and stress-activated protein kinase 1, were demonstrated to be involved in the signaling pathway for regulating transcription of the aquaporin 3 gene and cAMP response element-binding protein is one of the transcriptional regulators for aquaporin 3 gene expression mediated by magnesium ion. Protein kinase C was shown to modulate the externalization of AQP3 by epinephrine.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：生物薬剤学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：アクアポリン3、グリセロール、インスリン、エピネフリン、マグネシウム、トラフィッキング、プロテインキナーゼA、プロテインキナーゼC

1. 研究開始当初の背景

アクアポリン（AQP）は現在までに 13 種の分子種が報告されており、消化管には主として AQP1、3、4、7、8 および 11 が局在する。このうち水以外の低分子溶質も透過するのは AQP3 と 7 であるが、発現量は AQP3 が有意に

多い。消化管に存在する AQP3 は消化物中の水分吸収と低分子物質の輸送に大きく関わると考えられており、AQP3 欠損マウスでは下痢及び血中グリセロール濃度の低下が観察されている。申請者らは、ヒト大腸癌由来 Caco-2 細胞にインスリン作用させたとき、

AQP3 mRNA 発現量が有意に抑制される事を見出し、AQP3 による食物中グリセロールの輸送調節が、インスリンの血糖降下作用に関連する可能性が考えられた。また、インスリンによる AQP3 遺伝子発現抑制のシグナル伝達経路には、PI3K と mTOR が関与する事も認められた。しかし、AQP3 遺伝子の発現調節に関わる転写調節因子については、未だ明らかにされていない。一方、AQP3 が下痢の成因に関係することから、AQP3 の機能や発現調節に及ぼす止瀉薬や瀉下薬の影響については非常に興味を持たれるが、今までにこれに関連した報告は無い。申請者らは、緩下剤として用いられている酸化マグネシウムに着目し、マグネシウムにより AQP3 の転写が増加することを新たに見出した。このことは、消化管において水分透過に関与する AQP3 が、酸化マグネシウムの新たな作用機序を見出すきっかけとなる分子として着目すべき点であると思われる。

2. 研究の目的

(1) AQP3 転写調節機構の解明を通じて、血糖値調節に果たす AQP3 の役割を明らかにし、更に、AQP3 遺伝子発現に関わる転写調節因子の糖代謝全体における意義を考察するため、以下のことを行なった。

インスリンによる AQP3 遺伝子発現抑制のシグナル伝達経路の解明

インスリン応答に起因した AQP3 の転写調節に関わるゲノム上の転写調節領域及び転写調節因子の同定

(2) 緩下剤として広く用いられている酸化マグネシウムによる腸管での水分の透過(移動)調節機序を解明する目的で、以下のことを行なった。

水の透過に関与する主な AQP 分子種 (AQP1, 3, 11) の発現に及ぼすマグネシウムの影響
マグネシウムによる AQP3 遺伝子発現上昇の機序解明

(3) AQP3 の膜局在性変化の機序を解明するため、以下のことを行なった。

インスリン及びエピネフリンによる AQP3 細胞内局在性変化の機序解明

3. 研究の方法

ヒト大腸癌由来細胞 Caco-2 は、10% FCS, 5% NEAA を含む DEME 培地中で維持した。AQP3 mRNA 及びタンパク質の発現量は、それぞれ real-time RT-PCR 法及びウエスタンブロット法を用いて測定した。AQP3 遺伝子転写調節に関わる因子の推定は、レポーター遺伝子アッセイ及び siRNA を用いて行なった。AQP3 発現調節に関わるシグナル伝達経路は、各種シグナル伝達因子阻害剤を用いて検討した。AQP3 の細胞内局在性の変化は、免疫蛍光染色法及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) インスリンによる AQP3 遺伝子発現抑制に関わる転写調節因子の解明

インスリンの AQP3 発現に及ぼす影響を調べた結果、AQP3 の発現抑制を認めたので、血糖調節に関わるホルモンと経口糖尿病薬の AQP3 転写調節に及ぼす影響について検討した。更に、これら血糖調節因子による AQP3 発現調節に関与するシグナル伝達系の解明を試み、以下の研究成果を得た。

Caco-2 細胞における AQP3 の遺伝子発現量は、100nM インスリンや 100 μ M トログリタゾンで 12 時間処理することにより約 30% に低下し、また、100 μ M トルブタミド処理でも 40% に低下した。一方、100nM エピネフリンで 12 時間処理することにより、AQP3 遺伝子発現量は約 2 倍に増加した(図 1)。

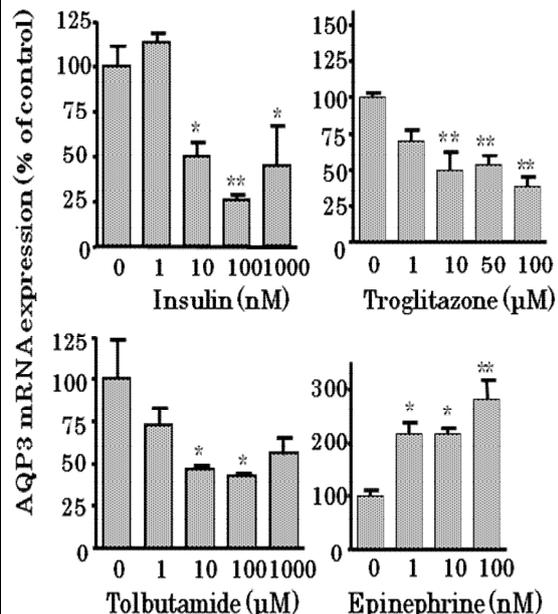


図 1 .AQP3 遺伝子発現に及ぼすホルモンと薬剤の影響

これら血糖調節ホルモンと薬剤による AQP3 の遺伝子発現制御機序を明らかにするため、各種シグナル伝達因子阻害剤を用いて AQP3 遺伝子発現に関わるシグナル伝達経路を検討した。PI3K 阻害剤ワートマニンや mTOR 阻害剤ラパマイシンはインスリン或いはトログリタゾンの AQP3 発現抑制作用を阻害したが、GSK3 阻害剤塩化リチウムは何ら影響を及ぼさなかった。PKA 阻害剤 H89 はエピネフリンによる AQP3 発現亢進を阻害したが、PKC 阻害剤カルフォスチン C は影響しなかった。以上の結果から、インスリンやトログリタゾンは PI3K 及び mTOR を介し、一方、エピネフリンは PKA を介したシグナル伝達経路により AQP3 遺伝子発現が制御されることが示唆された(図 2)。

インスリンによる AQP3 mRNA 発現抑制に関わる転写調節因子を特定するため、AQP3 遺伝

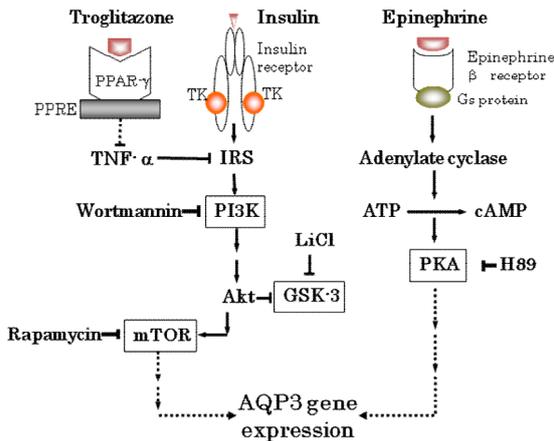


図2 . AQP3 遺伝子発現制御機序

子転写調節領域を解析した結果、Foxa2 がインスリン処理によって発現抑制されることをリアルタイム RT-PCR 法を用いて見出した。また、Foxa2 結合領域を変異すると、レポーター遺伝子アッセイにおけるルシフェラーゼの応答が減少したと、及び、Foxa2 に対する siRNA を用いて Foxa2 の転写をノックダウンすると、インスリンによる AQP3 発現抑制が解除されたことから、Foxa2 はインスリンによる AQP3 発現抑制に関与する転写因子であることが示唆された(図3)。

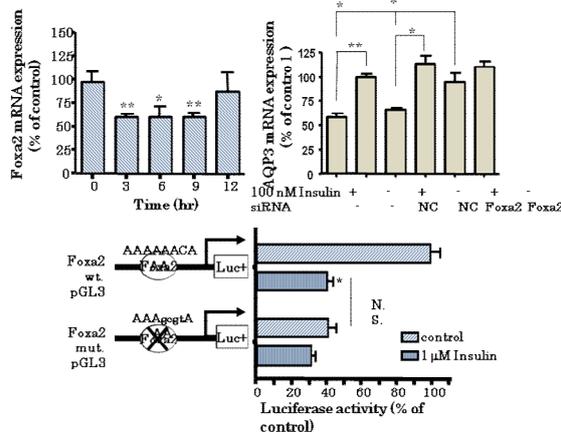


図3 . Foxa2 による AQP3 遺伝子の転写調節

(2) マグネシウム(イオン)による AQP3 発現調節機序の解明

大腸における水透過の調節は下痢や便秘の成因と深く関係があるが、下剤や止瀉剤の AQP3 に及ぼす影響についてはほとんど解明されていない。そこで、緩下剤として臨床で広く用いられている酸化マグネシウムに着目し、マグネシウム(イオン)による AQP3 発現とその発現調節機序について検討した。

Caco-2 細胞を 50mM 酢酸マグネシウムで 12 時間処理したところ、AQP3mRNA 発現は約 2 倍に増加した(図4)。この増加は、adenylyl cyclase、PKA、MEK1/2 及び MSK1 の阻害剤である MDL-12,330A、H-89、U0126、Ro-31-8220

処理により消失した(図5)。

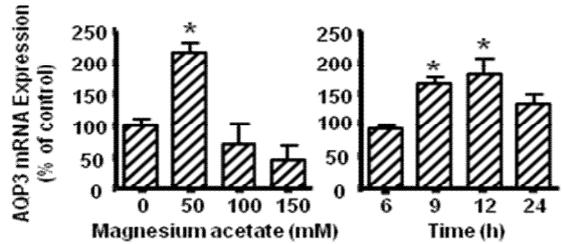


図4 . AQP3 遺伝子発現に及ぼす酢酸マグネシウムの影響

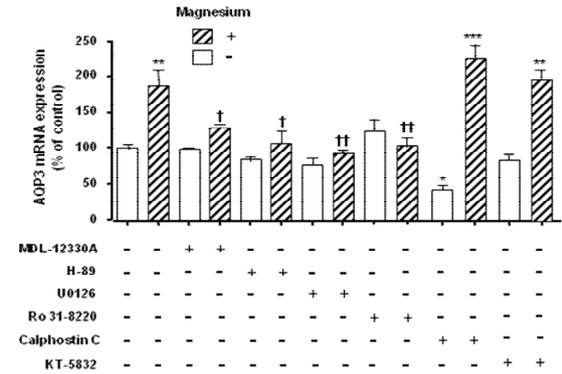


図5 . AQP3 遺伝子発現に及ぼす各種阻害剤の影響

レポーター遺伝子アッセイ及び阻害剤を用いた上記結果を考慮して AQP3 の転写調節領域を探索したところ、転写調節因子の候補として CREB が見出された。そこで、CREB に対する siRNA を用いて CREB をノックダウンした結果、酢酸マグネシウムによる AQP3 遺伝子の発現亢進は完全に消失した。すなわち、CREB は、酢酸マグネシウムによる AQP3 遺伝子の発現亢進における転写調節因子として働くことが示唆された(図6)。

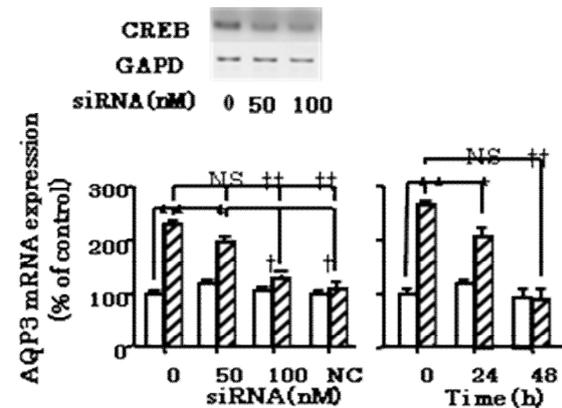


図6 . CREB siRNA による転写増強の喪失

(3) エピネフリンにより惹起される AQP3 の膜移行

グルコースを輸送する GLUT4 は、インスリンにより細胞質内から細胞膜上に移行する

ことが知られている。グリセロール輸送という機能を果たすためには AQP3 が細胞膜上に存在することが重要である。しかし、細胞中にある全ての AQP3 分子が常に細胞膜上に存在するのではなく、GLUT4 と同様にグリセロール輸送の必要性に応じて、AQP3 分子は細胞膜上と細胞質内を移動していると考えられる。そこで、この膜移行の機序を解明するため、エピネフリンによる AQP3 の細胞内局在性の変化及びこれに関与するシグナル伝達経路の検討を行った。

1 μ M エピネフリンで Caco-2 細胞を 60 分間処理した結果、膜画分における AQP3 タンパク質量は未処理群と比較して約 2 倍に増加した(図 7)。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた視覚的評価においても、エピネフリンによる AQP3 の膜移行が観察された(図 8)。

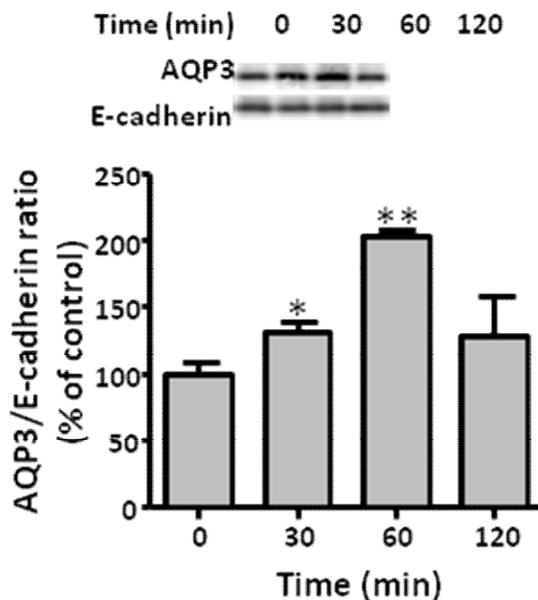


図 7 . エピネフリンによる AQP3 の膜移行

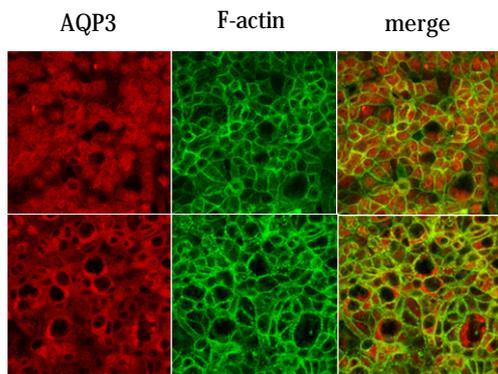


図 8 . 共焦点レーザー顕微鏡による観察

エピネフリンによる AQP3 の膜移行促進は PLC 及び PKC 阻害剤である U73122 と Calphostin C により消失した(図 9)。

以上の結果から、エピネフリンによる AQP3 の膜移行促進は、PLC 及び PKC を介したシグナル伝達経路で制御されることが示唆された。

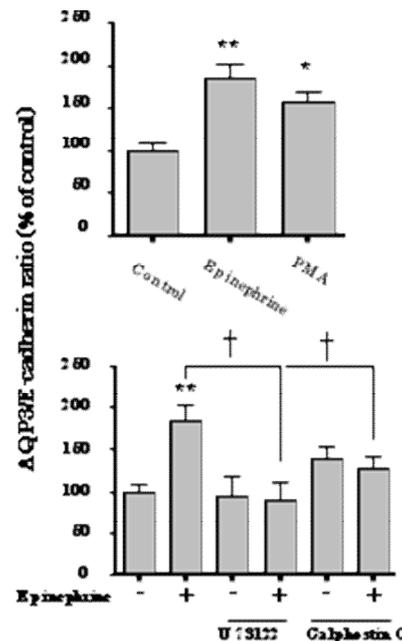


図 9 . PLC 及び PKC 阻害剤による AQP3 膜移行の抑制

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 5 件)

Masafumi Kubota, Aya Shinoda, Kazuhiro Iguchi, Yukari Takahashi, Shigeyuki Usui, Tadashi Kiho and Kazuyuki Hirano. Up-regulation of the lysyl hydroxylase 2 gene by acetaminophen and isoniazid is modulated by transcription factor c-Myb. *J. Pharm. Pharmacol.* 62(4), 477-483 (2010). 査読有

Yuichi Yokoyama, Masafumi Kubota, Kazuhiro Iguchi, Shigeyuki Usui, Tadashi Kiho and Kazuyuki Hirano. Regulation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase expression by metformin in HepG2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 32(7), 1160-1165 (2009) 査読有

Hideyuki Yasui, Masafumi Kubota, Kazuhiro Iguchi, Shigeyuki Usui, Tadashi Kiho, and Kazuyuki Hirano. Membrane trafficking of aquaporin 3 induced by epinephrine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 373, 613-617 (2008) 査読有

Masaki Okahira, Masafumi Kubota, Kazuhiro Iguchi, Shigeyuki Usui, and Kazuyuki Hirano. Regulation of aquaporin

3 expression by magnesium ion. Eur. J. Pharmacol., 588(1), 26-32 (2008). 査読有
Shota Higuchi, Masafumi Kubota, Kazuhiro Iguchi, Shigeyuki Usui, Tadashi Kiho, and Kazuyuki Hirano. Transcriptional regulation of aquaporin 3 by insulin. J. Cell. Biochem., 102, 1051-1058 (2007). 査読有

井口 和弘 (IGUCHI KAZUHIRO)
岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10295545

(3)連携研究者 該当なし

〔学会発表〕(計7件)

横山雄一, 井口和弘, 臼井茂之, 平野和行 AMPKを介したアクアポリン9の発現抑制機構の解明 日本薬学会第131年会 2011年3月30日 静岡

木村純子, 井口和弘, 臼井茂之, 平野和行 AMPKによるAQP9の細胞内トラフィッキング調節 日本薬学会第131年会 2011年3月30日 静岡

横山雄一, 井口和弘, 臼井茂之, 平野和行 AMPKを介したアクアポリン9の発現抑制機序 日本薬学会第130年会 2010年3月30日 岡山

横山雄一, 井口和弘, 臼井茂之, 平野和行 AMPKを介したアクアポリン9の発現抑制 第55回日本薬学会東海支部総会・大会 2009年7月11日 名古屋

横山雄一, 井口和弘, 臼井茂之, 平野和行 AMPKを介したアクアポリン9の発現制御 日本薬学会第129年会 2009年3月27日 京都

保居英行, 窪田傑文, 井口和弘, 臼井茂之, 平野和行 エピネフリン及びAMP活性化プロテインキナーゼによるアクアポリン3の膜移行制御 日本薬学会第128年会 2008年3月27日 横浜

Shigeyuki Usui, Masashi Okahira, Masafumi Kubota, Kazuhiro Iguchi, and Kazuyuki Hirano. Regulation of Aquaporin 3 Expression by Magnesium Ion. The 5th International Conference of Aquaporin. July 14, 2007. Nara

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gifu-pu.ac.jp>

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

平野 和行 (HIRANO KAZUYUKI)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90057365