

機関番号：16101
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791806
 研究課題名 (和文) 翻訳後修飾による水チャネルアクアポリン5の細胞内局在・輸送制御
 研究課題名 (英文) Regulation of posttranslational modification of water channel aquaporin-5 in the intracellular localization and trafficking
 研究代表者
 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

研究成果の概要 (和文)：

マウス唾液腺細胞において、水チャネルアクアポリン5 (AQP5) は2種類の翻訳後修飾 (リン酸化とユビキチン化) を受けることを見出した。AQP5は細胞内カルシウムシグナルを介して一過的に短鎖ユビキチン化されること、細胞内cAMPシグナルを介して一過的にリン酸化されることを明らかにした。これらの事は交感神経および副交感神経系による唾液分泌の調節にAQP5の翻訳後修飾が関与していることを示している。

研究成果の概要 (英文)：

Two types of posttranslational modification (phosphorylation and ubiquitination) of water channel aquaporin-5 (AQP5) were found in mouse salivary gland cells. AQP5 was transiently ubiquitinated and phosphorylated through the stimulation of intracellular Ca^{2+} signaling and the cAMP signaling, respectively. Our present study reveals that the posttranslational modifications of AQP5 are involved in the saliva secretion that is regulated by sympathetic and parasympathetic nervous systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：口腔分子生理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：アクアポリン、翻訳後修飾、リン酸化、ユビキチン化、細胞内輸送、唾液腺

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の効率的な水透過には、アクアポリン (aquaporin; AQP) と呼ばれる水チャネルの存在が必要であり、哺乳類では13種類のAQPアイソフォームが存在する。このうち、数種のAQPは、ホルモンや神経伝達物質などの外部刺激に応じて細胞内と細胞膜間を輸送されるAQPであり、この細胞内輸送が生理的に重要な役割を持つ。たとえば、腎臓集合

管のAQP2は、抗利尿ホルモン依存的な細胞内-細胞膜間の輸送調節により、原尿からの水再吸収に重要な役割を果たす (Fushimi et al., Nature 361, 549-552, 1993)。また、唾液腺の腺房上皮細胞に発現するAQP5は、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (M3受容体) を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がシグナルとなり、細胞膜へ動員されることから、漿液性唾液の分泌促進に重要である (Ishikawa

et al. Biochem Biophys Res Commun 245, 835-840, 1998)。

AQP2の抗利尿ホルモン依存的な細胞内-細胞膜間の輸送調節にはAQP2自身の翻訳後修飾が深く関与している。AQP2リン酸化は細胞内小胞から細胞膜へのエキソサイトシスのシグナルであること(Katsura et al., Am J Physiol 272, 1997)、AQP2ユビキチン化は細胞内への取込みやライソソームへの輸送シグナルであること(Kamsteeg et al., Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2006)が想定されている。

AQP2のような生理的機能に直結する翻訳後修飾の調節は、AQP5では知られていない。肺上皮や気管上皮の培養細胞でリン酸化するという報告(Sidhaye et al., J Biol Chem 280, 2005; Woo et al. Biochem Biophys Res Commun 366, 2008)があるが、いずれも生体における検討はなされていない。また、唾液腺AQP5における報告は皆無であり、AQP5翻訳後修飾の機能や細胞内輸送・局在調節への関与も未解明のままである。

2. 研究の目的

上記のようにAQP5の翻訳後修飾はその存在や調節機構および機能について未解明な点が多い。本研究は、我々が見出したAQP5のユビキチン化やリン酸化等の翻訳後修飾について、特にAQP5細胞内輸送に与える影響を解析し、生体における翻訳後修飾の意義を明らかにすることを目的としている。また、本研究では唾液腺AQP5を主として解析するが、AQP5は気管支腺や涙腺などの外分泌腺や肺胞上皮細胞にも発現しており、AQP5翻訳後修飾の意義を明らかにすることで、各器官の水代謝システムの一端を解明することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) AQP5の分画および溶解法の検討

AQP5の翻訳後修飾(ユビキチン化およびリン酸化)を解析するためにAQP5免疫沈降法を行うが、まず、その手法に至るまでの分画、溶解等の生化学的手法を改善した。唾液腺破砕液を比較的低速度(17,000 x g)で遠心をした沈澱物に、ほとんどのAQP5は含まれていた。また、AQP5は細胞膜においてラフトに存在し(Ishikawa et al., Am J Physiol Cell Physiol 289, C1303-1311, 2005)、低温下の非イオン性界面活性剤Triton X-100処理では不溶となる。これは本研究で行うAQP5免疫沈降実験結果の信頼性低下を招くので、AQP5溶解法の改善が必要であった。コレステロール除去剤を含む様々な界面活性剤の処理順序や組合せの検討から、サポニン処理後

Triton X-100処理を行うことで効率的に可溶化することが可能となった。このAQP5分画・抽出条件で常法通り以降のAQP5免疫沈降を行った。

(2) AQP5リン酸化に関する研究

① マウス唾液腺におけるAQP5リン酸化の検出およびリン酸化酵素種の探索

ICR(CD1)マウス顎下腺抽出液からのAQP5免疫沈降物で、複数のリン酸化モチーフ抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

② 培養細胞系におけるAQP5リン酸化の誘導とAQP5リン酸化部位の同定

常法によりマウスAQP5 cDNAを組み込んだ哺乳類細胞発現ベクターを作製した。このベクターを基に、PKAによる推定リン酸化部位や近傍のセリン(S)やスレオニン(T)をアラニン(A)に置換したAQP5の点変異体を作製した。また、FLAGタグAQP5の各点変異体も作製した。これらAQP5発現ベクターをヒト唾液腺由来HSG細胞に一過的あるいは恒常的に発現させ、薬剤処理時のAQP5リン酸化や局在の解析を行った。

③ 抗リン酸化AQP5ペプチド抗体を用いたマウス唾液腺におけるAQP5リン酸化誘導および局在の解析

AQP5リン酸化部位を同定後、リン酸化AQP5を認識する抗ペプチド抗体(抗pAQP5(T259)抗体)を作製し、免疫沈降法を介さないリン酸化AQP5の検出(直接ウェスタンブロット)や、マウス唾液腺の免疫染色に用いた。

マウスにイソプロテレノール(・アドレナリン受容体アゴニスト;交感神経模倣;細胞内cAMP濃度上昇)を投与後、唾液腺を採取してAQP5のリン酸化を調べた。

(3) AQP5ユビキチン化に関する研究

① マウス唾液腺におけるAQP5ユビキチン化の誘導

ICR(CD1)マウスにピロカルピン(ムスカリン受容体アゴニスト;副交感神経刺激模倣;細胞内Ca²⁺濃度上昇)を投与後の唾液腺を採取し、AQP5免疫沈降物に対し、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行うことで、AQP5のユビキチン化を検出した。

② 培養細胞系におけるAQP5ユビキチン化の誘導とAQP5ユビキチン化部位の同定

正常マウスAQP5発現ベクターを基に、AQP5の細胞内領域に存在するリシンをアルギニンに置換したAQP5の点変異体を作製した。また、FLAGタグAQP5の各点変異体も作製した。これらAQP5発現ベクターをヒト唾液腺

由 HSG 細胞に一過的あるいは恒常的に発現させ、薬剤処理時の AQP5 ユビキチン化や局在の解析を行った。

4. 研究成果

(1) AQP5 リン酸化に関する研究

① マウス唾液腺における AQP5 リン酸化の検出およびリン酸化酵素種の探索

ICR (CD1) マウス顎下腺抽出液からの AQP5 免疫沈降物で、複数のリン酸化モチーフ抗体を用いてウェスタンブロットを行い、どのキナーゼ種が AQP5 をリン酸化する可能性があるのか探った。抗プロテインキナーゼ A (PKA) リン酸化基質抗体で顕著なシグナルが検出されたため、以降は主に PKA による AQP5 リン酸化の解析を進めた。

② 培養細胞系における AQP5 リン酸化の誘導

正常 AQP5 を HSG 細胞に発現させ、細胞からの AQP5 免疫沈降物に対して抗リン酸化 PKA 基質抗体でウェスタンブロットを行うと、約 28.3kD のバンドが検出された。このバンドは正常 AQP5 (約 27.0kD) よりも少し大きい位置に検出された。この細胞に cAMP 濃度上昇薬 (8-bromo-cAMP、フォルスコリン) や PKC 活性化剤 (PMA) を 10 分作用させると、このバンドは増強されたが、A23187 では増強されず、むしろ低下していた。増強されたバンドは H89 の前処理によって阻害された。さらに FLAG タグ付与した AQP5 ではこのバンドは FLAG タグの分子量 (約 1kD) だけシフトした。また、時間依存的なリン酸化を調べると、少なくとも試薬添加後 2 分後からバンドが増強され始めた。これらのことは、AQP5 自身が cAMP シグナルを介して、PKA の標的部位において素早くリン酸化されることを示している。

③ AQP5 リン酸化部位の同定

6 回膜貫通タンパク質である AQP5 の推定 PKA 標的配列はループ D (細胞内) にある SRRTS¹⁵⁶ と C 末端領域 (細胞内) にある RKKT²⁵⁹ の 2 箇所あり、それぞれ S156 と T259 がリン酸化され得る。抗リン酸化 PKA 基質抗体で検出されるバンドがどちらのリン酸化部位によるものなのか、あるいは S152 や T155 が実際のリン酸化部位でないかを確認した。HSG 細胞において AQP5 リン酸化部位点変異体の解析を行うと、AQP5-T259A は抗リン酸化 PKA 基質抗体でバンドは検出されなかった。FLAG タグ AQP5 変異体発現細胞において、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した場合にも同様の結果であった。従って AQP5 は T259 でリン酸化されることが判明した。

④ 抗リン酸化 AQP5 ペプチド抗体を用いたマウス唾液腺における AQP5 リン酸化誘導および局在の解析

T259 でリン酸化された AQP5 を検出できる抗リン酸化 AQP5 (T259) 抗体 (pAQP5 (T259) 抗体) を作製した。この抗体を用いることで、従来の間接的な (AQP5 免疫沈降後リン酸化 PKA 基質抗体で検出する) 方法ではなく直接的にリン酸化 AQP5 が生化学的に検出できるうえに、免疫染色で組織内の局在も可視化できる。

マウス唾液腺 (顎下腺と耳下腺) において、培養細胞系と同様に、cAMP シグナルを誘導した時リン酸化 AQP5 が検出されるかを調べた。イソプロテレノール投与後、経時的に唾液腺を採取し、従来の間接的リン酸化 AQP5 検出法と抗 pAQP5 (T259) 抗体の直接的検出法を用いて、ウェスタンブロットで比較した。リン酸化 AQP5 のシグナルはイソプロテレノール投与後 5-10 分で最大に達し、その後減少した。また、両抗体の検出でほぼ同じ結果が得られた。このことは、*in vivo* においても、AQP5 は T259 において cAMP シグナル下で素早くかつ一過的にリン酸化されることを示している。また、pAQP5 (T259) 抗体の特異性と有用性が示された。

唾液腺の免疫染色において、この pAQP5 (T259) 抗体を用いてイソプロテレノール投与時のリン酸化 AQP5 の局在を調べると、平常時あまり検出されないが、投与後 5 分で腺房細胞の細胞膜が染色されるようになった。通常の抗 AQP5 抗体での染色は、平常時および投与時でほとんど細胞膜が染色されることから、AQP5 のリン酸化は細胞膜で起こること、イソプロテレノール刺激で AQP5 は細胞内輸送を起こさず、AQP5 のリン酸化は細胞内輸送のシグナルではないことが考えられた。

また、対照的に、ピロカルピン投与時のマウス唾液腺において抗 pAQP5 (T259) 抗体で AQP5 のリン酸化を調べると、平常時よりもリン酸化 AQP5 の量が低下する傾向が見られた。

⑤ HSG 細胞での cAMP シグナル経路における AQP5 リン酸化と細胞内輸送の解析

上記のように、正常 AQP5 を発現する HSG 細胞では、cAMP 濃度の上昇で AQP5 リン酸化が誘導される。リン酸化誘導時の AQP5 の局在を AQP5-T259A 変異体でも調べると、正常 AQP5 と同様に常に細胞膜に局在した。*in vivo* における局在解析を裏付ける結果であり、AQP5 のリン酸化は細胞内輸送に関与しないことが示唆された。

⑥ AQP5 リン酸化研究のまとめ

AQP5 リン酸化に関する研究をまとめると、cAMP シグナルを介して AQP5 は T259 で PKA に

よって一過的にリン酸化されること、AQP5 リン酸化の細胞内輸送シグナルとなる可能性は低いことが明らかとなった。また、このことは交感神経刺激による唾液タンパク分泌過程に AQP5 のリン酸化が起こることを示唆しており、この過程において細胞内輸送の抑制や AQP のチャネル機能変化などの何らかの調節機構への寄与が推察される。

(2) AQP5 ユビキチン化に関する研究

① マウス唾液腺における AQP5 ユビキチン化の誘導

マウスにピロカルピンを投与後、経時的に唾液腺（顎下腺および耳下腺）を採取し、AQP5 免疫沈降物に対し、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行った。投与前ではほとんどシグナルは検出されないが、投与後 5 分で約 36kD、45kD、53kD のラダー状のバンドが検出され始め、10 分後にこれらのシグナルが最大に達し、その後減少した。ユビキチン 1 分子は約 8.6kD であり、ラダー状のバンドは AQP5 (約 27kD) にユビキチン分子が 1~3 分子程度結合したものと推定された。この実験結果はピロカルピンによる一過的な AQP5 の短鎖ユビキチン化が誘導されたことを示している。

② 培養細胞系における AQP5 ユビキチン化の誘導と AQP5 ユビキチン化部位の同定

正常 AQP5 を発現させた HSG 細胞において、A23187（カルシウムイオノフォア）や thapsigargin（小胞体 Ca ポンプ阻害薬）などの細胞内 Ca^{2+} 上昇薬を作用させると、マウス唾液腺と同様に、AQP5 の短鎖ユビキチン化を示すラダー状バンドの強度は、処理後 5 分で最大になり、その後減弱した。タンパク質のユビキチン化はリシンで起こることが多いことから、AQP5 の細胞内領域にあるリシンをアルギニンに置換した変異体を作製し、同様の解析を行った。AQP5-K2R、-K3R、K2RK3R、-K140R では短鎖ユビキチン化は検出されるが、AQP5-K257R や AQP5-K258R ではシグナルは減弱し、AQP5-K257RK258R では完全にシグナルが消失した。また、FLAG タグ AQP5 でのラダー状のバンドは、正常 AQP5 のものと比べて、FLAG タグの分子量（約 1kD）だけシフトした。これらのことは Ca^{2+} シグナルを介して、AQP5 自身が K257 あるいは K258 で素早く一過的にユビキチン化されることを示している。

③ HSG 細胞での Ca^{2+} シグナル経路における AQP5 ユビキチン化と細胞内輸送の解析

タンパク質ユビキチン化の役割は多様であり、一般的なプロテアソームによる分解シグナルだけではなく、受容体や輸送体などの

膜タンパク質では、モノユビキチン化がエンドサイトーシスやライソソームへの輸送のシグナルになることが知られている (Staub et al., *Physiol Rev* 86, 2006)。また、本研究で得られた短鎖ユビキチン化は、唾液分泌低下の開始時期に観察される。AQP5 ユビキチン化が細胞内輸送の特にエンドサイトーシスに関与することを想定し、HSG 細胞におけるユビキチン化誘導時の AQP5 細胞内輸送を解析した。

非ユビキチン化 AQP5 変異体 (AQP5-K257RK258R) あるいは正常 AQP5 を発現する HSG 細胞を用いた免疫染色において、両 AQP5 は主に細胞膜に局在した。A23187 あるいは thapsigargin 等の Ca^{2+} シグナル上昇薬処理でも同様の局在を示した。また、細胞膜表面タンパクのビオチン化および脱ビオチン化でエンドサイトーシス AQP5 量を生化学的に解析しても、両者に顕著な違いは見られなかった。このことは、AQP5 ユビキチン化はエンドサイトーシスのシグナルとして関与しないことを意味している。しかしながら、AQP5 ユビキチン化は微量であり明確な差が出ていないのかもしれない、実験検出系に改良が必要である。

④ AQP5 ユビキチン化研究のまとめ

AQP5 ユビキチン化に関する研究をまとめると、 Ca^{2+} シグナルを介して AQP5 は K257 あるいは K258 で素早く一過的に短鎖ユビキチン化されることが明らかとなった。AQP5 ユビキチン化の詳細な機能は未解明であるが、少なくとも副交感神経刺激による漿液性唾液の分泌過程に関わることが示唆された。

(3) 本研究の総括と展望

本研究によって AQP5 の翻訳後修飾（リン酸化とユビキチン化）その細胞内シグナル調節機構が明らかとなった。それぞれ翻訳後修飾の生理的意義は明確にはされていないが、自律神経系による 2 種の唾液分泌過程に関わることは明らかである。本研究では実験上、それぞれ単独の刺激によって AQP5 の翻訳後修飾の役割を探ったが、*in vivo* では唾液腺腺房細胞は交感神経および副交感神経の二重支配を受けており、その支配下にある Ca^{2+} と cAMP シグナルの相互作用も知られている。また、本研究で 2 つの AQP5 翻訳後修飾は AQP5 内の極近傍で起こり、相互作用することが想定される。今後、2 つの細胞内シグナルと 2 つの AQP5 翻訳後修飾の連関を解析することで、AQP5 翻訳後修飾の生理的役割に対する知見を深めることも必要である。

(4) 得られた成果の位置づけとインパクト
本研究の成果は唾液分泌現象に関する新たな知見を与えるものである。国内外において

この研究はなされていないので、発表時には大きなインパクトが期待できる。また、唾液分泌現象に限らず、AQP5の発現する肺や気管支における水代謝調節機構の解明に役立つことが想像される。

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)

1. Karabasil MR, Hasegawa T, Hosoi K (他5名, 2番目)

Effects of naturally occurring G103D point mutation of AQP5 on its water permeability, trafficking and cellular localization in the submandibular gland of rats, Biol Cell 103, 69-86, 2011, 査読有

2. Azlina A, Hasegawa T, Hosoi K. (他4名, 4番目)

Roles of lysosomal proteolytic systems in AQP5 degradation in the submandibular gland of rats following chorda tympani parasympathetic denervation, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 299, G1106-G1117, 2010, 査読有

3. Yao C, Hasegawa T, Hosoi K. (他7名, 6番目)

Potential down-regulation of salivary gland AQP5 by LPS via cross-coupling of NF-kB and p-c-Jun/c-Fos. Am J Pathol 177, 724-734, 2010, 査読有

[学会発表] (計2件)

(1) 長谷川 敬展、アズリナ アハマド、ジャフラン フルジャフ、廣島 佑香、姚 陳娟、赤松 徹也、細井 和雄 唾液腺細胞におけるアクアポリン5リン酸化のシグナル伝達機構 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会 2010年9月20-22日 東京都

(2) 長谷川 敬展、アズリナ アハマド、ジャフラン フルジャフ、姚 陳娟、赤松徹也、細井和雄 アクアポリン5のユビキチン化とその細胞内輸送系における役割 第51回歯科基礎医学会学術大会・総会 2009年9月9-11日 新潟市

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :