

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592781

研究課題名(和文) シェーグレン症候群モデルマウス唾液腺アクアポリン5の動態とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on the molecular mechanism of aquaporin 5 distribution in salivary glands of Sjogren's syndrome model mice

研究代表者

梨田 智子 (TOMOKO, NASHIDA)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：10133464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：1. マウス耳下腺において、エズリンがアクアポリン5と共存することを明らかにした。糖尿病NODマウス耳下腺では、これらは共に局在性が変化した。2. 耳下腺ホモジネートから等電点の異なる3つのアクアポリン5を検出した。コントロールマウスではpI 6.0付近のものが主であったが、疾患マウスではpI 8.8付近のものが主であった。すなわち、糖尿病NODマウスではアクアポリン5のリン酸化レベルが低いことがわかった。

研究成果の概要(英文)：1. The protein which co-localizes with aquaporin 5 was determined. Localization of these proteins was changed in the diabetic NOD mice. 2. Three spots of aquaporin 5 with different isoelectric points were determined. The main spot in the control mouse was detected at pI 6.0, and that in the diabetic NOD mouse was at pI 8.8 which coincides with the isoelectric point of aquaporin 5 without phosphorylation. This indicated that the phosphorylation level of aquaporin 5 was lower in the diabetic NOD mouse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：アクアポリン シェーグレン症候群 マウス 耳下腺

1. 研究開始当初の背景

唾液腺に発現し唾液分泌に関与する水チャンネル、アクアポリン5は、耳下腺においては腺房細胞の先端膜(分泌面)に存在し、細胞内から導管部へ水を分泌するといわれている。

シェーグレン症候群患者の唾液腺およびシェーグレン症候群のモデル動物として使用されているNODマウス(non-obese diabetic)の耳下腺では、アクアポリン5の局在性が正常とは異なることが報告されている。副交感神経刺激によるアクアポリン5の活性化が、病態唾液腺では起こらないことが知られており、アクアポリン5の局在性変化がその一因と考えられるが原因はわかっていない。

2. 研究の目的

糖尿病NODマウス耳下腺腺房細胞におけるアクアポリン5の局在性変化の原因を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病NODマウス、非発病NODマウスおよびコントロール(C57BL/6)マウスから調製した耳下腺腺房細胞からRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ解析により細胞内輸送に関与するタンパク質、リン酸化に関与するタンパク質、エンドサイトーシスおよび分解に関与するタンパク質の発現変化を調べ、病態マウスで変化しているものを抽出し、アクアポリン5とのタンパク質の共存性を調べた。

(2) アクアポリン5のC末ペプチドを作成しNHS HP SpinTrap (GE) に結合させ、マウスホモジネートから結合するタンパク質を抽出した。溶出後、プロテオーム解析により結合タンパク質の同定を試みた。

(3) これまでの研究および文献から、アクアポリン5と局在する可能性のあるものとしてERMタンパク質に焦点をあて、これらの局在性およびアクアポリン5との共存性を免疫染色により調べた。

(4) コントロールおよび糖尿病NODマウス耳下腺ホモジネートを二次元電気泳動し、アクアポリン5抗体を用いたWestern blottingにより、アクアポリン5のリン酸化の違いを検出した。

4. 研究成果

(1) 疾患に関係する細胞内輸送タンパク質のcDNAマイクロアレイによる検索

細胞内輸送に関与するタンパク質: rab3C, rab26, rab27b および rab6b が糖尿病NODマウスにおいて減少していた。特に rab6b は著しく減少していた(約0.03倍)。チューブリ

ン、アクチンの発現には変化は見られなかった。リン酸化に関与するタンパク質: 糖尿病NODマウスにおいて、キナーゼおよびキナーゼ阻害剤に劇的に変動しているものは無かった。分解に関与するタンパク質: カルパインには発現に全く差が見られなかった。カテプシン類はSのみが減少していたが他は変化なかった。ユビキチン系タンパク質には発現が減少しているものが数種類あった。

関与する可能性のある輸送タンパク質として、rab6bに焦点をあてた。まず正常マウス耳下腺腺房細胞におけるrab6bの分布を調べた。rab6bは主に低密度の小胞画分に存在していたが、他の複数の画分にも検出された。一方、アクアポリン5は形質膜以外にこの低密度の小胞画分にも検出された。しかし、免疫組織染色像で、アクアポリン5とrab6bの局在は現在まで得られた結果では必ずしも一致せず、さらなる検討が必要である。

(2) アクアポリン5のC末ペプチドに結合するタンパク質の検出

この方法では結合タンパク質を捉えることができなかった。

(3) アクアポリン5と共存するタンパク質の同定

ERMタンパク質(エズリン,ラディキシン,モエシン)の発現および局在性を調べた。以前申請者らが行った研究で、 α -アドレナージック刺激後、アクアポリン5はEPI64と同様に挙動することが認められていた。エズリンとの共存性の可能性があると考え、まず、ERMタンパク質との共存性を調べた。耳下腺の免疫染色ではエズリンのみが腺房細胞の先端膜に存在していたが、筋上皮細胞にも発現しているため、腺房細胞の単離後の染色を試みた。エズリンの免疫活性は腺房細胞分散中に減少するため、パラホルムアルデヒド固定後分散して観察した。

エズリンの局在性はアクアポリン5と一致し、コントロールマウスでは先端膜に局在していた。一方、糖尿病発病NODマウス耳下腺腺房細胞においては、エズリンはアクアポリン5と一致した局在性を示したが、両者の局在はコントロールとは異なり、基底膜に広く分布していた。すなわち、アクアポリン5はエズリンと共局在し、糖尿病NODマウスでは共に局在性が変化することがわかった。

(4) 構造変化およびリン酸化

NODマウスにおいて、DNA配列に変化は認められなかった。

一方、耳下腺ホモジネートの二次元電気泳動の結果から、アクアポリン5のリン酸化程度が疾患NODマウスで低いことがわかった。本来のpIは8.81であるが、正常マウスではpI 6.0付近に最大のスポット、ついでpI 7.0付近にもスポットが検出された。しかし、NODマウスでは最大スポットはpI 8.8に検出さ

れ, ついで pI 7.0 付近および pI 6.0 付近にわずかに検出された。すなわち, NOD マウスではアクアポリン 5 のリン酸化が抑制されていると考えられた。これまでプロテイン C キナーゼによるリン酸化は薬理学的実験により活性発現に重要であることが知られているものの, リン酸化部位は特定されていない。アクアポリン 1 との構造の比較により, 2 か所のプロテイン C キナーゼリン酸化部位候補を候補とし, このいずれかのリン酸化が活性発現に必要なのではないかと予想している。

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 8 件)

1. Shimomura H, Imai A, Nashida T, Characterization of cysteine string protein in rat parotid acinar cells. Arch Biochem Biophys 538(1):1-5, 2013. DOI: 10.1016/j.abb.2013.08.001.

2. Imai A, Ishida M, Fukuda M, Nashida T, Shimomura H, MADD/DENN/Rab3GEP functions as a guanine nucleotide exchange factor for Rab27 during granule exocytosis of rat parotid acinar cells. Arch Biochem Biophys 536(1):31-7, 2013. DOI: 10.1016/j.abb.2013.05.002.

3. Nashida T, Yoshie S, Haga-Tsujimura M, Imai A, Shimomura H, Atrophy of myoepithelial cells in parotid glands of diabetic mice; detection using skeletal muscle actin, a novel marker. FEBS Open Bio 3:130-134, 2013. DOI: 10.1016/j.fob.2013.01.009.

4. Nashida T, Sato R, Haga-Tsujimura M, Yoshie S, Yoshimura K, Imai A, Shimomura H, Antigen-presenting cells in parotid glands contain cystatin D originating from acinar cells. Arch Biochem Biophys 530:32-39, 2013. DOI:10.1016/j.abb.2012.12.009.

5. Fukushima T, Nashida T, Haga-Tsujimura M, Mataga I, Chitinase expression in parotid glands of non-obese diabetic mice, Oral Dis, 18(5):506-12, 2012.

6. Imai A, Yoshie S, Haga-Tsujimura M, Nashida T, Shimomura H, Exocyst subunits are involved in isoproterenol-induced amylase release from rat parotid acinar cells, Eur J Oral Sci, 120:123-131, 2012. DOI:10.1111/j.1600-0722.2012.00952.x

7. Imai A, Yoshie S, Ishibashi K, Haga-Tsujimura M, Nashida T, Shimomura H, Fukuda M, EPI64 protein functions as a physiological GTPase-activating protein for Rab27 protein and regulates amylase release in rat parotid acinar cells, J Biol Chem, 286(39):33854-62, 2011. DOI:10.1074/jbc.M111.281394

8. Shimomura H, Imai A, Nashida T, Evidence for amylase release by cyclin-dependent kinase 5 in the rat parotid, Arch Biochem Biophys, 507: 310-314, 2011. doi:10.1016/j.abb.2010.12.025

[学会発表](計 21 件)

1. Nashida T, Yoshie S, Mizuhashi F, Sato R, Imai A, and Shimomura H: Antibacterial proteins in parotid acinar cells of non-obese diabetic mouse. 2nd Meeting of IADR- Asia Pacific Region; 2013 年 8 月 21 ~ 23 日 バンコック (タイ) .

2. Sato R, Nashida T, Tsutida S, Susuga M, Kikuchi H, Harada S, Sato A, Miyazaki A, Takahashi A, Imai A, Suda T and Shimomura H: Relation of mRNA level histatine. 2nd Meeting of IADR- Asia Pacific Region; 2013 年 8 月 21 ~ 23 日 バンコック (タイ) .

3. Shimomura H, Imai A, Nashida T: Identification and Characterization of CSP in parotid acinar cells. 91th General Session & Exhibition of the IADR; 2013 年 3 月 20 ~ 23 日 シアトル (USA) .

4. Imai A, Ishida M, Fukuda M, Nashida T, Shimomura H: Role of Rab27-GEF in parotid acinar cell exocytosis. 91th General Session & Exhibition of the IADR; 2013 年 3 月 20 ~ 23 日 シアトル (USA) .

5. Nashida T, Imai A, Shimomura H: lincRNA in parotid acinar cells of non-obese diabetic mouse. 90th General Session & Exhibition of the IADR; 2012 年 6 月 21 ~ 23 日 フォスドイグアス (ブラジル) .

6. Imai A, Yoshie S, Haga-Tsujimura M, Nashida T, Shimomura H: Role of exocyst subunits in parotid acinar cells. 90th General Session & Exhibition of the IADR; 2012 年 6 月 21 ~ 23 日 フォスドイグアス (ブラジル) .

7. Nashida T, Yoshie S, Haga M, Imai A, Shimomura H: Expression of aquaporins in parotid glands of NOD mouse. 9th European

Symposium on Saliva; 2011年5月23~25日
エグモンドアアンジー(オランダ).

8. Shimomura H, Imai A, Nashida T:
Phosphorylation of Munc18c by CDK5 evokes
exocytosis in rat parotid. 9th European
Symposium on Saliva; 2011年5月23~25日
エグモンドアアンジー(オランダ).

9. Sato R, Nashida T, Imai A, Shimomura H,
Haga M, Yoshie S: Cystatin 10 in rat
parotid and kidney. 9th European Symposium
on Saliva; 2011年5月23~25日エグモンド
アアンジー(オランダ).

10. 今井あかね, 石田森衛, 吉江紀夫, 辻村
麻衣子, 佐藤律子, 梨田智子, 福田光則:
ラット耳下腺腺房細胞の開口分泌時における
Rab27のGDP/GTP交感サイクル.第58回日本
唾液腺学会;2013年12月14日 東京.

11. 梨田智子, 吉江紀夫, 佐藤律子, 今井あ
かね, 下村浩巳:NODマウス耳下腺腺房細胞
における抗菌性タンパク質の発現.第55回
日本歯科基礎医学会学術大会;2013年9月
20~22日 岡山.

12. 下村-黒木淳子, 竜佑宗, 梨田智子:小
児における齲蝕と遺伝的要因についての検
討.第55回日本歯科基礎医学会学術大会;
2013年9月20~22日 岡山.

13. 佐藤律子, 梨田智子, 三上正人, 今井あ
かね:唾液ヒスタチン mRNA レベルと口腔環
境衛生との相関性.第55回日本歯科基礎医
学会学術大会;2013年9月20~22日 岡山.

14. 今井あかね, 石田森衛, 福田光則, 梨田
智子, 下村浩巳:DENN/MADD/Rab3GEPは耳下
腺腺房細胞においてRab27のGDP/GTP交換因
(GEF)として機能する.(第85回日本生化学
会大会;2012年12月14~16日 福岡.

15. 今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳:耳下
腺腺房細胞の開口分泌におけるRab27のグ
アニンヌクレオチド交換因子(GEF)関与.第54
回日本歯科基礎医学会大会;2012年9月14
~16日 郡山.

16. 梨田智子, 吉江紀夫, 羽下-辻村麻衣子,
今井あかね, 下村浩巳:マウス耳下腺筋上皮
細胞における骨格筋アクチンの発現.第54
回日本歯科基礎医学会大会;2012年9月14
~16日 郡山.

17. 梨田智子, 佐藤律子, 吉江紀夫, 羽下麻
衣子, 今井あかね, 下村浩巳:Cystatin 10の
ラットにおける発現と動態.第84回日本生
化学会大会;2011年9月22~24日 京都.

18. 今井あかね, 吉江紀夫, 石橋弘太郎, 福
田光則, 羽下麻衣子, 梨田智子, 下村浩巳:
耳下腺腺房細胞EPI64はRab27-GTPase-
activating protein (Rab27-GAP)として開口
分泌にかかわっている.第84回日本生化学
会大会;2011年9月22~24日 京都.

19. 佐藤律子, 梨田智子, 吉江紀夫, 羽下麻
衣子, 今井あかね, 下村浩巳:ラット耳下腺
と腎臓におけるシスタチン10の発現.第53
回日本歯科基礎医学会大会;2011年9月25
~27日 岐阜.

20. 今井あかね, 吉江紀夫, 羽下-辻村麻衣
子, 梨田智子, 下村浩巳:耳下腺腺房細胞に
おけるRab27とRab35の働き.第53回日本
歯科基礎医学会大会;2011年9月25~27日
岐阜.

21. 佐藤律子, 梨田智子, 羽下麻衣子, 吉江
紀夫, 今井あかね, 下村浩巳:Cystatin Dの
ラット耳下腺における発現と動態.第56回
日本唾液腺学会;2011年12月3日 東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

梨田 智子 (NASHIDA TOMOKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号:10133464

(2)研究分担者

今井 あかね (IMAI AKANE)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号:60180080

吉江 紀夫 (YOSHIE SUMIO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号:30095278

下村 浩巳 (SHIMOMURA HIROMI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号:40139259

(3)連携研究者

羽下-辻村 麻衣子(HAGA-TSUJIMURA MAIKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師
研究者番号:60535219

佐藤 律子 (SATO RITSUKO)

日本歯科大学・新潟短期大学・准教授
研究者番号:50178787