

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：16101
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23792124
研究課題名（和文） 唾液腺水チャネル・アクアポリン5の翻訳後修飾調節とその生理的役割
研究課題名（英文） Physiological roles of post-translational modifications of water channel aquaporin-5 in the salivary glands.
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）：

唾液腺細胞における水チャネルアクアポリン5（AQP5）の2つの翻訳後修飾（リン酸化および短鎖ユビキチン化）を調べた。AQP5はcAMPシグナルで素早く一過的に細胞膜上でリン酸化され、細胞内輸送に関与する可能性が低いことを報告した。AQP5短鎖ユビキチン化については、その量が少なくAQP5構成性輸送の存在が解析を困難にしたため、その役割は明らかにできていないが、AQP5のリン酸化とユビキチン化は互いの修飾に影響を及ぼしあうことを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Two types of post-translational modifications, phosphorylation and short-chain ubiquitination, of water channel aquaporin-5 (AQP5) were investigated in the salivary gland cells. We reported that AQP5 is rapidly and transiently phosphorylated at the plasma membrane through the cAMP signaling pathway and this phosphorylation may not be involved in the intracellular AQP5 trafficking. A role of Ca^{2+} -induced short-chain ubiquitination of AQP5 could not be cleared because of technical difficulties, small amount of its ubiquitination and the constitutive internalization of AQP5. However, we found that phosphorylation and ubiquitination of AQP5 affect each other's modification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：口腔生理学、アクアポリン、翻訳後修飾、ユビキチン化、リン酸化、唾液腺、細胞内輸送

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る。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は細胞内と細胞膜間を輸送されるAQPであり、この調節された細胞内輸送が生理的水輸送現象に重要である。例えば腎臓集合管におけるAQP2は抗利尿ホルモン依存的

な細胞内と細胞膜間の輸送により原尿からの水再吸収に深く関与している（Fushimi *et al.*, *Nature* 361, 549-522, 1993）。また、AQP5は、唾液腺、気管支腺や涙腺などで自律神経支配下の外分泌の促進に関与し（Ma *et al.*, *J Biol Chem* 274, 20071-200741）、特に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+} 濃度上昇で細胞膜へ動員されることから、漿液性唾液の分泌促進への関

与が示唆されている (Ishikawa *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 245, 835-840, 1998)。

このような細胞内輸送の調節には翻訳後修飾の関与が想定されており、実際に AQP2 では自身のリン酸化が細胞膜への輸送に、ユビキチン化が細胞内への取り込みに深く関与することが明らかにされた (Moller *et al.*, *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F1062-F1073, 2011)。一方で AQP2 の細胞内輸送研究に比べて AQP5 細胞内局在・膜輸送機構の解明は遅れており、決定的な輸送局在シグナルや結合タンパク質などの発見には至っていない。AQP5 の翻訳後修飾は一部報告 (Woo *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 366, 2008) はあるものの、その他修飾の存在やその細胞内輸送への関与および生理的役割などはほとんど明らかにされてこなかった。

そこで研究代表者は、未解明な点が多い AQP5 翻訳後修飾の研究を、平成 21 年度[科学研究費補助金若手研究 (B)、課題番号 21791806]より開始し、特に唾液分泌調節に関わる唾液腺 AQP5 の 2 つの翻訳後修飾を見出した。1 つは交感神経刺激下 (唾液タンパク質分泌促進; 細胞内 cAMP シグナル上昇) で素早く AQP5 の 259 番目のスレオニンでプロテインカイネース A (PKA) を介したリン酸化が一過的に起こることであり、もう 1 つは副交感神経刺激 (唾液の水電解質分泌; Ca^{2+} シグナル) 下において素早く AQP5 の 257 番目あるいは 258 番目のリシンで短鎖ユビキチン化が一過的に起こることである。しかしながらこれら 2 種の AQP5 翻訳後修飾の機能と、それに基づく特に唾液分泌との関連性や生理的な役割を明らかにするまでに至っていない

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究成果および知見をもとに研究を進展させ、唾液腺における AQP5 の機能・役割と修飾相互作用を明らかにすることで AQP5 翻訳後修飾の生理的役割を探ることとした。

既述の様に、AQP2 におけるリン酸化およびユビキチン化は細胞内輸送のシグナルとしてそれぞれ独自の機能があることが明らかにされている。また、AQP2 のみならず、一般的な膜タンパク質の短鎖あるいはモノユビキチン化はエンドサイトーシスやライソソームへの輸送におけるシグナルとなることが知られている。

AQP2 などと同様に AQP5 の翻訳後修飾も細胞内輸送機構の調節に重要な働きをもつことが考えられる。そこで本研究では、AQP5 細胞内輸送を解析し、AQP5 のリン酸化および短鎖ユビキチン化のそれぞれがどの輸送

過程のシグナルとなるのか、まず単独修飾の役割について明らかにすることを目的とした。

また、既述のように、この 2 種の AQP5 翻訳後修飾は異なったシグナルで誘導されるが、それぞれの修飾部位は極めて近接しているため、互いの修飾が影響を及ぼす可能性がある。加えて実際の唾液腺では交感神経および副交感神経の協調作用や反射などにより Ca^{2+} と cAMP の両シグナル経路の惹起が想定され、両シグナル経路間クロストークの存在も示唆されている。AQP5 の短鎖ユビキチン化およびリン酸化の相互作用、例えば拮抗するのか、あるいはリン酸化依存的なユビキチン化が起こるのかなどを明らかにする。

これら翻訳後修飾の単独の機能と修飾相互調節作用を明らかにすることで、AQP5 翻訳後修飾の生理的役割、特に唾液分泌における役割や意義を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究全般において、マウス唾液腺 (顎下腺および耳下腺) ならびにマウス AQP5 を発現させたヒト唾液腺 HSG 細胞を用いた。特に培養細胞系では AQP5 リン酸化部位および短鎖ユビキチン化部位を変異させた各種 AQP5 変異体も使用している。非リン酸化 AQP5 変異体として AQP5-T259A を、非ユビキチン化 AQP5 変異体として AQP5-K257RK258R および AQP5-K257QK258Q を使用しているが、これらは結果的に変異の結果 PKA 認識にも影響を与えるため、AQP5-K257RK258R は強リン酸化体となり、AQP5-K257QK258Q は非リン酸化体となる。これらマウス唾液腺や AQP5 発現 HSG 細胞はウェスタンブロットや免疫沈降などの生化学的解析や免疫組織化学な局在解析に使用した。

まず、リン酸化および短鎖ユビキチン化のそれぞれ単独の AQP5 翻訳後修飾について調節機構および細胞内輸送に関する役割を調べた。

(1) AQP5 リン酸化に関する研究

AQP5 リン酸化は、AQP5 抗体による免疫沈降後に抗リン酸化 PKA 基質抗体で検出するか、リン酸化 AQP5 抗体で検出した。

① マウス唾液腺における AQP5 のリン酸化

ICR(CD1)マウスにイソプロテレノール (6mg/kg 体重) を腹腔内投与後、適時唾液腺を摘出して使用し、リン酸化 AQP5 発現量変化や局在等を調べた。

② HSG 細胞における AQP5 のリン酸化

正常 AQP5 あるいは非リン酸 AQP5 変異体 (AQP5-T259A) の発現 HSG 細胞において、

細胞内 cAMP 上昇薬 (フォルスコリン等) で AQP5 リン酸化を誘導した。培養細胞は細胞表面ビオチン化解析等も行い、AQP5 細胞内輸送にリン酸化が与える影響を調べた。

(2)AQP5 短鎖ユビキチン化に関する研究

AQP5 ユビキチン化は、AQP5 抗体による免疫沈降後に抗ユビキチン抗体で検出した。

①マウス唾液腺における AQP5 の短鎖ユビキチン化

ICR(CD1)マウスにピロカルピン (10mg/kg 体重) を腹腔内投与後、適時唾液腺を摘出して使用し、AQP5 の短鎖ユビキチン化の変動やその時の局在等を調べた。

②HSG 細胞における AQP5 の短鎖ユビキチン化

正常 AQP5、非ユビキチン化 AQP5 変異体 (主に AQP5-K257QK258Q)、細胞外領域に FLAG タグ配列を挿入した AQP5 を発現する HSG 細胞を用い、細胞内 Ca^{2+} 上昇薬 (主にカルシウムイオノフォア A23187) で AQP5 短鎖ユビキチン化を誘導した。培養細胞は通常の生化学・免疫細胞化学に加え、複数種のエンドサイトーシス解析、薬理的解析等にも使用し、AQP5 細胞内輸送に短鎖ユビキチン化が与える影響を調べた。

(3)AQP5 翻訳後修飾相互作用に関する研究

①マウス唾液腺における相互作用

ICR(CD1)マウスにピロカルピン(10mg/kg 重)とイソプロテレノール(6mg/kg 重)を同時に腹腔内投与した。投与 10 分後の唾液腺を摘出し、AQP5 のリン酸化および短鎖ユビキチン化の量を比較した。

②AQP5 発現 HSG 細胞における相互作用

正常 AQP5 発現 HSG 細胞において、A23187 およびフォルスコリンを同時処理あるいは時間差処理し、AQP5 のリン酸化および短鎖ユビキチン化の量を比較した。

4. 研究成果

(1)AQP5 リン酸化に関する研究

平成 21~22 年度で実施した研究に基づき、本年度行った方法(1)①-②による修正を加えた上で、この成果を学術論文 (Hasegawa *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011) として報告した。詳細は科学研究費補助金成果報告書[若手研究 (B)、課題番号 21791806、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、研究代表者: 長谷川敬展]に記載しているが、以下、簡単に内容を記す。

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、AQP5 がプロテインキナーゼ A (PKA) でリン酸化されることを見出した。AQP5 発現 HSG 細胞において、細胞内 cAMP 濃度上昇薬

(8-bromo-cAMP、フォルスコリン) や PKC 活性化剤 (PMA) でリン酸化され、PKA 阻害薬 H89 の前処理によってリン酸化が阻害されることも、PKA が責任酵素であることを裏付けている。また、HSG 細胞における AQP5 変異体の解析で、AQP5 のリン酸化部位が 259 番目のスレオニンであることを特定した。抗リン酸化 AQP5 抗体を作製し、リン酸化 AQP5 の量や局在の解析に用いた。イソプロテレノール (細胞内 cAMP 濃度上昇薬) 投与したマウスの唾液腺では、AQP5 は素早く一過的に (投与後 5-10 分) リン酸化されるものの、その局在はほとんどが細胞膜上に検出された。正常 AQP5 あるいは非リン酸化 AQP5 変異体の発現 HSG 細胞においても同様に、cAMP 濃度の上昇で AQP5 リン酸化が素早く誘導されるが、AQP5 局在は常に細胞膜に局在した。これらの事から AQP5 リン酸化は細胞膜で起こり、AQP5 細胞内輸送のシグナルとなる可能性は低いことが示唆された。

(2)AQP5 短鎖ユビキチン化に関する研究

平成 21~22 年度で実施した研究において、マウス唾液腺 AQP5 はピロカルピン投与で、培養細胞に発現させた AQP5 は培養細胞に発現させた AQP5 も細胞内 Ca^{2+} 上昇薬 (A23187 など) で素早く (約 10 分) 一過的に短鎖ユビキチン化されることを見出している。また、AQP5 変異体の解析で AQP5 の 257 番目あるいは 258 番目のリシンが短鎖ユビキチン化部位であることを特定した。正常 AQP5 あるいは非ユビキチン化 AQP5 (AQP5-K257RK258R、AQP5-K257QK258Q) を発現する HSG 細胞の免疫染色において、AQP5 の局在は A23187 処理等の刺激後も特に変化は見られず、主に細胞膜に局在した。

本研究ではこれまでの結果を踏まえ、細胞内輸送への関与をさらに詳細に検討するため、以下の複数の解析法により AQP5 のユビキチン化とエンドサイトーシスの関連性を探った。

①蛍光標識デキストランを細胞に取り込ませ、エンドサイトーシスと AQP5 短鎖ユビキチン化の関連性を調べた。無刺激時、デキストランは取り込み開始約後 10 分から細胞内に粒状のシグナルとして観察され始め、その後 60 分まで時間依存的にシグナル粒数と強度が増加した。この粒状のシグナルの一部は LAMP1 免疫陽性であったことから、一部のデキストランはライソソームに運ばれたことを意味している。この取り込み傾向は A23187 処理で促進されないこと、非ユビキチン化 AQP5 細胞においても同様であった。また、AQP5 の局在は主に細胞膜であり、A23187 処理でも局在に差違は見られなかった。

②次に細胞表面タンパク質をビオチン化および脱ビオチン化し、細胞内への取り込まれた AQP5 を生化学的に解析した。時間依存的な AQP5 取り込みはみられるものの、A23187 処理依存的、ユビキチン化依存的な AQP5 取り込みは見られなかった。

③より直接 AQP5 の取り込みを確認するために、細胞外領域に FLAG タグ配列を挿入した AQP5 を発現する HSG 細胞を作製し、抗体取り込み解析を行った。この細胞では抗 FLAG 抗体で細胞膜上にある AQP5 をパルス標識することができ、AQP5 のエンドサイトーシスやその後の局在および挙動を観察することができる。他の解析法と同様に、時間依存的な AQP5 取り込みがみられ、粒状のシグナルとして観察された。取り込まれた AQP5 は時間依存的であるものの、A23187 依存的、ユビキチン化依存的な AQP5 取り込みは見られなかった。

これら(2)-①-③におけるエンドサイトーシス解析から、HSG 細胞ではユビキチン非依存的な構成性の AQP5 取り込みが行われることが示唆され、ユビキチン依存的な取り込みは行われなからるかあるいは短鎖ユビキチン化 AQP5 量が僅かであることが推察された。

AQP5 構成性輸送の存在と微量な短鎖ユビキチン化 AQP5 により、短鎖ユビキチン化による調節性の AQP5 輸送を実験的に見逃している可能性が考えられた。そこで、次に正常 AQP5 発現 HSG 細胞を用いて AQP5 脱ユビキチン化を阻害する薬剤を生化学的に探索し、その結果を指標に役割を探ることとした。薬剤は細胞内輸送に関するものを中心として、ライソソーム機能阻害薬 Chloroquine (pH 上昇)、Methylamine (pH 上昇) や E-64 (システインプロテアーゼ阻害)、プロテアソーム阻害薬 Epoxomicin や Lactacystin、小胞体ストレス誘起薬剤 brefeldin A (小胞体-ゴルジ体間の輸送傷害) や 2-mercaptoethanol (ジスルフィド結合の還元)、脱ユビキチン化酵素阻害剤 PR619 などを、A23187 による AQP5 短鎖ユビキチン化誘導前から作用させ、どの輸送段階で AQP5 短鎖ユビキチン化あるいは脱ユビキチン化が起こるかを探った。

残念なことに脱ユビキチン化を阻害する薬剤は 1 つもなく、むしろユビキチン化を阻害する薬剤 (Epoxomicin、Chloroquine や PR619) などが複数存在した。これら薬剤の作用機序が多岐であるため、現時点でどのような機構によるものなのか不明であるが、少なくとも細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇から AQP5 短鎖ユビキチン化までの過程で何らかの調節機構が存在していることが示唆された。

(3) AQP5 翻訳後修飾相互作用に関する研究

ピロカルピンとイソプロテレノールの同

時投与における唾液腺 AQP5 のリン酸化および短鎖ユビキチン化を経時的に調べると、短鎖ユビキチン化とリン酸化がやや抑制され、脱リン酸化が抑制により長く続く傾向であった。また、HSG 細胞における各変異体を用いた解析で、非リン酸化 AQP5-T259A では短鎖ユビキチン化は減弱した。これらのことは AQP5 修飾に対する cAMP とカルシウムの両シグナル経路間クロストーク、あるいは修飾同士が影響を及ぼし合うことを示唆している。

また、AQP5-K257RK2758R 変異体は非ユビキチン化体であると同時に強リン酸化体であるが、この変異体を持つ HSG 細胞で A23187 処理を行うと、時間依存的に未リン酸化 AQP5 が減少し、徐々に AQP5 リン酸化が増加していくことが分かった。HSG 細胞内の AQP5 リン酸化部位が主に細胞膜であることを考慮すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇環境で AQP5 が短鎖ユビキチン化されないことで AQP5 が細胞膜に蓄積しやすくなっているのかもしれない。今後詳細な解析が必要ではあるが、この AQP5-K257RK258R の解析で修飾相互作用のみならず、短鎖ユビキチン化やリン酸化の単独の役割を明らかにすることが期待できる。

(4) 本研究の総括と展望

AQP5 リン酸化については学術論文としてまとめることができ、AQP5 リン酸化は細胞膜上で起こること、AQP5 細胞内輸送のトリガーシグナルとなる可能性は低いことを示した。しかしながら、実際にリン酸化がどのように役割を果たすのかは明確に示すことはできていない。細胞内輸送への影響のみならずリン酸化による機能制御も視野にいれて解析を進める必要がある。

本研究で短鎖ユビキチン化される AQP5 は僅かであることや AQP5 構成性輸送の存在が示唆されたため、調節的なユビキチン化の役割を解明することは困難であった。今後、微量なユビキチン化 AQP5 の挙動を見逃さないためにライブセルイメージング法の導入や、細胞内でユビキチン化酵素を発現し強制的に AQP5 をユビキチン化させて解析する方法、AQP5 とユビキチンの分子間相互作用を細胞内で検出する方法などといった革新的な解析法を取り入れていく。

また、翻訳後修飾の相互作用を調べる過程で、修飾される細胞内部位の知見が極めて重要で、精査していくべきであると感じた。加えて AQP5-K257RK258R 変異体なども用いて解析を進めていくことで、翻訳後修飾の相互作用のみならず修飾単独の役割も見出せるかもしれない。

本研究ではおおよそ AQP5 翻訳後修飾の生理的役割を明らかにできてはいない。しかし

ながら、本研究で生まれた知見を基にした実験材料や手法などの新たな方策が解決の糸口になることと思われる。

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 2 件)

① Shibata Y, Takeuchi HA, Hasegawa T, Suzuki M, Tanaka S, Hillyard SD, Nagai T.

Localization of water channels in the skin of two species of desert toads, *Anaxyrus (Bufo) punctatus* and *Incilius (Bufo) alvarius*. **Zoolog Sci** 28, 664-670, 2011, 査読有, DOI: 10.2108/zsj.28.664,

② Hasegawa T, Azlina A, Javkhlan P, Yao C, Akamatsu T, Hosoi K.

Novel phosphorylation of aquaporin-5 at its threonine 259 through cAMP signaling. **Am J Physiol Cell Physiol** 301, C667-C678, 2011, 査読有, DOI:10.1152/ajpcell.00058.2011

[学会発表] (計 1 件)

① 長谷川敬展、唾液腺細胞におけるアクアポリン 5 の翻訳後修飾、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会サテライトシンポジウム、2011. 9. 30、長良川国際会議場 (岐阜市)

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：5 0 4 4 7 2 7 3

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：