

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462891

研究課題名(和文) 唾液分泌を司る水チャネル翻訳後修飾の分子調節機構

研究課題名(英文) Molecular regulatory mechanisms for post-translational modifications of the water channel controlling salivary secretion.

研究代表者

長谷川 敬展 (HASEGAWA, Takahiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：50447273

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)：水チャネル・アクアポリン5(AQP5)の翻訳後修飾、短鎖ユビキチン化およびリン酸化の役割を探った。ヒト唾液腺細胞において、カルシウム誘導性のAQP5短鎖ユビキチン化はエンドサイトーシスやリサイクリング、多胞体等への取り込みや分泌などの細胞内輸送過程に関与する可能性は低いのかもしれない。翻訳後修飾の役割は確定できていないが、AQP5短鎖ユビキチン化に関与する2つのユビキチンリガーゼや、リン酸化依存的と思われるAQP5結合タンパク質などを同定した。また、AQP5リン酸化とユビキチン化の直接的な相互作用は少ないことも見出した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the post-translational modifications, short-chain ubiquitination and phosphorylation, of water channel aquaporin-5 (AQP5). Ca<sup>2+</sup>-induced AQP5 ubiquitination in human salivary gland cells may not play critical roles in the intracellular trafficking events, such as endocytosis, recycling, uptake into multivesicular bodies, and secretion. Although the roles of these modifications could not be fully elucidated in the present study, we identified two ubiquitin ligases for AQP5 ubiquitination and some AQP5 binding proteins, which may be a phosphorylation-dependent. In addition, we found little direct interactions between phosphorylation and ubiquitination of AQP5.

研究分野：口腔分子生理学

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 細胞内膜輸送 唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

水チャネル・アクアポリン (aquaporin; AQP) の中には、外部刺激に応答して細胞膜と細胞内を輸送されるアイソフォームが存在し、生理的な水輸送現象に重要である。例えば、腎集合管では抗利尿ホルモン依存的な AQP2 の細胞内-細胞膜間輸送が尿からの水再吸収調節に重要である (Fushimi et al., *Nature* 361, 549-552, 1993)。また、唾液腺では副交感神経性刺激の AQP5 細胞膜動員による水電解質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)。

これら細胞内輸送の調節には翻訳後修飾の関与が想定され、実際に AQP2 では自身のリン酸化やユビキチン (Ub) 化が膜輸送調節に重要であることが明らかにされている (Moellar et al., *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F1062-F1073, 2011)。一方で AQP5 細胞内輸送における翻訳後修飾の関与はほとんど明らかにされてこなかった。

一般に、副交感神経刺激で水電解質を多く含む唾液の分泌が、交感神経刺激でタンパク質を多く含む唾液の分泌が起こる。我々は特にこれら唾液分泌過程における AQP5 翻訳後修飾の関与を調べてきた。その結果、副交感神経刺激 (細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇) で、素早く一過的に AQP5 の 257 番目あるいは 258 番目のリシン残基で短鎖 Ub 化が起こること、交感神経刺激 (細胞内 cAMP 上昇) で、細胞膜上で素早くかつ一過的に 259 番目のスレオニンがリン酸化されるが、AQP5 リン酸化が細胞内輸送のトリガーである可能性は低いこと (Hasegawa et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C667-C678, 2011) などを見出してきた。これら AQP5 の翻訳後修飾が自律神経で調節される粘液性および漿液性唾液分泌過程に関与することが明らかになった。しかしながら、それぞれの翻訳後修飾がどのような役割を持ち、唾液分泌に寄与するのは不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、AQP5 翻訳後修飾の調節機構を明らかにし、それらの唾液分泌機構を含む生理現象における意義を示すことを最終目標としている。そのために、まず AQP5 の翻訳後修飾、短鎖 Ub 化およびリン酸化について個々に解析し、機能や役割を明らかにすることを旨とした。また、両修飾間の相互作用の存在やその調節機構を調べ、各個翻訳後修飾の機能や役割に与える影響を明らかにすることを目的とした。

### (1)短鎖 Ub 化の役割

タンパク質 Ub 化は、プロテアソームによる分解シグナルだけではなく、膜タンパク質では、モノ・短鎖 Ub 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)。これまでの研究においても、これら細胞内輸送過程に着目して AQP5 短鎖 Ub 化の役割を探ってきたが、細胞内構成輸送の存在することや、短鎖 Ub 化が微量であることなどから、明瞭な結果を得るのは困難であった。本研究ではこれまで用いてきた手法に加え、新たに複数の改善手法を取り入れて、細胞内輸送過程における AQP5 短鎖 Ub 化を解析し、その役割を明らかにすることを目的とした。

### (2)リン酸化の役割

リン酸化部位同定により結合タンパク質による何らかの調節機構の存在が想定された。AQP5 リン酸化がどのような調節機構のもとにどのような役割をもつのか推測するため、結合タンパク質の同定を行った。

### (3)翻訳後修飾間の相互作用

翻訳後修飾部位は AQP5 分子内の極近傍にあるので相互作用することも想定された。短鎖 Ub 化とリン酸化の両修飾が互いに拮抗するのか、リン酸化依存的 Ub 化を起こすかなどを明らかにし、翻訳後修飾個々の機能や役割に与える影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

マウス唾液腺およびヒト唾液腺 HSG 細胞において、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇薬で AQP5 の短鎖 Ub 化を、細胞内 cAMP 上昇薬で AQP5 のリン酸化を一過的に誘導できる。また、既に AQP5 のリン酸化部位および Ub 化部位を同定しており、非リン酸化・模倣リン酸化・強リン酸化ならびに非 Ub 化の各 AQP5 変異体が利用できる。

### (1)短鎖 Ub 化の役割

HSG 細胞内の AQP5 短鎖 Ub 化は微量で、明瞭な結果を得るためには解析が困難であった。そこで本研究では、一般的な生化学・免疫細胞化学的手法の改善や、ライブセルイメージングによる動態解析、AQP5-Ub 間相互作用の局在定量解析、細胞内強制 Ub 化実験等の複数の改善策を計画・導入して、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇で誘導された AQP5 短鎖 Ub 化がエンドサイトーシスやライソソーム分解等のシグナルとなるかを調べた。

### (2)リン酸化

当初の計画であるエピトープタグ発現法や GST タグプルダウン法などは不適と判断したことから、方法を変更した。HSG 細胞で AQP5 リン酸化を誘導し、調製した AQP5 免疫沈降産物からショットガン質量分析により AQP5 結合タンパク質の同定を行った。

### (3)相互作用

AQP5 分子内でリン酸化部位と Ub 化部位が近接していること、 $Ca^{2+}$  シグナル惹起時に AQP5 脱リン酸化が起こることなどから、拮

抗などの翻訳後修飾間の相互作用が想定された。

マウス唾液腺および HSG 細胞において、cAMP と  $Ca^{2+}$  シグナル同時惹起や時間差惹起時における AQP5 翻訳後修飾を調べ、拮抗などの相互作用の有無を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1)短鎖 Ub 化の役割

少しでも AQP5 短鎖 Ub 化量を増加するように実験条件を至適化し、HSG 細胞における細胞表面タンパク質のビオチン化・脱ビオチン化を用いたエンドサイトーシス解析を行った。正常 AQP5 で A23187 (細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇) 濃度依存的な AQP5 短鎖 Ub 化とともに AQP5 エンドサイトーシスが認められた。一方で、非 Ub 化 AQP5 変異体においても同様の結果であり、A23187 による AQP5 エンドサイトーシスは Ub 化非依存的であることが考えられた。

AQP5 短鎖 Ub 化に関する実験の改善を図るために以下の解析に取り組んだ。

ライブセルイメージングによる動態解析

顕微鏡ステージ上で培養細胞を比較的長期間観察できるようにシステムを構築した。

しかしながら、蛍光タグ (GFP、テトラシステインタグや Halo タグ) 付加した AQP5 は、正常 AQP5 の細胞膜局在と異なり、HSG 細胞内の主に小胞体に局在しており、動態観察には適していなかった。また、蛍光検出感度や空間分解能などのハード性能も不足していたことから、本法を用いて調節的な AQP5 動態を本格的に探るのは困難であった。

AQP5-Ub 間相互作用の局在定量解析

AQP5 は細胞内のどこで短鎖 Ub 化されるのか、その後どこに輸送されるのか等を調べる目的で、Proximity ligation assay (PLA) による免疫細胞化学的手法を行った。しかしながら、本法に適用できる抗体価の高い特異的な抗 Ub 抗体が得られず、外因性タグ付与 Ub を細胞導入し、抗タグ抗体を用いて同法を試みている状況である。

細胞内強制 Ub 化実験

AQP5 の強制 Ub 化により短鎖 Ub 化量を増やし、解析を容易にする狙いである。タンパク質の特異的な Ub 化を促進するため、AQP5 に対する Ub リガーゼ (E3) の同定を行った。多くの膜タンパク質 Ub 化に実績のある HECT 型 E3 である Nedd4 ファミリーや MARCH ファミリーをマウス顎下腺からクローニングし、HSG 細胞で AQP5 と共に強発現させた。結果、2 種の Nedd4 ファミリー E3 で AQP5 短鎖 Ub 化に影響がみられた。1 種は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇による AQP5 短鎖 Ub 化を一過的に著しく増強し、もう 1 種は構成的に AQP5 短鎖 Ub 化を促進した。前者の調節的 AQP5 Ub 化 E3 では刺激時の AQP5 のエンドサイトーシス量は Ub 化非依存的であった。また、後者の構成的 AQP5 Ub 化 E3 は AQP5 の減少を促進するが、Ub 化非依

的な AQP5 分解に関与することが示唆された。

また、A23187 処理で AQP5 短鎖 Ub 化は素早く起こるが、その後 1 時間程度で短鎖 Ub 化のシグナルは消失する。このシグナル消失が AQP5 の分解によるものかどうか調べた。ライソソーム阻害剤やプロテアソーム阻害剤では AQP5 短鎖 Ub 化シグナルの消失は阻害されず、これらタンパク質分解系の関与は乏しいと考えられた。

これら実験結果から、短鎖 Ub 化が AQP5 エンドサイトーシスや分解に及ぼす影響は乏しいこと、短鎖 Ub 化が他の細胞内事象において役割を果たすことが想定された。そこで、エンドサイトーシス後の AQP5 動態について、特に、リサイクリング経路、多胞体内への取り込みおよび分泌の各行程を、短鎖 Ub 化との関連性を含めて解析した。

細胞表面ビオチン化・脱ビオチン化を利用したリサイクリング解析で、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた AQP5 の多くはライソソームやプロテアソームによる分解経路ではなく、むしろ細胞膜へのリサイクリング経路を辿ることが判明した。また、細胞破碎液を用いたプロテアーゼプロテクション解析で、プロテアーゼ K 非分解 AQP5 が A23187 処理で少し増加することから、エンドサイトーシスされた一部の AQP5 は多胞体等の小器官に包含される可能性が示唆された。加えて、培養上清 AQP5 量が A23187 処理で増加したことから、AQP5 は分泌されていることが示唆された。非 Ub 化 AQP5 変異体でこれら解析を行ったが、正常 AQP5 と類似の結果となり、エンドサイトーシス後の細胞内輸送行程においても Ub の役割は乏しいと考えられた。

まとめると、AQP5 は細胞内  $Ca^{2+}$  上昇で一部の AQP5 がエンドサイトーシスされる。エンドサイトーシスされた AQP5 の多くは、ライソソームやプロテアソームによる分解経路ではなく、細胞膜へとリサイクリング経路を辿る。また、一部の AQP5 は多胞体等への取り込みを経てエキソソーム分泌経路を辿る可能性がある。AQP5 細胞内輸送過程では短鎖 Ub 化の積極的な関与はないのかもしれない。

##### (2)リン酸化

cAMP シグナル惹起時の AQP5 安定発現 HSG 細胞を用い、AQP5 免疫沈降産物でショットガン質量分析を行った。細胞骨格タンパク質とその調節タンパク質、脱リン酸化酵素や Ub などが検出された。リン酸化は細胞内輸送や細胞貯留シグナルとして役割を果たす可能性があるが、リン酸化依存的な結合であるかなど今後精査する必要がある。

##### (3)相互作用

細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇薬処理で一過的に AQP5 短鎖 Ub 化が起こるとともに、一過的

に AQP5 のリン酸化が減少することから、翻訳後修飾間の拮抗などの調節機構が想定された。

HSG 細胞における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇薬および細胞内 cAMP 上昇薬の同時あるいは時間差刺激実験において、薬剤単独処理の場合と同パターンで AQP5 リン酸化と短鎖 Ub 化が検出された。同様に、マウスの唾液腺においても、薬剤単独投与時と同パターンで AQP5 リン酸化と短鎖 Ub 化が検出された。

また、非リン酸化および模倣リン酸化 AQP5 変異体においても A23187 処理で短鎖 Ub 化が誘導された。

これらのことから、AQP5 のリン酸化や Ub 化は独立的に起こること、両翻訳後修飾の直接的な相互の誘導や抑制は起こらないことが示唆された。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇で起こる AQP5 リン酸化の減少等の例から、AQP5 翻訳後修飾の上流にある細胞内シグナル間の相互作用によって、巧みに AQP5 翻訳後修飾が調節されていることが考えられた。

#### (4)本研究の総括

研究期間内に AQP5 のリン酸化および短鎖 Ub 化各個の機能や役割を確定することはできなかった。しかしながら、翻訳後修飾間の相互作用について一定の可能性を示すことができた。また、副次的ではあるが、本研究によって有益な知見も得られた。例えば AQP5 Ub 化を増強する HECT 型 E3 や、AQP5 結合タンパク質の候補を複数同定したことなどが挙げられる。加えて、AQP5 翻訳後修飾が細胞外部浸透圧変化に応答した細胞容積調節機構や細胞外部 pH 変化に関与することも明らかにしており、細胞レベルの外部環境応答における AQP5 翻訳後修飾の重要性を見出すことができた。

今後、別視点で AQP5 翻訳後修飾を解析し、その役割と意義を見出す必要がある。また、新たに見出した細胞容積調節機構への関与などを明らかにしていく。特に細胞容積調節機構はアポトーシスやネクローシス (Okada et al., J Physiol, 532, 3-16, 2001)、細胞の遊走 (Hoffmann et al., Physiol Rev 89, 193-277, 2009) などにも関与していることが知られているので、翻訳後修飾の役割を明らかにできれば、唾液分泌機構のみならず細胞生存などの水輸送を伴う様々な生命現象の一部解明に繋がる。

#### 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)

[学会発表](計 2 件)

長谷川敬展、姚陳娟、赤松徹也、吉村弘、ユビキチンリガーゼによる AQP5 のユビキチン化亢進とダウンレギュレーション、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

長谷川敬展、姚陳娟、赤松徹也、吉村弘、ヒト唾液腺 HSG 細胞における構成的な AQP5 の取り込み、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 22 日、岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

長谷川 敬展 (HASEGAWA, Takahiro)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号：50447273

##### (2)研究分担者

吉村 弘 (YOSHIMURA, Hiroshi)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：90288845