

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2007 年 3 月 9 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 李雪飞 

指導責任者名： 細井和雄 職名： 教授

所属機関名： 日本徳島大学HBS研究部口腔分子生理学
〒 770-8504

所在地： 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15

電話： 088-633-7324 内線： 5211

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ
唾液腺AQP5発現の神経系による調節

3. 成果の概要 (100字程度)
顎下腺を支配する自律神経を切断したラットに、塩酸セビメリンなどの薬を経口投与して、AQP5とAQP1の蛋白質およびmRNAレベルを観察するとともに、リンゾーム酵素の活性を測定した。これらの結果を解析したところ、副交感神経によるAQP5蛋白質発現レベルの調節は転写段階で行われているのではなく、リンゾーム酵素系により制御されていると考えられた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

「第48回歯科基礎医学会学術大会並びに総会」・ラット唾液腺AQP5、AQP1、及びリンゾーム酵素系に対する自律神経切除及びSNI2011投与の影響

「The 3rd International Symposium on Salivary Gland in Honor of Niels Stensen」・Effects of autonomic denervation and administration of SNI-2011 on the expression of AQPs in the rat salivary gland

「The 1st International Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century"」・Effects of autonomic denervation and administration of muscarinic receptor agonist on the expression of AQPs in the rat submandibular gland

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

「四国歯学会雑誌第20巻、第1号(2007、印刷中)」・ラット顎下腺アクアポリン5および1発現に対する自律神経切除および塩酸セビメリン投与の影響

唾液腺 AQP5 発現の神経系による調節

研究者氏名	李雪飞
中国所属機関	大連医科大学付属第二病院外科
日本研究機関	日本徳島大学 HBS 研究部口腔分子生理学
指導責任者	教授 細井 和雄
共同研究者名	カラバシル ミレーバ, プルワンティ ヌヌク, 姚陳娟, 赤松徹也, 金森憲雄

要 旨

【目的】本研究はラット顎下腺における水チャネル、アクアポリン (AQPs) の自律神経系による調節機構を明らかにする目的で行った。【方法】7週齢雄性のSDラットを用い、顎下腺を支配する自律神経である交感神経または副交感神経切除を上頸神経及び鼓索神経を切断することにより行った(それぞれCSTD、CTDとする)。術後15日目から塩酸セビメリン(CM, 10mg/kg体重)、ピロカルピン(PC, 0.3mg/kg体重)クロロキン(CQ, 50mg/kg体重)を連続7日間経口投与した。AQP5とAQP1の蛋白質レベルをウェスタンブロッティングで、又mRNAレベルをノーザンブロッティングとRT-PCR、リアルタイムPCRにより解析した。【結果】CSTDはAQP5及びAQP1蛋白質レベルに大きな影響を与えなかった。CTDはラット顎下腺の重量とAQP5蛋白質レベルを減少させたが、AQP5 mRNAレベルには顕著な影響を与えなかった。CTDラットに対するムスカリンM3アゴニスト、塩酸セビメリンの投与は、低下したAQP5蛋白質含有量を著明に回復させ、AQP1含有量を増加させたが、ピロカルピン投与はこれらに影響を与えなかった。塩酸セビメリン投与はAQP5及びAQP1 mRNAレベルに顕著な影響を示さなかった。CTDはリソゾーム酵素カテプシンB、D、Eの活性を上昇させ、塩酸セビメリンはこの上昇を抑制した。カテプシンB、D、EのmRNAレベルもCTDにより上昇したが、塩酸セビメリンはこの上昇を抑制しなかった。リソゾーム変性剤であるクロロキンの投与によりリソゾームを変性させ、その機能を抑制すると、副交感神経切除により減少したAQP5の発現は回復した。【結論】副交感神経によるAQP5発現レベルの調節は転写レベルによるのではなく、リソゾーム酵素系により制御されていると考えられた。

Key Words : アクアポリン, 自律神経切除, 塩酸セビメリン, カテプシン

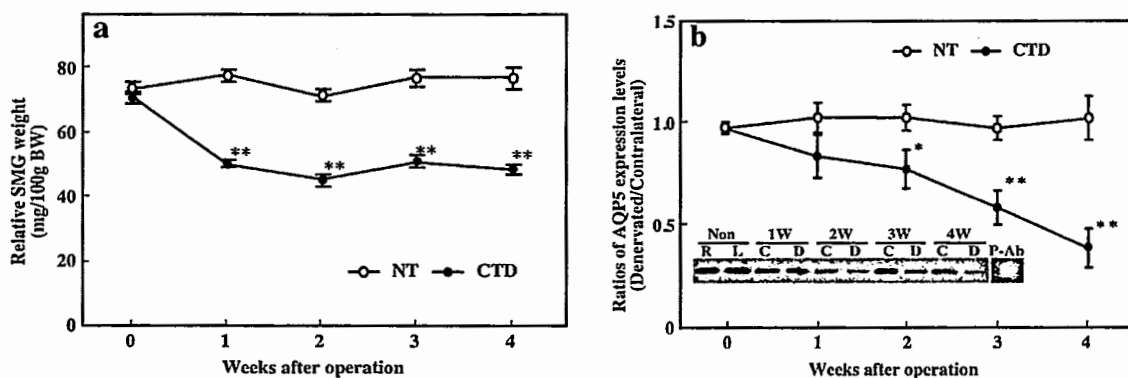
緒言

アクアポリン (AQP) は微生物から動植物まで広く分布する水チャネルで、これにより生体膜を隔てた水移動が浸透圧勾配依存的に行われる。水チャネル AQPs はファミリーを構成し、現在までに 13 種類のメンバーが存在することが知られている。AQPs は細胞膜に存在し、選択的に水、あるいは水とグリセロールや尿素などの小分子を輸送する。AQPs は細胞膜を 6 回貫通しているセルペンチン型膜蛋白質で、分子内のループ B とループ E にファミリー間で良く保存された NPA モチーフがそれぞれ 1 ヶ所ずつ存在する。これらはヘミチャネルを形成し、水はこの部位を通過することが明らかにされている。AQPs の発現・機能のホルモンによる調節については比較的よく研究されている。一方、AQPs の発現に対する自律神経系による調節についてはこれまでほとんど研究されていない。唾液腺は交感神経と副交感神経によって二重支配されている。唾液腺 AQP の発現や細胞内輸送が神経系・神経伝達物質により調節されている可能性が考えられ、これを検証する目的で、本研究に着手した。

対象と方法

動物と処置: 実験には 7 週齢の SD ラットを用い、上頸神経節 (交感神経) 切断、または鼓索神経 (副交感神経) 切断を行った。切断術は実験により、片側または両側に行った。一部の実験では、ピロカルピン (PC, 0.3 mg/kg 体重) および塩酸セビメリン (CM, 10 mg/kg 体重), あるいはクロロキン (CQ, 50 mg/kg 体重) を術後 15 日目から 7 日間, 1 日に一回経口投与した。

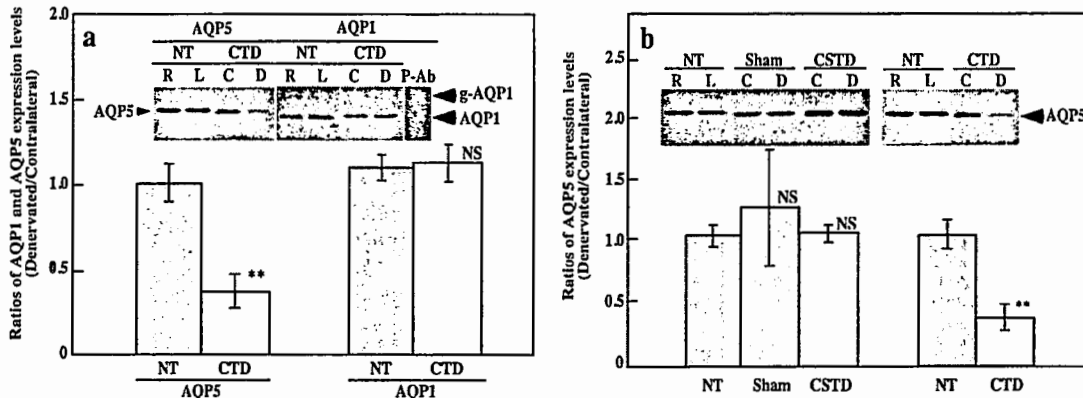
Fig.1



AQPs 発現の解析: AQP1、AQP5 蛋白質発現は当教室の方法により行った。即ち膜分画を調製した後、蛋白定量を Bradford の方法により、また AQPs は教室作成の特異抗体を用いた Western blot 法により行った。AQPs mRNA の定量はディゴキシゲニン標識したプローブを PCR により作成し、Northern blot 法、リアルタイム PCR により行った。

蛋白分解酵素活性の測定: 市販の消光性蛍光基質を使って、正常群、対照群、投与群それぞれのリソゾーム、プロテアソームの酵素活性を測定した。

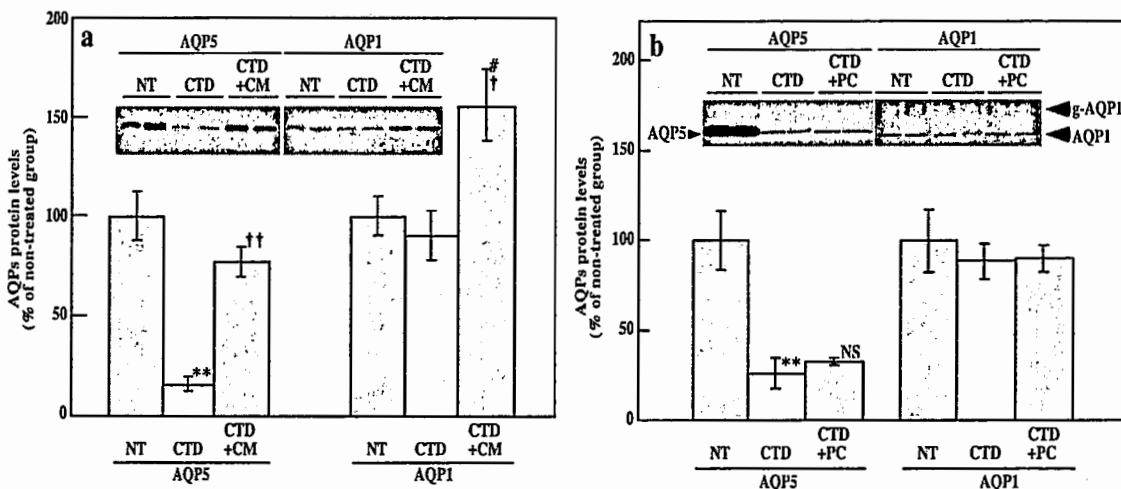
Fig. 2



結果と考察

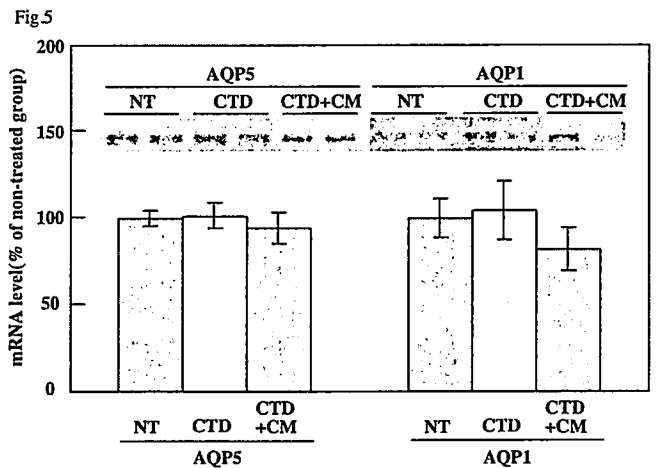
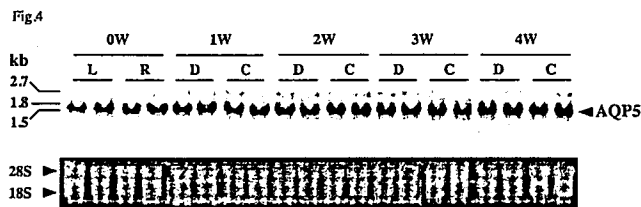
AQP5 および AQP1 蛋白質発現に対する自律神経切断およびムスカリンアゴニスト投与の影響:

Fig. 3



まず、副交感神経（鼓索神経）を切除したラットにおける顎下腺重量と AQP5 蛋白質レベルを解析した。その結果、副交感神経切除（CTD）を行った場合、術側の顎下腺相対重量（腺重量/体重）は直ちに減少し、術後1週以降4週までに於いて対照側の約60%で推移した。この術側と対照側での腺相対重量の違いには有意差が認められた ($p < 0.01$, $n = 5$, Fig. 1a)。また、術側の対照側に対する AQP5 蛋白質レベルの相対率は術後徐々に減少し、対照側 (NT) との有意差 ($p < 0.05$) が術後2週目から認められ、4週目にはこの率は対照側の $37 \pm 9.45\%$ ($p < 0.01$, $n = 5$) にまで減少した (Fig. 1b)。AQP1 発現レベルは術後4週目においても有意に減少しなかった (Fig. 2a)。交

感神経切除 (CSTD) 後 4 週において、顎下腺相対重量 (腺重量/体重) は対照側の約 $81.00 \pm 3.61\%$ ($p < 0.01$, $n=5$) にまで減少したが、AQP5 蛋白質発現レベルに顕著な差が認められなかった (Fig. 2b)。M3 受容体アゴニストである塩酸セビメリンを、1 日 1 回、1 週間経口投与 (10 mg/kg 体重) すると、副交感神経切除によって減少した AQP5 蛋白質発現レベルは有意 ($p < 0.01$, $n=5$) に回復した。また、副交感神経切除による影響が認められなかった AQP1 蛋白質発現レベルは塩酸セビメリン投与により有意に増加した ($p < 0.05$, Fig. 3 a)。ピロカルピンを経口投与 (0.3 mg/kg 体重) しても、副交感神経切除により減少した AQP5 蛋白質発現レベルは回復しなかった (Fig. 3b)。なお、顎下腺重量は塩酸セビメリン投与により増加しなかった。



AQP5 および AQP1 mRNA 発現に対する自律神経切断およびムスカリンアゴニスト投与の影響: ノーザンプロテイングによって検出した AQP5 mRNA に相当する 1.6 kb のバンドの強度は副交感神経切除後の対照側 (R, C) と術側 (L, D) の間で大きな差は認められなかった (Fig. 4)。リアルタイム PCR によって確認された各群 AQP5 mRNA の相対値 (無処置群: NT, 100 とした) は各群間に有意差は認められなかった ($n=5$, Fig. 5)。副交感神経切除 (CTD) による AQP5 蛋白質レベルの減少および塩酸セビメリン (CM) 投与による AQP5 および AQP1 蛋白質レベルの増加は mRNA 発現レベルの変動に起因するのではないことが考えられた。

蛋白質代謝レベルに対する自律神経切断及びムスカリンアゴニスト投与の影響: 以上により副交感神経/M3 アゴニストによる AQP5 蛋白質レベルの変化は転写調節によるものではなく翻訳又は蛋白質代謝レベルによって調節されている可能性が示唆された。そこで蛋白質分解系の酵素に注目し、その活性変化を調べたところ、リソゾーム分解酵素カテプシン D/E の活性が副交感神経切断によって上昇し、この上昇は塩酸セビメリン投与によって抑制された (Fig. 6b)。これらの処置はプロテアソームの酵素活性には顕著な影響を与えなかった (Fig. 6 d)。顎下腺は主として腺房細胞と導管細胞から構成され、AQP5 は腺房細胞に局在する。副交感神経切除および術後塩酸セビ

メルリンを投与したラット顎下腺より Percoll 密度勾配遠心法により導管細胞から腺房細胞を分離し (Fig. 7), 得られた腺房細胞を用いてカテプシン活性を測定した結果, 前述の組織サンプルでの測定結果と同様の傾向が認められた (Table 1)。これらの実験から AQP 蛋白質レベルはリソゾーム系蛋白質代謝酵素によって調節されている可能性が強く示された。この可能性を検証するために、リソゾームを変性させる作用を有すると報告されているクロロキンを投与して、AQP_s 蛋白質レベルを調べたところ、クロロキンは塩酸セビメリンと同様に AQP5 蛋白質レベルを上昇させた (Fig. 8)。即ちリソゾームの変性により AQP5 分解が抑制され、AQP5 レベルが上昇したものと考えられた。

Fig.6

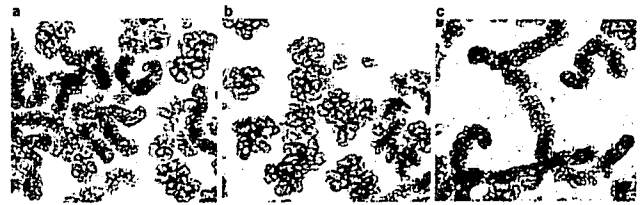
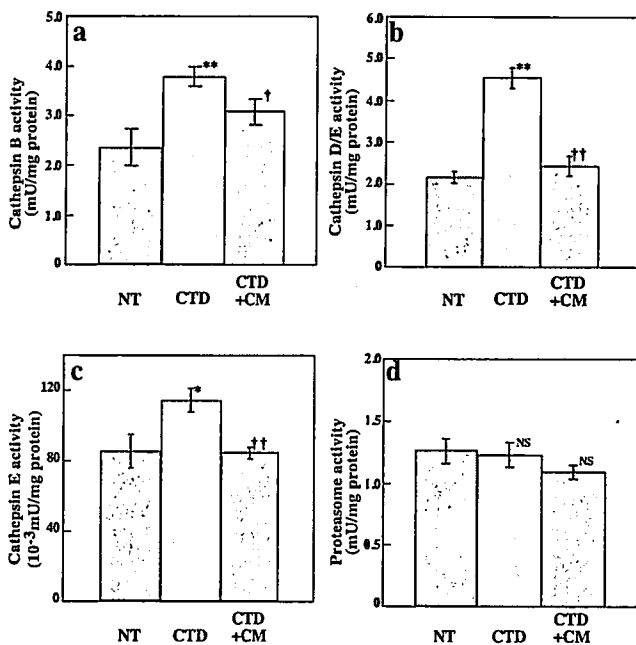


Fig.7 Phase contrast microscopic pictures of rat SMG duct and acinous cells. The SMG was digested by 0.1% collagenase and washed. a: Duct and acini before separation. b: Acini separated by 65% Percoll. c: Duct separated by 65% Percoll.

Fig.8

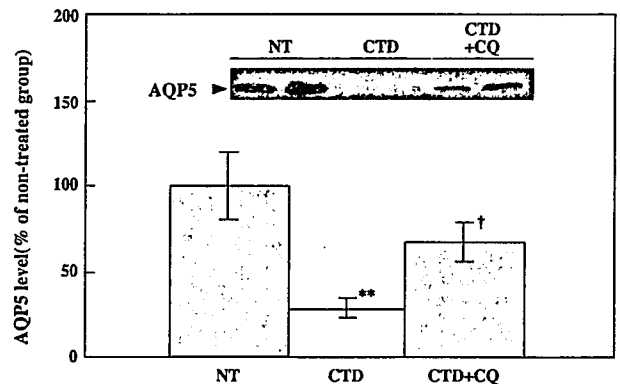


Table 1 Effects of the chorda tympani denervation and SNI-2011 administration on the cathepsin activities of isolated rat acinous cells

	Cathepsin activities (mU/mg protein)			
	D + E (%) ^a	E (%) ^b	D (%) ^c	B (%)
Normal	3.58±0.37(100±10.33)	0.1336±0.0142(100±10.63)	3.44±0.36(100±10.47)	0.0159±0.0024(100±15.09)
CTD	4.61±0.20(128.77±5.59)*	0.0705±0.0094(52.77±7.04)	4.51±0.17(131.10±4.94)*	0.0139±0.0029(87.42±18.24)
CTD+SNI-2011	2.74±0.31(76.54±8.66)**	0.0435±0.0064(32.56±4.79)	2.69±0.30(78.20±8.72)**	0.0211±0.0058(132.70±3.65)

* p<0.05, significantly different from the normal group. **p<0.01, significantly different from the CTD group. c: Calculated by subtracting the value in "b" from those in "a".

結論

顎下腺にある AQP_s の発現レベルに対する副交感神経切除および塩酸セビメリン投与の影響は, mRNA の転写調節によるものではなく, リソゾーム酵素, 主にカテプシンDの活性調節によって制御されている可能性が強いと考えられた。

参考文献

1. Agre P: Molecular physiology of water transport: aquaporin nomenclature workshop: Mammalian aquaporin. Biol Cell 89, 225-257 (1997) (等 48 件文献を引用しましたが、ページ数のために省略させていただきます)

注：本研究は 2006 年 9 月 22 日「第 48 回歯科基礎医学会学術大会並びに総会、鶴見」にてポスター発表、2006 年 10 月 22 日「The 3rd International Symposium on Salivary Gland in Honor of Niels Stensen, Okazaki, Japan」にて口演発表、2007 年 3 月 2 日「The 1st International Symposium and Workshop “The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century”, Awaji, Japan」にてポスター発表、四国歯学会雑誌第 20 巻、第 1 号 (2007, 印刷中) に掲載。

作成日：2007 年 3 月 7 日