

学位論文の内容の要旨

藤田 慶恵 印

Aquaporin-5 protein is selectively reduced in rat parotid glands under conditions of fasting or a liquid diet.

(ラット耳下腺のアクアポリン5タンパク質は、絶食または液体食摂取により選択的に減少する。)

(学位論文の要旨)

【背景】

唾液の水分泌は、唾液腺腺房細胞の少なくとも3つの細胞膜タンパク質、すなわち、水チャネルである aquaporin-5 (AQP5)、Ca²⁺活性化 Cl⁻チャネルである transmembrane protein 16A (TMEM16A)、および Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体 (NKCC1) が関与している。AQP5 と TMEM16A は腺房細胞の腺腔側細胞膜に局在し、NKCC1 は基底側細胞膜に局在する。唾液分泌時には副交感神経からのアセチルコリンの作用により、TMEM16A と NKCC1 を介した Cl⁻の腺腔への分泌がおこり、細胞間隙を通過して Na⁺が腺腔へ移動する。その結果生じる浸透圧勾配が原動力となって AQP5 とタイトジャンクションを通過して腺腔へ水が分泌される。

筆者らは過去に、3日間絶食したラット耳下腺の AQP5 タンパク質量が著明に減少することを報告した (Susa et al. 2013)。本研究では、AQP5 タンパク質量の減少は絶食による咀嚼運動の低下によるものと仮定し、絶食群に加えて液体食を摂取させる群を設定して耳下腺 AQP5 の変化を mRNA レベル、タンパク質レベルで検討した。さらに、唾液の水分泌に関与する TMEM16A と NKCC1 についても検討を行った。また AQP5 減少におけるタンパク質分解系の関与を知る目的で、リソソーム阻害剤、カルパイン阻害剤、プロテアソーム阻害剤を投与して絶食にする実験も行った。

【材料と方法】

8-9週齢雄性 Wistar ラット (体重 200g 前後) に対して、以下のプロトコルに従って実験を行い、耳下腺を採取した後、蛍光抗体法、定量的イムノブロット法、定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) 法を行った。統計学的解析は、コントロール群と実験群の比較を Dunnett の方法、または対応のない2群の *t* 検定で行った。

液体食または絶食 (48時間または1週間)

- 1) コントロール群：固形食 (CE-2、クレア) および水を自由摂取
- 2) 液体食群：液体食 (メイバランス HP1.0、明治) および水を自由摂取
- 3) 絶食群 (48時間のみ)：水のみ自由摂取

各ラットの固形食または液体食の摂取量を測り摂取カロリー値を算出し、実験前後の体重を測定し体重変化量を算出した。

クロロキン（リソソーム阻害剤）を投与して絶食（48時間）

クロロキンまたは Vehicle を実験開始 24 時間前、4 時間前、および実験開始 24 時間後に投与して 48 時間の絶食（水のみ自由摂取）

カルペプチン（カルpain阻害剤）を投与して絶食（48時間）

カルペプチンまたは Vehicle を実験開始時および実験開始 24 時間後に投与して 48 時間の絶食（水のみ自由摂取）

MG132（プロテアソーム阻害剤）を投与して絶食（48時間）

MG132 または Vehicle を実験開始 24 時間前、4 時間前、および実験開始 24 時間後に投与して 48 時間の絶食（水のみ自由摂取）

【結果】

まず、固形食を与えたコントロール群と液体食群の摂取カロリー値と体重変化量から、実験に用いた液体食（メイバランス）によりラットは固形食と同等のカロリーを摂取したと判断した。

液体食または絶食による AQP5、TMEM16A、NKCC1 の変化

蛍光抗体法では 48 時間の絶食、液体食、1 週間の液体食、いずれの群のラットにおいても AQP5 のシグナルの明らかな低下を認めたが、TMEM16A および NKCC1 は、いずれもシグナルの低下を認めなかった。定量的イムノブロット法では AQP5 タンパク質量はコントロール群と比較して 48 時間の絶食、液体食、1 週間の液体食、いずれの群のラットにおいても有意に減少し、TMEM16A と NKCC1 は有意な変化がないことが確認された。RT-qPCR では、AQP5、TMEM16A および NKCC1 の mRNA 量は液体食や絶食による減少は認められず、1 週間の液体食においては NKCC1 mRNA の有意な上昇が認められた。

リソソーム、カルpain、またはプロテアソーム阻害剤を投与して絶食にしたラットの AQP5 の変化

AQP5 タンパク質の減少におけるタンパク質分解系の関与を調べるために、各種阻害剤を投与して絶食にする実験を行ったが、いずれの阻害剤を投与しても、絶食による AQP5 タンパク質の減少は抑制されなかった。

【考察】

本研究では、絶食のみならず液体食でもラット耳下腺 AQP5 タンパク質量が減少することが明らかになった。この結果は、AQP5 の減少が絶食による飢餓が原因ではなく、咀嚼運動の低下が原因であり、耳下腺では AQP5 の維持には咀嚼刺激が必要であることを示唆している。TMEM16A と NKCC1 は 48 時間の絶食、液体食、および 1 週間の液体食において減少しなかったこと、また、AQP5 mRNA は減少しなかったことから、AQP5 タンパク質が咀嚼運動の低下によって選択的に分解される可能性が考えられる。耳下腺 AQP5 の減少が直ちに唾液分泌の著しい低下を引き起こすことはないと思われるが、AQP5 が選択的に減少するメカニズムについては興味深く、種々のタンパク質分解系の阻害剤を用いた実験を行ったが、明らかな結果が得られなかった。用いたラットの個体数が少なかったこと、薬剤の投与量および投与方法に検討の余地があることなどから、さらなる実験が必要である。

【結語】

本研究により、咀嚼運動が減少したラット耳下腺においては AQP5 タンパク質が減少するが、AQP5 とともに水分分泌に関与する TMEM16A と NKCC1 は減少しないことが明らかになった。AQP5 が選択的に減少するメカニズムについては興味深く、さらなる解明を必要とする。