

研究課題名(和文)

水輸送を担うアクアポリン水チャネルの機能と制御機構

研究課題名(英文)

Function and regulatory system of water transporting aquaporin channels

研究代表者 SASAKI SEI

氏名 佐々木 成

所属研究機関・部局・職 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授



推薦の観点: 創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の概要: 機能未知のアクアポリン(AQP)の生体内での役割を明らかにするために、遺伝子改変マウスを作成しその形質を解析する。AQP機能制御の分子基盤を、AQP分子を取り巻く蛋白複合体とその分子間相互作用を明らかにすることで解明する。

研究分野/科研費の分科・細目/キーワード: 生物学/生物科学・機能生物学/水チャネル・アクアポリン・水輸送

### 1. 研究開始当初の背景

生体はその大部分が水から構成されており、当然種々の生命現象の多くは、生理的にも病態的にも水の移動を伴うことによってなされている。1991年の水チャネルの発見以前は、このような水の移動に水を通すチャネル(アクアポリン)が関わることを認識している研究者は少なかったが、アクアポリン(AQP)研究の進展に伴い、生体内で水の移動が障害されることで起こる病気が、アクアポリン分子の異常として記述できるという、いわばアクアポリン病とも呼べる新しい概念が生まれつつある。この概念を確固たる新たな学問体系として確立することは、創造的・革新的学問領域を創成する学術創成研究の理念に合致するものと考えられる。

### 2. 研究の目的

すでにヒトでは13種のAQPが存在し、各臓器に分布している事は明らかになっている。しかしながら、その生体内での役割は未だ不明な点が多く、最近では水だけでなくAQPを介したglycerol, 尿素, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の移動も報告されており、多彩な生命現象を担っていることが推察される。しかしながら強制発現系での結果の解釈は時として注意を要し、我々は遺伝子改変マウスを使用してその生理的機能を明らかにする。

一方、水の輸送は種々のシグナル刺激に呼応して調節されており、その制御系の解析も生

体でのAQPの機能理解にとって重要である。AQPのうち腎臓に存在し、その遺伝子異常で腎性尿崩症を呈することが知られているAQP2は、バソプレシン刺激で数分のオーダーで細胞内から細胞膜への移動が起こり、これが尿濃縮機構の重要なメカニズムとなっている。しかしながら、AQP2の細胞内移動の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究では、AQP2をとりまく分子複合体を明らかにし、それらがAQP2の細胞内移動のメカニズムにどのように関わるかを分子間相互作用を中心に明らかにする。

### 3. 研究の方法

遺伝子改変マウスは通常のノックアウトマウス、コンディショナルノックアウトマウス、ならびにヒトでの遺伝子異常を再現するノックインマウスを相同組み替えの方法にて作成する。

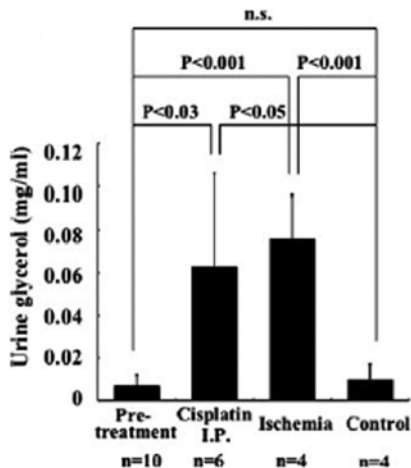
AQP複合体の解析は、AQP抗体による免疫沈降物を質量分析により同定する。この際、通常のマウス、ラットを材料とする以外に、遺伝子改変動物も適宜使用し、野生型との比較によりより目的とするものの同定を容易にする方法や、強制発現系の培養細胞も目的に応じて随時使用する。個補蛋白が同定された後は、リボソーム再構成系による機能解析、表面プラズモン共鳴やFRET、蛍光相関分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS)などによる分子間相互作用解析により、AQP結合たんぱく質のAQPの機能制御の役割を決定する。

#### 4. これまでの成果

A. アクアポリンの生体内での役割の解明  
 アクアポリン遺伝子改変マウスの作成とその解析(以下抜粋)

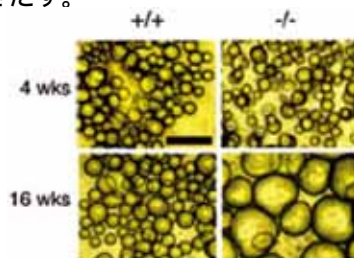
##### A-1 AQP7 ノックアウトマウス

1) AQP7 ノックアウトマウスでは glycerol 尿症を呈する。このことより正常マウスにおいて尿中グリセロール排泄は尿細管障害のバイオマーカーと成り得る事を明らかにした。



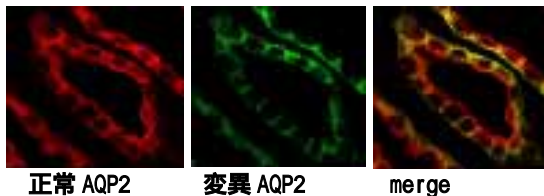
シスプラチン腎症、虚血による尿中 glycerol 排泄の増加。

2) AQP7 ノックアウトマウスでは脂肪細胞の肥大をきたす。



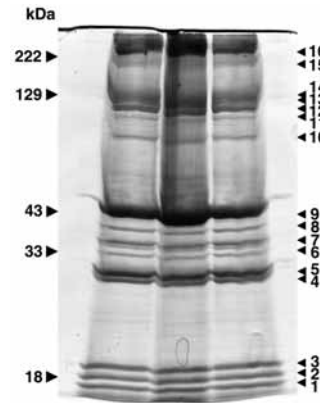
##### A-2 尿崩症 AQP2 ノックインマウス

ノックインマウスの正常 AQP2 は変異型 AQP2 の basolateral 側局在に引き寄せられ、脱水時も apical 側への集積が減少。



#### B. アクアポリンの機能制御の分子基盤の解明

AQP2 結合蛋白の網羅的同定の試み。



ラット腎髄質からの AQP2 抗体カラムによる AQP2 結合蛋白の単離同定。5: AQP2, 9: actin, 14: SPA1.

#### 5. 今後の計画

- AQP11, AQP12 のノックアウトの解析を継続。AQP8, AQP9 ノックアウトの解析。
- 尿中 AQP7, glycerol のヒト腎障害バイオマーカーとしての有用性の検討。
- 腎臓特異的 AQP7 ノックアウトマウスの作成と解析、など。
- AQP2 と actin や他の結合蛋白の相互作用の AQP2 trafficking における意義の確定。蛍光相互相関分光法 (FCS) 法の膜輸送体蛋白相互作用研究への応用。

#### 6. これまでの発表論文の抜粋

1. Rai T, Sasaki S, Uchida S: The polarized trafficking of the aquaporin-3 water channel is mediated by an N-Terminal Sorting Signal. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290(1): C298-304, 2006.
2. Sohara E, Rai T, Yang SS, Uchida K, Nitta K, Horita S, Ohno M, Harada A, Sasaki S, Uchida S. Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin 2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 14217-14222, 2006.
3. Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7 deficient mice: Adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem.* 280(16):15493-15496, 2005.
4. Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SB, Uchida S, Sasaki S, Ishibashi K. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 330(3):832-838, 2005.
5. Kuwahara M, Asai T, Terada Y, Sasaki S. The C-terminal tail of aquaporin-2 determines apical trafficking. *Kidney Int.* 68:1999-2009, 2005.
6. Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, Ando A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol. Cell Biol.* 25: 7770-7779, 2005.
7. Noda Y, Horikawa S, Katayama Y, Sasaki S. Identification of a multiprotein "motor" complex binding to water channel aquaporin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 330: 1041-1047, 2005.
8. Sohara E, Rai T, Miyazaki J, Verkman AS, Sasaki S, Uchida S. Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(6):F1195-1200, 2005.

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/aquaporin/index.html>