

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成17年度採択分

平成20年 3月31日現在

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）

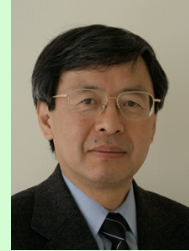
unction and regulatory system of water transporting

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：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：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、水の輸送は種々の生体内シグナル伝達

系に調節されており、その制御系の解析もAQPの生体内で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、バゾ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の質量分析による同定、酵母 two-hybrid 法を使用する。候補蛋白が同定された後は、その機能的意義をリポ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, FCCS) などによる分子間相互作用解析により検討する。

### 4. これまでの成果

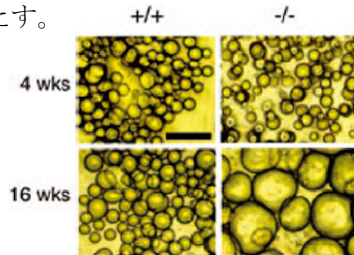
A. アクアポリンの生体内での役割の解明

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

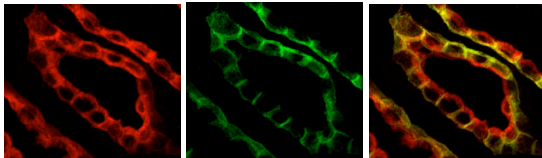
1) AQP7 ノックアウトマウスでは glycerol 尿症を呈する。このことより正常マウスにおいて尿中グリセロール排泄は尿細管障害のバイオマーカーと成り得る事を明らかにした

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。このマウスを用いて本疾患の治療法を明らかにした。



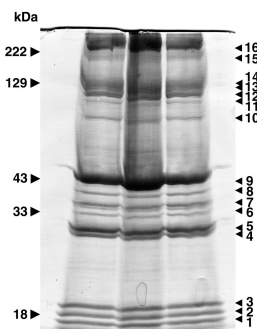
正常 AQP2      変異 AQP2      merge

#### A-3 スーパーアクアポリンノックアウトマウスの作成と解析

AQP11 ノックアウトの引き起こす嚢胞腎の病態解析により、他の嚢胞腎と共通の分子メカニズムが存在する可能性を明らかにした。膵臓特異的 AQP12 ノックアウトマウスは高コレステロール血症を引き起こすことが明らかになった。

#### B. アクアポリンの機能制御の分子基盤の解明

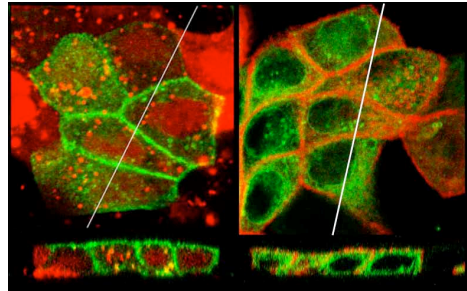
##### B-1 AQP2 結合蛋白の網羅的同定の試み。



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。4: トロポミオシン 5b, 5: AQP2, 9: actin.

##### B-2 AQP2 細胞内輸送機序の解明。

同定された蛋白のうち、アクチンとトロポミオシンについては、AQP2 がリン酸化されると高親和性にトロポミオシンが結合し、トロポミオシンと結合していた F-actin が脱重合することが明らかになった。これにより AQP2 が移動できる環境が整うと考えられる。



緑: AQP2 (左では膜への移動が促進、右では阻害されている)、赤左: トロポミオシン KD siRNA、赤右: 過剰発現したトロポミオシン。(JCB under revision)。

#### 5. 今後の計画

- AQP11, AQP12KO マウスの解析を継続。
- AQP7 腎臓特異的 KO マウスの作成と解析。AQP7/AQP8, AQP7/AQP9 ダブル KO の解析。
- トロポミオシンや actin 以外の AQP2 結合蛋白の AQP2 trafficking における意義の確定。
- FCCS 法の膜輸送体蛋白相互作用研究への応用の確立。

#### 6. これまでの発表論文の抜粋

1. Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin S-H, Moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S. Molecular pathogenesis of pseudoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4 D561A/+ knock-in mouse model. *Cell Metab* 5: 331-344, 2007.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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>