

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2006～2009  
課題番号：18390057  
研究課題名（和文）水チャネル・アクアポリン2をモデルとしたエンドソーム・ポストエンドソーム系の解析  
研究課題名（英文）Analysis of endosome/post-endosome system with special reference to water channel aquaporin 2  
研究代表者  
高田 邦昭（TAKATA KUNIAKI）  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20129290

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：アクアポリン2、エンドソーム、小胞、トラフフィッキング、水輸送

### 1. 研究計画の概要

細胞表面機能分子の数が細胞内小胞からの移行や回収によって調節されている系の中で、水チャネル・アクアポリン2 (AQP2)は、エンドソーム系により調節がおこなわれている。本研究では、AQP2をモデルとしてエンドソーム・ポストエンドソーム系の新たな機能に光を当てる。

### 2. 研究の進捗状況

筋細胞や脂肪細胞で発現しているグルコーストランスポーター4 (GLUT4)と腎臓集合管主細胞で発現している AQP2 の細胞内局在部位や動態を培養細胞系で解析した。GFP 標識 GLUT4 は主として細胞内の核周囲部に局在した。ゴルジ装置のマーカーとしてゴルジ 58 k 蛋白質、TGN のマーカーとしてフェーリンコンベルターゼなどと比較したところ、GFP 標識 GLUT4 はゴルジ装置や TGN 域にあるのが判明した。次に、AQP2 との分布局在を多重標識法で検討した。AQP2 は、Rab11 陽性の頂部細胞膜直下の小胞に主として分布し、ゴルジ装置や TGN にはほとんどみられなかった。初期エンドソームマーカーの EEA1 で標識すると、GLUT4 との共局在はみられたが、AQP2 はほとんど EEA1 陰性だった。このように、AQP2 貯蔵部位は、GLUT4 貯蔵部位とは基本的に異なるコンパートメントであった。

腎集合管主細胞では、バソプレシン V2 受容体を介したプロテインキナーゼ A の活性化により AQP2 がリン酸化されることにより AQP2 小胞の細胞膜への融合が起こるとされる。そこで、リン酸化 AQP2 を特異的に認識する抗体を作製し、水をロードしたラットと、バソプレシンを投与したラットについて、そ

の腎臓クリオスタット切片を使って蛍光抗体法により免疫染色をおこなった。その結果、バソプレシン処理により細胞膜にリン酸化 AQP2 が出現した。ただし、水をロードした状態でも、細胞内小胞にある AQP2 のかなりのものに陽性反応が見られた。また AQP2 を発現した MDCK 培養細胞でも、フォルスコリン刺激を加えなくても細胞内小胞にリン酸化 AQP2 が見られた。

そこで、このような細胞内でのリン酸化 AQP2 の分布局在をさらに詳細に検討するために、免疫電子顕微鏡法を用いてその分布を可視化した。ラット腎臓集合管主細胞では、ナノゴールド・プレエンベディング法により免疫標識した。AQP2 を発現した MDCK 培養細胞では、トライトン X100 でパーミアピライズしてナノゴールド法標識をおこなった。ラット集合管細胞では、バソプレシン刺激前は、AQP2 は細胞膜直下の小型小胞や、少し深部の比較的大きな小胞に局在していた。バソプレシン刺激により、ほとんどの AQP2 は細胞表面へと移行した。リン酸化 AQP2 抗体を用いてリン酸化された AQP2 の局在を電顕レベルでみると、刺激時には細胞表面に局在していたが、非刺激時にも細胞内小胞にある AQP2 でリン酸化がみられた。AQP2 を発現させた MDCK 細胞でも同様な結果が得られた。以上の結果から、超微形態レベルでも、細胞表面 AQP2 のみならず、一定量の細胞内 AQP2 はリン酸化されているのが明らかになった。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

AQP2 を持った小胞のポストエンドソーム

系における位置づけを見るために、AQP2 と同じように調節的に細胞内小胞と細胞膜とを行き来している分子として、インスリン依存性糖輸送体 GLUT4 に着目して、その局在と動態とを比較した結果、ポストエンドゾーム系がヘテロジニアスな系であることが示された。またこのようなポストエンドゾーム系における AQP2 貯蔵小胞のエクソサイトシスによるトラフィッキングの調節機構を見るために、リン酸化に着目して解析した。そのためにリン酸化 AQP2 を特異的に認識する抗体を作製し、十分なキャラクタライズをおこなった後に、免疫組織化学的な解析に用いた。その結果、リン酸化と細胞での局在が必ずしも従来考えられていたような単純なものではないことが判明した。すなわち、「リン酸化＝細胞表面への移行」、「脱リン酸化＝細胞内小胞への回収保持」といった単純な図式では説明できないことが明らかとなった。リン酸化と細胞内での AQP2 小胞のトラフィッキングと局在については、さらに検討を加える必要がある。

#### 4. 今後の研究の推進方策

AQP2 の小胞コンパートメント間での動態を違った角度から解明するために、頂部細胞膜とその近傍の小胞を含んだ標本を、ポリリジンコートカバースリップで吸着する方法によって作製し、細胞膜近傍における AQP2 小胞の動態をより明確に明らかにする。同時にラフトをはじめとする膜マーカートの多重標識により、これらの多様な小胞系にキャラクタリゼーションを進める。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, & Hasegawa H: Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem Cell Biol* 130: 187-209, 2008. 査読有り。
2. Aoki T, Hagiwara H, Matsuzaki T, Suzuki T & Takata K: Internalization of caveolae and their relationship with endosomes in cultured human and mouse endothelial cells. *Anat Sci Int* 82: 82-97, 2007. 査読有り。
3. Hasegawa T, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Suzuki T, Aoki T, Hagiwara H & Takata K: Differential localization of aquaporin-2 and glucose transporter 4 in polarized MDCK cells. *Histochem Cell Biol* 127(3):233-241, 2007. 査読有り。
4. Ablimit A, Matsuzaki T, Tajika Y, Aoki T, Hagiwara H & Takata K: Immunolocalization of water channel

aquaporins in the nasal olfactory mucosa. *Arch Histol Cytol* 69: 1-12, 2006. 査読有り。

5. Takata K: Aquaporin-2 (AQP2): Its intracellular compartment and trafficking. *Cell Mol Biol* 52: 34-39, 2006. 査読有り。

[学会発表] (計 23 件)

1. Takata K: Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. 50th Symposium of the Society for Histochemistry (Rober Feulgen Lecture 2008), Interlaken, Switzerland, Oct 1-4, 2008.
2. Takata K: Intracellular localization and trafficking of water channel aquaporin 2 (AQP2). 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju (Symposium L-07 Recent Progress of Functional Morphology of the Kidney), Korea, Nov 2-7, 2008.
3. Takata K, Hasegawa T, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Suzuki T, Aoki T & Hagiwara H: Intracellular compartment of aquaporin-2 (AQP2) and glucose transporter-4 (GLUT4) in MDCK Cells. The 5th International Conference of Aquaporin, Nara, Japan, July 13-16, 2007.
4. Takata K, Tajika Y, Matsuzaki T, Suzuki T, Aoki T & Hagiwara H: Intracellular compartment and trafficking of aquaporin-2 water channel. The 16th International Microscopy Congress, Sapporo, Japan, Sep 3-8, 2006.
5. Aoki T, Suzuki T, Matsuzaki T, Hagiwara H & Takata K: Internalization of caveolae and their relationship with endosomes. The 16th International Microscopy Congress, Sapporo, Japan, Sep 3-8, 2006.

[図書] (計 2 件)

1. 高田邦昭, 松崎利行: アクアポリンの分布 (動物)。からだと水の事典 (佐々木成、石橋賢一編)、朝倉書店、東京、pp57-64、2008。
2. 高田邦昭, 斎藤尚亮, 川上速人 (編): 染色・バイオイメージング実験ハンドブック。細胞や組織の形態・遺伝子・タンパク質を観るための染色法と顕微鏡観察のすべて。実験医学別冊、羊土社、東京、pp1-334, 2006。