

平成 22 年 5 月 14 日現在

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・学長
研究者番号：20129290

研究成果の概要（和文）：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り調節される系は、腎臓での水の再吸収や血糖値恒常性の維持機構などにおいて重要な役割を果たしている。このようなエンドソーム・ポストエンドソーム系での小胞トラフィックングにより調節されているものの中で、水チャネル・アクアポリン2(AQP2)をモデルとしてその分布と調節機構を解析した。アクアポリン2とインスリン刺激によりトラフィックングの調節がおこるグルコーストランスポーター4(GLUT4)あるいはGFP標識GLUT4をMDCK細胞で同時に発現させたところ、アクアポリン2とGLUT4はそれぞれ独自の分布局在パターンをとった。さらにフォルスコリン刺激によりアクアポリン2を細胞膜へと移行させたり細胞内へのリサイクリング過程を追跡してみても、GLUT4の分布・局在はほとんど影響されなかった。この結果は、アクアポリン2とGLUT4は、ポストエンドソーム域においてその局在と動態はそれぞれ独自のものであることを示していて、ポストエンドソーム域がヘテロな小胞集団であることを示唆している。次にアクアポリン2小胞のリン酸化による調節を、リン酸化アクアポリン2を特異的に認識する抗体を作製し、ウエスタンブロット法と蛍光抗体法や免疫電顕法により観察した。その結果、リン酸化アクアポリン2が細胞内でもある一定レベル存在することが判明した。

研究成果の概要（英文）： Vesicular trafficking that determines the number of cell surface molecules serves as one of important regulatory mechanisms found in the control of the reabsorption of water in the kidney, maintenance of blood glucose level, etc. Intracellular vesicles involved in the endocytosis and subsequent recycling process, such as endosomes and post-endosomal vesicles are key components in such vesicular trafficking and storage. We used water channel aquaporin 2 whose trafficking is regulated by hypophysial hormone vasopressin. Glucose transporter 4(GLUT4), whose trafficking is regulated by insulin in adipocytes and muscle cells, was coexpressed with aquaporin 2 in MDCK cells, and their localization was visualized by immunofluorescence and GFP-tagging methods. Aquaporin 2 and GLUT4 exhibited distinct localization pattern each other in both the resting and stimulated states, showing that aquaporin 2 and GLUT4 are stored in distinct post-endosomal compartments each other, and that their trafficking is differentially regulated. Translocation of aquaporin 2 has been considered to be regulated by its phosphorylation. We raised antibodies that specifically detect phosphorylated aquaporin 2. By western blotting and immunofluorescence microscopy, phosphorylation of aquaporin 2 was found not only on the cell surface but also intracellular vesicles, suggesting the ubiquitous presence of phosphorylated aquaporin 2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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、トラフィックキング、水輸送

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトシスによって形成されるエンドソームは、細胞表面膜と細胞内膜系とのインターフェースに位置する細胞内オルガネラである。エンドソームは、エンドサイトシスによって生じた小胞からまず形成される初期エンドソーム、核の近傍に位置するリサイクリングエンドソーム、取り込んだ物質の分解に関与するレイトエンドソームに大別される。これらのエンドソーム間や、エンドソームと細胞膜、トランスゴルジネットワーク(TGN)、ゴルジ装置などとの間の小胞輸送の解明は、様々な機能を担った細胞表面膜分子のトラフィックキング(トランスロケーション)による細胞表面活性調節を解明する上でのキーポイントとなる。従来、このエンドソームは、エンドサイトシスとリサイクリングの系として理解されてきたが、本研究では、細胞膜水チャネルであるアクアポリン2(AQP2)の系に焦点を定め、エンドソームと、細胞膜機能分子の特異的な貯蔵システムとしてのポストエンドソーム系を想定し、エンドソーム・ポストエンドソーム系の新たな機能に光りを当てるものである。

アクアポリン2は、腎臓集合管に発現する膜の水チャネル分子のひとつである。変異により腎性尿崩症が起こり、尿の濃縮過程では決定的に重要な役割を果たしている。アクアポリン2は、通常は細胞膜には局在せず細胞内小胞に貯蔵され、バソプレシン刺激等によりこの貯蔵小胞のエクソサイトシスにより細胞膜へと移行し(アクアポリン2の細胞膜へのトランスロケーション)、細胞膜の水透過性を上げるとされている。刺激がオフになると、エンドサイトシスにより細胞膜からふたたび細胞内小胞へと回収される(リサイクリングモデル)。アクアポリン2については、従来、細胞膜へのトランスロケーション時のシグナル伝達系の研究がほとんどで、実際の

水移送にあたるアクアポリン2や、アクアポリン2小胞の細胞内での局在部位、動態、調節機構についての解析は少ない。特に、細胞膜からのエンドサイトシスとエンドソームを介したリサイクリング機構は、私たちが本格的に始めたばかりである。

2. 研究の目的

本研究では、細胞膜へのトランスロケーションやリサイクリングによる細胞表面の活性調節機構の最も重要な部分を担っているエンドソーム・ポストエンドソーム系の実体と動態を、アクアポリン2をモデルシステムとして明らかにする。このために、アクアポリン2の細胞内局在・動態を、MDCK細胞などの培養細胞やラット腎臓集合管の主細胞で調べる。さらに、アクアポリン2と同様に細胞内貯蔵小胞と細胞表面とをリサイクルする分子であるグルコーストランスポーター(GLUT4)の動態とも比較検討し、このようなポストエンドソームシステム的一般性と分子毎の特異性を検証する。アクアポリン2分子のこれらのエンドソーム系・ポストエンドソーム系でのトラフィックキング過程における調節機構を調べるために、アクアポリン2のリン酸化の状況を、特異抗体を作製して検討する。

3. 研究の方法

アクアポリン2を発現させたMDCK細胞やラット腎臓集合管の主細胞におけるアクアポリン2の発現と局在を蛍光抗体法で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を使って解析した。特にMDCK細胞では、糖輸送体GLUT4をトランスフェクションさせてその局在をみた。このアクアポリン2とGLUT4とを発現している細胞を使い、フォルスコリン刺激によりアクアポリン2が細胞表面へと移行し、さらにフォルスコリンを除去してからチェ

入することにより細胞内へとリサイクリングし、最終的に EEA1 陽性の貯蔵小胞と戻る過程について解析した。

リン酸化アクアポリン2に対する抗体は、合成部分ペプチドをヘモシアニンに結合させたものを抗原としてウサギで作製し、アフィニティカラムで精製した。抗体のキャラクタリゼーションはウエスタンブロット法と蛍光抗体法を用い、リン酸化した抗原ペプチドやリン酸化していないペプチドによる阻害実験などによりおこなった。

免疫組織化学は、ラット腎臓集合管主細胞では、アルデヒド固定してから凍結切片を作製し、蛍光抗体法あるいはナノゴールド・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 細胞では、トライトン X100 でパーミアビライズしてのち、蛍光抗体法あるいはナノゴールド法標識をおこなった。

4. 研究成果

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アクアポリン2は、ともに通常は細胞内小胞に局在し、それぞれインスリンやバソプレシン刺激時に細胞表面へ移行して糖の取込や水輸送にあずかっている。小胞トラフィッキングにより調節が行われているこのようなトランスポーターやチャネルの、細胞内局在部位や動態を培養細胞系で解析した。まず、GLUT4 の挙動を多重標識法で調べるために、GLUT4 をグリーンフルオロセントプロテイン (GFP) で標識し、アクアポリン2を発現する MDCK 細胞に導入して、その局在を非標識アクアポリン2と比較した。まず、MDCK 細胞で発現させた GFP 標識 GLUT4 と非標識 GLUT4 の局在を蛍光抗体法により比較し、GFP 標識により、GLUT4 の局在に変化のないのを確認した。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、アクアポリン2との分布局在を多重標識法で検討した。アクアポリン2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、アクアポリン2はほとんど EEA1 陰性だった。このように、アクアポリン2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。

次に、アクアポリン2のリン酸化にともなうアクアポリン2を有する小胞のトラフィッキング機構を解明するために、まずリン酸化

アクアポリン2に対する抗体を、合成部分ペプチドをヘモシアニンに結合させたものを抗原としてウサギで作製し、アフィニティカラムで精製した。まずアクアポリン2を発現した MDCK 細胞やラット腎臓で、この抗体を使ってウエスタンブロット法をおこない、シグナルがリン酸化した抗原ペプチドによって消失するが、リン酸化していないペプチドでは変化がないのを確認した。またホスファターゼ処理により、シグナルが消失するが、同条件で通常のアクアポリン2に対する抗体のシグナルは変化しないのを確認した。腎臓の集合管細胞やアクアポリン2を発現した MDCK 細胞での蛍光抗体標識でも、リン酸化抗原ペプチドにより阻害されるが、リン酸化していないペプチドでは変化が無いのを確認した。これらの結果から、リン酸化アクアポリン2を認識している抗体が得られたことが判明した。次にこの抗体を使ってアクアポリン2を発現した MDCK 細胞におけるリン酸化アクアポリン2のフォルスコリン刺激による変化をウエスタンブロット法で解析した。その結果、常に一定レベルのリン酸化がみられ、それがフォルスコリン刺激により一時的に増加することが判明した。次に、形態レベルでの解析を行った。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、刺激前やバソプレシン刺激除去後にも細胞内小胞において AQP2 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 がリン酸化されているのが明らかになった。この過程においても、小胞、細胞表面ともに一定量のリン酸化はみられ、特に細胞表面のリン酸化が顕著といった傾向は認められなかった。さらに、バソプレシンを遺伝的に欠損するブラッテルボロ・ラットでの細胞内アクアポリン2でも同様のリン酸化がみられた。以上の結果は、アクアポリン2のリン酸化はその細胞内での局在を一義的には規定している訳ではないことを示唆している。

5. 主な発表論文等

(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. Suzuki T, Matsunami T, Hisa Y, Takata K, Takamatsu T & Oyamada M: Roles of gap junctions in glucose transport from

glucose transporter 1-positive to -negative cells in the lateral wall of the rat cholera. *Histochem Cell Biol* 131:89-102, 2009. 査読有り。

2. Matsuzaki T, Hata H, Ozawa H & Takata K: Immunohistochemical localization of the aquaporins AQP1, AQP3, AQP4, and AQP5 in the mouse respiratory system. *Acta Histochem Cytochem* 42: 159-169, 2009. 査読有り。

3. 松崎利行, 高田邦昭, 小澤一史. 腎臓と唾液腺における細胞膜水チャネル, アクアポリン. *顕微鏡* 44:111-116, 2009. 査読有り。

4. Ablimit A, Aoki T, Matsuzaki T, Suzuki T, Hagiwara H, Takami S & Takata K: Immunolocalization of water channel aquaporins in the vomeronasal organ of the rat: Expression of AQP4 in neuronal sensory cells. *Chemical Senses* 33: 481-488, 2008. 査読有り。

5. Egawa M, Kamata H, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Nakatsu Y, Ying G, Jun Z, Tsuchiya Y, Takata K, Kurihara H & Asano T: Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast BeWo cells. *Placenta* 29:1003-1008, 2008. 査読有り。

6. 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。

7. 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。

8. 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。

9. 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。

10. 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 28 件)

1. Matsuzaki T, Sawai N, Takata K, Ozawa

H: Immunohistochemical distribution of water channel, AQP4, in the rat central nervous system. The 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones. Kitakyushu, Japan, September 4-8, 2009.

2. 青木武生, 萩原治夫, 鈴木健史, 高田邦昭: MDCK細胞における頂部細胞膜カベオラと水チャネルアクアポリン2との関係。日本組織細胞化学会 50 回総会学術集会、大津、2009 年 9 月 26~27 日。

3. 松崎利行, 畑英一, 高田邦昭, 小澤一史: マウス呼吸器系における水チャネル、アクアポリンの分布局在。日本組織細胞化学会 50 回総会学術集会、大津、2009 年 9 月 26~27 日。

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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。

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.gunma-u.ac.jp/anatcellbiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 邦昭 (TAKATA KUNIAKI)
群馬大学・学長
研究者番号：20129290

(2) 研究分担者

萩原 治夫 (HAGIWARA HARUO)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80189464

青木 武生 (AOKI TAKEO)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70150919

鈴木 健史 (SUZUKI TAKESHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00261868

松崎 利行 (MATSUZAKI TOSHIYUKI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30334113

(3) 連携研究者

(なし)