

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580342
 研究課題名（和文） 新規水チャネルアควアポリン-11に関連する分子基盤の解析
 研究課題名（英文） Studies on molecular basis of a novel water channel (aquaporin-11) function
 研究代表者
 池田 正浩（IKEDA Masahiro）
 宮崎大学・農学部獣医学科・准教授
 研究者番号：60281218

研究成果の概要：本研究では、我々が発見した新規アควアポリン（AQP）分子種である AQP11 に関連する分子基盤を明確にし、その機能異常がどのような分子メカニズムを通して細胞死を伴う囊胞を形成するのかを解明することを目的とする。研究期間を通して、(1) AQP11 の小胞体膜局在やテトラマー形成に必要なアミノ酸配列の解析、(2) AQP11 結合タンパク質の同定とその結合の意義、(3) AQP11 と小胞体ストレス、あるいは囊胞形成関連分子との interaction について解析した。その結果、AQP11 の小胞体膜局在に必要なアミノ酸配列を見出すことはできなかったが、(1) AQP11 の4次元構造形成に99番目のアスパラギン残基および101番目のシステイン残基が重要で、それらの残基は AQP11 のC末端側の3次元構造を保つことに寄与しており、それらのアミノ酸残基が変異すると、AQP11 のC末端側の3次元構造が変化するために、正しい4次元構造が形成されないこと、(2) 3種類の AQP11 結合タンパク質を同定し、その中で AQP11 と同じ近位尿細管細胞に発現している AQP1 は、AQP11 によってその細胞膜への局在が調節されていること、(3) 小胞体ストレスが発生するような場合には AQP11 の発現量が減少すること、そして囊胞形成に重要な分子で、小胞体ストレスとの関連性が最近報告された分子と AQP11 が相互作用することなどを示唆するデータを得た。

今後これらの発見に基づいて、AQP11 の機能の生物学的意義の全貌解明、AQP11 ノックアウトマウスにおける囊胞形成のメカニズムなどが明らかにされるものと考えられる。

なお本研究の一環として実施した、AQP11 と同じ膜タンパク質の新しい機能について、また小胞体ストレスの生体モデルである実験的急性腎不全モデルを用いて、急性腎不全の新規治療薬や体質との関連性について調べた研究成果を国際雑誌に発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：水チャネル、aquaporin、AQP11、多量体、小胞体ストレス、急性腎不全、ヘテロオリゴマー

1. 研究開始当初の背景

アクアポリン (aquaporin、以下 AQP とする) 分子種とは、疎水性の脂質二重膜である生体膜を水分子が透過する通路として同定された膜タンパク質分子種である。現在では 200 以上の AQP 分子種が、微生物、植物、無脊椎動物および脊椎動物から単離されていて、生命を維持する上で AQP 分子種が根本的なタンパク質分子の一つであると見なされるようになった。哺乳動物においては 13 種類 (AQP0~AQP12) の AQP 分子種が同定されていて、そのうちのほとんどは細胞膜に局在して、水や中性分子を細胞内外へ輸送する機能を持つ。米国の Agre 博士のグループは、1992 年に AQP1 を最初に発見した後は、AQP1 の分子構造を解くことに精力を注いだ。その結果 2000 年に、京大の藤吉博士のグループの協力もあって、AQP1 の分子構造を高分解能で観察することに初めて成功した。それによると AQP1 は 4 量体で細胞膜に存在し (ホモテトラマー)、各単量体に水分子が透過する穴が 1 つずつ開いている分子構造を持っていた。その後明らかにされた他の AQP 分子種においても、基本的な構造は同様であることが明らかになっている。

AQP 分子種の生理的・病態生理的な役割を明確にするために、1990 年代後半から現在までに、多数の種類 AQP 分子種のノックアウトマウスが作られてきた。その結果、生理的・病態生理的な役割が明確にされた AQP 分子種としては、次のようなものがある。AQP1 が細胞の遊走に関わっていて、AQP1 の発現を抑制するとガンの転移が起こり難くなること、AQP4 が脳脊髄液の交通に関わっていて、そのノックアウトマウスでは脳浮腫からの回復が遅れること、AQP7 が脂肪細胞における脂質の通路となっていて、AQP7 ノックアウトマウスは肥満を示すことなどである。また、AQP 分子種の変異が関与する遺伝性疾患もヒトにおいて次々に明らかにされてきている。いくつか例を挙げると、AQP0 の変異によって起こる白内障、AQP1 の変異によって起こる尿の濃縮障害、AQP2 の変異によって起こる尿崩症などである。

これらの遺伝性疾患の中で、遺伝様式と表現型との関係が分子レベルで明らかにされ

ているものに AQP2 がある。AQP2 の変異による腎性尿崩症には、優性遺伝型と劣性遺伝型が知られる。優性遺伝型の尿崩症の原因となる AQP2 の変異は、主として C 末端側に見られる。この C 末端側に変異があるタンパク質は、正常な AQP2 タンパク質とテトラマーは形成するものの、バゾプレシンの刺激を受けても管腔側膜に発現することができず、水の再吸収を行うことができない。一方劣性遺伝型の尿崩症の原因となる AQP2 の変異は、N 末端側から 22 番目のロイシン~216 番目のセリン残基の間に見られ、変異体同士ではテトラマーを作れず、翻訳後速やかにタンパク質が分解されることが知られている。この AQP2 の例に見るように、AQP 分子種の研究において、その局在、分子の存在様式、結合タンパク質、そしてそれらに関わっているアミノ酸配列を調べることは、AQP の機能発現を理解する上で非常に重要な研究項目である。

最近申請者のグループは、新しい AQP 分子種である AQP11 を世界に先駆けて発見した (Morishita et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2005)。AQP11 の機能を探るためにその遺伝子のノックアウトマウスを作製したところ、腎の近位尿細管において、細胞内の小胞体の拡張を伴う細胞死と嚢胞の形成が認められ、それが原因で、マウスは生後間もなく腎不全で死亡した。この表現型は、他の AQP 分子種を含め、今までに知られているタンパク質分子をノックアウトした動物では認められておらず、AQP11 が未知の機能を有している分子であることを示している。また AQP11 の細胞内での存在様式や発現場所について調べたところ、AQP11 はテトラマーを形成して小胞体膜に局在することを見いだした。しかしながら、細胞内局在やテトラマー形成に必要なアミノ酸配列については明らかにされていない。

最近小胞体ストレスと呼ばれる小胞体を起源とする細胞死が、神経変性疾患、糖尿病、あるいは虚血における細胞死の原因であることが指摘され、小胞体ストレスに関する研究に注目が集まっている。先述したように AQP11 が小胞体に局在すること、AQP11 のノックアウトマウスにおいて小胞体の拡張

を伴う細胞死が認められることなどから、AQP11 と小胞体ストレス発生との関連性は興味深い。その関連性については不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、生化学的手法、分子生物学的手法を用いて以下の(1)～(3)のを行い、AQP11に関連する分子基盤を明確にし、その機能異常がどのような分子メカニズムを通して細胞死を伴う囊胞を形成するのかを解明することを目的とする。(1) AQP11の小胞体膜局在やテトラマー形成に必要なアミノ酸配列の解析、(2) AQP11結合タンパク質の同定とその結合の意義の解明、(3) AQP11と小胞体ストレス、あるいは囊胞形成関連分子とのinteractionについての解析。

3. 研究の方法

(1) AQP11の小胞体膜局在やテトラマー形成に必要なアミノ酸配列の解析

他のAQP分子種において、小胞体膜局在やテトラマー形成に必要なアミノ酸配列が報告されている。本研究ではこれらの報告に基づいて、いくつかのアミノ酸残基に変異を加えたAQP11を作製した。そしてその変異体を培養細胞に発現させ、共焦点顕微鏡による観察や、タンパク質架橋剤や共免疫沈降法による生化学的な手法により、小胞体膜局在やテトラマー形成能について検討した。

(2) AQP11結合タンパク質の同定とその結合の意義の解明

AQP11と同じ近位尿細管細胞に発現しているタンパク質について、いくつか候補を選び、それらをタグと融合させたタンパク質として培養細胞にAQP11とともに発現させて、共免疫沈降法やウエスタンブロット法を用いてAQP11結合タンパク質について探索した。タグには、蛍光タンパク質であるGFPやDsRed、低分子量ペプチドのmycやV5などを用いた。また、結合の意義を調べる実験では、見出された結合タンパク質とAQP11を培養細胞に共発現させ、共焦点顕微鏡による観察、水の透過性を測定する実験、そしてAQP11ノックアウトマウスを用いた観察などを行った。

(3) AQP11と小胞体ストレス、あるいは囊胞形成関連分子とのinteractionについての解析

我々の研究室では、実験的に生体において小胞体ストレスを惹起するモデルとして、実験的急性腎不全モデルが該当することを確立してきた。本研究ではこのモデルを用いて、腎におけるAQP11の発現量を遺伝子およびタンパク質レベルで調べた。

これまでに囊胞形成に関わるタンパク質として、polycystin-1、polycystin-2、polyductinなどが知られている。本研究では、これらの中で、最近小胞体ストレスとの関連性が報告された、polycystin-2についてAQP11とのinteractionについて検討した。

4. 研究成果

(1) AQP11の小胞体膜局在やテトラマー形成に必要なアミノ酸配列の解析

今回作製した変異体においては、小胞体局在が著明に変化するものを見出すことはできなかった。

テトラマー形成に重要なアミノ酸配列について検討を行った結果、免疫沈降実験により、野生型に比べてC101A(101番目のシステイン残基)変異体では多量体形成能が低下することを観察した。C101A変異体の多量体形成能の低下は、化学架橋剤を用いた多量体検出実験においても見られた。次に野生型とC101A変異体との結合を調べたところ、野生型同士に比べて、野生型とC101A変異体との結合能も低下していることが明らかになった。また、N99D変異体においても同様の検討を行ったところ、変異体同士の多量体形成能、および野生型と変異体との結合能の低下が見られた。一方、G102V変異体においては、それら同士、および野生型とG102V変異体との結合能は低下していなかった。

現在までに明らかにされているAQP1の分子構造によると、AQP1は4量体で細胞膜に存在し、各単量体に水分子が透過する穴が1つずつ開いている構造を持っている。そしてその穴は、単量体内にある2つのNPAモチーフがお互いに向かい合うように位置して構成されていることが分かっている。また、この2つのNPAモチーフはAQP分子種間で非常に保存性が高いことから、分子分類において、AQP分子ファミリーの、一つの判断基準となっている。このため2つのNPAモチーフは、AQPのsignature motifと呼ばれている。しかしながらAQP11では、そのN末端側のモチーフは、NPCとなっている。今回、

この部位に変異が起こると AQP11 のテトラマー形成能が低下するという結果が得られた。

AQP11 の結晶構造は明らかにされていない。そのため、AQP11 分子内において NPC が他の AQP 分子種と同様に分子内の中心部に位置して、水分子が透過する穴を形成しているかどうか分からない。しかし、そのように仮定すると、NPC モチーフが直接隣の分子の結合に関わっているとは考え難い。そこで、AQP1 の 3 次元構造を鋳型として、野生型 AQP11 および C101A の分子モデリングを行った。図 1 にはその結果を重ね合わせたものを示す。白で示されているのが野生型 AQP11 の構造で、赤で示されているのが C101A の構造である。ぴったりと重なっているところは白で示されている。図 1 を見ると、C101A 変異体では、C 末端側の構造がゆがめられていることが分かる。

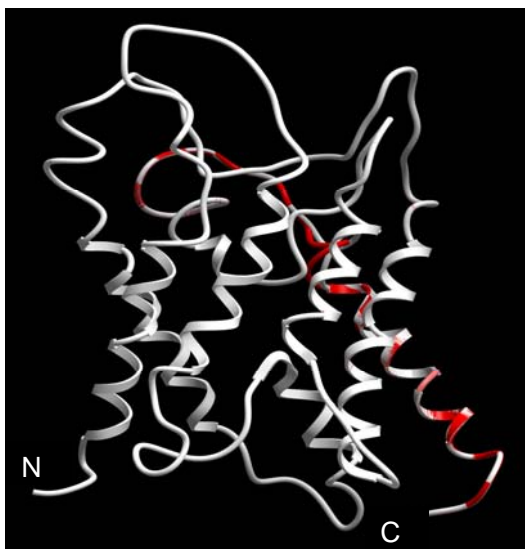


図 1. AQP1 の 3 次元構造を鋳型として行った、野生型 AQP11 および C101A の分子モデリング。

以上の成績から、AQP11 のテトラマー形成には、AQP11 において特徴的な配列である NPC モチーフが重要であること、そして、そのモチーフは、AQP11 の C 末端側の 3 次元構造を保つことに寄与しており、それらのアミノ酸残基が変異すると、AQP11 の C 末端側の 3 次元構造が変化するために、テトラマー形成能が低下する可能性も考えられた。今後、AQP11 の結晶構造が明らかにされれば、より正確な分子メカニズムが明らかにされるだろう。さらに、NPC モチーフは AQP の水透過性のための穴を形成している可能性が高い。今後、テトラマー形成のみならず、

AQP11 の水透過性についても検討していく必要がある。

(2) AQP11 結合タンパク質の同定とその結合の意義の解明

同じ近位尿細管細胞に発現しているタンパク質について、AQP11 との結合性について調べた。その結果 3 種類の結合タンパク質を見出した。今回この中で生体内の水代謝において重要な役割を果たしている AQP1 について、その AQP11 との結合の意義について検討を進めた。細胞にそれぞれ単独で発現させたところ、AQP1-GFP は主として細胞膜および小胞体膜に、DsRed-AQP11 は小胞体膜に局在することが観察された (図 2 参照)。共発現させると、DsRed-AQP11 の局在には変化を認めなかったものの、AQP1-GFP の細胞膜での発現量は著明に減少していた。この減少は、図には示していないものの biotinylation assay においても確認された。

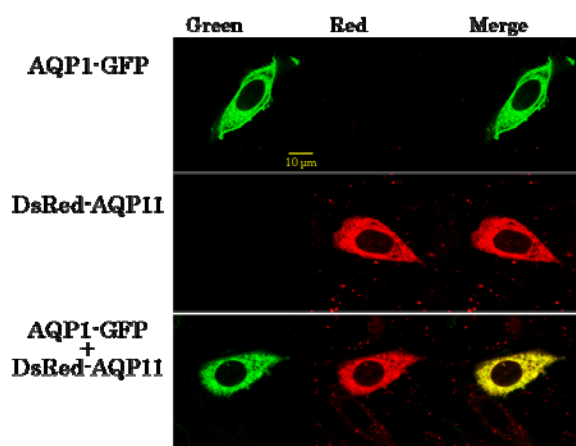


図 2. AQP1-GFP、DsRed-AQP11、あるいはそれらを共発現させたときの細胞内局在。AQP1-GFP は緑色で、DsRed-AQP11 は赤色で示されている。

次に、AQP1 および AQP11 の結合が、細胞膜の AQP1 の水透過性に対して、どのように影響するのかについて検討した。図 3 にその結果を示す。AQP1-GFP を単独に発現させると、細胞外の溶液の浸透圧を半分にする、20 秒以内に細胞の体積がおおよそ 1.3 倍となった。一方、DsRed-AQP11 を発現させた場合には、細胞外の溶液の浸透圧を半分にしても、細胞の体積はほとんど変化しなかった。AQP1-GFP および DsRed-AQP11 共発現させても、細胞の体積変化は見られなかった。以上の図 2 および図 3 の結果から、AQP1 お

よび AQP11 はお互いに結合することにより AQP1 の細胞膜移行が減少するために、AQP1 による細胞膜の水透過性が抑制されることが考えられた。

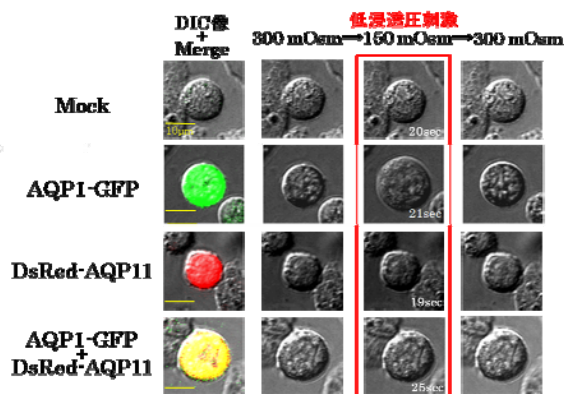


図3 AQP1-GFP、DsRed-AQP11、あるいはそれらを共発現させたときの細胞膜水透過性の検討。

次にその結合による調節が生体内においても見られるかどうかについて、AQP11 ノックアウトマウスを用いて検討した。その結果、AQP11 ノックアウトマウスにおいて、近位尿細管細胞膜における AQP1 の発現量が、野生型マウスに比べて増加していることが観察された (図は示していない)。

以上より、AQP1 と AQP11 との相互作用により AQP1 の細胞膜での発現量が調節されることが明らかとなった。哺乳動物において異なった AQP 分子種間の相互作用を見出した今回の結果は、AQP の細胞生物学において初めての知見である。

(3) AQP11 と小胞体ストレス、あるいは囊胞形成関連分子との interaction についての解析

実験的急性腎不全モデルは、小胞体ストレスの良いモデルとなりうることを、我々の研究室では明らかにしてきた。今回このモデルを用いて AQP11 の発現量について調べた。その結果、急性腎不全が生じると、AQP11 の発現量が減少することを見出した。現在 RNA 干渉法などを用いて、その意義について検討を継続している。

優性遺伝多発性囊胞腎は、polycystin-1 や polycystin-2 と呼ばれるタンパク質に変異が生じると発症することが知られている。また、最近になり polycystin-2 が小胞体ストレスにおける細胞応答を調節する因子である可能性も報告された。そこで polycystin-2 と AQP11 との相互作用について検討した。その結果、それらのタンパク質同士が直接的に

interaction する可能性を見出した。現在詳細については検討中である。

以上の本成果をまとめると、(1) AQP11 の 4 次元構造形成に NPC モチーフが重要で、そのモチーフは AQP11 の C 末端側の 3 次元構造を保つことに寄与していること、(2) 3 種類の AQP11 結合タンパク質を同定し、その中で AQP11 と同じ近位尿細管細胞に発現している AQP1 は、AQP11 によってその細胞膜への局在が調節されていること、(3) 小胞体ストレスが発生するような場合には AQP11 の発現量が減少すること、そして囊胞形成に重要な分子で、小胞体ストレスとの関連性が最近報告された分子と AQP11 が相互作用することなどを示す結果を得た。今後これらの発見に基づいて、AQP11 の機能の生物学的意義の全貌解明、AQP11 ノックアウトマウスにおける囊胞形成のメカニズムなどが明らかにされていくものと考えられる。

5. 主な発表論文等

- Sharyo, S., Kumagai, K., Yokota-Ikeda, N., Ito, K., **Ikeda, M.** Amelioration of renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of IL-6 production in the poloxamer 407-induced mouse model of hyperlipidemia. *J. Pharmacol. Sci.* doi: 10.1254/jphs.08283FP (2009) 査読有り
- Prachasilchai, W., Sonoda, H., Yokota-Ikeda, N., Ito, K., Kudo, T., Imaizumi, K., **Ikeda, M.** A protective effect of a newly developed molecular chaperone inducer against mouse ischemic acute kidney injury. *J. Pharmacol. Sci.* 109, 311-314 (2009) 査読有り
- Prachasilchai, W., Sonoda, H., Yokota-Ikeda, N., Oshikawa, S., Aikawa, C., Uchida, K., Ito, K., Kudo, T., Imaizumi, K., **Ikeda, M.** A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *Eur. J. Pharmacol.* 592, 138-145 (2008) 査読有り
- Sharyo, S., Yokota-Ikeda, N., Mori, M., Kumagai, K., Uchida, K., Ito, K., Burne-Taney, M., Rabb, H., **Ikeda, M.** Pravastatin improves renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the mevalonate pathway. *Kidney Int.* 74, 577-584 (2008) 査読有り
- Morell, C.N., Sun, H., **Ikeda, M.**, Beique, J.C., Swaim, A.M., Mason, E., Martin, T.V., Thompson, L.E., Gozen, O., Ampagoomian, D., Sprengel, R., Rothstein, J., Faraday, N., Haganir, R., Lowenstein, C.J. Glutamate mediates platelet

activation through the AMPA receptor. J. Exp. Med. 205, 575-584 (2008) 査読有り

6. Ito, K., Iwami, A., Katsura, H., **Ikeda, M.** Therapeutic effects of the putative P2X(3)/P2X (2/3) antagonist A-317491 on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 483-490 (2008) 査読有り

7. Kato, T., Nasu, T., Sonoda, H., Ito, K.-M., **Ikeda, M.**, Ito, K. Evaluation of olmesartan medoxomil in the rat monocrotaline model of pulmonary hypertension. J. Cardiovasc. Pharmacol. 51, 18-23 (2008) 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Takamatsu, N., Shimono, M., Taki, A., Sonoda, H., Ito, K., Takata, K., Ishibashi, K., Ikeda, M. Interaction between AQP1 and AQP11 regulates plasma membrane expression of AQP1. American Society of Nephrology. 41st Annual Meeting. 2008/11/7, Philadelphia, PA, USA

2. Sonoda, H., Yokota-Ikeda, N., Oshikawa, S., Ito, K., Ikeda, M. Urinary exosomal aquaporin-1 is a possible early biomarker for ischemic acute kidney injury. American Society of Nephrology. 41st Annual Meeting. 2008/11/8, Philadelphia, PA, USA

3. 伊藤勝昭、岩見暁人、飯田真志、池田正浩. ラット下部尿路閉塞モデルの膀胱過活動に対する P2X3/P2X2/3 受容体拮抗薬 A-317491 の影響. 第 81 回日本薬理学会年会. 2008/3/18、横浜、神奈川県.

4. 高松夏子、下野茉莉子、安藤綾華、伊藤勝昭、石橋賢一、池田正浩. アクアポリン 11 多量体形成における N 末端 NPC モチーフの重要性の検討. 第 1 回トランスポーター研究会九州部会. 2007/11/24、熊本、熊本.

5. 園田紘子、押川さやか、伊藤勝昭、池田正浩. 腎虚血再灌流傷害において尿中アクアポリン 1 排泄は減少する. 第 1 回トランスポーター研究会九州部会. 2007/11/24、熊本、熊本.

6. 伊藤勝昭、岩見暁人、桂 裕美、池田正浩. Cyclophosphamide 誘発性ラット膀胱炎における排尿反射亢進に対する oxybutynin および A-317491 の影響. 第 14 回日本排尿機能学会. 2007/10/6、猪苗代、福島.

7. Prachasilchai Worapat, 押川さやか、相川千恵、伊藤勝昭、池田正浩. Elucidation of the role of ER stress in renal ischemia reperfusion injury. 第 144 回日本獣医学会. 2007/9/3、江別、北海道.

8. 吉田貴子、保田昌宏、伊藤勝昭、池田正浩、那須哲夫. ニワトリ腎門脈弁の自律神経

調節に関わる受容体の解析. 第 144 回日本獣医学会. 2007/9/3、江別、北海道.

9. Sonoda, H., Yokota-Ikeda, N., Oshikawa, S., Ito, K., Ikeda, M. Identification of urinary aquaporin-1 as a novel noninvasive biomarker for ischemic acute renal failure. The 5th International Conference of Aquaporin. 2007/7/14, Nara, Japan.

10. Ito, K., Ohnishi, K., Hasahino, S., Ikeda, M. Disorders of collagen-induced aggregation of platelets from cattle and rats with Chediak-Higashi syndrome. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007/7/8, Geneva, Switzerland.

11. 池田直子、園田紘子、池田正浩. 尿中アクアポリン(AQP)の急性腎不全診断マーカーとしての有用性の検討. 第 50 回日本腎臓学会学術総会. 2007/5/26、浜松、静岡.

〔その他〕

本研究成果の一部が、平成 20 年 11 月 22 日の宮崎日日新聞に掲載された。

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 正浩 (IKEDA Masahiro)

宮崎大学農学部准教授

研究者番号：60281218

(2)研究協力者

伊藤 勝昭 (ITO Katsuaki)

宮崎大学農学部教授

研究者番号：70136795

石橋 賢一 (ISHIBASHI Kenichi)

明治薬科大学薬学部教授

研究者番号：80223022

高田 邦昭 (TAKATA Kuniaki)

群馬大学医学部教授

研究者番号：20129290

社領 聡 (SHARYO Satoru)

宮崎大学農学部

プラチャシルチャイ ワラパット

(PRACHASILCHAI Worapat)

宮崎大学農学部

園田 紘子 (SONODA Hiroko)

宮崎大学農学部

高松 夏子 (TAKAMATSU Natsuko)

宮崎大学農学部