

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590185
 研究課題名（和文） 膜微小ドメインにおける水チャネル・アクアポリン2とカベオリンに関する時空間的解析
 研究課題名（英文） Spatio-temporal analysis for water channel aquaporin-2 and caveolin in raft domain.
 研究代表者
 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

研究成果の概要：細胞内細胞内プールに存在する AQP2 は頂部細胞膜に移動しそこで水チャネルとしての役割を果たし、その後この蛋白は細胞内にエンドサイトーシスされる。この蛋白は膜微小ドメインに関係したカベオラ依存性の経路でエンドサイトーシスされることが判明した。siRNA を用いた発現抑制の結果は caveolin-1 が頂部細胞膜における一時的な稽留と、エンドサイトーシスとその後のリサイクリングに重要な役割を果たしていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物学

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：膜微小ドメイン、水チャネル、アクアポリン、カベオラ、コレステロール

1. 研究開始当初の背景

頂部細胞膜にはスフィンゴ糖脂質、コレステロールが濃縮する膜ドメイン「ラフト」が存在するといわれる。このドメインの唯一の形態的指標である 50-80nm の Ω 状の陥凹構造はカベオラと呼ばれている。本構造の主要な構成タンパク質はカベオリン-1 であるが、フロティリンもその構成要素のひとつである。カベオリン-1 は細胞腫によって発現はさまざまであり、脂肪細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞には多いが、神経細胞、リンパ球には存在しない。フロティリン-1、-2 はこの意味では、どの細胞の「ラフト」

にも普遍的に存在している。このドメインのエンドサイトーシスとの関連性については、周知のものとなっていないが、われわれは、コレステロールプローブやアクアポリン（水チャネル蛋白、特にアクアポリン-2：AQP2）を指標にして、そのエンドサイトーシスの機能への関与の機序を解明しつつある (Aoki et al 2007)。

アクアポリンは浸透圧勾配に従う受動的な水の移動を可能にしているチャネル（13 種類）で、特に腎臓には 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11 の 7 種類のアクアポリンの発現が確認されている。我々の教室では以前より AQP2 の膜ト

ラフィッキングを研究対象にしている。ヒト AQP2 を導入した MDCK 細胞 (イヌ腎臓上皮由来) ではフォルスコリンの刺激 (MDCK 細胞では腎尿細管上皮に存在するバソプレシン受容体が存在しないので、cAMP を増加させるためにこの薬品を用いる) により、AQP2 は細胞内プールから頂部細胞膜に移動するが、刺激がなくなると、頂部細胞膜のチャネルは何らかの機構でエンドサイトーシスされ、初期エンドソーム、後期エンドソームへと輸送される。カベオラには、細胞内カルシウム調節蛋白をはじめ数多くのシグナル伝達分子が存在すること、SV40 ウイルスやヒトコロナウイルスがカベオラから進入することから、その機能が注目されていた (特に内皮細胞、Aoki et al 1999)。また、この構造に結合する毒素 (コレラ毒 B サブユニット) は、カベオラのマーカーとして良く用いられているが、MDCK 細胞頂部からはこのマーカーは取り込まれない。カベオリンにはアイソフォームが 3 つあり、それぞれカベオリン-1、カベオリン-2、カベオリン-3 と呼ばれている。このうち普遍性が高いのがカベオリン-1 であり、カベオリン-3 は筋細胞にのみ発現している。カベオリン-2 は通常 TGN に存在していることから、その機能については論議を呼んでいるが、ヒト AQP2 を発現している MDCK 細胞に、カベオリン-2-GFP を MDCK 細胞に発現させると、カベオリン-1-GFP と同様に頂部と基底側部細胞膜の両方に存在している。しかし、フロティリン-2-GFP を同様の細胞に発現させると、頂部細胞膜にのみ発現していた。フロティリンには小胞を形成し、内在化に関する独自の経路が存在するという説もあるが、これらのプローブの相互関係については定説が無い

2. 研究の目的

近年これらの問題を打開するために新しいプローブが開発されてきた。過去にも蛍光フィリピンが使用されてきたが、最近、コレステロールに結合する BC θ や蛍光ポリエチレングリコール-コレステロール (蛍光-PEG-cholesterol) が開発され、データが蓄積しつつあるが、そのデータは線維芽細胞など極性を持たない細胞のものが多い。われわれの予備実験では、極性を持つ細胞頂部に存在するカベオラドメインに、これらのプローブが集中するリアルタイムイメージング像が観察されている。このことと、基底側部細胞膜に存在する本来のカベオラにこのようなプローブがどのような関係を持つのか確認しデータを整理し、そこに存在する AQP2、AQP3、AQP4 やフロティリンとの関連性を整理する必要がある。

3. 研究の方法

われわれの予備実験では、頂部細胞膜上の AQP2 の存在部位とカベオリンのドメインに密接な関連性があることがわかってきた。この結果から AQP2 は膜脂質マイクロドメインと関連性があることが示唆される。この系は、AQP2 とカベオリンで代表される膜脂質ドメインの両方の挙動を解明できる良いモデルになると考え、以下 3 点に整理して研究を進める。

(1) AQP2 がエンドサイトーシスされる時、クラスリンとカベオリンのどちらを選択しているのだろうか? あるいは未発見の第 3 の系が存在するのだろうか? AQP2 とカベオリンは、初期エンドソームに運ばれた時、AQP2 とカベオリンが共存するのか?

カベオリンのドミナントネガティブの変異体 2 種類を導入して、AQP2 のエンドサイトーシスがどのように変化したかを観察した。クラスリンのドミナントネガティブの変異体 2 種類を導入して、AQP2 のエンドサイトーシスがどのように変化したかを観察した。

(2) 膜微小ドメインが、AQP2 のエンドサイトーシスに関係するとすれば、その役割は何か? このドメインにコレステロールの取り込みは関係するのか?

siRNA によるカベオリン-1 とクラスリンおよび AP2・2 の発現を抑制し、頂部細胞膜からのエンドサイトーシスにどのような変化が起きるのかを観察した。

(3) リアルタイム蛍光イメージングで取得できたデータを Matlab など、分析を簡単に行えるように解析ソフトを構築した。

コレステロールの取り込みの観察には蛍光色素標識 PEG-コレステロールを用いて、リアルタイム蛍光イメージングと共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。リアルタイム画像の取得はキーエンスの HS オールインワン蛍光顕微鏡 BIOREVO-BZ-9000 を用いて行った。細胞は MDCK 細胞を用いた。(細胞バンク: HSRRB より) 観察温度 37 度に保ったチャンバーの中にガラスボトムディッシュに培養した細胞を入れ、炭酸ガス 5% の雰囲気ですきた状態の細胞を観察した。倒立型蛍光顕微鏡なので、下からレンズでのぞいて一番奥の細胞の上面を観察している。レンズは [×40] と [×100] の油浸レンズを用いた。

4. 研究成果

(1) - 1 リサイクリングに関する実験の結果、クラスリン依存性エンドサイトーシス経路はほとんど関与していないことが判明した。クラスリン関連エンドサイトーシスに必須の幾つかの分子をドミナントネガティブ分子の過剰発現させた細胞では、この経路の関与はほとんど認められなかった。クラスリンおよび AP2・2 の RNA による発現抑制でも同様な結果であった。

(1) - 2 カベオリン-1 のドミナントネガティブ分子を導入した結果、AQP2 のエンドサイトーシスが明瞭に阻害されることでその関与が一層明らかとなった。

(1) - 3 MDCK 細胞頂部の構造は明らかにカベオリン-1 の関与するカベオラ構造であり、caveolin-2 も関係のある構造であること、さらに脂質ラフトに関連する 2 種類の分子とエンドサイトーシスの輸送路の一部を共有している可能性を示唆する結果が得られた。

(2) - 1 エンドサイトーシスの経路は、膜微小ドメインに関係したカベオラ依存性の経路でのエンドサイトーシスについて様々な証拠が得られた。ポリエチレングリコールと蛍光色素で標識したコレステロールは頂部細胞膜カベオラより取り込まれるが、このドメインはクラスリンの局在とは関係しなかった。

(2) - 2 siRNA を用いた発現抑制を行ったところ、caveolin-1 を抑制した細胞では、forskolin 刺激後頂部細胞膜に移動した AQP2 は直ちに初期エンドソームに移動したが、その後まだ知られていない EEA1 陰性、Rab11 陰性、カテプシン D 陰性の小胞内にとどまっていた。この結果は、caveolin-1 が頂部細胞膜における一時的な稽留と、エンドサイトーシスとその後のリサイクリングに重要な役割を果たしていることを示している。頂部細胞膜からのエンドサイトーシスにかかわるアダプター蛋白 AP2・2 の RNAi の結果からは、このときクラスリン関連経路は積極的には関与していないことも分かった。

(3) リアルタイム蛍光画像取り込み装置を用いて観察し、その結果を MathWorks 社の数値計算、データ解析、可視化を行う対話型ソフトである MATLAB で解析ソフトを作製し、これを用いて解析した。そのデータを用いても、カベオラの局在とコレステロールの相関性は大変高い

ものであった。

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 13 件)

① Hagiwara H, Aoki T, Takata K. (他 2 名) The primary cilia of secretory cells in the human oviduct mucosa. *Med. Mol. Morph.* 41, 193-198, 2009. 査読有

② Hagiwara H, Aoki T, Takata K. (他 2 名) Immunohistochemical and electron microscopic observations of stromal cells in the human oviduct mucosa. *Med. Mol. Morph.* 41, 221-226, 2009. 査読有

③ Shiba D, Yamaoka Y, Hagiwara H, (他 3 名 3 番目) Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region. *J. Cell Sci.*, 122(Pt 1):44-54, 2009. 査読有

④ Omran H, Hagiwara H, (他 21 名 6 番目) Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 456, 611-616, 2008. 査読有

⑤ Takata K, Matsuzaki T, (他 3 名) Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem. Cell Biol.* 130(2): 197-209, 2008. 査読有

⑥ Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H, Takata K, (他 3 名 2 番目) 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

⑦ Kogure K, Takata K, (他 4 名 5 番目) The caudate processus hepatic vein: a boundary hepatic vein between the caudate lobe and the right liver. *Ann. Surg.* 247(2), 288-93, 2008. 査読有

⑧ Tanaka Y, Aoki T, Takata K, (他 2 名 7 番目) Experimental Model of Lacunar Infarction in the Gyrencephalic Brain of the Miniature Pig: Neurological Assessment and Histological, Immunohistochemical, and Physiological Evaluation of Dynamic Corticospinal Tract

Deformation. Stroke 39(1), 205-213, 2008.
査読有

⑨ Suzuki T, Hagiwara H, Aoki T, Takata K. (他1名2番目) Recent Advance on Fluorescent Labeling Technique For Fluorescence Microscopy Acta Histochem. Cytochem. 40(5), 131-137, 2007. 査読有

⑩ 高田邦昭 水制御機構—タイトジャンクションとアクアポリン水チャネル日本耳鼻科学会 Otol. Jpn. 17(3), 173-177, 2007. 査読有

⑪ Liu Y, Takata K, (他9名10番目) Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. Hum. Pathol. 38, 171-178, 2007. 査読有

⑫ Kogure K, Takata K, (他7名7番目) Close relation between the inferior vena cava ligament and the caudate lobe in the human liver. J Hepatobiliary Pancreat Surg 14(3):297-301, 2007. 査読有

⑬ Aoki T, Hagiwara H, Takata K, (他2名) Internalization of caveolae and their relationship with endosomes in cultured human and mouse endothelial cells. Anat. Sci. Int. 82 (2), 82-97, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計16件)

① 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を用いた内在化システムの存在の可能性について 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009.03.28~30 岡山市

② 鈴木健史、高田邦昭、アブラハム・クッパー 免疫シナプスにおけるPKCターゲティングの分子機構 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009.03.28~30 岡山市

③ 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、鈴木秀樹、新木健一郎、桑野博行、依藤宏、高田邦昭、幕内雅敏 Appendix fibrosa hepatisが胎児肝左葉先端の萎縮により形成されたことを想起させる典型的な症例 第70回日本臨床外科学会総会 2008.11.27~29 東京都

④ Takata K Localization and Trafficking of Aquaporin-2 in the kidney. 51th Symposium of the Society for Histochemistry, 2008.10.7~10, Fulpmes, Austria

⑤ 高松夏子、下野茉莉子、瀧麻香、園田絃子、伊藤勝昭、高田邦昭、石橋賢一、池田正浩 AQP1とAQP11との相互作用はAQP1の細胞膜発現を調節する 第146回日本獣医学会学術集会 2008.9.24~26 宮崎市

⑥ 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、鈴木秀樹、志村龍男、桑野博行、依藤宏、高田邦昭、幕内雅敏 肝鎌状間膜内に遺残した肝組織が認められた極めて希な解剖肝の一例 第63回日本消化器外科学会学術集会・総会 2008.7.16~18 大阪市

⑦ 鈴木健史、高田邦昭、Kupfer Abraham 免疫シナプス構築過程におけるPKCのcSMACターゲティング機構 集60回日本細胞生物学会大会 2008.6.29~7.1 横浜市

⑧ 萩原敬一、篠崎哲也、高岸憲二、高田邦昭 ヒト正常関節軟骨およびOA軟骨におけるアクアポリン水チャネルの発現と局在 第81回日本整形外科学会学術集会 2008.05.22~25 札幌市

⑨ 鈴木健史、高田邦昭、クッパー・アブラハム 免疫シナプスにおけるPKC分子動態制御機構 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 2008.03.27~29 由布市

⑩ 萩原治夫、高田邦昭 線毛と形態形成線毛の構造と形成機構、特に基底小体付属構造についての解析 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 2008.03.27~29 由布市

⑪ 小林大介、塚原達也、萩原治夫、原央子、水野秀昭、河野弘幸、八木俊樹、宮脇敦史、渡邊嘉典、神谷律、武田弘幸 繊毛運動障害を示すメダカ突然変異体kintoun(ktu)の解析 日本解剖学会第83回近畿支部学術集会 2007.11.17 京都府南丹市

⑫ バイオイメージングで生体機能を観る、測る 免疫シナプス超分子クラスターの分子機能動態 鈴木健史、高田邦昭、Kupfer Abraham 第48回日本組織細胞化学会総会 2007年9月28日(金)-9月29日(土) 甲府市

⑬ 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、鈴木秀樹、志村龍男、末廣剛敏、桑野博行、依藤宏、高田邦昭、幕内雅敏 下大静脈靱帯の組織学的検討 第62回日本消化器外科学会総会学術集会 2007.7.18~20 東京

⑭ Aoki T, Hagiwara H, Takata K. その他 Aquaporin-2 (AQP2) is Endocytosed via

Caveolin-dependent, Clathrin-independent
Pathway in MDCK Cells The 5th
International Conference of Aquaporin
2007. 7. 13~16 奈良市

⑮ Takata K, Aoki T, Hagiwara H, その他
Intracellular compartment of Aquaporin-2
(AQP2) and Glucose Transporter-4 (GLUT4)
in MDCK cells The 5th International
Conference of Aquaporin 2007. 7. 13~16
奈良市

⑯ 小林大介, 塚原達也, 八木俊樹, 萩原治
夫, 関水庚申, 三宅頭三, 津田佐知子, 成
瀬清, 神谷律, 武田洋幸 メダカ変異体
(knt)は原発性線毛機能不全症候群(PCD)の
新規モデル動物である 第40回日本発
生生物学会・第59回日本細胞生物学
会合同大会 2007. 5. 28~30 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

松浦 勉 (MATSUURA TSUTOMU)
群馬大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80181692

(3) 連携研究者

()

研究者番号：