

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770054  
 研究課題名 (和文) 水チャネルアクアポリン2の細胞内輸送調節～比較生物学からのアプローチ～  
 研究課題名 (英文) Control of intracellular trafficking of water channel aquaporin-2

研究代表者  
 長谷川 敬展 (HASEGAWA TAKAHIRO)  
 徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教  
 研究者番号：50447273

## 研究成果の概要：

水チャネルアクアポリン2 (aquaporin-2; AQP2) は腎臓集合管の水再吸収を担う重要なタンパク質であり、バソプレシンにより細胞内の貯蔵小胞と細胞膜間で輸送が調節される。AQP2の細胞内輸送機構を解明するために、AQP2のC末端領域に結合するタンパク質をGST融合AQP2によるプルダウンアッセイで探索した。AQP2は約40kDおよび約70kDのタンパク質と結合すること、さらに約40kDのタンパク質の結合はAQP2のリン酸化に依存していることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,600,000 | 0       | 1,600,000 |
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,800,000 | 360,000 | 3,160,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学

キーワード：アクアポリン2、腎臓集合管、小胞輸送、プルダウンアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

水チャネルアクアポリン2 (aquaporin-2; AQP2) は、腎臓集合管の水再吸収を担う重要なタンパク質であり、バソプレシンシグナルにより細胞内の貯蔵小胞と細胞膜間で輸送が調節される。AQP2は通常時、細胞内に

プールされているが、シグナルにตอบสนองして速やかにアピカル細胞膜へと輸送されることで、細胞膜の水透過性が促進される。このシグナル伝達の過程では、まずバソプレシンシグナルによりcAMP依存性プロテインキナーゼ (protein kinase A; PKA) が活性化し、AQP2

のC末端領域にある256番目セリン(S256)がリン酸化される。このリン酸化はAQP2が細胞内から細胞膜へ輸送される過程で、重要なステップとみなされており、AQP2のC末端領域、特にリン酸化シグナルはAQP2小胞輸送に重要である(Fushimi et al., J Biol Chem, 1997)。しかしながら、このリン酸化シグナルがどのように関わるか、すなわちリン酸化によるAQP2と他分子との相互作用や、脱リン酸化シグナルのタイミングといった問題については明確ではなかった。

一方で、AQP2小胞輸送に関わる分子群が同定されてきた。小胞のレールとなるアクチンの重合を調節する因子Rhoや、小胞のドッキング・融合装置となるVAMPやSyntaxinなどのSNAREタンパク質が複数報告されている。東京医科歯科大の佐々木らのグループは、AQP2に直接結合するタンパク質群の解析を進め、アクチンが結合することや、AQP2のC末端領域にあるPDZドメインにSPA-1と呼ばれるアクチン重合の調節に関わる因子が結合することを報告している(Noda et al., FEBS Lett, 2004; Biochem Biophys Res Commun, 2004)。

## 2. 研究の目的

抗利尿ホルモン(ADH)調節性であるAQP2の細胞内輸送にはAQP2自身のリン酸化が深く関与している。AQP2の緻密な細胞内輸送制御には、このリン酸化部位を含むAQP2のC末端領域に結合する因子の存在が想定される。そこで、本研究はこのAQP2のC末端領域に結合するタンパク質を同定することを第一の目的とした。また、同定されたタンパク質のAQP2リン酸化との関わりを明らかにすることでAQP2細胞内小胞輸送メカニズムを探ることとした。

## 3. 研究の方法

想定されるAQP2結合タンパク質を同定するために、まずグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)タグを付与したラットAQP2C末端領域タンパク質を作製した。pGEX-6pベクターにAQP2-C末端領域をコードするcDNAを連結し、大腸菌内へ導入した。IPTGによる誘導発現の後、大腸菌を破碎、グルタチオン担体で精製溶出した。このときAQP2のC末端領域は長鎖(45アミノ酸残基)と短鎖(22アミノ酸残基)のものを作製した。また、結合タンパク質のAQP2リン酸化による影響を調べるために、セリンをグルタミン酸(擬似リン酸化セリン)あるいはアラニン(未リン酸化セリン)に置換したGST融合AQP2C末端長鎖も作製した。

SDラット腎臓髄質部あるいはイヌ腎由来Madin-Darby Canine Kidney(MDCK)細胞を1%TritonX-100および脱リン酸化阻害剤を含む緩衝液で破碎し、低速で遠心したものを試料液とした。試料液をグルタチオンセファロースビーズと反応させ、非特異的結合物を取り除いた後、グルタチオンセファロース-GST融合AQP2C末端タンパク質の複合体と反応させた。この反応ビーズを洗浄し、SDSサンプルバッファーあるいはPreScission Proteaseにより目的タンパク質を溶出した。SDS-PAGEで溶出物を分離しクマシーブリリアントブルー染色あるいは銀染色を施し可視化した。

また、MDCK細胞を無処理およびフォルスコリン処理で細胞内cAMP濃度を上昇させた(AQP2リン酸化の細胞内条件)試料を作製し、上述の操作を行い、結合タンパク質の比較を行った。

## 4. 研究成果

AQP2のC末端長鎖(45アミノ酸)および

短鎖 (22 アミノ酸) の GST 融合タンパク質を用いて、ラット腎および MDCK 細胞のホモジェネートからプルダウンアッセイ後 SDS-PAGE および銀染色を行うと、両サンプルにおいて約 70kD と約 40kD のバンドが確認された。

また、平常時の MDCK 細胞においてセリン擬似リン酸化 AQP2C 末端 (GST-CS256E) およびセリン非リン酸化 AQP2C 末端 (GST-CS256A) の GST 融合タンパク質を用いると、約 40kD のバンドは GST-CS256E よりも GST-CS256A で強く検出された。さらにフォルスコリン処理で細胞内 cAMP 濃度を上昇させた MDCK 細胞では、この約 40kD のバンドの染色性は減弱した。これらのことは、約 40 kD のタンパク質が非リン酸化 AQP2 の C 末端への結合し、cAMP シグナル依存的すなわち AQP2 リン酸化依存的に AQP2 の C 末端から解離することを示している。この約 40kD タンパク質と AQP2 の相互作用が細胞膜への AQP2 小胞輸送に関与していることが推察された。

当研究では実際にタンパク質の同定は成し得なかったが、約 70kD および約 40kD のバンドは、それぞれ近年 AQP2 の結合タンパク質として同定された HSP70 (Lu et al., J Biol Chem 282, 2007) およびアクチン (Noda et al., BBRC 322, 2004) と非常に似通ったものであった。特に当研究で得られた約 40kD のタンパク質と AQP2 との結合が AQP2 リン酸化により減弱するという知見は、AQP2 がリン酸化するとアクチンが解離しトロポミオシンと結合するという野田らの報告 (J Cell Biol. 182, 2008) を裏付ける証拠であるかもしれない。

そのため今後は、これら両タンパク質の同定の成功が第一に必要な。同定後のこれら両タンパク質について、MDCK 細胞などの

in vitro モデル系のみならず in vivo 系において、時間・空間的に動態を見ていくことで、AQP2 リン酸化と結合タンパク質との相互作用による小胞輸送制御の詳細が明らかにできると思われる。

#### 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 4 件)

- ① Karabasil MR, Hasegawa T, Azlina A, Purwanti N, Purevjav J, Yao C, Akamatsu T, Hosoi K. (2009). Trafficking of GFP-AQP5 chimeric proteins conferred with unphosphorylated amino acids at their PKA-target motif ((152)SRRTS) in MDCK-II cells. J Med Invest 56, 55-63, 査読有
- ② Akamatsu T, Azlina A, Purwanti N, Karabasil MR, Hasegawa T, Yao C, Hosoi K: Inhibition and transcriptional silencing of a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4/SPC4, reduces the branching morphogenesis of and AQP5 expression in rat embryonic submandibular gland.. Dev Biol 325:434-443,2009,査読有
- ③ Li X, Azlina A, Karabasil MR, Purwanti N, Hasegawa T, Yao C, Akamatsu T, Hosoi K: Degradation of submandibular gland AQP5 by parasympathetic denervation of chorda tympani and its recovery by cevimeline, an M3 muscarinic receptor agonist.. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295:G112-G123,2008,査読有
- ④ Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Hasegawa T: Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney.. Histochem Cell Biol 130:197-209,2008,査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 敬展 (HASEGAWA TAKAHIRO)

徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教

研究者番号 : 50447273