

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390061

研究課題名(和文) アクアポリン 4 の蛋白複合体とアレイ構造による機能制御に関する研究

研究課題名(英文) Regulation of aquaporin-4 by formation of protein complex and orthogonal array

研究代表者

安井 正人 (YASUI MASATO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90246637

研究成果の概要(和文):

アクアポリン 4 (AQP4) によるアレイ構造形成の生体内における意義を明らかにする目的で、AQP4 M1 アイソフォーム特異的ノックアウトマウス(アレイ構造が通常より大きくなるマウス) 及び AQP4 完全ノックアウトマウスを作製した。網羅的表現型解析の結果、アレイ構造の大きさが適切でないと、網膜の光に対する応答に異常が生じることが明らかになった。また、AQP4 完全ノックアウトマウスを用いて、脳穿刺損傷モデルを作製したところ、AQP4 は脳内の免疫機能に重要な役割を果たしていることが明らかになった。これら 2 種類の AQP4 ノックアウトマウスは理研 BRC に寄託され、今後他の研究者が自由に使用することができる。

研究成果の概要(英文):

To investigate physiological roles of square array formation of aquaporin-4 (AQP4) *in vivo*, we established two kinds of AQP4 knockout mice: M1 isoform-specific KO, which is expected to possess much larger arrays than wild type, and null mice. As a result of comprehensive phenotype analysis, we found that appropriate size of the square arrays is essential for the retinal response to light stimulation. In addition, we demonstrated that AQP4 plays an important role for immunological function in the central nervous system by making stub-wounded model using AQP4-null mice. Both types of knockout mice have been deposited at RIKEN BRC so as to be used freely by other researchers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：アクアポリン・蛋白複合体・構造機能相関・水分子・脳浮腫

1. 研究開始当初の背景

AQP1の発見以来、体内水分調節、分泌・吸収の多くが、分子レベルで理解できるようになってきた。現在までに哺乳類では13種類のAQPの存在が確認されている(AQP0-AQP12)。AQPは、ほぼ全身にわたって分布しているが、各々ユニークな組織分布を示しており、それぞれに特有の生理的意義が示唆されている。哺乳類の脳では、主にAQP4が発現している。AQP4は、神経細胞にはその発現を認めず、グリア細胞、特にアストロサイトに発現している。アストロサイトは、神経細胞が形成するシナプスを取り囲んでいる以外に毛細血管の周囲を取り囲んでいることが知られている。AQP4は、この毛細血管周囲のアストロサイトの足突起に特に限局して発現している。その他、脳室周囲の上皮細胞や脳表面の軟膜直下のアストロサイトの突起にもその発現を認める。これらの発現パターンからAQP4は、脳脊髄液の循環、とくにその吸収に関与していると考えられている。AQP4独自の特徴として、(1)ジストロフィン複合体の一部として、nNOS等と共存している、(2)4量体が更に重合し、碁盤の目のようなアレイ構造を形成する、などが挙げられる。蛋白複合体に関しては、C末のPDZ認識サイトが重要な働きをしている可能性が高い。一方、アレイ構造の生物学的意義に関してはまだ謎が多い。アレイ形成には、M1、M23という2つのアイソフォームの発現パターンが重要ということが、藤吉らの構造解析で明らかになってきた。臨床的にもAQP4に対する認識は高まってきている。AQP4は多くの脳疾患に伴って現れる脳浮腫の病態生理に深く関与しているのみならず、カリウムのクリアランスや痙攣の病態生理にも関与している可能性が考えられている。大変興味深

いことに、躁うつ病などの感情障害とAQP4の関連を示唆する報告も出てきている。更に、自己免疫疾患として特徴づけられる多発性硬化症亜系患者(NMO)の自己抗体に対する抗原としてAQP4が同定されたことは注目に値する。AQP4の高次機能を理解するためには、どうしても*in vivo*による解析が必須となる。我々は、AQP4の特徴であるアレイ構造に着目し、単にAQP4完全ノックアウトマウスを作成・解析するのみならず、アレイ構造に影響を与える可能性が高いAQP4M1アイソフォーム特異的ノックアウトも作成することで、AQP4の生理的役割をより深く理解できると考えた。

2. 研究の目的

AQP4のアレイ構造と蛋白複合体に着目して、AQP4の高次脳機能を理解するため、以下の3つの項目を期間内に明らかにしていく予定である。

(1) AQP4 完全ノックアウトマウスに加え、AQP4M1 アイソフォーム特異的ノックアウトマウスを作成する。

これまでの*in vitro*の解析から、M1ノックアウトはより大きなアレイを形成することが予測される。その場合、AQP4タンパク複合体の変化やアストロサイトにおける局在に影響を及ぼすか検討する。また、このマウスは、AQP4のプロモーター下でGFPあるいはガラクトシダーゼを発現するようなくみになっているので、特に胎児期の脳の発生過程や再生過程におけるAQP4の発現パターンを詳細に解析していく。最初は脳浮腫をおこすモデルから解析していく。

(2) 脳浮腫をおこすモデルを作成し、上記マウスの表現系の解析も行う

AQP4M1 特異的ノックアウトと完全ノック

アウトを比較検討することで、様々な病態における AQP4 の制御機構とその役割を明らかにしていきたいと考えている。

(3) Blue Native PAGE 等を用いて、アレイ構造と蛋白複合体の関係を生化学的に解析する

我々は、すでに Blue Native PAGE を用いることで、AQP4 が 4 量体以上の高次構造が解析できることを見出している。上記マウスに様々なストレスを与え、AQP4 を発現している各臓器別に解析していくことで、AQP4 のアレイ構造と複合体の組織特異性や病態時における変化等を調べていく。また、二次元電気泳動を組み合わせることで複合体に含まれる未知のタンパク質の分離・同定も試みる。

3. 研究の方法

(1) AQP4 M1 アイソフォーム特異的ノックアウト

AQP4 遺伝子は、M1 が exon 0 から、M23 が exon 1 から別々のプロモーターによって転写され、また、exon 0 はスプライシングにより exon 1 と連結するため、M23 の発現量を変化させることなく M1 のみをノックアウトするには AQP4 遺伝子の構造を可能な限り維持しつつ遺伝子改変を行う必要がある。まず、exon 0 上にある M1 アイソフォームの開始コドンに変異を導入することでここから翻訳が起こらないようにした。M1 アイソフォームの 23 番目のメチオニンは、M23 アイソフォームの開始コドンであり、周辺の構造が Kozak のコンセンサス配列に良くマッチしているため、M1 アイソフォームの mRNA から M23 アイソフォームが産生される可能性がある。実際に我々は M1 アイソフォームの cDNA から M23 アイソフォーム

も産生されることを、培養細胞を用いた一過性発現系で確認している。従って、M1 アイソフォームの mRNA が開始コドンの変異以外は極力野生型と同様になるように塩基の欠損は行わず、exon 0 内の開始コドンの 5' 側にカセットを挿入し、カセットのほぼすべてが後に Cre リコンビナーゼを発現させることで除去できるように 2 つの loxP 配列ではさんだ。また、このカセットの薬剤耐性マーカー (PGK-neo) の 5' 側には ガラクトシダーゼ cDNA (LacZ) が挿入されている。薬剤耐性マーカーは 2 つの FRT 配列で挟まれているため、Flp リコンビナーゼを発現させることで除去でき、この結果内在性プロモーターの制御下に ガラクトシダーゼを発現させることができるため、M1 アイソフォームの発現する組織を標識することが可能である。ES 細胞は TT2 細胞を用い、PCR によるスクリーニングの後サザンブロット解析により相同組換えが確認できたクローンを ICR マウスの胚にインジェクションする。我々は既に相同組換えクローンを複数有しており、直ちにキメラマウス作製に入れる状況である。キメラマウスが誕生したら C57BL/6 の雌と交配し F1 マウスを得る。サザンブロット解析により F1 マウスにヘテロ個体が存在することを確認した上で、Cre リコンビナーゼ、Flp リコンビナーゼを全身で発現するトランスジェニックマウスとそれぞれ交配し、M1 アイソフォーム特異的ノックアウトアレルを有するマウス、ガラクトシダーゼを AQP4 M1 プロモーター制御下に発現するアレルを有するマウスを作製し、数代のもどし交配の後、については最終的にホモ個体とし、解析に供する。

(2) AQP4 完全ノックアウト

AQP4の全てのアイソフォームはexon 1を含んでおり、またM23アイソフォームの開始コドンがexon 1にあることから、M23の開始コドンを含む約250塩基をexon 1から欠失させ、そこにカセットを挿入した。カセットには上述のように2つのFRT配列により挟まれた薬剤耐性マーカーの5'側にEGFPを挿入することでAQP4発現細胞を生かしたまま同定可能となるようにした。これは従来のAQP4ノックアウトマウスには無かった新たな点である。完全ノックアウトはこのアレルのホモ個体を作製することで達成できるが、もし蛍光タンパク質の発現が不要な場合はこれも除去できるようにEGFPのcDNAを2つのloxP配列で挟んだ。しかし、Creリコンビナーゼ発現によるEGFP cDNA除去後もポリA配列は残るように設計してあるため、いかなる転写産物もexon 1で終結する。既に相同組換えクローンを複数得ており、キメラマウスの作製及び繁殖はM1特異的ノックアウトマウスに準じて行う。

4. 研究成果

(1) AQP4 M1 アイソフォーム特異的ノックアウトマウスの作製

理化学研究所発生・再生科学総合研究センターとの共同研究によりキメラマウスを作製し、3系統を得た。得られたキメラマウスはC57BL/6Jと交配し、3系統中2系統においてF1マウスを得た。戻し交配を継続するとともに、F1どうしの交配によりホモ個体を作製し、AQP4の発現をノーザンブロット及びウェスタンブロットにより解析を行った。その結果、リポーター遺伝子及び薬剤耐性遺伝子が存在する状況ではRNAレベル、タンパク質レベルいずれにおいてもnullであった。Creリコンビナーゼトランスジェニックマウスと交配することで挿入したカセットを除去したところ、ホモ個体においてAQP4

M23 アイソフォームの発現が見られるようになったが、mRNAレベル、タンパク質レベルいずれにおいてもその発現量が野生型マウスと比較して減少していた。しかしながら、小脳アストロサイトの足突起の凍結切断電顕像を観察すると、数は少ないものの、野生型より遥かに巨大なアレイ構造が形成されていた。このようにして作製されたAQP4 M1 アイソフォーム特異的ノックアウトマウスは肉眼的には野生型マウスとの差異は認められなかったが、理化学研究所バイオリソースセンターのマウスクリニックにおいて網羅的表現型解析を行い、網膜の光に対する応答に異常があることが明らかとなった。現在詳細な解析を進めているところである。本結果は論文発表後にマウスクリニックのホームページ上で広く公開される予定となっている。

なお、本マウスは理化学研究所バイオリソースセンターに寄託する手続きが既に終了しており、論文発表後、他の研究者が自由に学術研究に使用することができる。

(2) AQP4 完全ノックアウトマウスの作製

M1 特異的ノックアウトマウスと同様に理化学研究所発生・再生科学総合研究センターと共同でキメラマウスを作製し、2系統を得た。得られたキメラマウスはC57BL/6Jと交配し2系統ともF1マウスを得た。FLPeリコンビナーゼトランスジェニックマウスと交配することにより薬剤耐性遺伝子を除去した後、戻し交配を継続するとともに、ホモ個体を作製し、ウェスタンブロットングにより、AQP4タンパク質がノックアウトされていることを確認した。このマウスについても、理化学研究所バイオリソースセンターのマウスクリニックにおいて網羅的表現型解析を行い、従来他のグループによって報告された

AQP4 null マウスと同様の表現型を有していることが確認された。

また、東京大学先端科学技術研究センター分子生物医学の浜窪隆雄教授のグループと共同で、このマウスにバキュロウィルスディスプレイ法を組み合わせ、AQP4 の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体の開発を行い、交差反応性の異なる複数の高親和性抗 AQP4 細胞外ドメイン抗体を得た（文献 1）。これらの抗体は AQP4 の水チャンネルとしての機能は阻害しなかったが、NMO 発症機構解明・新規治療法の開発のための有用なツールとして期待される。

本マウスも理化学研究所バイオリソースセンターに寄託する手続きが既に終了しており、既に論文も発表済みであるため、近日中には他の研究者が自由に学術研究に使用することができる。

(3) 脳穿刺損傷モデル

マウスの大脳皮質へ吻側尾側軸で針による穿刺損傷を施し、損傷後 1, 3, 7, 日後に損傷部位周囲より mRNA を抽出してマイクロアレイ解析を、また灌流固定後の組織切片の免疫染色による解析を行った。対照群として、穿刺損傷を行わない脳で損傷部位と同じ領域の組織を用いて解析を行った。WT マウスでは損傷部位周囲における増殖細胞が非常に多数認められたが、AQP4/KO マウスではその四分の一程度に減少していた。その中でも増殖性ミクログリアの数は WT マウスの五分の一程度であった。さらに AQP4 の発現は、活性化アストロサイトのみならず一部の活性化ミクログリアでも認められた。

脳損傷部位周囲の組織で発現する遺伝子のプロファイルを作成するために、WT および AQP4/KO マウスの穿刺損傷部位およ

びその周囲の組織から mRNA を調整し、マイクロアレイによる比較解析を行った。その結果 WT マウスでは、主に炎症や免疫反応に関わる因子が多数活性化されていた。特に、炎症性サイトカインの誘導因子の一つオステオポンチン (OPN) が、非常に強いレベルで活性化ミクログリアおよび活性化アストロサイトに発現が認められた。その一方で、AQP4/KO マウスでは OPN を含む炎症や免疫反応に関わる因子の発現は認められたものの低レベルであった。さらに OPN の受容体であるインテグリン $\alpha 9$ および $\beta 1$ さらに炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-6 受容体) の発現レベルも WT マウスでは OPN の発現に呼応するように上がっていたが、AQP4/KO マウスではいずれも低値であった。このことから脳損傷によって引き起こされる OPN の強い発現には、AQP4 が関与している事が示唆された。

脳穿刺損傷のモデルマウスでは、損傷部位周囲で損傷後三日目をピークとして炎症および免疫関連因子が強く発現しており、特に炎症性サイトカインの誘導因子の一つ OPN が活性化アストロサイトおよび活性化ミクログリアにおいて非常に強いレベルで発現が認められた。AQP4/KO マウスを用いた本研究結果より、損傷部位周囲のアストロサイトやミクログリアの活性化には OPN を介して AQP4 が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

(4) AQP4 プロモーター解析

2 種類のノックアウトマウスを作製する過程で得た AQP4 遺伝子断片の解析から、M1 アイソフォームの転写開始点より約 2kb 上に、少なくともアストロサイトにおいて AQP4 の発現を誘導するために機能するエン

ハンサーの存在が明らかになった(文献3)。このことから、このエンハンサーを連結したプロモーターの下流にAQP4のRNAiを挿入したウィルスベクターにより、アストロサイトにおけるAQP4の発現が*in vivo*で制御できるようになると考えられ、脳浮腫の新たな治療法開発の可能性が広がった。

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3件)

Miyazaki K, Abe Y, Iwanari H, Suzuki Y, Kikuchi T, Ito T, Kato J, Kusano-Arai O, Takahashi T, Nishiyama S, Ikeshima-Kataoka H, Tsuji S, Arimitsu T, Kato Y, Sakihama T, Toyama Y, Fujihara K, Hamakubo T and Yasui M, Establishment of Monoclonal antibodies against the extracellular domain that block binding of NMO-IgG to AQP4, *J. Neuroimmunol.*, 査読有, 2013, in press

Ikeshima-Kataoka H, Abe Y, Abe T, and Yasui M, Immunological function of aquaporin-4 in stab-wounded mouse brain in concert with a pro-inflammatory cytokine inducer, osteopontin, *Mol. Cell. Neurosci.*, 査読有, 2013, in press

Abe Y, Ikeshima-Kataoka H, Goda W, Niikura T, and Yasui M, An astrocyte-specific enhancer of aquaporin-4 gene functions through a consensus sequence of POU transcription factors in concert with multiple upstream elements, *J. Neurochem.*, 査読有, 120(6), 2012, 899-912

[学会発表](計14件)

安井 正人, Roles of AQP4 in brain disorders, THE FIRST WORLD CONGRESS ON WATER CHANNEL PROTEINS (AQUAPORINS AND RELATIVES) CELEBRATING THE 25TH ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF THE FIRST WATER CHANNEL PROTEIN(LATER CALLED AQUAPORIN 1), 平成23年10月27日-29日, CLUJ-NAPOCA, ROMANIA

安井 正人, Water Biology:水分子ナノ動態から高次脳機能に迫る, 第5回トランスポーター研究会九州部会, 平成23年9月17日, ホテル JAL シティ 宮崎

安井 正人, Water Biology:水分子ナノ動態から高次脳機能に迫る, 創薬薬理フォーラム第19回シンポジウム, 平成23年9月13日

安井 正人, Roles of aquaporins in water dynamics of the cells, International Conference "Water and Nanomedicine", 平成23年8月30日, Academy of Sciences and Arts of Republic of Srpska Banja Luka

安井 正人, AQP と脳水腫, 北京大学医学部特別講演会, 平成23年8月16日, 北京大学医学部

安井 正人, Perinatal dynamism of water balance and role of aquaporin, 第11回アジア小児腎臓学会学術集会, 第46回日本小児腎臓病学会学術集会, 平成23年6月2日-4日, 福岡国際会議場

安井 正人, アクアポリンとドライシンドローム, 日本ドライシンドローム学会設立記念講演会, 平成23年3月4日

安井 正人, Aquaporin and Water Seen by Two Photon Microscopy, WINPTech2009 Workshop on Information, Nano and Photonics Technology 2009, 平成21年12月2日, KOBE University Centennial Hall and Takikawa Memorial Hall, Kobe University

安井 正人, アクアポリン-4の調節機構, 第39回慶應ニューロサイエンス研究会, アクアポリン-4と神経疾患-新たな病態メカニズムの展開と治療への戦略, 平成21年10月31日, 慶應義塾大学医学部 北里講堂

安井 正人, Clinical relevance of water channel aquaporin, The First International Meeting on Japan - China - Korea Traditional Medicine, 平成21年10月25日, 昭和薬科大学記念講堂

安井 正人, Aquaporins in brain disorders, 北京大学医学部, 平成21年9月16日, 北京大学

安井 正人, Regulation, structure, and function of brain aquaporins, The 22nd Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the Asian Pacific Society for

Neurochemistry(APSN), Busan, Korea, 平成 21 年 8 月 24 日, BEXCO, Busan, Korea

安井 正人, 水代謝の生理と病態に関する最新の話題－アクアポリンの構造機能相関と分子標的創薬, 第 4 4 回日本小児腎臓病学会学術集会, 平成 21 年 6 月 26 日, 一橋記念講堂

安井 正人, 中枢神経におけるアクアポリン-4 (AQP4) の役割, 第 5 0 回日本神経学会総会, 平成 21 年 5 月 22 日, 仙台国際センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/pharm/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

安井 正人 (YASUI MASATO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 90246637

(2) 研究分担者

中尾 和貴 (NAKAO KAZUKI)

独立行政法人理化学研究所・動物実験支援

ユニット・ユニットリーダー

研究者番号 : 20217657

(3) 連携研究者

阿部 陽一郎 (ABE YOICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 10317331

行武 良哲 (YUKUTAKE YOSHINORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 80449016