

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 5月13日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790191

研究課題名（和文） アクアポリン2のリン酸化と細胞内分布および細胞内移送に関する解析

研究課題名（英文） Studies on the importance of aquaporin-2 phosphorylation in its subcellular distribution and intracellular trafficking.

研究代表者

松崎 利行（MATSUZAKI TOSHIYUKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30334113

研究成果の概要（和文）：腎臓の細胞膜水チャネルであるアクアポリン2は、生体内バソプレッシン濃度の変化に応じて細胞内と細胞膜を移行するが、その際のアクアポリン2の256番目のセリンと269番目のセリンのリン酸化について検討した。バソプレッシンの濃度が低いと、269番目のセリンはリン酸化されずに細胞内に存在し、バソプレッシンの作用によって急速にリン酸化され、アクアポリン2は細胞膜に移行することが判明した。また、バソプレッシンの作用を阻害すると、アクアポリン2は細胞内に戻りながら急速に脱リン酸化されることが判明した。つまり269番目のセリンがリン酸化されたAQP2は、細胞膜に存在しやすいことが判明した。一方、これまで重要とされてきた256番目のセリンについては、リン酸化が細胞膜への移行には直接影響を与えないことが判明した。

研究成果の概要（英文）：Aquaporin-2 (AQP2) is a membrane water channel protein which plays an important role in water reabsorption in the kidney. AQP2 is trafficking between intracellular vesicles and the plasma membrane by the effect of serum vasopressin. In the present study, effects of the phosphorylation of serine 256 and serine 269 on subcellular distribution of AQP2 was examined by using phosphorylated AQP2-specific antibodies. It was shown that serine 269 is unphosphorylated and AQP2 remains intracellularly when the vasopressin level is low. Upon the elevation of vasopressin level, serine 269 was rapidly phosphorylated and AQP2 was accumulated on the plasma membrane. Inhibition of the vasopressin effect by its antagonist caused AQP2-returning to the intracellular compartment as serine 269 was rapidly dephosphorylated. These results suggested that serine 269-phosphorylated AQP2 tends to stay in the plasma membrane. On the other, phosphorylation of serine 256, which has been believed to have a dominant effect on AQP2-trafficking to the plasma membrane, was found not to be very important for its subcellular distribution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：基礎医学

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：水チャネル、アクアポリン 2、リン酸化、細胞内分布、リン酸化アクアポリン 2 特異抗体

1. 研究開始当初の背景

腎臓集合管の細胞膜水チャネルであるアクアポリン 2 (AQP2) は、生体内のバソプレッシン濃度依存的に細胞内小胞と細胞膜との間を往来し、水の再吸収量を調節している。このような AQP2 の細胞内分布の変化には、AQP2 のカルボキシル末端付近の 256 番目のセリン (S256) のリン酸化が重要であると考えられ、S256 がリン酸化されると AQP2 は細胞膜へ行き、S256 が脱リン酸化されると細胞内小胞へ戻るとされてきた。しかし、S256 のリン酸化が必ずしも AQP2 を細胞膜へと移行させるわけではないことや、S256 近傍には他にも S261、S264、S269 がバソプレッシンに反応してリン酸化状態が変化することがわかりつつあり、S256 のみならず、他のセリンのリン酸化も AQP2 の細胞内分布の変化に重要である可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、AQP2 の S256、S261、S264、S269 の 4 つのセリンのリン酸化が細胞内分布・細胞内での移送に及ぼす影響と、その調節機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 特異抗体の作製

AQP2 のそれぞれのセリンのリン酸化は特異抗体で検出することとし、特異抗体の作製をおこなった。まずは 4 つのセリンの中でも、とくにバソプレッシンに対する反応が顕著であるとされる S256 と S269 についてリン酸化ペプチドを合成し、ウサギに免疫することで抗体を作製した。得られたウサギの血清は、非リン酸化ペプチドカラムを通すことで、非リン酸化 AQP2 を認識する抗体を除去し、さらにリン酸化ペプチドカラムで抽出することで、リン酸化 AQP2 だけを認識する特異抗体を得た。

(2) 動物を用いた解析

①バソプレッシン欠損ラット DDI/Ddia ラットを用いた解析
生体内バソプレッシンが欠損した状態と、バソプレッシンを外因性に投与した状態での AQP2 のリン酸化の変化を解析するために、バソプレッシン欠損ラットである DDI/Ddia ラットをナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(京都大学) から譲り受けた。コントロール群とバソプレッシンを投与した群を作成し、腎臓を用いた免疫組織化学およびウェスタンブロットによる解析をおこ

なった。

②SD ラットを用いた解析

DDI/Ddia ラットに加え、通常の SD ラットを用いた解析もおこなった。SD ラットでは下垂体後葉からのバソプレッシン分泌は正常におこなわれている。コントロール群は、5%グルコース水溶液ならびに 5%グルコース・1%エタノール水溶液を自由飲水させることで、生体内バソプレッシン濃度を低下させた状態とした。その後バソプレッシンを投与した群を作成し、腎臓を用いた免疫組織化学およびウェスタンブロットによる解析をおこなった。バソプレッシン投与により AQP2 は細胞内の小胞から細胞膜へと急速に移行し、細胞膜に集積するが、細胞膜から細胞内へ回収される様子を観察する目的で、バソプレッシン受容体阻害薬である OPC-31260 (大塚製薬より譲り受け) を、バソプレッシン投与後一定時間経過後に投与した群を作成し、腎臓を解析した。

(3) 培養細胞を用いた解析

ブタ腎臓由来の培養細胞である LLC-PK1 細胞を用いた。LLC-PK1 細胞は内因性にバソプレッシン受容体を発現しているが、AQP2 は発現していないため、ラット AQP2 を強制発現させて解析をおこなった。リン酸化と細胞内分布の関係を解析する目的では、セリンをアスパラギン酸またはアラニンに置換し、それぞれリン酸化擬似体、非リン酸化擬似体として用いた。

4. 研究成果

(1) 抗体の特異性

S256 のリン酸化を認識する抗体においては、とりわけ特異抗体を得るのが困難であった。リン酸化ペプチドを抗原に用いても、免疫したウサギの血清には、非リン酸化フォームを認識する抗体もかなり含まれていた。非リン酸化ペプチドカラムを複数回通し、入念に非リン酸化フォームを認識する抗体を除去し、リン酸化フォームに対する特異性を高めた。組織切片上でのペプチド阻害による免疫染色の結果などを入念に検討し、特異性を確認したうえで以下の解析に用いた。S269 のリン酸化を認識する抗体は比較的容易に得られたが、特異性を十分に確認して、以下の解析に用いた。

(2) 腎臓における AQP2 のリン酸化と細胞内分布

まず、バソプレッシン欠損ラットを用いた免疫染色とウェスタンブロットの解析で、AQP2

の S256 は、バソプレッシン非存在下でもかなりリン酸化されており、しかも細胞内にとどまっていることが判明した。バソプレッシンを投与すると、投与後 30 分で S256 のリン酸化は増し、細胞膜への移行もおこることがわかった。また S269 については、バソプレッシン非存在下ではリン酸化されておらず、バソプレッシン投与によりリン酸化の程度が著しく増し、しかもそのシグナルはほとんど細胞膜に集積してみられた。このことから、S256 のリン酸化にはバソプレッシンの作用は必須ではないが、リン酸化されていてもバソプレッシンの作用がないと細胞膜への移行はできないことが示唆された。一方、S269 のリン酸化にはバソプレッシンの作用が必要で、1) リン酸化された AQP2 はすぐに細胞膜に移行する、あるいは 2) 細胞膜に移行してから細胞膜上でリン酸化され、リン酸化されている限り細胞膜にとどまるという 2 つの可能性が考えられた。そこで、S269 が細胞内でリン酸化されるのかを確認する目的で、SD ラットを用い、バソプレッシン投与後 5 分という早い段階での変化を観察した。その結果、バソプレッシン投与後 5 分では細胞内に S269 のリン酸化シグナルが検出されたことから、S269 のリン酸化は細胞内で起こることが示唆された。また、AQP2 が細胞内へ取り込まれる際には S269 が脱リン酸化されるのかを確認する目的で、次の実験をおこなった。すなわち、バソプレッシン投与後 30 分おき、AQP2 を十分に細胞膜へ移行させたのちに、バソプレッシン受容体阻害薬である OPC-31260 を投与し、AQP2 が細胞内に回収されてくる過程での AQP2 のリン酸化の変化について詳しく検討した。その結果、OPC-31260 を投与すると、5 分後にはすでに細胞内への取り込みが盛んに起こっており、S269 のリン酸化シグナルはかなり減少していたが、一部は細胞内にも検出された。また OPC-31260 投与後 30 分では、AQP2 のほとんどは細胞内に取り込まれたうえに、S269 のリン酸化シグナルはほとんど検出されなくなっていた。一方 S256 については、OPC-31260 投与後 30 分でもリン酸化シグナルはかなり残っていて、細胞内に分布していた。これらの結果から、S269 についてはバソプレッシンの作用で細胞内でリン酸化され、すぐに細胞膜へ移行し、バソプレッシンの作用が遮断されると、細胞内へ取り込まれながら急激に脱リン酸化されるものの、細胞内への取り込みで脱リン酸化が必須の条件ではないことが示唆された。また S256 については、細胞内への取り込みの際にも脱リン酸化は必要ではないことが示唆された。当初、S256 がリン酸化されることで AQP2 は細胞膜へ移行し、脱リン酸化により細胞内へ取り込まれるというモデルが考えられていたが、S256 のリン酸化は重要な因子ではない可

能性が高く、むしろ S269 のリン酸化が重要な役割を果たす可能性が示唆された。しかし、複数のセリンのリン酸化が複雑に関係しながら AQP2 の細胞内での移送が調節されていることが考えられ、S256 と S269 の関係を確認すべく、培養細胞を用いた検討をおこなった。

(3) 培養細胞での検討

ラット腎臓での解析から、AQP2 の S256 のリン酸化は AQP2 の細胞内分布には直接影響を及ぼさないと考えられたが、これまでの培養細胞を用いた解析では、S256 をアラニンに置換した非リン酸化擬似体ではバソプレッシンを作用させても細胞膜へ移行しないことがわかっている。これは S256 がリン酸化されないために S269 のリン酸化もおこらないからではないかと考えた。そこで、S256 をアラニンに置換した AQP2、あるいは S256 をアスパラギン酸に置換した AQP2 を安定的に発現させた LLC-PK1 細胞を用いて、バソプレッシンを作用させたときの S269 のリン酸化の変化と、細胞内分布について解析を始めた。しかし、培養細胞ではリン酸化 AQP2 特異抗体でリン酸化 AQP2 を検出することが難しく、引き続き検討中である。

本研究では、AQP2 の 269 番目のセリンがリン酸化されると、AQP2 は細胞膜表面に分布しやすくなることが判明した。S269 がリン酸化された AQP2 を細胞膜上に集積させる機構が存在することが考えられ、今後更なる解析へと発展させることが必要である。

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 8 件)

- ① Keiichi Hagiwara, Tetsuya Shinozaki, Toshiyuki Matsuzaki, Kuniaki Takata, Kenji Takagishi. Immunolocalization of water channel aquaporins in human knee articular cartilage with intact and early degenerative regions. *Med Mol Morphol*, 2013 in press, DOI 10.1007/s00795-013-0014-3, 査読有
- ② Toshiyuki Matsuzaki, Taketo Susa, Kinue Shimizu, Nobuhiko Sawai, Takeshi Suzuki, Takeo Aoki, Satoshi Yokoo and Kuniaki Takata. Function of the Membrane Water Channel Aquaporin-5 in the Salivary Gland. *Acta Histochem Cytochem* 45: 251-259, 2012, DOI: 10.1267/ahc.12018, 査読有
- ③ Dongfeng Niu, Tetsuo Kondo, Tadao Nakazawa, Tomonori Kawasaki, Tetsuo Yamane, Kunio Mochizuki, Yohichiro Kato, Toshiyuki Matsuzaki, Kuniaki

- Takata, Ryohei Katoh. Differential Expression of Aquaporins and Its Diagnostic Utility in Thyroid Cancer. PLoS ONE 2012; 7(7): e40770, DOI: 10.1371/journal.pone.0040770, 査読有
- ④ Takeo Aoki, Takeshi Suzuki, Haruo Hagiwara, Michio Kuwahara, Sei Sasaki, Kuniaki Takata and Toshiyuki Matsuzaki. Close Association of Aquaporin-2 Internalization with Caveolin-1. Acta Histochem Cytochem 45: 139-146, 2012, DOI: 10.1267/ahc.12003, 査読有
- ⑤ Toshiyuki Matsuzaki, Yuki Inahata, Nobuhiko Sawai, Chun-Ying Yang, Makito Kobayashi, Kuniaki Takata, Hitoshi Ozawa. Immunohistochemical localization of the water channels AQP4 and AQP5 in the rat pituitary gland. Acta Histochem Cytochem 44: 259-266, 2011, DOI: 10.1267/ahc.11031, 査読有
- ⑥ Masahiro Ikeda, Ayaka Andoo, Mariko Shimono, Natsuko Takamatsu, Asaka Taki, Kanako Muta, Wataru Matsushita, Tamayo Uechi, Toshiyuki Matsuzaki, Naoya Kenmochi, Kuniaki Takata, Sei Sasaki, Katsuaki Ito, Kenichi Ishibashi. The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. J Biol Chem 286: 3342-3350, 2011, DOI: 10.1074/jbc.M110.180968, 査読有

[学会発表] (計 26 件)

- ① Toshiyuki Matsuzaki. Phosphorylation of AQP2 and Subcellular Distribution in Vasopressin-Deficient Rats. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 京都国際会館 (京都府), 2012. 8. 29
- ② Kinue Shimizu. Effects of Vasopressin Stimulation on AQP2-phosphorylation and its Subcellular Distribution. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 京都国際会館 (京都府), 2012. 8. 29
- ③ Taketo Susa. Effect of Starvation and Salivary Stimulation on Aquaporin-5 Expression in Rat Salivary Glands. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 京都国際会館 (京都府), 2012. 8. 29
- ④ Takeo Aoki. AQP2 retention in the apical membrane is related with membrane microdomain compartment. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 京都国際会館 (京都府), 2012. 8. 29
- ⑤ 松崎利行. 免疫電子顕微鏡法の基礎と応用. 日本組織細胞化学会主催第 37 回組織細胞化学講習会. 高槻現代劇場 (大阪府), 2012. 8. 2
- ⑥ 松崎利行. 水チャネル, アクアポリン 2 の細胞内分布. 平成 24 年度日本解剖学会 関東支部春季懇話会. 日本医科大学 (東京都), 2012. 6. 16
- ⑦ 須佐岳人. 細胞膜水チャネル, アクアポリン 5 の唾液腺における発現調節に関する検討. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 山梨大学 (山梨県), 2012. 3. 26
- ⑧ 清水絹恵. アクアポリン 2 のリン酸化と細胞内分布に関する検討. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 山梨大学 (山梨県), 2012. 3. 28
- ⑨ 松崎利行. 蛍光抗体法の基本. 日本顕微鏡学会第 36 回関東支部講演会. 東京都市大学 (東京都), 2012. 3. 10
- ⑩ 松崎利行. 唾液分泌と水チャネル, アクアポリン. 第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 金沢大学 (石川県), 2011. 9. 25
- ⑪ 松崎利行. 細胞膜水チャネル, アクアポリンの組織化学的研究. 第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 金沢大学 (石川県), 2011. 9. 24
- ⑫ 青木武生. MDCK 細胞頂部における AQP2 保持能力に関する膜微小ドメイン構成成分に関する検討. 第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 金沢大学 (石川県), 2011. 9. 24
- ⑬ 小澤一史. ラット下垂体における水チャネル, アクアポリン 4 (AQP-4)、アクアポリン 5 (AQP-5) の発現と局在について. 第 21 回バゾプレシン研究会, 慶應義塾大学 (東京都), 2011. 1. 8
- ⑭ 松崎利行. 水チャネル, アクアポリンの分布局在. 第 61 回東北臨床超微形態懇話会, 東北大学 (宮城県), 2010. 6. 30

[図書] (計 1 件)

- ① 松崎利行, 青木武生, 澤井信彦, 小澤一史, 高田邦昭. 免疫電子顕微鏡法の基礎と応用. 組織細胞化学 2012 (日本組織細胞化学会編), 日本組織細胞化学会, 京都: pp193-202, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 利行 (MATSUZAKI TOSHIYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30334113

- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし