

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570191

研究課題名(和文) 脳の水チャネルアクアポリン 4 の構造と機構研究

研究課題名(英文) Functional studies based on the structure of brain water channel, aquaporin-4

研究代表者

廣明 洋子 (Hiroaki, Yoko)

名古屋大学・細胞生理学研究センター・特任准教授

研究者番号：80378588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：脳に優位に発現しているAQP4は種間で高度に保存されている。AQP4の生理機能を構造的知見に基づいて理解するために、接着機能欠損AQP4マウスのアストロサイトをmRNA及び蛋白質レベルで網羅的に解析した。9割以上の細胞がGFAPなどのアストロサイトマーカー陽性となる培養法を確立した。これを用いてマイクロアレイ解析を実施したところ、遺伝子改変マウスでは、接着分子の増加を示すとともに、各種キナーゼの減少が多く観察された。質量分析では細胞骨格関連因子やインテグリン類が減少していた。最終年度途中でやむなく所属異動をすることになりそのプロジェクトの専従義務が生じたため、実験を中断せざるを得なかった。

研究成果の概要(英文)：AQP4 revealed in the brain at predominance is highly preserved between species. In order to understand the physiological function of AQP4 based on structural analysis, the astrocyte from mice including genetically engineered mice expressing AQP4 without adhesive function were comprehensively analyzed on mRNA as well as a protein level. The culture procedure was established that 90% of the cultured cells showed positive reaction to the astrocyte-markers, such as GFAP. Microarray analyses showed reduction of various kinases but increase of adhesion molecules in the genetically engineered mice compared with those in WT ones. Cytoskeleton related factors and integrin family proteins were found to be decreased by mass spectrometry.

Because of devotion duty caused by my new affiliation, this project has to regrettably be stopped at the middle of the last fiscal year, while this project is interesting.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：膜蛋白質 アクアポリン-4 電子線結晶構造解析

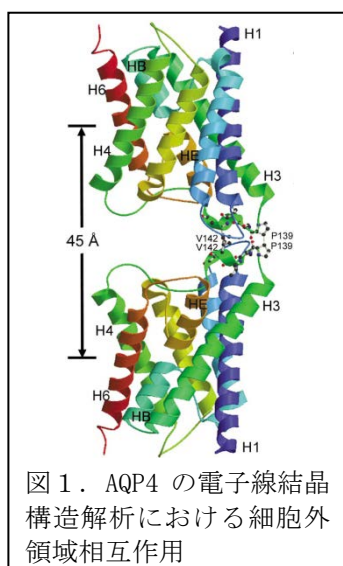
1. 研究開始当初の背景

【学術的背景】水は生体に必須な物質であり、生体内での水の移動は水を選択的に通す水チャネル アクアポリン(AQP)を介して行われる。水チャネルは植物から哺乳類まで幅広く存在しており、ヒトでは13種類がそれぞれ組織特異的に発現しているが、AQP4だけがそのN末の長さの異なるアイソフォームを持っている。Met1から始まるAQP4M1とMet23から始まるAQP4M23が代表例である。AQP4は脳、腎臓、筋肉等に発現しているが、その発現部位でorthogonal arrayといわれる特徴的な格子状の構造を形成することが知られている。

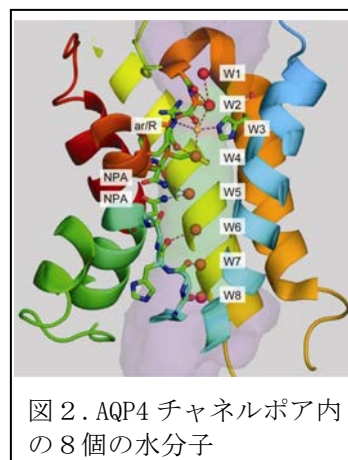
【国内外の動向】過去の報告でAQP4M23がorthogonal arrayを形成し、AQP4M1がその形成を阻害することが分かっていた。一方、C末端領域には、C末端にPDZドメイン結合モチーフおよびその上流20残基あたりに膜表面への輸送にかかわる領域が存在することが明らかとなっている。また、免疫沈降実験やシントロフィンのノックアウト、およびmdxマウスでの実験からAQP4はシントロフィンおよびDp71と相互作用していることが分かっている。

【研究経緯】1995年より膜蛋白質の構造と機能に興味を持ち、電子顕微鏡による電子線結晶構造解析を軸として研究を進めてきた。電子線結晶学では電子顕微鏡や解析プログラムの開発は進んでいたものの、膜蛋白質の2次元結晶化がボトルネックとなっていた。そこで結晶化に向けた膜蛋白質の発現から2次元結晶化までを重点的に取り組んできた。近年は、蛋白質の発現・精製から結晶化まで、ノウハウの蓄積により、以前よりかなり容易に進められるようになってきているが、膜蛋白質の昆虫細胞を用いた発現系を確立しミリグラムオーダーで精製できるようにした(T. Doi *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **248**, 139-148 (1997))。この発現系を用いて脳に優位に発現しているAQP4の電子線結晶構造解析を3.4Å分解能で解くことに成功した(Y. Hiroaki *et al.*, *J. Mol. Biol.* **355**, 628-639 (2006))。この構造は2次元結晶が二層に重なったものから解かれ、向かい合う脂質膜に存在するAQP4の、細胞外領域の3₁₀ヘリックス同士が互いにゆるく接着していた(図1)。

さらにこの



AQP4の細胞内に存在するSer180がリン酸化されることにより水の透過性が下がるという報告を受けて、アスパラギン酸に置換しリン酸化を模倣した変異体(AQP4M23S180D)の電子線結晶構造解析も行った(K. Tani *et al.*, *J. Mol. Biol.* **389**, 694-706 (2009))。この変異体は2.8Å分解能で解析し、AQP4テトラマーの周りを取り囲む脂質分子と、チャネルポア内部に8分子の水が見えた(図2)。しかし、このAQP4M23S180Dは構造的にも機能的にも野生型とほぼ同等であった(T. Mitsuma *et al.*, *J. Mol. Biol.* **402**, 727-739 (2010))。さらに、AQP4M1のN末に存在する2つのシステイン残基(Cys13とCys17)がパルミトイル化されることがorthogonal array形成を阻害することを見出した(H. Suzuki *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**, 1181-1189 (2007))。



種間での相同性が非常に高いAQP4の中では、C末端側の細胞内領域は、比較的アミノ酸配列が異なっており、さらに既存のドメインとの相同性もない。我々が既に構造を解いたリン酸化模倣変異体の構造は野生型と変化がなかったが、両者ともにC末端領域の構造は乱れており解析できていない。リン酸化酵素やドパミンにより水の透過量が減少するという報告があることから、これらが作用すると予測されているC末端領域を含む細胞内領域に何らかの修飾が起きていることが考えられた。

これまでの研究成果をさらに統合的に研究して、脳の機能とorthogonal arrayを形成し細胞を接着して層状構造も形成できるAQP4の分子機能との関連を理解するために、(1)AQP4遺伝子改変マウスを作製し解析する、(2)C末領域に着目してAQP4の構造解析を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は膜蛋白質の構造情報を高度に活用しつつ遺伝子改変マウスと生化学的手法を用いて、脳に優位に発現している水チャネルAQP4の生理機能を構造学的視点から理解することである。構造情報に基づき細胞外領域の3₁₀ヘリックスをAQP1の同領域に置

換するよう設計した遺伝子改変（機能的ノックアウト）マウス、および AQP4 ノックアウトマウスを野生型マウスと遺伝子レベルおよび蛋白質レベルで網羅的に比較する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス由来アストロサイトの網羅的解析

①初代アストロサイトの調製

P0 の仔マウスを断頭後、全脳を摘出する。脳梁を切断し、左右の脳の部分のみを取り出す。この時、できる限り髄膜を剥ぐ。脳をトリプシン 0.25% 溶液で 37°C、3 分間処理後、10% FBS/DMEM で反応停止させ、ピペッティングでよくほぐす。ほぐした細胞を洗い、培地に懸濁、セルストレイナー（70 μm ）に通し撒種する。1 週間ごとに培地交換し、コンフルエントになるまで培養する。

②免疫染色

試料（培養アストロサイト）を 4%ホルムアルデヒドで固定、過剰なホルムアルデヒドをグリシンでブロックした後、0.7%サポニン処理をする。5%スキムミルクでブロッキング後、1 次抗体（ウサギ抗 AQP4 抗体）、2 次抗体（ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、alexa488 結合）処理を施し、蛍光顕微鏡観察を行った。

③全 RNA 調製

目的組織摘出後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。純度を確認するため、高速多検体電気泳動システム TapeStation 2200 (Agilent) で RIN[®] を測定した。

④マイクロアレイ解析および質量分析

調製した全 RNA を用いて、Affymetrix 社の GeneChip Mouse Gene 2.0 ST Array でトランスクリプトーム解析を実施した。また、アストロサイトを回収後、カルバモイルメチル化を施し、全細胞の SDS-PAGE を行った。各レーンをはしご状にゲル片を 18 に切り分け、トリプシンによるゲル内消化を実施し、ペプチドとして回収した。それぞれを、nano LC-Q Exactive MS システムでプロテオーム解析した。

(2) AQP4 C 末に着目した構造機能解析

ラット AQP4M23 delC65 を野生型 AQP4 の大量発現・精製法と同様の方法で調製し、精製標品を得た。収量は Sf9 細胞 3 リットル培養から ~2.5mg/ml であった。この 2 次元結晶化条件についても、野生型と同条件で実施した。

(3) 電子線トモグラフィ法によるグリア層状構造の高分解能解析

マウスを麻酔下でパラホルムアルデヒド/グルタルアルデヒド溶液の還流固定をし、全組織を固定する。固定した個体から全脳を摘出し、固定溶液中で一晩、4°C で保存する。ビ

ブラトームで 400 μm 厚の粗切片を切り出し、2 日間かけて段階的にショ糖濃度をあげ氷晶防止措置をとる。氷晶防止措置を施した粗切片をシャーベット状になった液体窒素中で凍結し、そのまま酢酸ウランでのブロック染色を行う。ブロック染色後、lowicryl HM20 樹脂を浸透させ、紫外線照射により樹脂を硬化させる。ウルトラマイクロトームで 75~85nm 厚の超薄切片を作製し、電子顕微鏡観察用モリブデングリッドにすくい取る。免疫ラベルを施す場合には、このグリッドをブロッキングした後、1 次抗体（ウサギ抗 AQP4 抗体）、2 次抗体（ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、15nm 金粒子結合）処理後、グルタルアルデヒドで固定する。その後、酢酸ウランおよび酢酸鉛で染色して、透過型電子顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

前述のように、本研究の最終目標は遺伝子改変マウスと生化学的手法を用いて、脳に優位に発現している水チャネル AQP4 の生理機能を構造学的視点から理解することである。立体構造に基づいて変異を導入した AQP4 を発現するマウスの解析から、AQP4 の機能が、遺伝子発現とタンパク質発現量という両者において、当初想定していたよりも複雑な機構によって制御されていることが、本研究により明らかになった。そのため、当初予定した研究方法のうち、特に方法論 (1) 遺伝子改変マウス由来アストロサイトの網羅的解析に主眼を置いて研究を進めた。その結果、以下の成果を得ることができた。

(1) 遺伝子改変マウス由来アストロサイトの網羅的解析

AQP4 ノックアウトマウスと野生型マウスを比較しても、脳の視床下部付近のグリア層状構造について明確な解剖学上の違いは観察されなかった。AQP4 の分子機能としては、電子線結晶構造解析より orthogonal array を形成し細胞を接着して層状構造も形成できることが明らかとなっている。その際、細胞外 3_{10} ヘリックスによる分子同士のコンタクトが極めて重要である。そこで、AQP4 の細胞外の 3_{10} ヘリックスをウシ AQP1 のものに置換した遺伝子改変マウスを作出し、野生型マウスとその脳切片を比較観察した。この遺伝子改変マウスは水透過に関連する orthogonal array は形成できるが、細胞を接着する機能が欠損していると考えられる。電子顕微鏡観察から、この考えを支持する結果が得られた。すなわち、グリア層状構造部分において、遺伝子改変マウスは野生型マウスより脂質 2 重膜の間隔が顕著に広がっていることが確認された。構造解析で予想した AQP4 の細胞接着機能は、結晶化によるアーティファクトではなく、少なくとも、視床下部のグリア層状構造における細胞接着という機能を担っていることが確認できた。特に、構造解析で発見した AQP4 の分子間相互作用の役割が、

個体レベルで確認できた意義は大きいと思われる。

一方、単純なノックアウトマウスではこのような表現型は顕著ではなかったことから、何らかの未知の分子補償機能が働き、AQP4 蛋白質欠損による表現型の変化を妨げる方向に調整が働いたと考えられた。現在までに、脳内の AQP4 に関してこのような大規模かつ複雑な制御機構があることは知られていない。そこで、トランスクリプトームならびにプロテオームの解析手法により、この機構を明らかにすることとした。

この目的のために、野生型マウスと AQP4 遺伝子改変マウスの脳から AQP4 を有意に発現しているアストロサイトを初代培養した。アストロサイトの初代培養は、細胞のダブルングタイムが遅く必要細胞数を得るのに時間がかかるが、脳そのものから試料を調製するよりも比較的夾雑物を少なくできると考えて実施した。アストロサイトのマーカーである GFAP と AQP4 の共染色を実施したところ、全体の 7 割程度が GFAP ポジティブで、かつ、そのうちの 8 割程度が AQP4 ポジティブであった。これらの結果は AQP4 発現細胞が予想よりも少ないことを示している。それゆえ、細胞から調製して質量分析を実施するために、より高頻度で AQP4 発現アストロサイトを調製する方法の条件検討を行った。様々な培養条件を検討した結果、9 割以上のアストロサイトが GFAP、AQP4 およびコネキシン-43 ポジティブとなる初代培養法を確立した (図 3)。

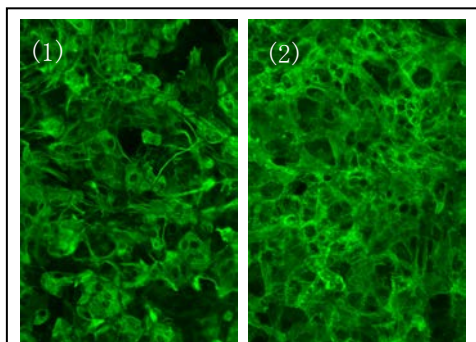


図 3. アストロサイト初代培養
(1)GFAP 染色、(2)AQP4 染色

この培養方法を用いて、野生型マウスと AQP4 遺伝子改変マウスの P0 個体の脳から AQP4 を有意に発現しているアストロサイトを初代培養した。野生型マウスや遺伝子改変マウス、ノックアウトマウス、シントロフィンノックアウトマウスの 4 群について、各群 N=3~4 となるように試料調製した。マイクロアレイ解析の結果、ノックアウトマウスでは 2 倍以上の変動が見られた遺伝子数は 7 と少ないが、接着性を除いた AQP4 を発現する遺伝子改変マウスでは 200 ほどの遺伝子の変動していた。この変化が見られた遺伝子群の中で、接着分子関係は増加を示すとともに、各種キナーゼの減少が多く観察されるという興味深い結果を得た。さらに、質量分析では細胞骨格関

連因子やインテグリン類の減少が観察された。

(2) AQP4 C 末に着目した構造機能解析

まず AQP4 の 2 次元結晶化において、AQP4 の C 末 65 残基を欠失させた変異体を用いた試みを行ったが、現状では以下の電子顕微鏡像のように比較的結晶性の悪い 2 次元結晶しか得られていない (図 4)。

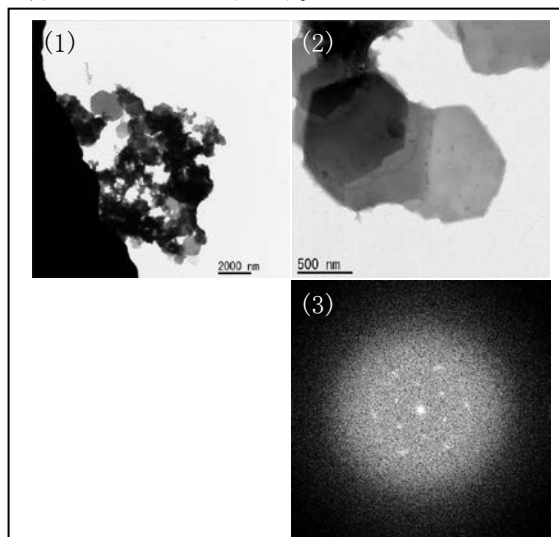


図 4. ラット AQP4 delC65 の 2 次元結晶化
(1) 2 次元結晶の負染色像、(2) は (1) の拡大像、(3) (2) の FFT パターン

次に、AQP4 の C 末 75 アミノ酸残基中に、他のタンパク質と相互作用する重要なサイトがあるのではないかと仮説をたてた。そこで、当該領域内に存在する、既存の相互作用モチーフの検索を目的として Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins (ELM) で探索を行った。その結果、タンパク質-タンパク質相互作用に関与するモチーフはエンドサイトーシスに関わるもの、およびクラス I PDZ ドメインであった。それ以外の探索結果として、細胞質で機能する因子との相互作用モチーフがいくつか散見された。さらに、未知の相互作用ドメインおよび相互作用する蛋白質を探索するため、遺伝子改変マウスを用いてマイクロアレイおよび質量分析を計画した。細胞試料の調製の過程で、アストロサイトのマーカーである GFAP と AQP4 とで共染色を実施したところ、アストロサイトの分化誘導の有無にかかわらず、AQP4 発現細胞が予想よりも少ないことがわかった。脳内で AQP4 をより高濃度に発現しているグリア層状構造は、その領域が非常に小さくトランスクリプトームやプロテオームの材料として採取するには非常に困難である。そこで、試料としてアストロサイト初代培養細胞を用いることとし、より高頻度で AQP4 発現アストロサイトを調製する方法の検討を行った。これに成功したので、この成果は、前項 (1) 遺伝子改変マウス由来アストロサイトの網羅的解析の成果のうち、マ

マイクロアレイ解析および質量分析計を利用した網羅的相互作用パートナー探索のための実験にすぐさま反映させた。

(3) 電子線トモグラフィ法によるグリア層構造の高分解能解析

AQP4 の構造解析に基づいて細胞外の 3₁₀ヘリックスをウシ AQP1 のものに置換して接着機能をなくした遺伝子改変マウスと野生型マウスの脳切片と比較観察した。その結果、遺伝子改変マウスでは脂質 2 重膜の間隔が顕著に広がっていることが明らかになった。

このグリア層状構造について、3次元立体構造を電子線トモグラフィ法でより詳細に解析するために、電子顕微鏡観察用超薄切片を作製した。当該部位の電子顕微鏡観察用超薄切片を作製し、電子線トモグラフィ法による解析に向けて、遺伝子改変マウスと野生型マウスのデータ収集を完了し、解析を進めたが、試料作製の場所の選定が悪かった問題と超薄切片の質が良くないという問題などのために、残念ながら明確な差を検出できなかった。特に試料の質の劣化の問題は、抗体ラベルのために緩和な固定条件が必要で、細胞膜のコントラストが弱くなるためと考えられた。その後試料作製条件を改良した結果、膜のコントラストも強く、抗体でのラベルもできる条件を得ることができた。

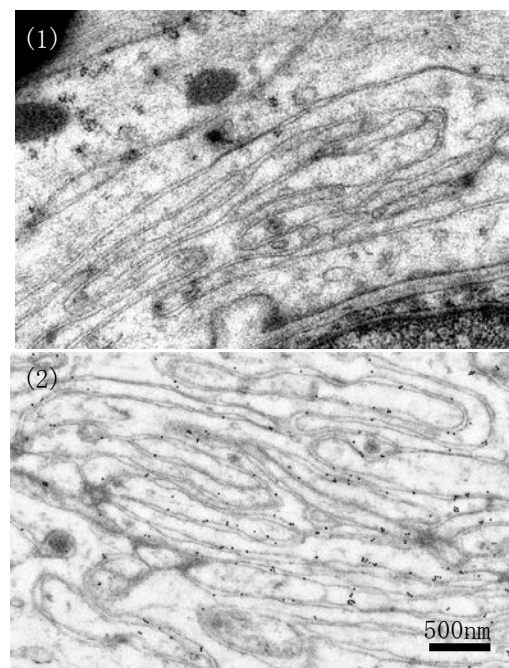


図 5. 遺伝子改変マウスの大脳視床下部付近のグリアラメラ領域の超薄切片電子顕微鏡像

(1)AQP4 ノックアウトマウス、(2)接着機能を欠損させた遺伝子改変マウス、金粒子(黒い粒子)は AQP4 の存在を示している

なお、2013 年 8 月より経済産業省プロジェクト個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発/天然化合物及び IT を活用した

革新的医薬品創出技術「電子線及び X 線によるタンパク質及びその化合物複合体の精緻立体構造取得技術の開発」に係る特命事項を遂行するため、当該プロジェクトに対して専従義務が生じた。このため、本研究課題実験は、残念ながら途中で停止することとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Two Alternative Conformations of a Voltage-Gated Sodium Channel. Tsai, C-J., Tani, K., Irie, K., Hiroaki, Y., Shimomura, T., McMillan, D. G., Cook, G. M., Schertler, G. F. X., Fujiyoshi, Y. and Li, X-D. *J. Mol. Biol.* 査読有、巻 **425**、号 22、ページ 4074-4088、DOI: 10.1016/j.jmb.2013.06.036 発行 Nov. 15, 2013.

② Electron tomographic analysis of gap junctions in lateral giant fibers of crayfish. Ohta, Y., Nishikawa, K., Hiroaki, Y. and Fujiyoshi, Y. *J. Struct. Biol.* 査読有、巻 **175**、号 1、ページ 49-61、DOI: 10.1016/j.jsb.2011.04.002 発行 Jul. 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣明 洋子 (HIROAKI, Yoko)

名古屋大学・細胞生理学研究所・特任准教授

研究者番号：80378588