

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380160

研究課題名(和文)小胞体局在型水チャネル分子による小胞体機能調節機序の解明

研究課題名(英文)A study on the molecular function of an ER-residential water channel protein, AQP11

## 研究代表者

池田 正浩 (Ikeda, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60281218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：アクアポリン-11(AQP11)は、小胞体に局在するユニークな水チャネル分子である。しかし、AQP11の小胞体における分子機能については全く明らかにされていない。本研究では、AQP11の小胞体における分子機能を明らかにする目的で、小胞体が細胞内カルシウム貯蔵部位であることに着目して、イメージング解析、プロテオーム解析などを行った。その結果、AQP11は小胞体内カルシウムイオン貯蔵量を適正に保つ機能を持つこと、そしてこの機能には、タンパク質輸送装置であるトランスロコンが関与している可能性などを見出した。今後、これらの知見の生物学的意義を明らかにしていく必要がある。

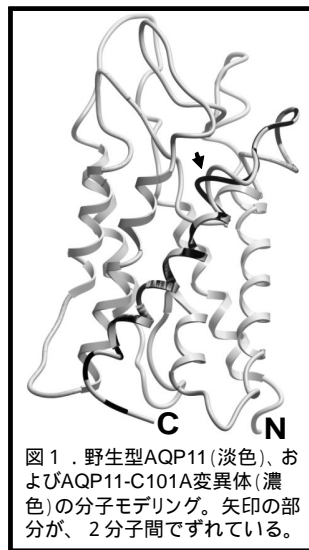
研究成果の概要(英文)：Aquaporin-11 (AQP11) is an ER-residential water channel protein. AQP11 is the latest member of the mammalian water channel protein family to be described and, thus, its molecular function in the ER is largely unknown. In this study, in order to clarify the molecular function, imaging analysis and proteomics were performed. Imaging analyses showed that AQP11 might have an important role in the regulation of calcium content in the ER. A proteome analysis identified a translocon protein as one of the AQP11-binding partners, and subsequent imaging studies suggested that this interaction was involved in the regulation of calcium content in the ER. Future studies will clarify the biological significance of calcium homeostasis in the ER by AQP11.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：薬理学 アクアポリン 小胞体 カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

アクアポリン (aquaporin, 以下 AQP とする) とは, 水分子が透過する孔 (水チャネル) として同定された膜タンパク質である。現在までに 13 種類 (AQP0~AQP12) の AQP が哺乳動物において同定されている。研究代表者のグループはこれらの中で, AQP11 を発見した (文献 )。そしてその後の研究から, (1) AQP11 が腎の生後の正常な発達に必須の分子であること, (2) AQP11 はホモ 4 量体を形成して小胞体膜に局在すること, (3) AQP 間で保存されている NPA モチーフが, AQP11 では NPC モチーフとなっており, この NPC モチーフが構造維持に重要 (図 1 参照) であること, (4) AQP11 の水チャネル活性は AQP1 等比べて 1/10 程度と非常に低いことなどを明らかにしてきた。しかしながら, 生後の腎の発達に必須の分子である AQP11 が, 小胞体においてどのような分子機能を持っているのかは不明のままである。



## 2. 研究の目的

小胞体の機能としては, タンパク質合成, 脂質代謝, 細胞内カルシウムの恒常性維持などの機能が知られている。AQP11 のノックアウト動物では, 腎の生後の発達期に嚢胞形成を伴う腎障害がみられる。これまでのヒトの常染色体優性遺伝多発性嚢胞腎の研究から, 細胞内カルシウムシグナリングの異常が嚢胞発症と密接に関わっていること (文献, 文献) から, 研究代表者は, AQP11 が細胞内カルシウムイオン濃度を適正に調節する分

子機能を持つとの仮説を立てた。本研究では, この仮説を証明するために, 細胞内カルシウムイオン濃度測定のためのイメージング解析や, AQP11 結合タンパク質を同定するためのプロテオーム解析などを行った。また, 小胞体ストレス応答と呼ばれる現象が, 小胞体内カルシウム量と密接に関係していることが報告されていること (文献) から, AQP11 と小胞体ストレス応答との関連性についての検討も行った。

## 3. 研究の方法

2. 「研究の目的」で述べた仮説を証明するために, (1) AQP11 結合タンパク質の同定, (2) AQP11 の小胞体カルシウム貯蔵量調節メカニズムの解明, そして (3) 小胞体ストレス応答における AQP11 の関与についての検討の 3 項目に分けて研究を行った。

(1) の研究には, 我々が新規に確立したオンビーズタンパク質消化 LC-MS/MS 法を用いて AQP11 結合タンパク質の同定を試みた。この方法を用いると, 旧来の方法では全く同定できなかった微量のサンプルを用いても, タンパク質を同定できることを確認している。

(2) については, エステルを切断する酵素を小胞体膜に選択的に安定発現させた細胞株に, Fluo-5N と呼ばれるカルシウム蛍光指示薬のエステル体を負荷して行った。この細胞株では, 小胞体に Fluo-5N が選択的に局在し, 局在部位のカルシウム濃度のみを測定することが可能となる。

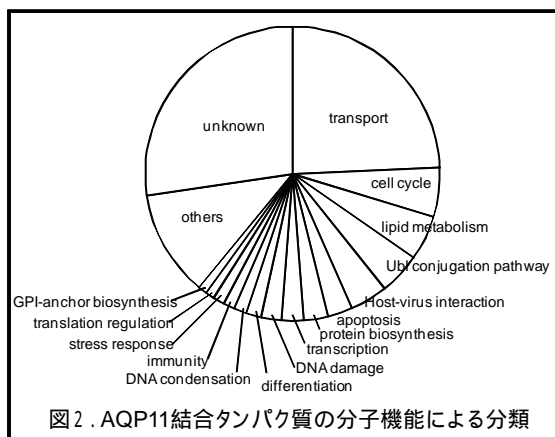
(3) に関しては, AQP11 ノックアウト動物の発現量を変化させて, 小胞体ストレス応答の指標である小胞体ストレスセンサータンパク質の発現量などがどのように変化するのかについて調べた。

最終的にはそれらの結果を総合的に考察することによって, AQP11 の分子機能としての細胞内カルシウムイオン濃度を適正に調

節する作用, また, この分子機能と小胞体ストレス応答との関連性についての仮説検証を行った.

#### 4. 研究成果

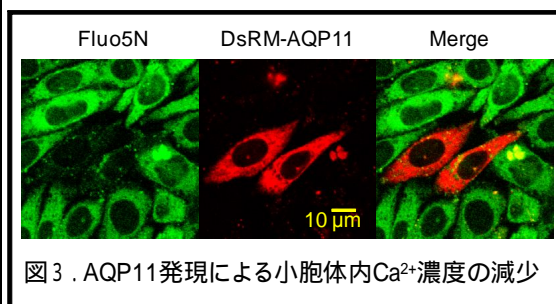
(1) AQP11 結合タンパク質の同定  
腎由来細胞株に AQP11 を発現させてプロテオーム解析 (オンビーズタンパク質消化 LC-MS/MS 法) を行った. コントロール群には, タンパク質の機能に関するデータベースを参考に, AQP11 とは結合しないが小胞体に局在するようなタンパク質を発現させたものを用いた. プロテオーム解析の結果, コントロール群と比べて, AQP11 と特異的に結合するタンパク質として 322 種類を同定した. 次に同定したタンパク質を The UniProt databases (<http://www.uniprot.org/help/about>) を参照して図 2 のように分類した. 図 2 から分かるように, AQP11 が水チャネルであることから, トランスポーター関連タンパク質が多く同定されている. これらのタンパク質の中で, 細胞内カルシウム濃度調節に関係する



タンパク質を, これまでの論文などを参考に選別した. 選別後, 機能複合体であれば代償性の変化が見られると考え, AQP11 ノックアウト動物由来の腎におけるこれらの遺伝子発現量を調べた. その結果, タンパク質輸送装置であるトランスロコンタンパク質が AQP11 と関連して細胞内カルシウム濃度を調節する候補分子として浮上した.

#### (2) AQP11 の小胞体カルシウム貯蔵量調節メカニズムの解明

最初の 2 年間において, 小胞体内カルシウムイオン濃度をリアルタイムにモニタリングできるイメージ解析系の構築を試みた. その結果, 系を構築することに成功した. この系を用いて, AQP11 発現による小胞体内カルシウム濃度を調べた結果を図 3 に示す.



シウム濃度を調べた結果を図 3 に示す. 図 3 から分かるように, AQP11 の発現 (赤色細胞) により, 小胞体内カルシウムイオン濃度の著明な減少を観察した (赤色細胞に一致した部位における緑色蛍光の減少). この結果は, AQP11 が小胞体内カルシウム濃度を減少させる作用を持つことを示している. 次にこの系を用いて, (1) の研究で見出した AQP11 結合タンパク質のトランスロコンタンパク質が AQP11 の小胞体内カルシウム濃度減少作用に関与するかどうかを, トランスロコンタンパク質の阻害薬であるアニソマイシンを用いて検討した. その結果, AQP11 発現による小胞体内カルシウム濃度減少効果がアニソマイシンにより減弱することを観察した. 以上の結果から, AQP11 はトランスロコンタンパク質と連動して小胞体内のカルシウム量を, 引いては細胞質のカルシウム濃度を適切に調節していることが考えられた.

#### (3) 小胞体ストレス応答における AQP11 の関与についての検討

小胞体における貯蔵カルシウム量の変動は, 小胞体ストレス応答と呼ばれる細胞内情報伝達経路を介して細胞の生死を調節してい

ることが知られている．そこで AQP11 と小胞体ストレス応答との関連性について調べた．その結果，小胞体ストレス応答→カスパーゼ3 活性化→ミトコンドリア機能不全→活性酸素量増加→細胞障害の経路に対して，AQP11 が保護的な役割を担っている可能性を見出した．

以上の成果から，AQP11 は小胞体内カルシウムイオン貯蔵量を適正に保つ機能を持ち，この機能の一部にはトランスロコンが関与していること，そしてこの機能は小胞体ストレス応答の調節に重要であることなどが考えられる．今後，AQP11 の細胞内カルシウム恒常性維持機構の生物学的意義をより明確にしていく必要がある．

#### <引用文献>

Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, **Ikeda M**, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol* 25: 7770-7779, 2005.

**Ikeda M**, Guggino WB. Do polycystins function as cation channels? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 539-545, 2002.

Wilson PD. D Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 350: 151-164, 2004.

Higo T, Hamada K, Hisatsune C, Nukina N, Hashikawa T, Hattori M, Nakamura T, Mikoshiba K. *Neuron* 68: 865-878, 2010.

#### 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 5 件 )

**Ikeda M**, Matsuzaki T. Regulation of aquaporins by vasopressin in the kidney. *Vitam Horm* 98: 307-337, 2015. 査読無

Abdeen A, Sonoda H, El-Shawarby R, Takahashi S, **Ikeda M**. Urinary excretion pattern of exosomal aquaporin-2 in rats that received gentamicin. *Am J Physiol Renal Physiol* 307: F1227-F1237, 2014. 査読有

Takahashi S, Muta K, Sonoda H, Kato A, Abdeen A, **Ikeda M**. The role of Cysteine 227 in subcellular localization, water permeability, and multimerization of aquaporin-11. *FEBS Open Bio* 4: 315-320, 2014. 査読有

Higashijima Y, Sonoda H, Takahashi S, Kondo H, Shigemura K, **Ikeda M**. Excretion of urinary exosomal AQP2 in rats is regulated by vasopressin and urinary pH. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1412-F1421, 2013. 査読有

Atochina-Vasserman EN, Biktasova A, Abramova E, Cheng DS, Polosukhin VV, Tanjore H, Takahashi S, Sonoda H, Foye L, Venkov C, Ryzhov SV, Novitskiy S, Shlonimskaya N, **Ikeda M**, Blackwell TS, Lawson WE, Gow AJ, Harris RC, Dikov MM, Tchekneva EE. Aquaporin 11 insufficiency modulates kidney susceptibility to oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F1295-F1307, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計10件)

Hiroko Sonoda, Ahmed Abdeen, and **Masahiro Ikeda**: The decreased excretion of urinary exosomal aquaporin-2 during gentamicin-induced urine concentrating defect in rats. American Society of Nephrology 47th Annual Meeting, Nov. 15, 2014, Philadelphia, PA.

加藤綾華, 園田紘子, 重村可南子, 高橋早樹, **池田正浩**: Unfolded protein response 誘導によるアクアポリン1発現調節. 第157回日本獣医学会, 2014年9月11日, 札幌.

加藤綾華, 園田紘子, 重村可南子, 高橋早樹, **池田正浩**: gentamicin 誘発性腎障害ラットモデルにおける尿中 exosomeAQP2 排泄パターンの変化. 第57回日本腎臓学会, 2014年7月4日, 横浜.

加藤綾華, 田畑達彦, 高橋早樹, 園田紘子, 加藤丈司, 北村和雄, **池田正浩**: 尿毒症モデルの肝障害に対するアドレノメジユリンの保護効果. 第66回日本薬理学会西南部会, 2013年11月16日, 福岡. (日本薬理学会西南部会優秀発表ポスター賞受賞)

森一也, 西村隆慈, 高橋早樹, 園田紘子, **池田正浩**: アクアポリン11の小胞体内Ca<sup>2+</sup>貯蔵量調節メカニズムに関する検討. 第156回日本獣医学会, 2013年9月20日, 岐阜.

海藤文葉, 園田紘子, 高橋早樹, **池田正浩**: 尿中エクソソームに含まれるアクアポリンタンパク質のネフローゼ症候群診断マーカーとしての有用性に関する研究. 第156回日本獣医学会, 2013年9月20日, 岐阜.

**池田正浩**: 細胞内局在型 aquaporin の機能. 第7回トランスポーター研究会年会, 2013年6月15日, 熊本. (招待講演)

Kanako Shigemura, Hiroko Sonoda, Saki Takahashi, Yoshiki Higashijima, **Masahiro Ikeda**: The activation of renal unfolded protein response reduces urinary exosomal aquaporin-1 excretion. American Society of Nephrology 45th Annual Meeting, Nov. 2, 2012, San Diego, CA.

園田紘子, 重村可南子, 高橋早樹, 東島佳毅, **池田正浩**: 腎における unfolded protein response 誘導の尿中 exosome aquaporin-1 による検出. 第6回トランスポーター研究会九州部会, 2012年9月1日, 福岡.

**池田正浩**, 園田紘子, 高橋早樹, 高松夏子, 松崎利行, 石橋賢一: Aquaporin11 結合タンパク質の探索研究. 第7回トランスポーター研究会年会, 2012年6月3日, 京都.

〔図書〕(計3件)

**池田正浩**・伊藤勝昭(2013), 血液に作用する薬 日本比較薬理学・毒性学会(編) 獣医薬理学 近代出版 pp.157-167. (総282ページ)

**池田正浩**(2013), 塩類代謝と腎機能に影響する薬 日本比較薬理学・毒性学会(編) 獣医薬理学 近代出版 pp.168-180. (総282ページ)

**池田正浩**(2013), 腎毒性 日本比較薬理学・毒性学会(編) 獣医毒性学 近代出版 pp.159-167. (総235ページ)

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：急性腎障害に起因する多臓器不全の予防又は治療薬

発明者：池田正浩他3名

権利者：宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2015-036815

出願年月日：2014年2月27日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

(<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/VetPharmacol/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 正浩 (IKEDA, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60281218

(2) 研究協力者

石橋 賢一 (ISHIBASHI, Kenichi, Hiroko),

北村 和雄 (KITAMURA, Kazuo),

加藤 丈司 (KATO, Joji),

松崎 利行 (MATSUZAKI, Toshiyuki),

園田 紘子 (SONODA, Hiroko),

高橋 早樹 (TAKAHASHI, Saki),

高松 夏子 (TAKAMATSU, Natsuko),

東島 佳毅 (HIGASHIJIMA, Yoshiki),

西村 隆慈 (NISHIMURA, Ryuji),

重村 可南子 (SHIGEMURA, Kanako),

海藤 文葉 (KAITO, Ayaha),

田畑 達彦 (TABATA, Tatsuhiko),

森 一也 (MORI, Kazuya),

加藤 綾華 (KATO, Ayaka),

ABDEEN, Ahmed .