

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860149

研究課題名(和文) 水晶体細胞膜のチャネル及び細胞接着の役割を担うアクアポリン0の機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of Rules and Functions with Aquaporin 0

## 研究代表者

中澤 洋介 (Nakazawa, Yosuke)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：60411708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水晶体特異的な水チャネルであるアクアポリン0 (AQPO) の物質透過能および細胞接着能について検討した。

その結果、(1) AQPOは水だけではなくアスコルビン酸を透過することが明らかとなり、(2) AQPO発現L細胞では認められなかった細胞接着が、AQPO発現L細胞同士のみ観察された。

研究成果の概要(英文)：(1) The permeation assay of AQPO was used the stable L-cell line expressing AQPO. As the result, AQPO can permeate ascorbic acid ex vivo, and also indicate that there is a difference between the import and export of ascorbic acid via AQPO channel.

(2) The cell adhesion assay of AQPO was revealed that AQPO could bind directly to the opposing membrane.

研究分野：生物学

キーワード：水晶体 水チャネル 白内障

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 水晶体は、外側をカプセルで覆われており、角膜側に一層の上皮細胞層がある。上皮細胞は赤道部付近で伸長し、水晶体実質の大半を占める線維細胞へと分化し、核やオルガネラを消失しながら徐々に内部へ押し込まれる。そのため、水晶体の細胞は生涯細胞が脱落することのない。また、無血管無神経組織であるため、水やビタミン、酸素といった生命活動に必要な物質は、房水から上皮細胞へ取り込まれ、線維細胞へ拡散される。そのため、上皮細胞-線維細胞、あるいは線維細胞間の接着や物質透過機能の探索は、水晶体透明性維持機構を知る上で非常に重要であると考えられている。

この水晶体が何らかの原因で混濁すると、白内障と呼ばれる疾患となる。白内障は、世界中の盲目の原因の第1位となっている。唯一の治療法は、混濁した水晶体を摘出し人工眼内レンズを挿入する外科的手術であるが、手術後の後発白内障発症など、問題点は数多く残っている。このことから、白内障発症抑制にむけた抗白内障薬の探索は急務であり、そのために水晶体の特性を明らかにすることは大変有意義である。

(2) 水晶体は無血管無神経組織であるが、光学系として機能を果たすため、透明性を維持する必要がある。そのため、水晶体の細胞間での物質移動・輸送は厳密に制御されている。水晶体線維細胞膜には、水晶体特異的な水チャンネルであるアクアポリン 0 (AQP0) が発現しており、60%以上を占めると言われている。この AQP0 は水透過機能だけではなく、水晶体線維細胞の細胞間接着に関与することが示唆されているが、それを直接示したデータは存在しない。

(3) アクアポリンは、哺乳類だけではなく、植物を含む様々な生物でこのチャンネルファミリーの発現が確認されている。その中でも AQP0 は他の AQP ファミリーと比べ水の透過能が極端に低い。AQP0 のチャンネルとしての機能は、C 末端領域のリン酸化や他のタンパク質との相互作用によって制御されている。これまでにいくつかのタンパク質が AQP0 の C 末端領域と結合し、その機能を調節することが報告されているが、いままでも知られていない AQP0 制御機構の存在も示唆されている。AQP0 と結合し、AQP0 のチャンネル機能を制御する新規タンパク質を明らかにすることは、水晶体の細胞間での物質移動・輸送を知る上で有益な情報となる。

近年、AQP0 チャンネルは、水以外にも幾つかの低分子化合物を透過させることが報告されている。AQP0 チャンネルを透過することができる化合物の物性特性を知ることが、AQP0 を標的とした医薬品開発の際の指標の一つとなりうる。

### 2. 研究の目的

本研究では、AQP0 を標的とした新規抗白内障薬の創生を目指し、以下のことを明らかにする。

(1) AQP0 と相互作用し、その機能を調整する新規タンパク質を探索する。

(2) AQP0 チャンネルを透過することができる物質の物性を明らかにする。

(3) AQP0 の細胞間接着能および、細胞間ジャンクション機能を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) AQP0 と相互作用する新規タンパク質の探索

GST に融合させた AQP0 の C 末端領域 (GST-AQP0 Cterm) ペプチドを大腸菌で発現させ、GST-AQP0 Cterm と水晶体抽出物を混合し、GST-pulldown 法により、結合タンパク質の探索を行った。

(2) AQP0 のチャンネル機能解析

AQP0 チャンネルを透過できる物質の物性特徴を解明することを検討するため、AQP0 を恒常的に発現させたマウス線維芽細胞 L 細胞 (L-AQP0) あるいは AQP0 を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた。L-AQP0、あるいは AQP0 発現卵母細胞を異なる物性をもつ低分子化合物で暴露し細胞内輸送能を検討した。具体的な化合物は、ルシファーイエロー (アニオン性低分子) および、DAPI (カチオン性低分子) である。

(3) AQP0 の細胞接着能の解明

AQP0 の細胞接着能の解明を L-AQP0 細胞を用いて検討した。L-AQP0 細胞を二群に分け、一群を CellTracker Red で標識し、一層に培養する。培養後、CellTracker Blue で標識したもう一群を播種し、細胞同士を接着させる。培養後、接着しなかった細胞を除去した後、フローサイトメーターにて、Red/Blue 比を測定し、細胞同士の接着を確認した。

### 4. 研究成果

(1) AQP0 と相互作用する新規タンパク質の探索

AQP0 と相互作用し、その機能を調整する新規タンパク質の探索を GST-pulldown 法を用いて検討した。その結果、水晶体特異的な中間径フィラメントであるフィレンシンが AQP0 と相互作用することが明らかとなり、さらに AQP0 の C 末端領域とフィレンシンの tail 領域で直接結合することが明らかとなった。

(2) AQP0 のチャンネル機能解析

AQP0 チャンネルを透過できる物質の物性特徴を解明することを検討した。その結果、アスコルビン酸は AQP0 チャンネルを透過することが明らかとなったが、ルシファーイエロー (アニオン性低分子) および、DAPI (カチオン性低分子) は AQP0 チャンネルを透過しないことが明らかとなった。

### (3) AQP0の細胞接着能の解明

AQP0の細胞接着能の解明をCellTracker RedおよびCellTracker Blue試薬を用いてflow cytometerにて細胞接着能を検討した。その結果、L-AQP0とベクターコントロールあるいはL-AQP0とAQP1安定発現L細胞の間で接着は認められなかったが、L-AQP0同士のみ組み合わせでのみ接着細胞が観察された。

本研究で、AQP0の物質透過能特性と細胞接着能特性を明らかにすることができた。今後AQP0を標的とした新規抗白内障薬の創生を目指す。

### 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 9 件)

Yosuke Nakazawa, Mikako Oka, Hiroomi Tamura, Makoto Takehana. Effect of hesperetin on chaperone activity in selenite-induced cataract. Open Medicine. 査読あり. *in press*.

Mikako Oka, Yosuke Nakazawa, Noriyasu Hada, Fumiyuki Kiuchi, Yukari Matsushima, Koji Chiba, Makoto Takehana. Evaluation of the inhibitory effects of Rokumigan and Hachimi jioigan on cataract formation in a rat model of streptozotocin-induced type 1 diabetes. Journal of the Japanese Society for Cataract Research. 査読あり. *in press*.

中澤洋介、岡美佳子、田村悦臣、竹鼻眞. アクアポリン0(AQP0)の細胞間接着に関与するアミノ酸の特定. 日本眼科学会誌. 査読なし. 2016(120) 50. URL: <http://www.nichigan.or.jp/member/journal/nggz/index.jsp>

Yosuke Nakazawa, Mikako Oka, Masayasu Bando, Makoto Takehana. Hesperetin prevents selenite-induced cataract in rats. Molecular Vision. 査読あり. 2015 (21) 804-810 URL: <http://www.molvis.org/molvis/v21/804>

Toshiyuki Yamada, Naoki Nanashima, Takeshi Shimizu, Yosuke Nakazawa, Mitsuru Nakazawa, Shigeki Tsuchida. Establishment of a recessive mutant small-eye rat with lens involution and retinal detachment associated with partial deletion and rearrangement of the CryBa1 gene. Biochemical Journal. 査読あり. 2015 (471) 293-305. DOI:10.1042/BJ20150165

Kakio Shota, Nakazawa Yosuke, Funakoshi-Tago Megumi, Tamura Hiroomi. Coffee Modulates the Function of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. Neuroscience and Medicine 査読あり. 2015 (6) 165-174. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/nm.2015.64025>

Mikako Oka, Kazuhiro Umezawa, Yoko Nakajima, Yosuke Nakazawa, Makoto Takehana. Lifespan of mRNA in the Lens. Journal of the Japanese Society for Cataract Research. 査読あり. 2015 (27) 50-62. DOI: <http://doi.org/10.14938/cataract.07-015>

中澤洋介. 水晶体のアクアポリン0の役割および機能に関する研究. 白内障学会誌. 査読なし. 2015 (27) 9-13. DOI: <http://doi.org/10.14938/cataract.07-015>

中澤洋介. フィレンシンによるアクアポリン0(AQP0)の機能解析. 白内障学会誌. 査読なし. 2015 (26) 28-29. DOI: <http://doi.org/10.14938/cataract.26.28>

#### [学会発表](計 8 件)

石森奈奈、中澤洋介、多胡めぐみ、岡美佳子、竹鼻眞、田村悦臣. コーヒーによる白内障抑制効果の検討. 日本薬学会第136年会大会、2016年3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Yosuke Nakazawa, Mikako Oka, Hiroomi Tamura, Makoto Takehana. Effect of interaction between aquaporin 0 and filenxin on the functions of aquaporin 0. The 3rd International Conference on the Lens 2015. 2015年12月6日. ハワイ(米国)

近藤俊介、野間諒太、上田史仁、多胡めぐみ、多胡憲治、柳澤健、中澤洋介、田村悦臣. 脂肪細胞分化におけるRNA helicase DDX5の役割. 第88回日本生化学会大会、2015年12月1日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

岡美佳子、中澤洋介、鹿本泰生、松嶋ゆかり、寺田一樹、千葉康司、竹鼻眞. ヒト脂肪由来幹細胞の水晶体細胞への分化誘導の試み. 第54回日本白内障学会総会/第41回水晶体研究会、2015年9月18日、ミッドランドスクエア(愛知県・名古屋市)

中澤洋介、岡美佳子、田村悦臣、竹鼻眞.  
アクアポリン 0 (AQP0) の細胞間接着に関  
与するアミノ酸の確定、第 54 回日本白内  
障学会総会/第 41 回水晶体研究会、2015  
年 9 月 18 日、ミッドランドスクエア (愛  
知県・名古屋市)

岡美佳子、射場智大、中澤洋介、竹鼻眞.  
水晶体線維細胞分化誘導の試み、第 67 回  
日本細胞生物学会大会、2015 年 6 月 30 日、  
タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

庄子英一、奥みずほ、中澤洋介、岡美佳  
子、竹鼻眞. レーザー虹彩切開術による角  
膜内皮細胞 DNA の障害、第 119 回日本眼科  
学会総会、2015 年 4 月 17 日、ロイトン札  
幌 (北海道・札幌市)

中澤洋介. 水晶体のアクアポリン 0 の役  
割および機能に関する新しい知見 (学術賞  
受賞講演)、第 53 回日本白内障学会総会、  
2014 年 9 月 27 日、TKP ガーデンシティ真  
川 (東京都・品川区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中澤 洋介 (NAKAZAWA Yosuke)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：60411708

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし