

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2005～2009

課題番号：17GS0312

研究課題名（和文） 水輸送を担うアクアポリン水チャネルの機能と制御機構

研究課題名（英文） Function and regulatory system of water transporting aquaporin channels

研究代表者

佐々木 成 (SASAKI SEI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60170677

研究成果の概要（和文）：機能未知のアクアポリン（AQP）の生体内での役割を明らかにするために、遺伝子改変マウスを作成しその形質を解析し、多くの AQP が病態と関わる事が判明した。また AQP の機能制御の分子基盤を、AQP 分子を取り巻く蛋白複合体を同定し明らかにした。この成果により、AQP を制御する方法についての知見を得ることができ、今後の AQP 阻害役の開発に道を開いた。

研究成果の概要（英文）：Physiological roles of AQPs were investigated by generating and analyzing AQP gene targeting mice. Regulatory mechanisms of AQPs were also clarified by identifying AQP-binding protein complexes. These results shed light on development of new drugs modulating the functions of AQPs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	87,600,000	26,280,000	113,880,000
2006 年度	68,200,000	20,460,000	88,660,000
2007 年度	72,100,000	21,630,000	93,730,000
2008 年度	53,200,000	15,960,000	69,160,000
2009 年度	53,200,000	15,960,000	69,160,000
総計	334,300,000	100,290,000	434,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：水チャネル・アクアポリン・水輸送

1. 研究開始当初の背景

生体はその大部分が水から構成されており、当然種々の生命現象の多くは、生理的にも病態的にも水の移動を伴うことによってなされている。1991 年の水チャネルの発見以前は、このような水の移動に水を通すチャネル（アクアポリン）が関わることを認識している研究者は少なかったが、アクアポリン（AQP）研究の進展に伴い、生体内で水の移動が障害されることで起こる病気が、アクアポリン分子の異常として記述できるという、いわばアクアポリン病とも呼べる新

しい概念が生まれつつある。この概念を確固たる新たな学問体系として確立することは、創造的・革新的学問領域を創成する学術創成研究の理念に合致するものと考えられる。

2. 研究の目的

すでにヒトでは 13 種の AQP が存在し、各臓器に分布している事は明らかになっている。しかしながら、その生体内での役割は未だ不明な点が多く、最近では水だけでなく AQP を介した glycerol, 尿素, CO₂, NH₃, H₂O₂ の移動も報告されており、多彩な生命現象を担

っていることが推察される。しかしながら強制発現系での結果の解釈は時として注意を要し、我々は遺伝子改変マウスを使用してその生理的機能を明らかにした。

一方、水の輸送は種々の生体内シグナル伝達系によって調節されており、その制御系の解析も AQP の生体での機能理解にとって重要である。AQP のうち腎臓に存在し、その遺伝子異常で腎性尿崩症を呈することが知られている AQP2 は、バゾプレシン刺激で数分内に細胞内から細胞膜への移動し、これが尿濃縮機構の重要なメカニズムとなっている。しかしながら、AQP2 の細胞内移動の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究では、AQP2 をとりまく分子複合体を明らかにし、それらが AQP2 の細胞内移動のメカニズムにどのように関わるかを分子間相互作用を解析し明らかにした。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスは通常のノックアウトマウス、コンディショナルノックアウトマウス、ならびにヒトでの遺伝子異常を再現するノックインマウスを遺伝子相同組み替えの方法にて作成した。AQP 複合体の解析は、AQP 抗体による免疫沈降物の質量分析による同定や、酵母 two-hybrid 法を使用して行った。候補蛋白が同定された後は、その機能的意義をリボソーム再構成系による機能解析、表面プラズモン共鳴や FRET、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCCS) などによる分子間相互作用解析により検討した。

4. 研究成果

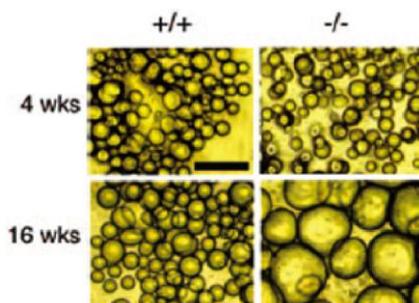
(1) アクアポリンの生体内での役割の解明

アクアポリン遺伝子改変マウスの作成とその解析 (以下要点のみ)。

① AQP7 ノックアウトマウス

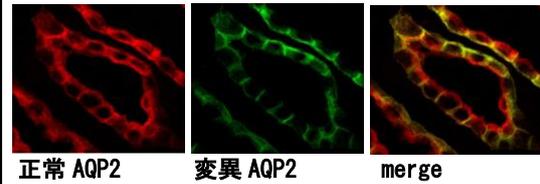
a) AQP7 ノックアウトマウスでは glycerol 尿症を呈する。このことより正常マウスにおいて尿中グリセロール排泄は尿細管障害のバイオマーカーと成り得る事を明らかにした

b) AQP7 ノックアウトマウスでは脂肪細胞の肥大をきたす。



② 尿崩症 AQP2 ノックインマウス

ノックインマウスの正常 AQP2 は変異型 AQP2 の basolateral 側局在に引き寄せられ、脱水時も apical 側への集積が減少。このマウスを用いて本疾患の治療法を明らかにした。

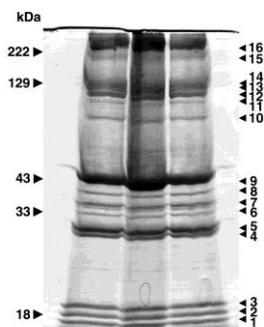


③ スーパーアクアポリンノックアウトマウスの作成と解析

AQP11 ノックアウトの引き起こす嚢胞腎の病態解析により、他の嚢胞腎と共通の分子メカニズムが存在する可能性を明らかにした。膀胱特異的 AQP12 ノックアウトマウスは、膀胱炎症モデルにおいて野生型に比して重症の膀胱炎を引き起こすことが明らかとなり、膀胱尿細胞で発達している小胞体膜上に存在することも明らかにした。AQP11 も腎臓尿細管細胞の小胞体上にあることが判明しており、小胞体にある AQP の生理的役割の解明を今後目指す事となった。

(2) アクアポリンの機能制御の分子基盤の解明

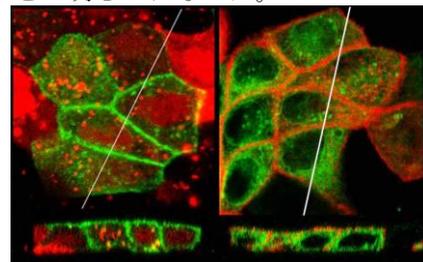
① AQP2 結合蛋白の網羅的同定の試み。



ラット腎髄質からの AQP2 抗体カラムによる AQP2 結合蛋白の単離同定。4: トロポミオシン 5b, 5: AQP2, 9: actin.

② AQP2 細胞内輸送機序の解明。

同定された蛋白のうち、アクチンとトロポミオシンについては、AQP2 がリン酸化されると高親和性にトロポミオシンが結合し、トロポミオシンと結合していた F-actin が脱重合することが明らかになった。



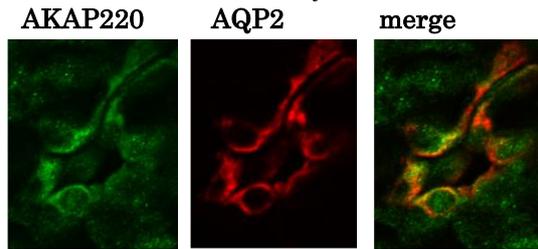
図の説明。緑: AQP2 (左では膜への移動が促進、

右では阻害されている)、赤左: トロポミオシン KD siRNA、赤右: 過剰発現したトロポミオシン。(JCB 2008)。

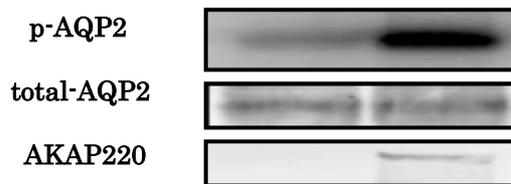
この機序は、輸送体分子がその細胞内移動において、自ら周囲の細胞内骨格分子に働きかけて、自らの進む道を切り開くという、全く新しい概念の細胞内分子輸送機構であり、JCB 誌でも featured article として取り上げられ、国内新聞等でも報道され注目された。

③ その他の AQP2 機能制御機構の解明。

a) AQP2 に結合し PKA によるリン酸化効率を促進する A-kinase anchoring protein (AKAP220) の同定 (Kidney Int 2008)。

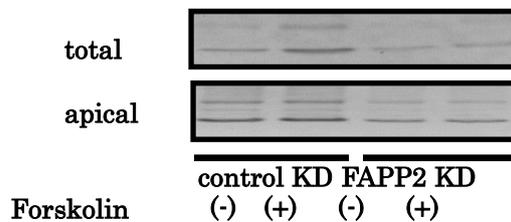


ラット腎集合管での AQP2 と AKAP220 の共存。



AKAP220 は AQP2 と結合し、PKA 依存性のリン酸化を増強する。

b) FAPP2 は trans-Golgi で AQP2 のリン酸化依存性の apical 膜輸送への選別に関わる (AJPCell 2008)。



MDCK 細胞において、内因性の FAPP2 をノックダウンすると、フォスコリンによる AQP2 の apical 膜への移動が完全に阻害された。

5. まとめ

AQP7, AQP11, AQP12 の生体内での役割を遺伝子改変マウスを作成し明らかにした。AQP7 は脂肪細胞からのグリセロール放出と腎臓でのグリセロール再吸収に関わっていることが判明した。AQP11 と AQP12 は小胞体に存在する AQP であることが明らかとなり、その欠損が嚢胞腎と膀胱炎という病態と関わることを示され、小胞体における AQP の重要性が明らかとなった。今後、AQP の小胞体機能における意味を明

らかにする。

AQP の制御機構の解明は主として AQP2 に関して行われた。AQP2 結合蛋白の同定と解析を通して AQP2 の細胞内の種々の部位における制御機構を明らかにした。トランス Golgi では FAPP2 が apical 側へのソーティングに関わり、細胞膜直下の PKA による AQP2 リン酸化には AKAP220 が関わり、このリン酸化をスイッチとして、AQP2 自身が周囲の細胞骨格系を制御して apical 膜への道を切り開くという、全く新しい制御機構を見いだした。その他、優性遺伝形式の AQP2 遺伝子異常による腎性尿崩症の分子病態をノックインマウスを作成し解析したところ、本来 apical 膜にいくべき AQP2 が変異により basolateral 側へ行くことが原因と判明し、治療法として PDE 阻害薬が有効である事を明らかにした。

6. 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 78 件)

- Ohta A, Rai T, Yui N, Chiga M, Yang SS, Lin SH, Sohara E, Sasaki S, Uchida S. Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion and lowers blood pressure. *Hum. Mol. Genet.* 18:3978-86, 2009.
- Ohta E, Itoh T, Nemoto T, Kumagai J, Ko SB, Ishibashi K, Ohno M, Uchida K, Ohta A, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Rai T. Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297:1368-78, 2009.
- Yui N, Okutsu R, Sohara E, Rai T, Ohta A, Noda Y, Sasaki S, Uchida S. FAPP2 is required for aquaporin-2 apical sorting at trans-Golgi network in polarized MDCK cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297:1389-1396, 2009.
- Noda Y, Horikawa S, Kanda E, Yamashita M, Meng H, Eto E, Li Y, Kuwahara M, Hirai K, Pack C, Kinjo M, Okabe S, Sasaki S. Reciprocal interaction with G-actin and tropomyosin is essential for aquaporin-2 trafficking. *J. Cell Biol.* 182:587-601, 2008.
- Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin S-H, Moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S. Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4 D561A/+ knock-in mouse model. *Cell Metab* 5: 331-344, 2007.
- Rai T, Sasaki S, Uchida S: The polarized trafficking of the aquaporin-3 water channel is mediated by an N-Terminal Sorting Signal. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290(1): C298-304, 2006.
- Sohara E, Rai T, Yang SS, Uchida K, Nitta K, Horita S, Ohno M, Harada A, Sasaki S, Uchida S. Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin 2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 14217-14222, 2006.
- Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7 deficient mice: Adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem.* 280(16):15493-15496, 2005.
- Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, Ando 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.
10. Noda Y, Horikawa S, Katayama Y, Sasaki S. Identification of a multiprotein "motor" complex binding to water channel aquaporin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 330: 1041-1047, 2005.
 11. Sohara E, Rai T, Miyazaki J, Verkman AS, Sasaki S, Uchida S. Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(6):F1195-1200, 2005.

〔学会発表〕 (計 265 件)

1. Ohta E, Itoh T, Nemoto T, Kumagai J, Ko S, Ishibashi K, Kawashima M, Uchida K, Ohta A, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Targeted disruption of pancreatic-specific water-Channel, aquaporin-12, results in increased susceptibility to drug-induced acute pancreatitis. World Congress of Nephrology 2009, Milan, May, 2009.
2. Noda Y, Li Y, Eto K, Horikawa S, Sasaki S. Reciprocal interaction with G-Actin and tropomyosin is critical for AQP2 translocation to the apical membrane. The 41st Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November, 2008.
3. Kobavashi K, Ishibashi K and Sasaki S. Neonatal kidneys of AQP11-disrupted mice exhibit enhanced apoptosis followed by a remarkable slowing of cyst-formation by rapamycin treatment. The 5th International Conference of Aquaporin, Nara, July, 2007.
4. Meng H, Noda Y, Yamashita M, Hirai K, Horikawa S, Sasaki S. Comparison between AQP2 and ENaC in intracellular trafficking. The 5th International Conference of Aquaporin, Nara, July, 2007.
5. Sohara E, Rai T, Verkman A.S., Sasaki S, Uchida S. Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. 38th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November 11, 2005.

〔図書〕 (計 15 件)

- ①佐々木 成 編. 水とアクアポリンの生物学. 中山書店, 216pp, 2008.
- ②佐々木 成, 石橋賢一 編. からだと水の事典. 朝倉書店, pp7-8, pp34-38, pp64-70, pp179, 2008.
- ③佐々木 成 編. みずみずしい体のしくみ. クバプロ, 183 pp, 2005.

〔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

<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/aquaporin/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 成 (SASAKI SEI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60170677

(2) 研究分担者

石橋 賢一 (ISHIBASHI KENICHI)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80223022

内田 信一 (UCHIDA SINICHI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50262184

小林 克樹 (KOBAYASHI KATSUKI)

国立病院機構千葉東病院・臨床研究センター・室長

研究者番号：40415451

野田 裕美 (NODA YUMI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：30372436

(H17年度～H19年度迄研究分担者。H20年度～H21年度迄、研究協力者。)