

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460267

研究課題名(和文) アクアポリン2のトラフィックングに重要な分子の同定とトラフィックング機構の解明

研究課題名(英文) Studies on molecules controlling aquaporin-2 trafficking and its mechanism.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓集合管細胞で、バソプレッシンによって細胞内から細胞膜へ移行するアクアポリン2について、269番目のセリン(S269)のリン酸化・脱リン酸化と細胞内トラフィックングに関する解析を、ラットと培養細胞でおこなった。Ser269のリン酸化を認識する抗体について、その特異性を十分に確認し、S269は間違いなく細胞内でリン酸化されることと、脱リン酸化されなくても細胞内へ戻ることが確認できた。また、脱リン酸化酵素としてカルシニューリンの可能性を考え、シクロスポリンによってカルシニューリンを阻害した状態ではS269の脱リン酸化が阻害されるか否かの解析を試みたが、条件設定において更なる検討が必要となった。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin-2 (AQP2) is a water channel protein which traffics between intracellular vesicles and surface plasma membrane in the presence of vasopressin. We analyzed the relationships between phosphorylation-dephosphorylation of serine 269 (S269) and intracellular trafficking both in the rat kidneys and cultured cells. We carefully verified the specificity of the antibody to S269-phosphorylated AQP2, which have been previously produced, and confirmed our results that S269 is phosphorylated intracellularly and AQP2 is internalized even if it is phosphorylated. Then, we focused on the dephosphorylation of S269. We expected the importance of calcineurin as a putative phosphatase. We examined whether S269-dephosphorylation would be delayed in the presence of cyclosporin which is a calcineurin inhibitor. However, further consideration of the experimental protocol is required.

研究分野：基礎医学

キーワード：アクアポリン2 リン酸化 脱リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓で尿量を調節するのに重要なアクアポリン 2 (AQP2) は集合管細胞の細胞内小胞と細胞膜表面との間をトラフィッキングする。生体内バソプレッシン濃度が高い状態ではより多くの AQP2 を細胞膜表面におき、水の再吸収を盛んにおこなう。つまり AQP2 のトラフィッキングは尿量調節においてきわめて重要であり、トラフィッキング機構の破たんは腎性尿崩症を引き起こす。我々はこれまでの研究で、AQP2 のリン酸化状態と細胞内分布の関係を中心に解析をおこなってきた (2010~2012 年度 若手研究 B 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)。AQP2 の細胞内 C 末領域には、バソプレッシンに反応してリン酸化状態を変化させるセリンが 4 か所存在する。このうち 256 番目のセリン (Ser256) と 269 番目のセリン (Ser269) を中心に解析した結果、以下の結果を得ることができた。従来トラフィッキングに重要と考えられていた Ser256 は、バソプレッシン非存在下でもリン酸化されていて、リン酸化されても細胞内にとどまる。一方、Ser269 はバソプレッシン作用時のみ急激にリン酸化され、リン酸化されたアクアポリン 2 はすぐに細胞膜へ移行する。つまり、バソプレッシンによるアクアポリン 2 のトラフィッキングには、Ser256 よりも Ser269 のリン酸化が重要であることが示唆された。しかし、Ser269 のリン酸化がトラフィッキングにおいてどのような役割を果たすかはほとんどわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

AQP2 のリン酸化状態に応じて相互作用する分子が存在し、アクアポリン 2 を細胞内小胞にとどめる、細胞膜へと移行させる、細胞膜に留める、さらには細胞膜から細胞内小胞へ移行させるといった過程をコントロールしていることが考えられる。このような調節因子の一部はわかりつつあるが、全容の解明にはほど遠い。本研究の目的は AQP2 のリン酸化状態の変化とトラフィッキングとの関係を明らかにしつつ、トラフィッキングを調節する因子を探索し、調節機構を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) リン酸化 AQP2 抗体の特異性の再検証

#### ウェスタンブロットによる検証

バソプレッシン投与 30 分後の SD ラットの腎臓を採取し、髄質のホモジネートを作成した。ホモジネートの一部は脱リン酸化酵素である lambda protein phosphatase (PP) で処理し、未処理のホモジネートとともに電気泳動をおこない、ウェスタンブロット解析を行った。

#### 免疫染色による検証

バソプレッシン投与 5 分、30 分後の SD ラットの腎臓を採取し、パラフィン切片を一部は

PP で処理し、一部は処理せずに免疫染色をおこなった。

### (2) 培養細胞を用いた Ser269 のリン酸化がおこる細胞内コンパートメントの解析

培養細胞はブタ腎臓由来の LLC-PK1 細胞を用いた。pcDNA3.1 ベクターまたは pEGFP-C1 ベクターにラット AQP2 の cDNA を組み込み、リポフェクション法でトランスフェクションし、安定的に発現させた細胞を用いた。AQP2 のセリンのリン酸化擬似体としてはセリンをアスパラギン酸に置換したものを、非リン酸化擬似体としてはアラニンに置換したものを PCR により作成した変異 cDNA の発現により解析した。培養細胞はカバーガラス上またはフィルター上で培養し、バソプレッシンまたはバソプレッシン受容体拮抗薬を培地に添加した。種々の時間後に固定し、蛍光抗体法で免疫染色をおこなった。

### (3) 脱リン酸化酵素に関する解析

SD ラットに 5% グルコース・1% エタノール水溶液を 1 晩与えて水負荷状態として以下の実験に用いた。脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの阻害薬であるシクロスポリン、またはコントロールとしてシクロスポリンの溶媒として用いたクレモフォルのみを腹腔に投与して、30 分後にバソプレッシン、さらに 30 分後にバソプレッシン受容体拮抗薬を順次投与し、その 30 分後に腎臓を採取して固定、パラフィン包埋した。免疫染色で AQP2 のリン酸化状態の変化を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) リン酸化 AQP2 抗体の特異性の再検証

我々は AQP2 の Ser269 のリン酸化について、ラットを用いた解析からバソプレッシンに反応して細胞内でリン酸化がおこり細胞膜へ移行すること、さらにバソプレッシン受容体拮抗薬を投与すると Ser269 がリン酸化された状態で AQP2 は細胞内へ取り込まれてくることを示した。しかし過去の報告では、Ser269 がリン酸化された AQP2 は集合管の頂部細胞膜にのみ検出されることが示されており (Moeller et al. 2009)、バソプレッシンによって細胞膜へ移行した AQP2 が細胞膜上のリン酸化酵素によってリン酸化されることが示唆された (Moeller et al. 2014)。したがって、我々の結果を慎重に検討する必要があり、Ser269 リン酸化抗体の特異性と、免疫染色の特異性を再度検証した。まずはウェスタンブロットにおいて、バソプレッシンを投与したラット腎臓のホモジネートを脱リン酸化酵素である lambda protein phosphatase (PP) で処理して解析した結果、未処理サンプルでは検出されたバンドが PP 処理サンプルでは消失した。さらに腎臓組織切片を PP 処理してから抗体を反応させたところ、PP 未処理切片では検出されたシグナルが、PP 処理切片では消失した。バソプレッシン

ン投与直後のサンプルでも PP 処理により細胞内のシグナルが消失したことから、我々の自作抗体の特異性と免疫染色での特異性は問題が無いことが確認できた。さらに過去の文献で用いられていたものと同等と考えられる市販抗体でも検討したが、市販抗体では脱リン酸化酵素で処理した切片でもシグナルが消失しないことから特異性に問題があることがわかり、本研究の遂行にあたっては自作抗体を用いることとした。この結果を受けて、ここまでの結果を学術誌に投稿し、掲載された (Shimizu et al. 2017)。

(2) 培養細胞を用いた Ser269 のリン酸化がおこる細胞内コンパートメントの解析  
ラット腎臓の解析から、AQP2 の Ser269 のリン酸化は細胞内でおこることが示唆された。このことを培養細胞で証明しようと試みた。Ser256 をアラニンに置換した非リン酸化擬似体 (S256A) ではバソプレッシンが作用しても AQP2 は細胞内に留まることが報告されていたこと、また我々の過去の研究で GFP を融合した AQP2 (GFP-AQP2) はバソプレッシンを作用させても細胞内に留まるとの結果を得ていたことから、AQP2-S256A または GFP-AQP2 を用いれば、細胞内で Ser269 のリン酸化がおこるか否かが確認できると考えた。両者を用いてバソプレッシン作用後の Ser269 のリン酸化について検討した。それぞれ cDNA を LLC-PK1 細胞に導入して安定的に発現させ、リン酸化 AQP2 抗体で免疫染色をおこなった。その結果、まず S256A ではバソプレッシンを作用させても明らかに AQP2 は細胞内に留まるが、Ser269 のリン酸化については安定した結果が得られなかった。Ser269 は Ser256 がリン酸化されていないとリン酸化されないとの報告もあるので、目的を達するためには別の変異体を用いる必要がある。GFP-AQP2 については、バソプレッシンを作用させると Ser269 のリン酸化がはっきりと認められた。しかし今回改めて解析すると、バソプレッシンを作用させていない状態で、GFP-AQP2 は細胞膜に移行している可能性が否定できなかったため、やはり Ser269 のリン酸化が細胞内でおこることを示すことはできなかった。LLC-PK1 細胞はバソプレッシン受容体を発現していることから、バソプレッシンの作用を検討するためには優れた培養系であるが、扁平な細胞であるため、細胞内と細胞膜のシグナルを蛍光顕微鏡レベルで解析するには困難を伴うことがわかった。

(3) 脱リン酸化酵素に関する解析  
バソプレッシン投与後、さらにはバソプレッシン受容体拮抗薬投与後の Ser269 のリン酸化・脱リン酸化は急激におこることから、Ser269 のリン酸化のみならず脱リン酸化は AQP2 の細胞内移送にはきわめて重要な事象であることが考えられる。そこで、これまであまり注目されてこなかった脱リン酸化酵

素について解析をおこなった。腎臓尿細管で機能する Na-K-Cl 共輸送体などでは、脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが輸送活性を調節するとの報告があり、AQP2 についてもカルシニューリンの関与が報告されている。カルシニューリンの解析には阻害剤としてシクロスポリンが用いられる。ラットにシクロスポリンを投与してカルシニューリン活性を阻害した状態で、バソプレッシンで Ser269 をリン酸化させ、引き続きバソプレッシン受容体拮抗薬投与後の脱リン酸化過程の変化を検討した。結果は Ser269 の脱リン酸化過程とシクロスポリン投与すなわちカルシニューリン活性阻害の有無との関係は明らかではなかった。問題点として、シクロスポリン投与で実際にカルシニューリンが阻害されていたのか否かの確認が難しいことである。カルシニューリンを検出する 2 種類の抗体で免疫染色したが、シクロスポリンを投与していない個体の腎臓でも染まらなかった。したがって実験方法の更なる検討が必要である。

このように、動物を用いた解析は条件設定等が難しいことから培養細胞での解析もおこなった。AQP2 を安定的に発現させた LLC-PK1 細胞を用いて、まず動物と同様に、バソプレッシン投与後にバソプレッシン受容体拮抗薬を投与することで脱リン酸化過程を解析できるかの確認をおこなった。しかし、現時点ではバソプレッシン受容体拮抗薬の効果が明らかではないことから、シクロスポリンを添加する実験には至っていない。更なる条件設定の検討が必要である。

以上の結果から、AQP2 のリン酸化状態に応じて相互作用する分子についての解析には至らなかったものの、AQP2 の Ser269 のリン酸化の重要性を示すことができた。リン酸化とともに脱リン酸化が AQP2 の細胞内移送に重要な機構であることが想定されるため、脱リン酸化調節機構については今後も検討が必要である。

#### < 引用文献 >

- Moeller et al. *Kidney Int* 75: 295-303 (2009)  
Moeller et al. *J Cell Sci* 127: 3174-83 (2014)  
Shimizu et al. *Arch Histol Cytol* 77: 25-38 (2017)

#### 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7件)

Siree Asvapromtada, Hiroko Sonoda, Minami Kinouchi, Sayaka Oshikawa, Saki Takahashi, Yuya Hoshino, Thitaporn Sinlapadeelerdkul, Naoko Yokota-Ikeda,

Toshiyuki Matsuzaki, and Masahiro Ikeda. Characterization of urinary exosomal release of aquaporin-1 and -2 after renal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 314: F584-F601, 2018. doi: 10.1152/ajprenal.00184.2017, 査読有

Kinue Shimizu, Megumi Sano, Aoi Kita, Nobuhiko Sawai, Akiko Iizuka-Kogo, Hiroshi Kogo, Takeo Aoki, Kuniaki Takata, and Toshiyuki Matsuzaki. Phosphorylation and dephosphorylation of aquaporin-2 at serine 269 and its subcellular distribution during vasopressin-induced exocytosis and subsequent endocytosis in the rat kidney. *Arch Histol Cytol* 77: 25-38, 2017. doi: 10.1679/aohc.77.25, 査読有

Shin Koike, Yasuko Tanaka, Toshiyuki Matsuzaki, Yoshiyuki Morishita, Kenichi Ishibashi. Aquaporin-11 (AQP11) Expression in the Mouse Brain. *Int. J. Mol. Sci.* 17(6), 861 2016. doi: 10.3390/ijms17060861, 査読有

Toshiyuki Matsuzaki, Tomoyuki Yaguchi, Kinue Shimizu, Aoi Kita, Kenichi Ishibashi, Kuniaki Takata. The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions. Review Article, *Anat Sci Int* 92: 187-199, 2017. Doi: 10.1007/s12565-016-0325-2, 査読有

Masahiro Ikeda, Toshiyuki Matsuzaki. Regulation of aquaporins by vasopressin in the kidney. *Vitam Horm* 98: 307-337, 2015. doi: 10.1016/bs.vh.2014.12.008, 査読有

[学会発表](計27件)

谷口明慧, 向後晶子, 向後寛, 横尾聡, 松崎利行. ピロカルピン長期投与が放射線照射による唾液腺機能低下へ及ぼす影響. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018年3月29日

Toshiyuki Matsuzaki. Renal water channel aquaporin-2: phosphorylation and subcellular distribution. The 12th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry. Zhangjiakou, China. Aug 27, 2017

松崎利行. アクアポリンによる体液調節. 日本内分泌学会第35回内分泌代謝学サマナーセミナー. シンポジウム. 2017年7月15日

松崎利行. 蛍光抗体法の基礎と実際. 第42回組織細胞化学講習会. 2017年8月2日

向後寛, 櫻井美久, 大森愛, 向後晶子, 松崎利行. マウス精巣におけるアクアポリン11の局在と機能. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017年3月30日

向後寛, 櫻井美久, 大森愛, 向後晶子, 松崎利行. アクアポリン11欠損マウス精巣の表現型解析. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年12月2日

松崎利行. 初心者のための蛍光免疫染色. 第41回組織細胞化学講習会. 2016年8月3日

喜多碧, 向後寛, 向後晶子, 松崎利行. マウス造血細胞でのアクアポリンの発現. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016年3月28日

谷口明慧, 黒川潤, 本間実, 向後寛, 向後晶子, 横尾聡, 松崎利行. 唾液腺腺房細胞で唾液分泌に必要とされるAQP5、NKCC1、およびTMEM16Aの絶食による発現量変化の検討. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016年3月29日

松崎利行, 喜多碧. 胎仔マウス造血細胞のアクアポリン. 第26回バゾプレシン研究会. 2016年1月9日

喜多碧, 向後寛, 向後晶子, 澤井信彦, 松崎利行. 胎仔期から乳仔期マウスの造血系におけるアクアポリンの発現変化. 日本解剖学会関東支部第103回学術集会. 2015年11月7日

松崎利行. 蛍光抗体法の基礎と応用. 第40回組織細胞化学講習会. 2015年8月5日

Toshiyuki Matsuzaki, Kuniaki Takata. Tissue distribution of water channel proteins (aquaporins and relatives). The second world congress on water channel proteins (aquaporins and relatives) celebrating the 30th anniversary of the discovery of the first water channel protein (later called aquaporin 1). Cluj-Napoca, Romania, 7 May, 2015

松崎利行, 矢口知征, 清水絹恵. ラット、マウスの腎臓近位尿細管におけるアクアポリンの分布局在の再検討. 第55回日本組織細胞化学学会総会・学術集会. 2014年9月28日

松崎利行. 腎臓における水チャネル. 第61

回北関東医学会総会 . 2014 年 9 月 26 日

松崎利行 . 免疫電子顕微鏡法の基本的知識  
と手技 . 第 39 回組織細胞化学講習会 . 2014  
年 8 月 7 日

松崎利行 , 清水絹恵 . アクアポリン 2 のリ  
ン酸化とトラフィッキングに関する検討 .  
第 57 回日本腎臓学会学術総会 . 2014 年 7  
月 5 日

〔図書〕(計 1 件)

松崎利行 : 免疫組織化学法 . ライフサイエ  
ンス顕微鏡学ハンドブック (山科正平 ,  
高田邦昭編) , 朝倉書店 pp 95-101 (総ペ  
ージ数 344) , 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://anatcb.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

## 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 : 3 0 3 3 4 1 1 3

### (2) 研究分担者

向後 寛 (KOGO, Hiroshi)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号 : 2 0 2 8 2 3 8 7

向後 晶子 (KOGO, Akiko)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号 : 2 0 3 4 0 2 4 2

青木 武生 (AOKI, Takeo)  
群馬県立県民健康科学大学・診療放射線学  
部・教授  
研究者番号 : 7 0 1 5 0 9 1 9

澤井 信彦 (SAWAI, Nobuhiko)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 7 0 3 0 7 9 1 6

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし