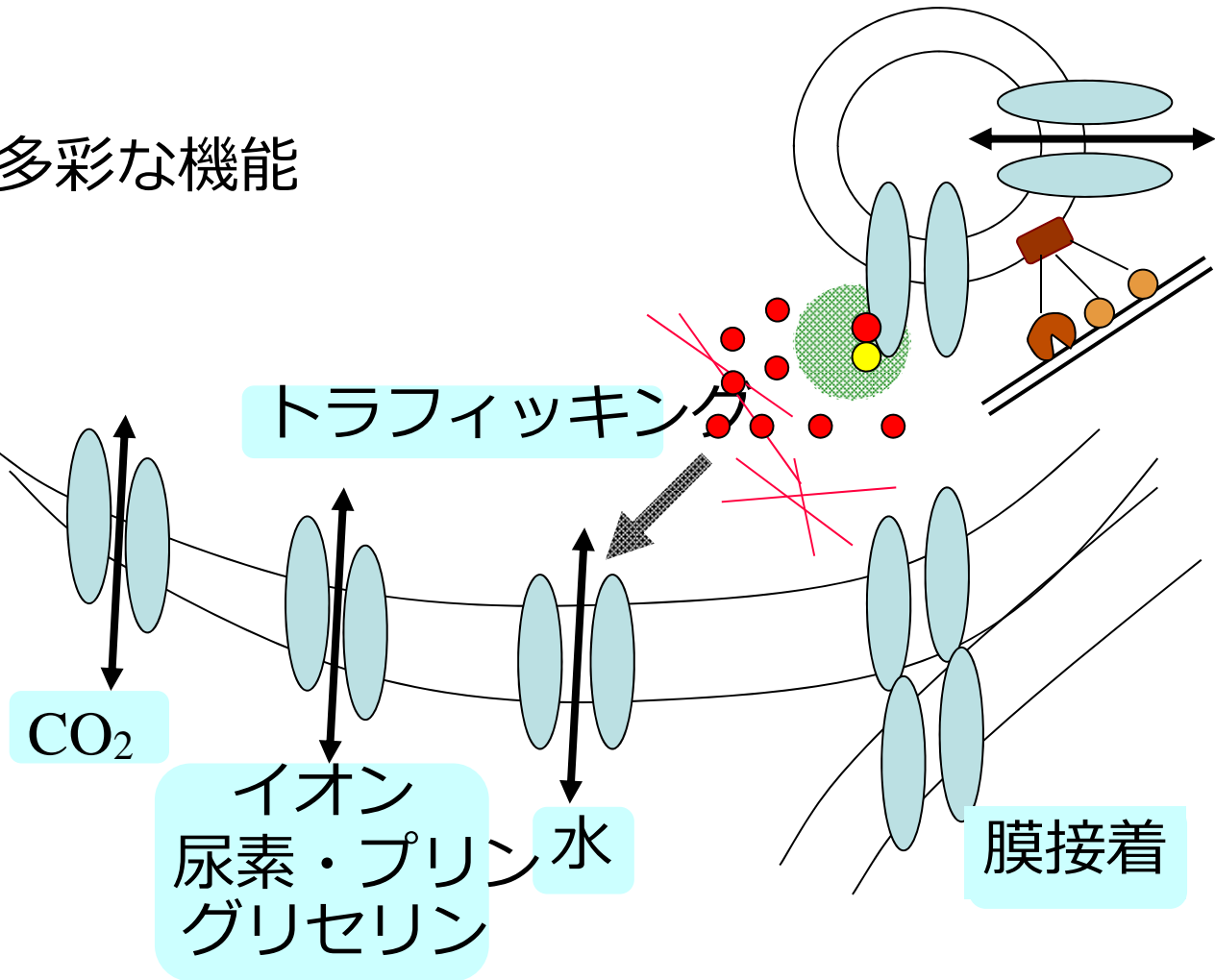


# アクアポリンが切り拓く新しいチャネルの世界

## アクアポリンの多彩な機能

水代謝  
脂肪代謝  
ガス代謝  
細胞接着  
細胞分化・増殖  
細胞遊走



細胞内での制御の解明  
未知の機能の解明・疾患の原因解明



新しいチャネルの  
分子生物学

# 研究の概要

## 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, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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以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ポ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。

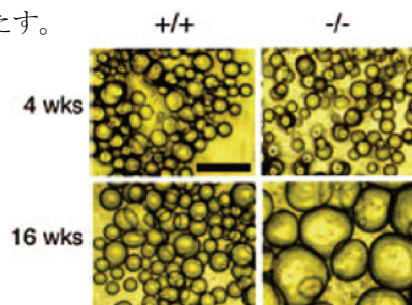
## 4. 研究成果

(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

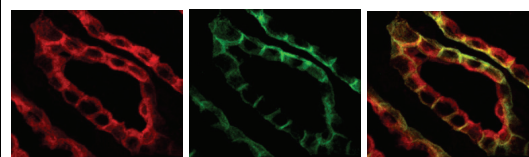
a) AQP7 ノックアウトマウスでは glycerol 尿症を呈する。このことより正常マウスにおいて尿中グリセロール排泄は尿細管障害のバイオマーカーと成り得る事を明らかにした

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。



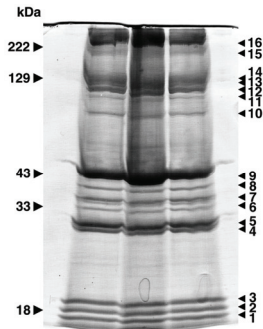
### ③ スーパーアクアポリンノックアウトマウスの作成と解析

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、膀胱惹起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、膀胱尿房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

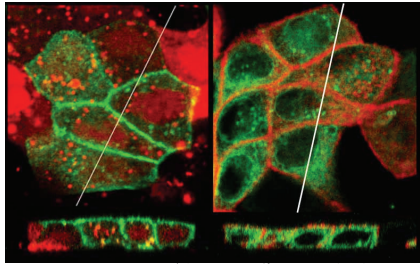
### ① AQP2 結合蛋白の網羅的同定の試み。



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。

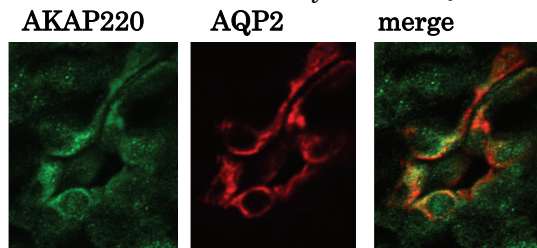


図の説明。緑: AQP2 (左では膜への移動が促進、右では阻害されている)、赤左: トロポミオシン KD siRNA、赤右: 過剰発現したトロポミオシン。(JCB 2008)。

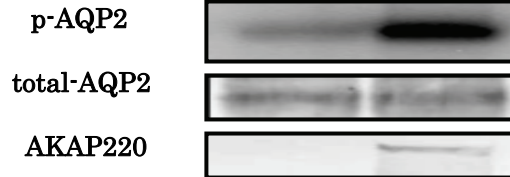
この機序は、輸送体分子がその細胞内移動において、自ら周囲の細胞内骨格分子に働きかけて、自らの進む道を切り開くという、全く新しい概念の細胞内分子輸送機構であり、JCB 誌でも featured article として取り上げられ、国内新聞等でも報道され注目された。

### 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)。

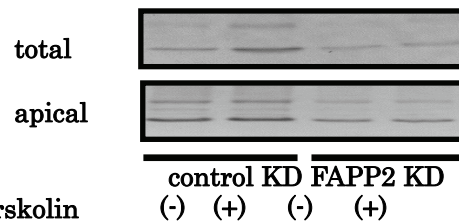


ラット腎集合管での AQP2 と AKAP220 の共存。



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 (AJP Cell 2008)。



MDCK 細胞において、内因性の FAPP2 をノックダウンすると、フォルスコリンによる 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 膜に行くべき 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。

## 業績

1. Noda Y, Sohara E, Ohta E, Sasaki S. Aquaporins in kidney pathophysiology. *Nat. Rev. Nephrol.* 6:168-178, 2010.
2. 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:C1368-C1378, 2009.
3. 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.* 18:3978-3986, 2009.
4. Li YH, Eto K, Horikawa S, Uchida S, Sasaki S, Li XJ, Noda Y. Aquaporin-2 regulates cell volume recovery via tropomyosin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:2466-2476, 2009.
5. 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:C1389-C1396, 2009.
6. Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int.* 74:1403-9, 2008.
7. Okutsu R, Rai T, Kikuchi A, Ohno M, Uchida K, Sasaki S, Uchida S. AKAP220 colocalizes with AQP2 in the inner medullary collecting ducts. *Kidney Int.* 74:1429-33, 2008.
8. 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.
9. Noda Y, Sasaki S. The role of actin remodeling in the trafficking of intracellular vesicles, transporters and channels: focusing on aquaporin-2. *Pflugers Archiv.-Eur. J. Physiol.* 456:737-745, 2008.
10. Noda Y, Sasaki S. Actin-binding channels. *Prog. Brain Res.* 170:551-556, 2008.
11. Sohara E, Ueda O, Tachibe T, Hanai T, Jishage K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Morphologic and functional analysis of sperm and testes in aquaporin 7 knockout mice. *Fertil Steril.* 87(3): 671-676, 2007.
12. Sasaki S, Noda Y. Aquaporin-2 protein dynamics within the cell. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16:348-352, 2007.
13. Tajima M, Hayama A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Barttin binds to the outer lateral surface of the ClC-K2 chloride channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362:858-864, 2007.
14. Yang S-S, 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*<sup>D561A/+</sup> knock-in mouse model. *Cell Metab*5:331-344, 2007.
15. Yakata K, Hiroaki Y, Ishibashi K, Sohara E, Sasaki S, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim Biophys Acta.* 1768(3):688-693, 2007.
16. Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa A, Gyobu N, Nishikawa K, Suzuki H, Walz T, Sasaki S, Mitsuoka K, Kimura K, Mizoguchi A, Fujiyoshi Y. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and

cell adhesion. *J Mol Biol.* 355:628-639, 2006.

17. Nakakoshi M, Morishita Y, Usui K, Ohtsuki M, Ishibashi K. Identification of a keratinocarcinoma cell line expressing AQP3. *Biol Cell.* 98: 95-100, 2006.
18. Ohta A, Yang SS, Rai T, Chiga M, Sasaki S, Uchida S. Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 349: 804-808, 2006.
19. 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.
20. 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.
21. Suda S, Rai T, Sohara E, Sasaki S, Uchida S. Postnatal expression of KLF12 in the inner medullary collecting ducts of kidney and its trans-activation of UT-A1 urea transporter promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 344(1): 246-52 2006.
22. Noda Y, Sasaki S. Regulation of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758:1117-1125, 2006.
23. Suzuki T, Rai T, Hayama A, Sohara E, Suda S, Itoh T, Sasaki S, and Uchida S. Intracellular localization of CIC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *J Cell Physiol,* 206: 792-798, 2006.
24. Hara-Chikuma M, Yang B, Sonawane ND, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS: CIC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation. *J Biol Chem.* 280(2): 1241-1247, 2005.
25. 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.
26. Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SB, Uchida S, Sasaki S, Ishibashi K. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 330(3):832-838, 2005.
27. Kasono K, Saito T, Saito T, Tamemoto H, Yanagidate C, Uchida S, Kawakami M, Sasaki S, Ishikawa SE. Hypertonicity regulates the aquaporin-2 promoter independently of arginine vasopressin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20: 509-515, 2005.
28. Kazama I, Hatano R, Michimata M, Suzuki K, Arata T, Suzuki M, Miyama N, Sato A, Satomi S, Ejima Y, Sasaki S, Matsubara M. BSC1 inhibition complements effects of vasopressin V-2 receptor antagonist on hyponatremia in SIADH rats. *Kidney Int.* 67: 1855-1867, 2005.
29. Kuwahara M, Asai T, Terada Y, Sasaki S. The C-terminal tail of aquaporin-2 determines apical trafficking. *Kidney Int.* 68:1999-2009, 2005.
30. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K, Shibuya H. WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem.* 280(52):42685-42693, 2005.
31. 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.
32. Sakuma Y, Nonoguchi H, Takayama M, Yang T, Terada Y, Inoue T, Nakayama Y, Kohda Y, Sasaki S, Tomita K. Differential effects of hyperosmolality on Na-K-ATPase and vasopressin-dependent cAMP generation in the medullary thick ascending limb and outer medullary collecting duct. *Hypertns. Res.* 28: 671-679, 2005.
  33. 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.
  34. 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.
  35. Morris RG, Uchida S, Brooks H, Knepper MA, Chou CL. Altered Expression profile of transporters in the IMCD of aquaporin 1 knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(1):F194-9, 2005.
  36. Tajika Y, Matsuzaki T, Suzuki T, Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H, Kuwahara M, Sasaki S, Takata K. Differential regulation of AQP2 trafficking in endosomes by microtubules and actin filaments. *Histochem Cell Biol* 124:1-12, 2005.
  37. Li H, Kamiie J, Moroshita Y, Yoshida Y, Yaoita E, Ishibashi K, Yamamoto T. Expression and localization of two isoforms of AQP10 in human small intestine. *Biol Cell.* 97:823-829, 2005.
  38. Noda Y, Sasaki S. Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2. *Biol. Cell.* 97:885-892, 2005.
  39. Takahashi N, Wang X, Tanabe S, Uramoto H, Jishage K, Uchida S, Sasaki S, Okada Y. CIC-3-independent sensitivity of apoptosis to Cl<sup>-</sup> channel blockers in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem.* 15(6):263-270, 2005.
  40. Temmei Y, Uchida S, Hoshino D, Kanzawa N, Kuwahara M, Sasaki S, Tsuchiya T. Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *FEBS Lett.* 579:4417-4422, 2005.
  41. Uchida S, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S. Impaired urea accumulation in the inner medulla of mice lacking the urea transporter UT-A2. *Mol Cell Biol.* 25(16):7357-7363, 2005.
  42. Yamauchi K, Yang SS, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Apical localization of renal K channel was not altered in mutant WNK4 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 332(3):750-755, 2005.
  43. Yang SS, Yamauchi K, Rai T, Hiyama A, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, Suda S, Sasaki S, Uchida S. Regulation of apical localization of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter by WNK4 in polarized epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 330(2):410-414, 2005.
  44. Noda Y, Sasaki S. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: molecular mechanism of water channel aquaporin-2 trafficking. *J. Pharmacol. Sci.* 96:249-254, 2005.
  45. Noda Y, Sasaki S. Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2. *Biol. Cell.* 97:885-892, 2005.
  46. 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.