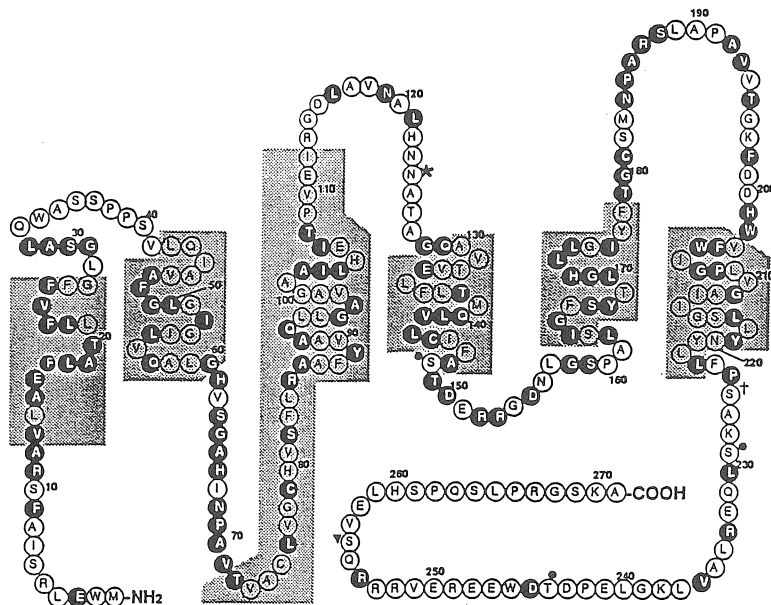


## 9234 水チャネルのクローニング

助成研究者:佐々木 成(東京医科歯科大学 医学部)

共同研究者:伏見 清秀(東京医科歯科大学)

哺乳類を含めて陸上にすむ動物は水を失い高浸透圧になる危険に常に晒されている。これを防ぐために腎において水を再吸収し体液浸透圧を一定に保つ機構が働いている。つまり尿濃縮機構である。尿濃縮機構の基本は、血液浸透圧の上昇に反応して下垂体後葉より抗利尿ホルモン (ADH)が分泌され、ADHが腎集合管に働いて尿細管内腔からの水再吸収を亢進することである。この課程において決定的に重要な働きをするのが集合管の管腔膜に存在する水チャネルである。本助成研究ではこの集合管の管腔膜の水チャネルのクローニングに挑戦し幸いにもcDNAクローンを得ることが出来た。方法としてはPCRクローニングを行ない、ラット腎のcDNAライブラリーより全長のcDNAクローンを得、(WCH-CD)と名付けた。WCH-CDは271個のアミノ酸より成り、以下の図に示すような構造が予想された。WCH-CDは腎集合管のみに発現が観察され、アフリカツメガエル卵での発現実験で水チャネルであることが証明された。





## 9234 水チャネルのクローニング

助成研究者:佐々木 成(東京医科歯科大学 医学部)

共同研究者:伏見 清秀(東京医科歯科大学)

## 研究目的:

哺乳類を含めて陸上にすむ動物は水を失い高浸透圧になる危険に常に晒されている。これを防ぐために腎において水を再吸収し体液浸透圧を一定に保つ機構が働いている。つまり尿濃縮機構である。尿濃縮機構の基本は、血液浸透圧の上昇に反応して下垂体後葉より抗利尿ホルモン (ADH)が分泌され、ADHが腎集合管に働いて尿細管内腔からの水再吸収を亢進することである。ADHは集合管細胞の血管側膜にある受容体に結合し、Gタンパクを介してadenylate cyclaseを活性化し、細胞内のcAMPを増加させる。cAMPはprotein kinase A(A kinase)の活性化を介して管腔膜の近傍に存在する細胞内小胞を管腔膜へ融合させる。この結果細胞内小胞膜上に存在する水チャネルが管腔膜へ挿入されたこととなり、管腔膜の水透過性が亢進する。この様な考え方はshuttle-hypothesis<sup>1)</sup>として広く受け入れられている。

この仮説は、電顕での観察が基盤となっている。Freeze fracture EM法によると膜内に粒子状のもの(intramembrane particle)が存在し、ADH存在下でそれが凝集することが観察されていた。このparticleが水チャネルと想定されている。また生理学的解析より、ADH存在下での高い水透過生はporeの様なものの介在するfacilitated diffusionでなければ説明が不可能であった。このようにして、poreの様なもの、即ち水チャネルは概念として提唱されていたが<sup>1)</sup>、その実体は長く不明であった。

ところが赤血球膜の28Kdのタンパクに注目し研究していたAgreらは、このタンパクのアミノ酸分析に基づいてcDNAクローニングを行なった。クローニングされたアミノ酸配列をデータベース検索すると、MIPファミリーと呼ばれる膜輸送体の一群と相同性が認められた<sup>2)</sup>。(MIP:major intrinsic protein,眼のレンズ細胞の細胞間結合を行なっているタンパク)。そこで彼らは28KdのタンパクをCHIP28 (channel integrated protein)と名付けその機能をアフリカツメガエルで検討したところ水チャネルであることが明らかになった<sup>3)</sup>。しかし免疫染色ではCHIP28は赤血球と腎近位尿細管に存在しており、ADH作用部位の集合管には認められなかった。そこで我々はADH感受性水チャネルのcDNAを得るために研究を行なった。

#### 方法：

MIP, CHIP28のアミノ酸配列を比較し相同性の保たれている配列を基にPCRクローニングを行なった。具体的にはMIP familyにはNPA box と呼ばれる塩基配列が共通して保存されており、この部分に対してdegenerate PCR primerを作成しPCRを行なった。PCRの鋳型は腎髄質のmRNAより作成したcDNAを使用した。PCR産物をプラスミドへサブクローニングし塩基配列を解読した。ほとんどのクローンはCHIP28であったが、そのなかに今までとは異なる未知のクローンが存在した。この未知のPCRクローンをプローブとしてラット腎cDNAライブラリーをスクリーニングしWCH-CD (water channel of collecting duct)と名付けた1.4KbのcDNAクローンを得ることが出来た<sup>4)</sup>。

結果：

### 1. WCH-CDの構造

図1にアミノ酸配列に基づくWCH-CDの構造図を示した。アミノ酸271個 (Mr 28928)より成り、ヒトCHIP28とは42.7%、ラットMIPとは59.1%のアミノ酸の相同性があり、膜6回貫通も他のMIP familyと共通している。細胞外ドメインには1個の糖鎖付着部位が認められた。N端、C端共に細胞内にあると推定され、C端にはprotein kinase A及びCによるリン酸化部位と思われるアミノ酸配列が認められた。また長いC端はCHIP28と全く相同性が無く、この水チャネルの固有の働きに関与していることが推定される。

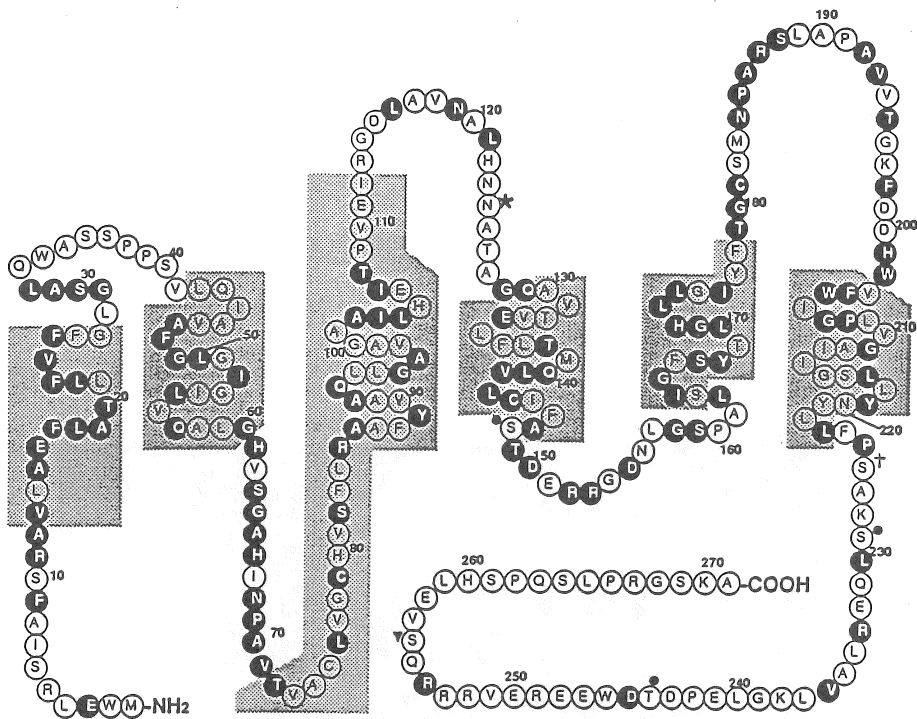


図1。WCH-CDの構造図

### 2. WCH-CDの発現部位

WCH-CDの発現部位を知るためにまずNorthern blot法を行なった。全身臓器を調べたかぎりではmRNAの発現は腎のみに認められた (poly(A) mRNA

10ugを載せたfilterでの検討)。他の臓器、例えば脳、肺、消化管、脾には全く発現は無かった。腎を皮質と髄質に分けると、その発現は髄質で著明に認められた。RT-PCR(reverse transcript PCR)を用いてmRNAの発現をネフロン分画において検討すると、皮質並びに髄質集合管のみに発現が認められ、他の近位尿細管やヘンレーループには認められなかった。

以上の結果は我々の当初の目的どおり、WCH-CDが集合管の水チャネルであることを強く示唆していた。しかしWCH-CDがADH感受性の水チャネルであることの証明には、このタンパクが集合管細胞の管腔膜上に存在すること示す必要があった。そこでWCH-CDのC端の15個のアミノ酸から成る合成ペプチドを抗原として、ウサギを免疫しポリクロナール抗体を作成した。この抗体を使用して免疫染色を行なうと、図2に示すように髄質集合管の管腔膜に強い染色が認められた。皮質集合管においても同様に管腔膜に染色が認められたが、一部の細胞では染色が認められなかった。これはADH感受性水チャネルが集合管の主細胞にのみ存在し、介在細胞には存在しないという生理学的データと一致する所見である。WCH-CDの免疫染色は近位尿細管やヘンレーループなどの他の尿細管には一切認められなかった。

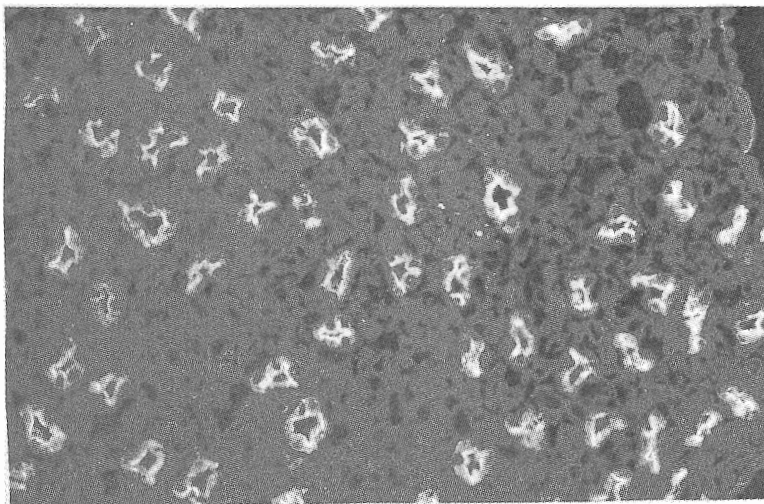


図2。WCH-CDの免疫組織像

### 3. WCH-CDの機能発現

WCH-CDの局在の同定により、WCH-CDがADH感受性水チャネルである可能性がほぼ確かとなったが、本当に水チャネルであるかどうかの機能面での証明も必要である。この目的のためには、WCH-CDのcDNAより*in vitro*でcRNAを作り、これをアフリカツメガエル卵へ注入する。アフリカツメガエル卵は外来性のmRNAを翻訳してタンパクを合成し細胞膜表面に発現する性質を有している。もしWCH-CDが水チャネルならば、WCH-CDのmRNAを打ち込んだ卵において水透過性の亢進が認められる筈である。水の透過性は卵の外液の浸透圧を200より70mOsmへ低下させ、卵が膨張してくるのを画像解析装置で測定し求めた。アフリカツメガエル卵においてcRNAよりタンパクへの翻訳が亢進するためにアフリカツメガエルのb-グロビンの5' と3' 側の非翻訳領域の配列を組み込んだ<sup>3)</sup>。

図3にWCH-CDのmRNAを2ng注入した卵と、対照として水を注入した卵での低浸透圧に対する容量増加のグラフを示した。明らかにWCH-CD注入群で水透過性が亢進していることが示された。計算された浸透圧性水透過性(Pf: osmotic water permeability)はWCH-CD注入群で $145 \times 10^{-4}$  cm/sであり、水注入群の25に比して、約6倍の増加を認めた。またこの増加は水チャネルの阻害剤として知られている水銀剤( $\text{HgCl}_2$ )で抑制されることも観察された。これらの結果はWCH-CDが水チャネルであることを示している。

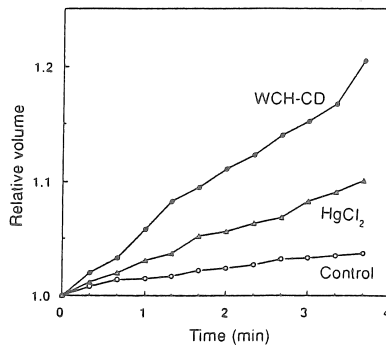


図3。アフリカツメガエル卵でのWCH-CDの機能発現

考察：

タンパクとmRNAの集合管での選択的発現とアフリカツメガエル卵での機能発現により、WCH-CDが長く仮説であった集合管のADH感受性水チャネルであることが明かとなった。このcDNAクローニングが比較的短期間に成功した原因としてはPCRクローニング法を用いたことが挙げられる。PCRクローニング法はあるgene familyの新しいmemberを見つけだすには最も強力で労力が少なくてすむ効率的な方法である。腎は機能分化した臓器であり、腎固有の機能を果たしている。この目的のためには腎特有の輸送体が腎に発現していることが予想される。今回我々がクローニングしたWCH-CDもそのようなものの例の1つであろう。今後この方法を使用することにより更に多くの腎固有の輸送体が同定されるであろう。事実我々は同じ方法を使用して腎ヘンレールのClチャネルのクローニングに最近成功している<sup>5)</sup>。

今後の課題：

WCH-CDのクローニングの成果を基にして今後様々な研究が行なわれると予想される。そのいくつかについて考えてみたい。

1。電顕のintramembrane aggregatesが水チャネルかどうかの確認。Freeze fracture EMでのintramembrane aggregatesが水チャネルであると信じられてきたが、抗体による免疫電顕でこの仮説が検証できるであろう。またADH投与によって水チャネルが細胞内小胞より管腔膜へ移動するとするshuttle仮説も免疫染色法で検証が可能となるであろう。

2。水チャネルの構造と機能の関連。WCH-CDのcDNAに欠損や変異を作成し、そのmRNAをアフリカツメガエル卵に注入し水チャネル活性を測定する。この対比により、水チャネルとしての最低必要単位、チャネルの選



択性決定部位などが明かになるであろう。

3。WCH-CD活性の調節。cAMPにより水チャネルが直接リン酸化されて、機能が変化する可能性も十分考えられる。タンパクのリン酸化の検討とアフリカツメガエル卵での発現実験により解明できる。同様にC-kinaseの関与についても検討できる。

4。腎性尿崩症はADHのV<sub>2</sub>受容体の遺伝子異常であることが最近報告されたが<sup>6)</sup>、WCH-CD遺伝子異常による腎性尿崩症例が存在するかもしれない。ゲノムDNAをPCRで増幅し解析することにより検討できる。

5。水利尿剤の開発。WCH-CDのアミノ酸構造や抗体を利用したスクリーニングによりWCH-CDの活性を抑える物質が見つかるかもしれない。それは純粋な水利尿剤として有用であろう。

クローニングは研究の出発点である。長くその存在が推定されていたADH感受性集合管水チャネルのcDNAクローニングは今後腎濃縮機構の分子・細胞レベルでの研究に大きく貢献することが予想される。

#### 文献：

1. Harris,H.W., Strange,K., Zeidel,M.L.: J. Clin. Invest. 88:1,1991.
2. Preston,G.M., Agre,P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 11110,1991.
3. Preston,G.M., Carroll,T.P., Guggino,W.B., Agre,P.:Science. 256:385,1992.
4. Fushimi,K., Uchida,S., Hara,Y., Hirata,Y., Marumo,F., Sasaki,S.: Nature 361:549,1993.
5. Uchida,S., Sasaki,S., Furukawa,T., Hiraoka,M., Imai,T., Hirata,Y., Marumo,F.: J. Biol. Chem. 268:3821, 1993.
6. Rothenthal,W., Seibold,A., Antaramian,A., Lonergan,M., Arthus,M.F., Hendy,G.N., Birnbaumer,M., Bichet,D.G.: Nature. 359:233,1992.

## **Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule**

**Sei Sasaki, Kiyohide Fushimi, Schinichi Uchida**  
**Second Department of Internal Medicine, Tokyo Medical  
and Dental University**

### **Summary**

Concentrating urine is mandatory for most mammals to prevent water loss from the body. Concentrated urine is produced in response to vasopressin by the transepithelial recovery of the water from the lumen of the kidney collecting tubule through highly water-permeable membranes. In this nephron segment, vasopressin regulates water permeability by endo- and exocytosis of water channels from or to the apical membranes. CHIP28 is a water channel in red blood cells and the kidney proximal tubules. We have performed PCR cloning strategy to obtain a cDNA of the kidney collecting tubule. The obtained cDNA clone (WCH-CD) is 42% identical in amino acid sequence to CHIP28. WCH-CD transcripts are detected only in the collecting tubule of the kidney. Immunohistochemically, WCH-CD is localized to the apical region of the kidney collecting tubule cells. Expression of WCH-CD in *Xenopus* oocytes markedly increases osmotic water permeability. The functional expression and the limited localization of WCH-CD to the apical region of the kidney collecting tubule suggest that WCH-CD is the vasopressin-regulated water channel.