

9334 水チャネルの構造と機能の解析

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)

内田 信一(東京医科歯科大学)

研究目的:我々は1992年度のソルトサイエンス研究財団の研究助成を受け、集合管水チャネルのcDNAクローニングに成功しAQP-CDと名付けた。本年度の研究の目的はこのcDNAクローンを用いてAQP-CDの構造と機能の解析、更には水チャネルファミリーの構造の解析を行なうことである。

方法:AQP-CDのcDNAよりcRNAを作成し、アフリカツメガエル卵へ打ち込み蛋白を発現させ、この卵での水透過性を測定し、蛋白と機能の相関を検討する。cRNAにmutationを入れ、機能、蛋白発現を比較する。

結果と考察:1) AQP-CDは271のアミノ酸より成るが、C末の42個のアミノ酸を除去しても機能に差は認められなかった。水チャネルのporeはこれよりN末に存在している。2) 256番目のセリンがA-kinaseによるリン酸化部位であるが、AQP-CDを発現しているアフリカツメガエル卵にcAMPを投与すると水透過性の亢進が認められた。256番目のセリンをアラニンに変えるとこの効果は消失した。リン酸化が水チャネルの機能を直接的に調節していることが示された。3) システイン残基が4つ存在するが、181番目以外のものにmutationを入れても変化はなかったが、181番目のシステインはアラニンに変えるとHgCl₂による阻害効果が消失した。4) 124番目のアスパラギンに糖鎖が付着するが、グルタミン酸に変えると糖鎖付着は消失した。しかし水チャネル機能は不変であった。これらの事実を積み重ねて水チャネルの構造に迫りたい。

9334 水チャネルの構造と機能の解析

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)

内田 信一(東京医科歯科大学)

研究目的:

我々は1992年度のソルトサイエンス研究財団の研究助成を受け、ラット腎臓の集合管水チャネルのcDNAクローニングに成功しAQP-CDと名付けた¹⁾。本年度の研究の目的はこのcDNAクローンを用いて、site-directed mutagenesisの手法によりAQP-CDの構造と機能の解析、更には水チャネルファミリーの構造の解析を行なうことである。また新しい水チャネルファミリーのメンバーをクローニングし、構造と機能を他のメンバーと比較することにより、さらに水チャネル一般の構造と機能についての理解を深めることを目指す。

方法:

1。構造と機能の解明。

AQP-CDのcDNAよりin vitroでcRNAを作成し、アフリカツメガエル卵へ打ち込み蛋白を発現させ、この卵での浸透圧性水透過性を測定し、蛋白構造と機能の相関を検討する。アフリカツメガエル卵にcRNAを2-20ng注入し、2日間18度でincubation後に水透過性を測定した。水透過性はアフリカツメガエル卵を低浸透圧液に漬けた際の容量増加をビデオモニターで測定し、増加の初期値をコンピューター解析し求めた^{1, 2)}。cRNAにmutationを入れたり、短縮したcRNAやキメラcRNAを作成し、その機能と蛋白発現をwild

typeと比較する。蛋白発現はアフリカツメガエル卵細胞膜蛋白を Western blot法を用いて解析し、発現量と質を確認した。

2. 新しい水チャネルのクローニング。

先にAQP-CDをクローニングしたのと同じ方法¹⁾を使用した。腎の髓質の mRNAを鋳型としてcDNAを合成し、これにPCRクローニング法を行なった。得られた新しいシーケンスを有するPCRクローンをプローベとして腎臓のcDNAライブラリーをスクリーニングし、新しいクローンの全長を得、AQP-3と名付けた。シーケンスによる塩基配列の決定、抗体の作成、Northern blot法と免疫染色による発現部位の同定、更にはアフリカツメガエル卵での機能発現実験を行なった。

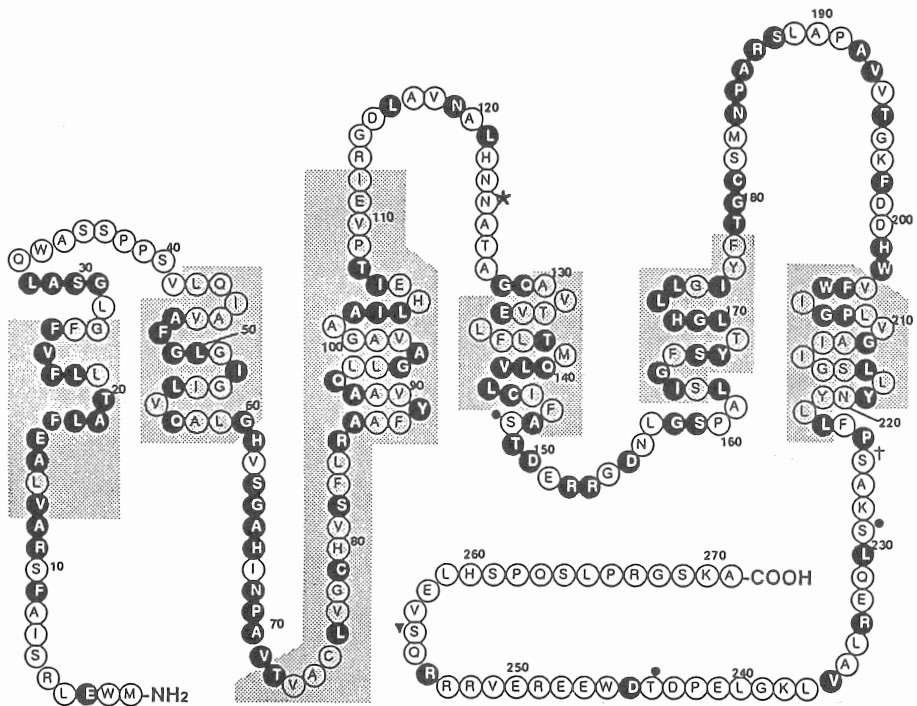


図1。AQP-CDの構造図

結果と考察：

1. 構造と機能の解明。

図1に示すように、AQP-CDは271のアミノ酸より成る^{1, 2)}。どの部位が水チャネルのporeを形成しているかを知るために、先ずC末の短縮を試みた。229番目、239番目、259番目のアミノ酸以降を切り縮めたAQP-CDを発現させても、水透過性には大きな影響は認められなかった。従って細胞内のC端は水チャネルのpore部分の構成には関与していないと考えられた。

256番目のセリンがA-kinaseによるリン酸化部位と予想される。またAQP-CDを発現しているアフリカツメガエル卵にcAMPを投与すると水透過性の亢進が認められた。256番目のセリンをアラニンに変えるとこのcAMPの効果は消失した。またアフリカツメガエル卵に発現させたwild typeのAQP-CD蛋白がin vitroでA-kinaseによりリン酸化されることも確かめられた。以上よりcAMPによるリン酸化が水チャネルの機能を直接的に調節している可能性が示唆された³⁾。このことは集合管においてADHがV2受容体を介して細胞内cAMP濃度を上昇させ、このcAMPが水透過性を上昇させる結果と良く一致する。従来cAMPの作用は水チャネルの細胞内貯蔵部位から細胞膜へのexocytosisを亢進させると信じられてきたが、我々の結果はこれ以外のメカニズムも存在することを示している。このAQP-CDのC端のA-kinaseによるリン酸化部位の配列はその後クローニングしたヒトのAQP-CDにおいても保存されており⁴⁾、その役割の重要性を示唆している。

水チャネルは水銀剤で抑制されることが知られており、その作用部位としてシステインが想定されている。AQP-CDの配列内にはシステインが4つ存在するが、181番目以外のものにmutationを入れても水透過性と水銀剤感受性に変化はなかった。一方181番目のシステインをアラニンに変えるとHgCl₂による阻害効果が消失した。以上より181番目のシステインが水銀剤

の作用部位であり、この部分が水チャネルのpore、ないしはporeの近傍を形成していると考えられた。

124番目のアスパラギンに糖鎖が付着することがそのアミノ酸配列から予想される。このアスパラギンをグルタミン酸に変えると糖鎖付着が消失することをWestern blot法で確認した。興味深いことにこの変異AQP-CDを発現させたアフリカツメガエル卵において水透過性は不変であった。これよりAQP-CDは糖鎖付着蛋白であり、糖鎖は水透過とは直接関連しない機能を果たしていることが示唆された。

今後更にmutationの種類を増やし、また他の水チャネルとのキメラを作成し、水チャネルの構造と機能の関連に迫る予定である。

2. 新しい水チャネルのクローニング。

水チャネルの構造と機能に迫るもう一つのアプローチは、機能が少し異なる水チャネルをクローニングし、そのアミノ酸配列と機能を各々比較し機能特異性を決定している部位を同定することである。この目的のためにAQP3と名付けた新しい水チャネルをラット腎よりクローニングした⁵⁾。

AQP3は279個のアミノ酸より成り、他のMIPファミリーのメンバーと同様に6回の膜貫通領域が認められた。他のMIPファミリー蛋白との相同性を比較すると、大腸菌のグリセロール輸送体(GlpF)と最も相同性が高く(42%)、AQP-CDやAQP-CHIPとは35%位であった。この事実は水チャネルの進化発生を考える上で興味深い⁵⁾。

図2に示すように、AQP3のmRNAの全身分布をNorthern blot法で調べると、mRNAの発現は腎髄質、腎皮質以外に大腸、小腸、胃、脾臓、膀胱に認められた⁵⁾。さらにC端に相当する合成ペプチドに対する抗体を作成し、これを使用した免疫染色によると、腎では集合管主細胞の側底膜に染色が

認められた。集合管主細胞の管腔膜に存在するAQP-CDとは対照的な分布であり、この二つの水チャネルにより、集合管上皮での管腔側から血管側への水の輸送のルートが確定した⁶⁾。腎以外では消化管上皮、膀胱上皮、気管支上皮、脳脈絡膜の各上皮に存在が認められた。従ってAQP3はこれらの組織での水輸送に関与していることが考えられた。

アフリカツメガエル卵での機能発現実験では、水透過性はAQP3発現により10倍増加し、その増加は水銀剤により抑制された。この実験よりAQP3が水チャネルであることが証明され、またAQP3においてもSH基が大切であることが再び明らかとなった。

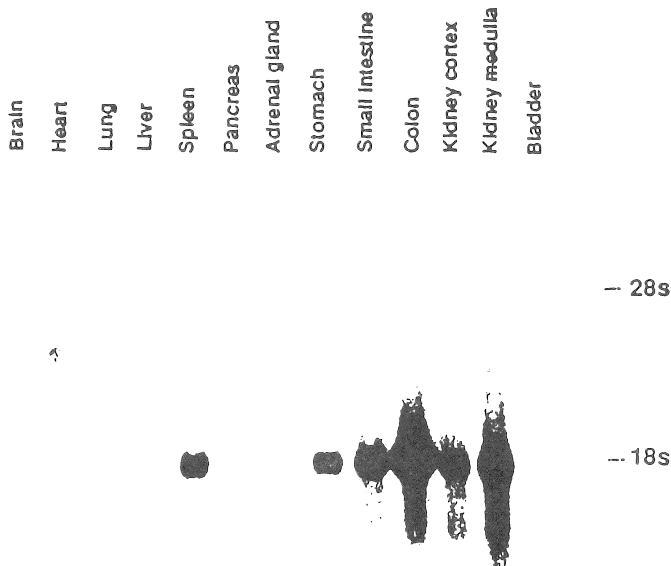


図2。AQP3のNorthern blot法による全身臓器での発現

AQP3のporeの特性を調べるために、グリセロールと尿素のアイソトープラベル体の吸収をアフリカツメガエルで測定した。驚くべきことにグリセロールの透過性はAQP3の発現により4倍増加し、尿素の透過性は2倍増加した。これらの透過性増加は阻害剤であるHgCl₂とphloretinによって抑制された。このことよりAQP3のporeは純粹に水選択的でなく、もう少し大きな溶質であるグリセロールと尿素も通過させることが明らかとなった。しかしイオンやもっと分子径の大きな糖、アミノ酸の透過性は認められなかった。このAQP3の機能特性は水チャネルの構造を考えるうえで大変貴重な手掛かりとなることが予想される。AQP3がGlpFと相同性が高いので、この結果も奇異ではないが、GlpFは水を通過させないので、その差がどのようにしてもたらされるは興味深い。我々は現在AQP-CD, AQP3, AQP-CHIPの色々な部位のキメラ体を作成し、その機能を水透過性、溶質透過性の双方から検討し、pore部位の決定、pore選択性のメカニズムの解明を研究中である。

最近の一連の水チャネルのcDNAクローニングの結果、生体内には多種類の水チャネルが存在し、水輸送の盛んな部位での水輸送に貢献していることが明らかとなった⁷⁾。また今回のAQP3のクローニングで示されたように水チャネルの機能も均一でないことも分かった。今後水チャネル蛋白の構造と機能の関連の研究が進展するならば、各種組織での水輸送の特性も明らかとなり、その異常による病態の存在も明らかとなってくることが予想される。そのような研究の発展に備えてヒトのAQP-CDの遺伝子の染色体上での部位⁸⁾と構造⁹⁾についても解析を進めた。今後さらにこのチャネルとしてはユニークな水チャネルの実体を明かにして行く予定である。

文献：

1. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S: Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361:549, 1993.
2. Fushimi K, Sasaki S, Yamamoto T, Hayashi M, Furukawa T, Uchida S, Kuwahara M, Ishibashi K, Kawasaki M, Kihara I, Marumo F: Functional characterization of AQP-CD water channel in the kidney collecting duct. *Am. J. Physiol.* in press
3. Kuwahara M, Sasaki S, Fushimi K, Marumo F: Protein kinase A regulates water channel of kidney collecting duct expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4:855, 1993.
4. Sasaki S, Fushimi K, Saito H, Saito F, Uchida S, Ishibashi K, Kuwahara M, Ikeuchi T, Inui K, Nakajima K, Watanabe TX, Marumo F: Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct. *J. Clin. Invest.* 93:1250-1256, 1994.
5. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, Marumo F: Molecular cloning and wxpression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrare of the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press
6. Sasaki S, Fushimi K, Ishibashi K, Marumo F: Water channels in the kidney collecting duct. *Kidney Int.* in press
7. Sasaki S, Fushimi K, Marumo F: The apical membrane water channel of collecting ducts. *Exp. Nephrol.* in press

8. Saito F, Sasaki S, Chepelinsky AB, Fushimi K, Marumo F, Ikeuchi T: Human AQP-2 and MIP genes, two members of the MIP family, map within chromosome band 12q13 using two-color FISH. *Cytogenet. Cell Genet.* in press
9. Uchida S, Sasaki S, Fushimi K, Marumo F: The isolation of human aquaporin-CD gene. *J Biol. Chem.* in press

Analysis of Structure and Function of Water channel Proteins

Sei Sasaki, Kiyohide Fushimi, Shinichi Uchida

Second Internal Medicine, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Summary

Receiving 1992 Research Grant from the Salt Science Research Foundation, we have succeeded in cloning of the ADH-regulated collecting duct water channel and named it AQP-CD. The aim of the study this year was to get insight into the relationship of protein structure and function of this protein. Two approaches were adopted; 1) site-directed mutagenesis of AQP-CD and its functional assay in the *Xenopus* oocytes, and 2) cloning of another water channel protein and comparison of sequences and functions with AQP-CD.

From site-directed mutagenesis study, several observations were made. 1) Removal of up to 42 amino acids of C-terminal did not affect its water channel function, implying this portion does not constitute water channel pore. 2) Mutation of 256-Ser inhibited the response of AQP-CD to exogenous cAMP, implying direct regulation of water channel function by phosphorylation by A-kinase. 3) 181-Cys was the site where HgCl₂ affect its inhibitory action, implying this area may compose water channel pore.

From cloning study, we obtained another water channel protein, and named it AQP3. AQP3 is 279-amino acid protein which belong to MIP family with homology to AQP-CD 34%, *E. coli* glycerol facilitator 42%. Its localization distributes kidney collecting duct basolateral membrane, GI tracts, bladder, choloid plexus. Functional assay confirmed its water channel function, but it also showed that AQP3 transports glycerol and urea. This functional characteristics is distinct from other water channels, and may offer a key clue for the identification of the filter of water channel.