

9433 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：桑原 道雄 (東京医科歯科大学 医学部)

伏見 清秀 (東京医科歯科大学 医学部)

柏立群 (東京医科歯科大学 医学部)

研究目的：我々はADH感受性である水チャネル、AQP2をクローニングし、さらに集合管側底膜に存在するhouse-keepingタイプの水チャネル、AQP3もクローニングした。この二つのアクアポリン (水チャネル) のアミノ酸配列を比較すると、AQP2にA-kinaseによりリン酸化されるアミノ酸配列が認められ、AQP3には認められなかった。本年度の研究の目的はAQP2について、1) アフリカツメガエル卵に発現させたAQP2蛋白のチャネル機能がcAMPで変化するか、2) AQP2蛋白が実際にin vitro, in vivoでA-kinaseによりリン酸化されるかどうかを調べることである。

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。in vitro, in vivoでAQP2蛋白のA-kinaseによるリン酸化を調べた。

結果と考察：AQP2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、水透過性は亢進しAQP2のチャネル機能はcAMPによって刺激されると考えられる。256番目のセリンを他のアミノ酸に置換した変異AQP2ではcAMPの効果は認められなかった。in vitroでAQP2はA-kinaseによりリン酸化され、このリン酸化は正常タイプのAQP2でのみ認められ、変異AQP2では認められなかった。AQP2蛋白のA-kinaseによるリン酸化はチャネル活性を直接調節していることが明らかとなった。

9433 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：桑原 道雄 (東京医科歯科大学 医学部)

伏見 清秀 (東京医科歯科大学 医学部)

柏立群 (東京医科歯科大学 医学部)

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に存在し、ADH感受性である水チャネルをクローニングしAQP2と名付け^{1, 2)}、さらに集合管側底膜に存在するhouse-keepingタイプの水チャネル、AQP3もクローニングした³⁾。この二つのアクアポリン (水チャネル) のアミノ酸配列を比較すると、AQP2のC末の細胞内ドメインにA-kinaseとC-kinaseにより燐酸化されるアミノ酸配列が認められ、AQP3には全く認められなかった。AQP2はADH感受性で⁴⁻⁶⁾、調節型のアクアポリンであることを考え併せるならば、燐酸化によってチャネル機能が調節されている可能性が考えられる。

本年度の研究の目的はAQP2について、1) アフリカツメガエル卵に発現させたAQP2蛋白のチャネル機能がcAMPで変化するかどうかの確認、2) AQP2蛋白が実際にin vitro, in vivoでA-kinaseにより燐酸化されるかどうか、また燐酸化されるならば、それはどのアミノ酸残基であるかの確認を目的とする。

方法：

1。AQP2蛋白の機能発現。

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

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, 3, 4)}。cRNAはAQP2のcDNAよりin vitroで合成した。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ので、このセリンをアラニン、ロイシン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換した変異cDNAを作成し、このcRNAも打ち込み、機能を測定した。cAMPの効果は浴液に0.5mMの8-(4-chlorophenylthio)-cAMPと50 μMのforskolinを加えるか、あるいは卵に1mMのcAMP液を20nl直接注入し、時間経過とともに効果を測定した⁷⁾。

2。Western blot法。

AQP2蛋白の解析はAQP2を発現しているアフリカツメガエル卵細胞膜分画、ラット腎髄質の細胞膜分画をとり、SDSPAGEにて泳動し、ビニール膜に移動する。この膜上のAQP2をAQP2のC端に対する抗体を使用して検出した。ミュータントのAQP2の発現も同様に確認した。抗体の認識部位は変異挿入部と離れており、抗体の認識には問題はなかった。

3。AQP2のリン酸化。

in vitroのリン酸化はアフリカツメガエル卵に発現しているAQP2をA-kinaseのcatalytic subunitと³²P-ATPと共に反応させ、抗AQP2抗体で免疫沈降後にSDSPAGEを行い、オートラジオグラフィーで検出した。in vivoのリン酸化はラット腎髄質を細片化し37℃で2時間³²P-orthophosphateと反応させ、その後cAMPとさらに反応させた後に組織を可溶化し、上述のように免疫沈降、SDSPAGEを行った。またリン酸化されるアミノ酸基を決めるために、³²Pでリン酸化したAQP2蛋白を加水分解し、coldのリン酸化アミノ酸と共に薄層クロマトグラフィーで泳動し、検討した。

結果と考察：

AQP2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、図1に示すように水透過性は亢進した。cAMPを浴液に加えた場合も、直接卵に注入した場合も同程度の亢進が認められ、30分をピークとする時間経過も同じであった⁷⁾。従ってAQP2のチャネル機能はcAMPによって刺激されると考えられる。

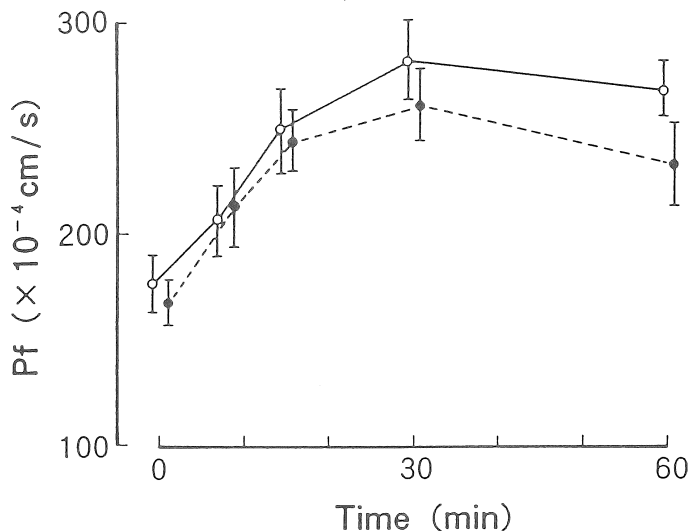


図1 AQP2に対するcAMPの効果

さらにこのcAMPの効果は256番目のセリンのA-kinaseによる燐酸化によるかどうかを検討するため、このセリンをアラニン、ロイシン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換した変異AQP2を発現させ、cAMPの効果と同様に調べた。その結果の一部を図2に示すが、正常AQP2ではcAMPにより水透過性は約50%亢進したが、変異AQP2ではそのような効果は全く消失していた⁷⁾。以上の結果は256番目のセリンがcAMPの効果発現に決定的な役割を果たしていることを示している。

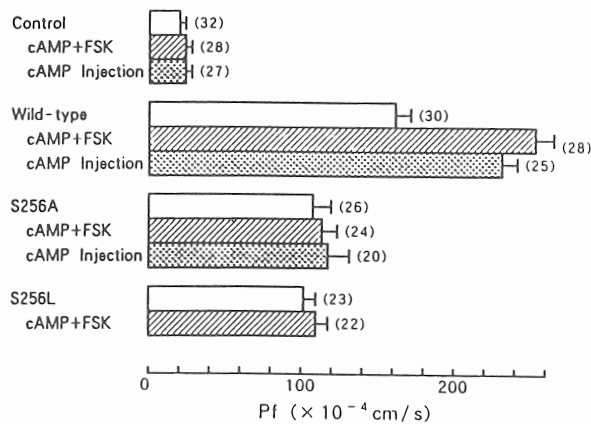


図2。正常ならびに変異AQP2に対するcAMPの効果

以上の結果は256番目のセリンの大切さを示唆しているが、他の可能性としては、これらの変異AQP2では蛋白の発現が少ないことが考えられる。Western blot法を用いて蛋白発現量を検討すると、正常・変異AQP2共に同程度の発現量であった⁷⁾ (図3)。

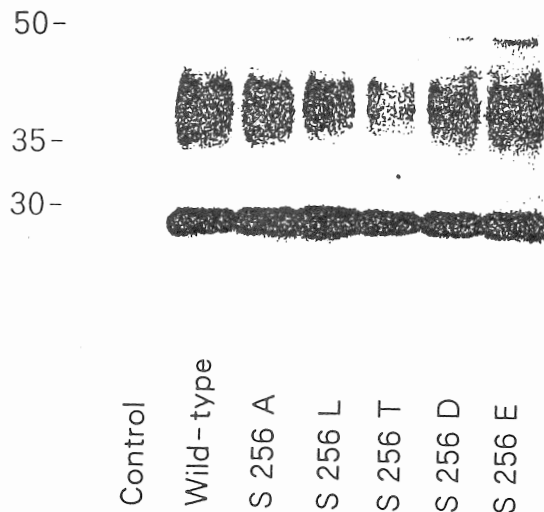


図3。Western blotによるAQP2発現の確認

次にin vitroでのAQP2蛋白のA-kinaseによる磷酸化の実験の結果を図4上段に示す。磷酸化は時間依存性であり、その経過は図1の水透過性亢進と良く一致しており、磷酸化が水透過性亢進と結び付いていることを示唆している。図4下段では磷酸化が正常タイプのAQP2でのみ認められ、変異AQP2では認められないことを示しており、確かに256番目のセリンがA-kinaseのターゲットであることを示している⁷⁾。

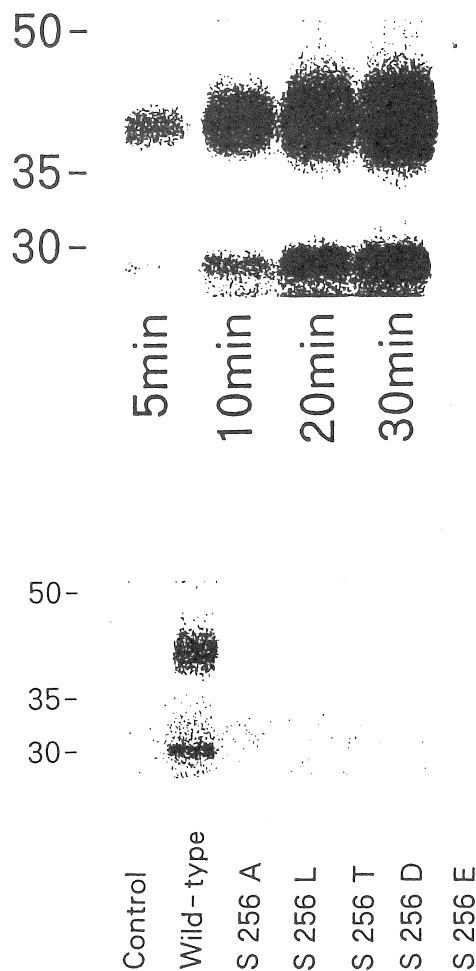


図4。AQP2蛋白のin vitroでの磷酸化

最後に磷酸化されるアミノ酸基の分析結果を図5に示すが、セリンが磷酸化されており、上述の結果を再確認することが出来た。

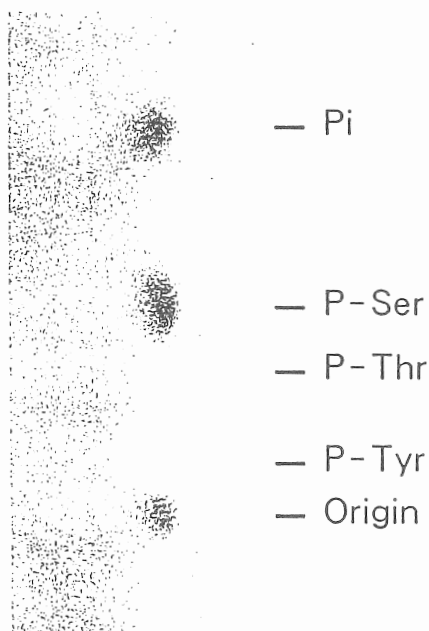


図5。磷酸化アミノ酸の検討

以上の結果はAQP2が調節型、AQP3がhouse-keeping型のアクアポリンであるという考え方と良く一致する⁸⁾。AQP2蛋白の磷酸かはチャネル活性の上昇だけではなく、AQP2蛋白の細胞内移動にも関与している可能性もあり、今後検討する予定である。AQP2とAQP3の機能、発現の差異は興味深く、我々は染色体遺伝子のクローニングも行い、この差異を種々の観点から検討を加えていく予定である^{9、10)}。またAQP2、AQP3へのsite-directed mutagenesisを行い機能との相関を調べる研究、さらにはドメイン毎のキメラ作成の仕事も進行中であり、この様な研究の積み重ねにより、アクアポリンのチャネルの実体が明らかにされると期待される。

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. 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.
3. 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.* 91:6269-6273, 1994.
4. 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.* 267:F573-F582, 1994.
5. Hayashi M, Sasaki S, Tsuganezawa H, Monkawa T, Kitajima W, Konishi K, Fushimi K, Marumo F, Saruta T: Expression and distribution of aquaporin of collecting duct are regulated by vasopressin V2 receptor in rat kidney. *J. Clin. Invest.* 94:1778-1783, 1994.
6. Yamamoto T, Sasaki S, Fushimi K, Ishibashi K, Yaoita E, Kawasaki K, Marumo F, Kihara I: Vasopressin increases AQP-CD water channel in the apical membrane of collecting duct cells without affecting AQP3 distribution in

Brattleboro rat. *Am. J. Physiol.* in press

7. Kuwahara M, Fushimi K, Terada Y, Bai L, Marumo F, Sasaki S: cAMP-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 270:10384-10387, 1995.

8. Sasaki S, Fushimi K, Ishibashi K, Marumo F: Water channels in the kidney collecting duct. *Kidney Int.* in press.

9. Uchida S, Sasaki S, Fushimi K, Marumo F: The isolation of human aquaporin-CD gene. *J Biol. Chem.* 269:23451-23455, 1994.

10. Inase N, Fushimi K, Ishibashi K, Ichioka N, Uchida S, Sasaki S, Marumo F: Isolation of human AQP3 gene. *J. Biol. Chem.* in press.

Analysis of Structure and Function of Water channel Proteins

Sei Sasaki, Michio Kuwahara, Kiyohide Fushimi, Liqun Bai

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

Summary

Among aquaporins AQP2 is the vasopressin regulated water channel. Vasopressin causes cAMP production in renal collecting duct cells, this is believed to initiate a series of events leading to an dramatic increase in water permeability of the apical membrane of this cell. AQP2 contains a consensus sequences for cAMP dependent protein kinase. To determine the role of this site, Ser256 was substituted for Ala, Leu, Thr, Asp, or Gly by site-directed mutagenesis. Incubation with cAMP plus forskolin or direct cAMP injection into the oocytes increased Pf of wild-type, but not mutated, AQP2-expressing oocytes, whereas the amount of AQP2 expression were similar in wild and mutated types as identified by Western blot analysis. In vitro phosphorylation studies showed that cAMP dependent protein kinase phosphorylated wild-type, but not mutated AQP2 proteins. Phosphoamino acid analysis revealed that this phosphorylation occurred at the serine residue. These data suggest that cAMP stimulates water permeability of AQP2 by phosphorylation. This process should contribute to the vasopressin-regulated water permeability of kidney collecting ducts.