

9 6 4 2 水チャネルの構造および機能発現に関する研究

助成研究者：桑原 道雄(東京医科歯科大学 医学部)
 共同研究者：石橋 賢一(青梅市立総合病院)
 伏見 清秀(東京医科歯科大学 医学部)

アクアポリン(aquaporin, AQP)とは水チャネル機能を有する一群の蛋白の総称である。AQPはほぼ全身の組織に分布して膜を介する水輸送に重要な役割を果たしており、現在までに、哺乳類ではAQP1から5までの5種のAQPがクローニングされている。AQP4を除くAQPはいずれも水銀によって水チャネル機能が阻害されることが知られている。AQP3は共同研究者の石橋が1994年にクローニングした水チャネルで、腎では集合管の血管側膜に存在し、腎による水バランスの調節に重要な役割を果たしている。AQP3は水の他にグリセロールや尿素といった小分子も通すという、アクアポリンファミリーの中でも特異な性質を有している。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたAQP2とAQP3の浸透圧水透過性(Pf)に対する水銀効果を比較したところ、AQP2のPf減少が50%でAQP3のPf減少が30%であったことより、AQP2に比してAQP3は相対的に水銀耐性であることが示された。AQP3のどのシスチン残基が水銀感受性であるかを検討するため、6つシスチン(Cys-11、Cys-29、Cys-40、Cys-91、Cys-174、Cys-267)をセリンで置換した変異体で検討したところ、Cys-11が水銀感受性シスチンであることが判明した。AQP1やAQP2においては、水銀感受性シスチンを大きな側鎖を有するトリプトファンで置換することによって水チャネル機能が消失することから、水銀感受性シスチンが水チャネル孔の形成に関わっていることが示唆されている。しかし、AQP3においてはCys-11をトリプトファンで置換した変異体(C11W)においても、Pfは野性型AQP3と同等であったことから、AQP3では、水銀感受性シスチンが水チャネル孔の形成に関わっていないと考えられた。AQP3のチロシン212(Tyr-212)は、AQPファミリーに共通に保存された2nd Asn-Pro-Ala配列(NPAボックス)から3つ上流のアミノ酸であり、AQP1、AQP2の水銀感受性シスチン部位に相当する。このTyr-212をシスチンで置換したY212Cでは水銀によるPf阻害は増大し、トリプトファンで置換したY212Wでは、Pfは対照のPfのレベルまで低下して水チャネル機能が失われた。以上より、Tyr-212が水チャネル孔形成に関与していることが示唆され、2nd NPAボックス周辺のアミノ酸が水チャネル孔形成に関わるというAQP1、AQP2で示された知見がAQP3にもあてはまることが示唆された。Tyr-212変異体AQP3のPglyを測定した結果は、シスチン置換で水銀感受性が増大した点やトリプトファン置換で透過性が失われる点が、Pf測定結果とまったく一致した。Pglyの活性化エネルギーは4.5kcal/molであり、グリセロールがチャネルにより輸送される際のエネルギーに合致していた。以上のから、水とグリセロールが同一のAQP3チャネル孔を共有することが示唆された。

9 6 4 2 水チャネルの構造および機能発現に関する研究

助成研究者：桑原 道雄(東京医科歯科大学 医学部)
共同研究者：石橋 賢一(青梅市立総合病院)
伏見 清秀(東京医科歯科大学 医学部)

研究目的

アクアポリン(aquaporin, AQP)とは水チャネル機能を有する一群の蛋白の総称である。AQPはほぼ全身の組織に分布して膜を介する水輸送に重要な役割を果たしており、現在までに、哺乳類ではAQP1から5までの5種のAQPがクローニングされている。

AQP4を除くAQPはいずれも水銀によって水チャネル機能が阻害されることが知られている。この阻害効果は、水銀がシステイン残基に作用してAQP蛋白の構造変化をもたらすためと考えられている。パンプレシン感受性AQPであるヒトAQP2の構造模式図を図1Aに示した(1)。AQP2は6回膜貫通型の蛋白で、このファミリーに共通に保存されたAsn-Pro-Ala(NPA)配列(NPAボックス)を2箇所所有している。システインは4箇所に存在し、このうち2nd NPAボックス近傍のCys-181が水銀作用部位であることが示されている(2)。また、Cys-181を大きな側鎖をもつトリプトファンで置換すると水チャネル機能が失われる。この結果はCys-181を含む2nd NPAボックス周辺のアミノ酸が水チャネル孔の形成に関与し、トリプトファン側鎖が水チャネル孔形成を阻害したためと解釈されている。AQP1においても同等の部位にシステインが存在し、同様の結果が報告されている。

AQP3は共同研究者の石橋が1994年にクローニングした水チャネルで、腎では集合管の血管側膜に存在し、腎による水バランスの調節に重要な役割を果たしている(3)。AQP3は水の他にグリセロールや尿素といった小分子も通すという、アクアポリンファミリーの中でも特異な性質を有している。また他のAQPとのアミノ酸相同性が比較的低く、たとえばAQP2との相同性は34%である。以上からAQP3が構造の点からも他のAQPと異なっている可能性が示唆されるが、今まで機能と構造に関する研究はほとんどなされていない。図1BにヒトAQP3の構造模式図を示した。AQP3も水銀感受性があることが知られているが、AQP2のCys-181に相当する部位にシステインは存在せず、水銀感受性システインがどの部位であるかは不明である。

本研究は、AQP3の機能と構造との関係を明らかにすることを目的とした。具体的には、AQP3において、AQP2との水銀感受性に差があるかどうか、水銀感受性システインがどの部位であるか、水チャネル孔部位がAQP1やAQP2と同様に2nd NPAボックス周辺にあると推定されるのか、水と小分子が同じチャネル孔を共有しているのか、という4点について検討した。

研究方法

1. AQP3変異体の作製

AQP3発現ベクター(pAQP3/ev1)を鋳型として、変異を含んだDNAフラグメントを polymerase chain reaction (PCR)を用いて作製した。AQP3発現ベクターの *Cla*I認識部位と *Bgl*II認識部位(nucleotide 932)の間を変異を含むフラグメントで置換した。変異はDNAシーケンサーにて確認した。AQP2とAQP3cRNAは *Not*Iで切断したAQP cDNAを用いて、T3 RNA polymeraseにて作製した。

2. アフリカツメガエル卵母細胞の浸透圧水透過性とグリセロール透過性の測定

卵母細胞に、40 nlの水または3ngのAQP2cRNA、5ngのAQP3cRNAを注入し、Barth's buffer中で20°Cにて48時間インキュベーションした後に測定を行なった(1,4)。浸透圧水透過性(Pf)を求めるため、卵母細胞を200 mOsm から70 mOsmの溶液へ移した際の細胞容積の変化を、CCDカメラと面積測定装置を用いて0.5秒おきにモニターした。Pfは、最初の15秒間の細胞容積変化より求めた。グリセロール透過性(Pgly)は、¹⁴C-グリセロールの取り込みから求めた。卵母細胞を2分間¹⁴C-グリセロールとインキュベーションし、10%SDSで細胞膜を溶解させた後に液体シンチレーションカウンターにて¹⁴Cを測定した。

3. ウエスタンブロット

水またはAQP3cRNAを注入後48時間の卵母細胞の細胞膜蛋白分画を採取し、70°Cで10分間インキュベーションしてからSDS-PAGEにて展開した(4)。蛋白をナイロンフィルターに移してから、フィルターをAQP3のC末端15アミノ酸を認識する抗AQP3抗体(1:200希釈)と1時間インキュベーションした。フィルターを洗浄後、さらに¹²⁵I-プロテインAと1時間インキュベーションし、オートラジオグラフィーにて蛋白を検出した。

研究結果

図2はラット(r)とヒト(h)のAQP2、AQP3を発現させた卵母細胞のPfとPfに対する水銀の阻害効果をまとめたものである。水を注入した対照卵母細胞のPfは $23 \pm 2(SE) \times 10^{-4}$ cm/sであったが、AQP2、AQP3 cRNAを注入した卵母細胞のPfは6-9倍と著明に上昇した。0.3mMの塩化第二水銀で5分間インキュベーション後にPfはいずれも減少したが(+Hg)、さらに還元剤である2-メルカプトエタノール(5mM)で15分間インキュベーションするとPfは前値近くまで回復した(+Hg+ME)。したがって、水銀のPfに対する阻害作用は非特異的毒性効果ではなく、水チャネルに特異的作用であると考えられた。AQP2とAQP3の水銀効果を比較すると、PfがAQP2では約50%低下したのに対してAQP3では約30%低下したにとどまったため、AQP2に比してAQP3は相対的に水銀感受性が低いことが示された。AQP3のどのシステイン残基が水銀感受性であるかを検討するため、6つシステイン(Cys-

11、Cys-29、Cys-40、Cys-91、Cys-174、Cys-267)のそれぞれをセリンで置換した変異体を作製して卵母細胞に発現させた(図3)。セリン変異体のPfはいずれも野性型AQP3のPfと有意差がなく、水チャネル機能は保たれていた。水銀とのインキュベーション後にC29S、C40S、C91S、C174S、C267SのPfは阻害されたのに対してC11SのPfは不変であったことから、Cys-11が水銀感受性シスチンであると考えられた。さらにCys-11をアラニン、トリプトファンで置換した変異体を作製した。これらの変異体C11S、C11WのPfは野性型AQP3と同様で、またC11Sと同じく水銀耐性であった。

AQP3のチロシン212(Tyr-212)は2nd NPAボックスから3つ上流のアミノ酸であり、AQP1、AQP2の水銀感受性シスチン部位に相当する。このTyr-212を他のアミノ酸で置換することによって、Pfや水銀感受性が変化するかを検討した(図4)。Tyr-212をシスチンで置換したY212Cでは、Pfは野性型AQP3と同等であったが、水銀によるPf阻害は63%とおよそ2倍に増大した。Tyr-212をセリンで置換したY212Sでは、Pfも水銀によるPf阻害も野性型AQP3と同等であった。Tyr-212をトリプトファンで置換したY212Wでは、Pfは対照のPfのレベルまで低下し、水チャネル機能が失われた。さらにTyr-212のとなりのアミノ酸であるアラニン213(Ala-213)をシスチン、セリン、トリプトファンで置換した変異体を作製して同様の検討を行った。それらの結果はTyr-212の置換で得られた結果とまったく一致した。

図5は、野性型AQP3およびTyr-212、Ala-213の変異体蛋白が卵母細胞膜に発現しているかをウエスタンブロットにて同定したものである。野性型AQP3のcRNAを注入した卵母細胞の膜分画では、26-kDa相当のバンドと33-45kDa相当の幅の広いバンドを認めた。これらは、AQP3蛋白とその糖鎖付着型のバンドであると考えられた。同様のバンドはTyr-212、Ala-213の変異体cRNAを注入した卵母細胞の膜分画にも認められたことから、卵母細胞膜への発現は野性型と変異型のAQP3と同程度であることが示唆された。

野性型AQP3とTyr-212、Ala-213の変異体AQP3のグリセロール透過性の測定結果を図6にまとめた。野性型AQP3では、cRNA注入によってPglyは3倍に増加し、水銀によってPglyは33%阻害された。Y212Cでは、cRNA注入によってPglyは野性型AQP3と同程度まで増加したが、水銀によるPgly阻害は61%と上昇し、水銀感受性が増大したと考えられた。Y212W、A213WのPglyは対照と同程度でAQP3によるグリセロール透過能が、トリプトファン置換で失われることが示された。

最後に、Pglyにおける活性化エネルギーを求めるために、Pglyを4°C、20°C、30°Cにて測定した(図7)(1)。卵母細胞は内因性のグリセロール透過能を有するので、AQP3を発現させた卵母細胞のPgly(図中の白丸)から対照卵母細胞のPgly(図中の白四角)を差し引いたAQP3依存性Pglyをプロットした(図中の黒丸)。Arrhenius plotより求めた活性化エネルギーは4.5kcal/molであった。

考察

水銀製剤が水チャネル機能を可逆的に阻害することは、以前よりよく知られていた。水チャネルに対する水銀製剤の効果は、今までの多くの研究で、0.3mMの塩化第二水銀で5分間インキュベーション後に評価され、可逆性はさらに5-10mMの2-メルカプトエタノールで5-30分間インキュベーション後に評価されていた。そこでわれわれも、同様のプロトコルを用いてアフリカツメガエル卵母細胞に発現させたAQP2とAQP3のPfに対する水銀効果を比較した。その結果、AQP2のPf減少が50%でAQP3のPf減少が30%であったことより、AQP2に比してAQP3は相対的に水銀耐性であることが示された。他の報告とも比較してみると、0.3mM水銀に対する阻害効果から、水銀感受性は高い順から、AQP1(62-79%阻害)>AQP2(47-53%)>AQP3(30-33%)>AQP4(0%)と考えられた。

AQP3のシスチンをセリンで置換した変異体の水銀効果から、AQP3の水銀感受性部位はCys-11であることが判明した。AQP1やAQP2においては、水銀感受性シスチンのトリプトファン置換によって水チャネル機能が消失することから、水銀感受性シスチンが水チャネル孔の形成に関わっていることが示唆されている(2)。しかし、AQP3においてはCys-11をトリプトファンで置換した変異体(C11W)においても、Pfは野性型AQP3と同等であった。したがってAQP3では、水銀感受性シスチンが水チャネル孔の形成に関わっていないと考えられた。AQP3における水銀感受性シスチンCys-11の存在意義は、今のところ不明である。

AQP3がAQP2に比して水銀耐性であるのは、AQP3におけるAQP2の水銀感受性シスチン相当部位(Tyr-212)がシスチンではないためである可能性がある。この仮説を検証するため、Tyr-212をシスチンで置換した変異体Y212Cを作製した。Y212Cは野性型AQP3と同等の水チャネル機能を有していたが、水銀感受性が増大したことから、上記の仮説が正しいことが示された。しかも、Tyr-212のトリプトファン置換で水チャネル機能が失われたことから、Tyr-212が水チャネル孔形成に関与していることが示唆された。さらにAla-213置換実験においても、まったく同様の結果が得られた。以上より、2nd NPAボックス周辺のアミノ酸が水チャネル孔形成に関わるというAQP1、AQP2で示された知見がAQP3にもあてはまることが示唆された。

最後に、同一のAQP3チャネル孔を水とグリセロールなどの小分子が通るがどうかについて検討した。Tyr-212、Ala-213変異体AQP3のPglyを測定した結果は、シスチン置換で水銀感受性が増大した点やトリプトファン置換で透過性が失われる点が、Pf測定結果とまったく一致した。一般的に活性化エネルギー値6.0kcal/mol以下は、チャネル孔を通過する際のエネルギーに合致するとされている。Pglyの活性化エネルギーは4.5kcal/molであったことから、グリセロールはAQP3チャネルを通過すると考えられた。もしAQP3に水とグリセロールが通過する2種類の異なったチャネルが存在すると仮定すると、1アミノ酸置換がこれら2種のチャネルに同様の機能的変化をもたらしたことになる。しかし、

この可能性はきわめて低いので、上記の結果は水とグリセロールがAQP3チャネル孔を共有することを示唆すると考えられた。

以上、今回の研究で、AQP2に比してAQP3は水銀耐性であること、AQP3の水銀感受性部位がCys-11であること、AQP1、AQP2と同様にAQP3でも2nd NPAボックス周辺のアミノ酸が水チャネル孔形成に関わること、水とグリセロールがAQP3チャネル孔を共有することが示唆された。

今後の課題

水チャネルの構造および機能発現の研究では、解明すべき課題が多く残されている。AQP3に関しては、水銀感受性部位Cys-11の存在意義を明らかにすること、2nd NPAボックス周辺アミノ酸以外の水チャネル孔形成に関わる部位を明らかにすること、グリセロール透過性を規定しているアミノ酸部位を明らかにすることなどである。また、AQP2の水チャネル孔形成部位についても、いくつかの仮説が提唱されているものの確立した説がないので、さらに詳細に検討する必要がある。AQP2の構造-機能を研究する上での重要な手がかりは、AQP2蛋白異常によって発症する腎性尿崩症である。すなわち、腎性尿崩症患者のAQP2遺伝子異常部位の発見がAQP2の構造-機能の解明に役立つと考えられる。

文献

1. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, and Sasaki S: Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361:549-552, 1993.
2. Bai L, Fushimi K, Sasaki S, and Marumo F: Structure of aquaporin-2 vasopressin water channel. *J Biol Chem* 271:5171-5176, 1996.
3. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, and Marumo F: Molecular cloning of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6269-6273, 1994.
4. Kuwahara M, Fushimi K, Terada Y, Bai L, Marumo F, and 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.

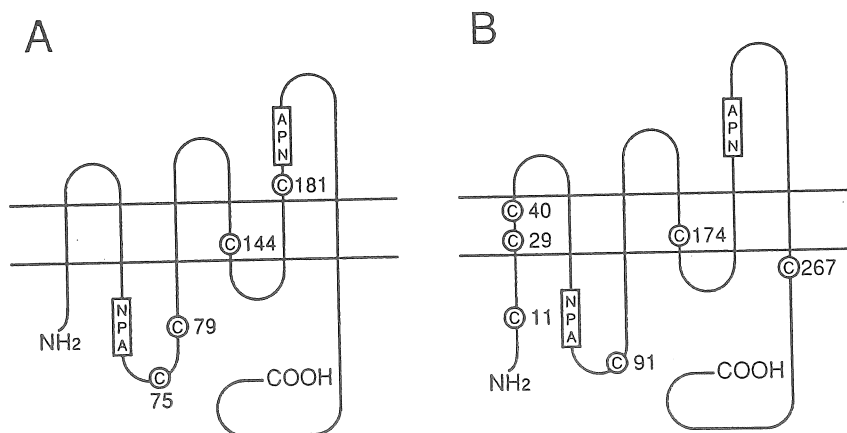


図1. AQP2(A)とAQP3(B)のMembrane Topology

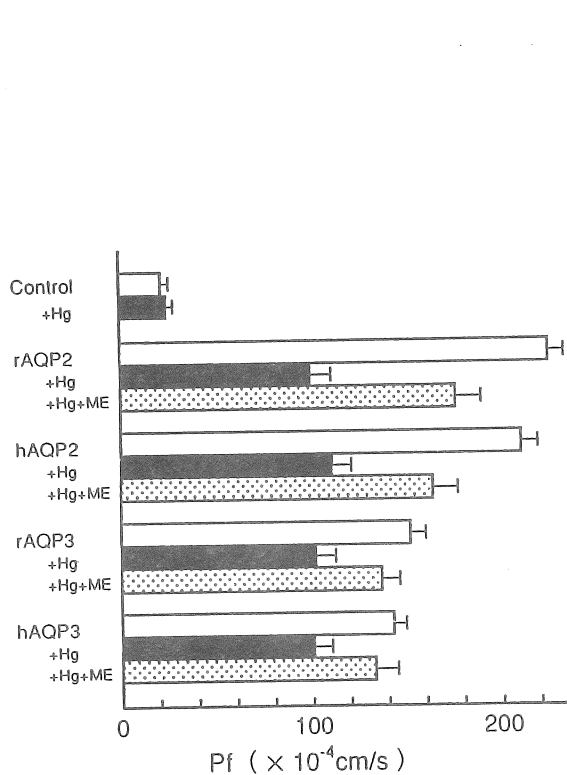


図2. AQP2とAQP3の水透過性に対する水銀の効果

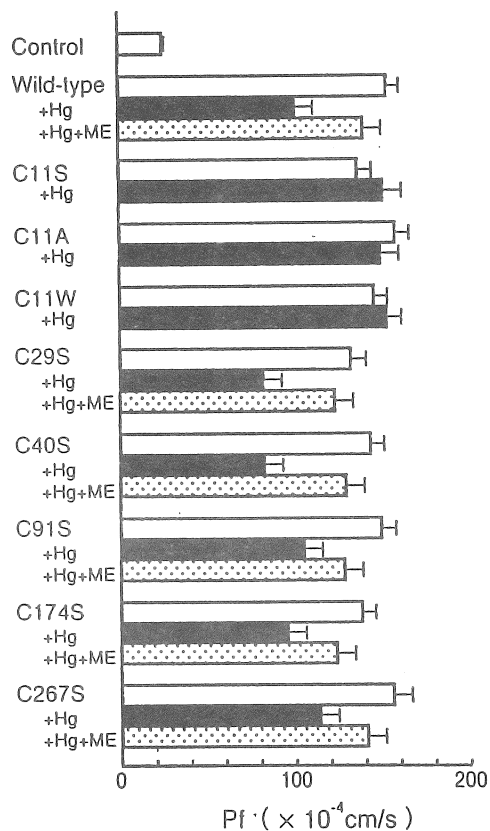


図3. AQP3シスチン変異体の水透過性に対する水銀の効果

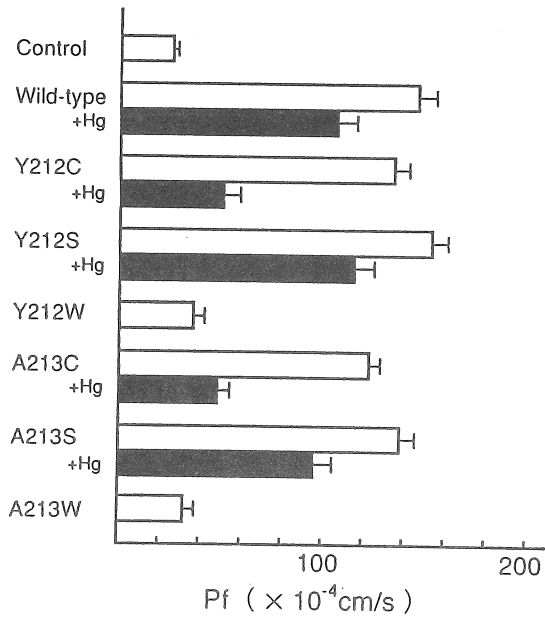


図4. AQP3 Tyr-212, Ala-213変異体の水透過性

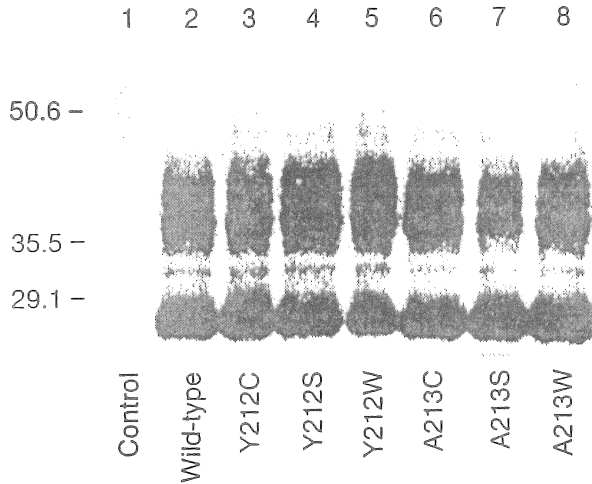


図5. AQP3 Tyr-212, Ala-213変異体蛋白の発現

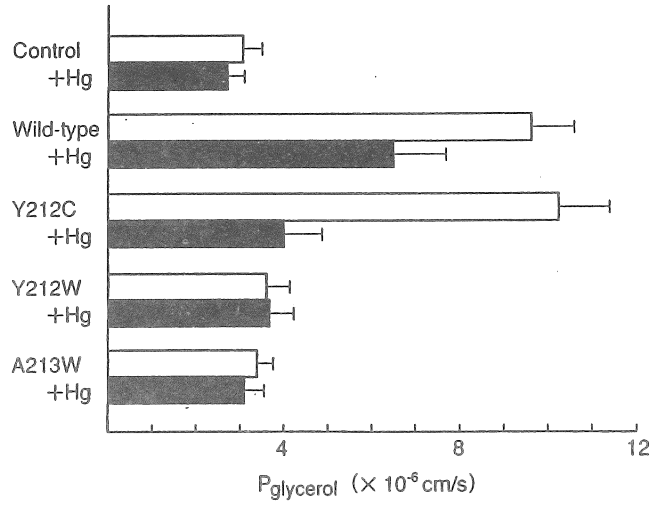


図6. AQP3 Tyr-212, Ala-213変異体のグリセロール透過性

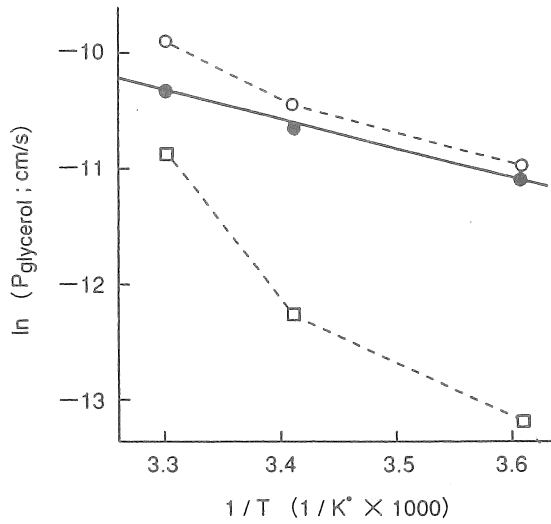


図7. グリセロール透過性の活性化エネルギーの測定

Structure and function of aquaporin water channelMichio Kuwahara¹, Kenichi Ishibashi², and Kiyohide Fushimi¹¹Second Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University. ²Internal Medicine, Oume General Hospital

Water channel function of all aquaporins (AQPs) but AQP4 can be inhibited by mercury reagents. To compare mercury sensitivity, AQP2 and AQP3 were expressed in *Xenopus* oocytes, and osmotic water permeability (Pf) of oocyte membrane was measured. Preincubation with 0.3 mM HgCl₂ decreased Pf by ~50% in AQP2 and ~30% in AQP3, suggesting that AQP3 is more resistant to mercury than AQP2. Mercurial reagents are believed to bind specifically to cysteine residue and block the aqueous pore of AQPs. Because of the low homology of AQP3 to other AQPs, it is not certain whether the pore structure of AQP3 is similar to that of the others. Determination of mercury-sensitive cysteine residues in AQP3 and comparison with those in other AQPs will help to resolve this question. To identify the mercury-sensitive site, 6 individual cysteine residues in human AQP3 (at positions 11, 29, 40, 91, 174, 267) were altered by site-directed mutagenesis. Mutant of C11S or C11A had a similar basal Pf as wild-type but acquired mercury resistance. Replacement of Cys-11 with Trp, which possesses a large side chain, did not decrease Pf. Mercurial inhibition of Pf was still observed in 5 other Ser-to-Cys mutants. These results suggest that Cys-11 is the mercury-sensitive residue in AQP3, and that this residue might be independent of the aqueous pore formation. Mutation of Tyr-212, a position corresponding to the mercury-sensitive residues in AQP1 and AQP2, to cysteine enhanced the mercurial inhibition of Pf. T212W had no water channel activity. Expression of AQP3 increased glycerol permeability (Pgly) 3.1-fold, whereas Pgly of Y212W-expressing oocytes was similar to Pgly of control oocytes. Cysteine mutation at Tyr-212 increased the inhibitory effect of mercury on Pgly. The activation energy for Pgly was 4.5 kcal/mol. These results suggest that the structure of the aqueous pore of AQP3 resembles to those of AQP1 and AQP2, and support the hypothesis that water and small molecules share a common pore in AQP3.