

## 9733 水チャネルの構造および機能の解明

助成研究者：桑原 道雄 (東京医科歯科大学 第2内科)  
 共同研究者：石橋 賢一 (青梅市立総合病院 内科)  
 伏見 清秀 (東京医科歯科大学 第2内科)

水チャネル機能を有する一群の蛋白は、アクアポリン(aquaporin, AQP)と総称され、ほぼ全身の組織に分布して水輸送に重要な役割を果たしている。AQPはMIPファミリーに属しているが、MIPファミリー蛋白には機能的な差異が認められる。すなわち、AQP1やAQP2は水透過性のみを有するのに対して、AQP3は水、グリセロール、尿素の透過性を有するし、AQP-CE1(線虫*Caenorhabditis elegans*においてわれわれが最初に同定した水チャネル)は水、尿素透過性を有する。グリセロール輸送体(GlpF)はグリセロール透過性はあるが水透過性はない。アミノ酸配列からみるとMIPファミリーは2群に大別され、AQP-CE1、AQP3、GlpFらの属する1群はいずれも、他の1群(AQP1やAQP2が属する)にはない約15のアミノ酸からなる配列を細胞外第2ループと第3ループに有している(以下このアミノ酸配列を"I"、"II"と呼ぶことにする)。以上のことから、アミノ酸配列I、IIがチャネルの選択性に関与している可能性がある。

本研究では、I、IIのアミノ酸配列の意義を検討するため、AQP-CE1のI、II配列をAQP3、GlpFのI、II配列で置換したキメラ体を作製した。そしてアフリカツメガエル卵母細胞にキメラ体を発現させ、キメラ体の浸透圧水透過性(Pf)、グリセロール透過性(Pgly)、尿素透過性(Purea)を測定した。作製したキメラ体は、AQP-CE1の配列I、IIをAQP3の配列I、IIで置換したキメラ体3種(AQP3 I、AQP3 II、AQP3 I/II)と、GlpFの配列I、IIで置換したキメラ体3種(GlpF I、GlpF II、GlpF I/II)の計6種である。これらのすべてのキメラ体は、野性型AQP-CE1と同様に水透過性と尿素透過性を認めたが、グリセロール透過性は認められなかった。したがってI、IIのアミノ酸配列が直接小分子チャネル孔を形成していないことが示唆された。しかし、キメラ体AQP-CE1のPf、Pureaは野性型AQP-CE1に比してそれぞれ39-74%、28-65%の低下がみられたことから、I、IIのアミノ酸配列はチャネル機能の調節に働いていることが示唆された。本研究とわれわれが以前AQP3について行った検討結果から、MIPファミリー蛋白のチャネル孔は1種類であり、水と小分子は同一のチャネル孔を共有すると考えられる。今後は、MIPファミリー蛋白のチャネル孔の部位をさらに詳細に同定し、さらにチャネル孔の選択性を規定している部位を明らかにする必要がある。



## 9 7 3 3 水チャネルの構造および機能の解明

助成研究者：桑原 道雄 (東京医科歯科大学 第2内科)  
共同研究者：石橋 賢一 (青梅市立総合病院 内科)  
伏見 清秀 (東京医科歯科大学 第2内科)

## 研究目的

水チャネル機能を有する一群の蛋白は、現在ではアクアポリン(aquaporin, AQP)と総称されている。陸生動物の約60%が水分から構成されていることからわかるようにAQPはほぼ全身の組織に分布しており、水輸送に重要な役割を果たしている。

現在までに、哺乳類ではAQP0から9までの10種のAQPがクローニングされているが、これらのAQPには機能的な差異が認められる。すなわち、AQP1やAQP2は水透過性のみを有するのに対して、AQP3とAQP7は水の他にグリセロールと尿素の透過性を有するし、AQP9は水の他に尿素透過性を有する。AQPファミリー蛋白の基本構造をFig. 1に示した。AQPファミリーは6回膜貫通型の蛋白で、N末端とC末端は細胞内に存在すると考えられている。アミノ酸配列からみるとAQPは2群に大別され、AQP3、AQP7、AQP9はいずれも、他の1群(Fig. 1A)にはない約15のアミノ酸からなる配列を細胞外第2ループと第3ループに有している(Fig. 1B、以下この配列を"I"、"II"と呼ぶことにする)。一方、水透過性のみを有するAQP1やAQP2は、I、IIのアミノ酸配列を有していないことがわかる(Fig. 1A)。以上のことから、I、IIのアミノ酸配列がチャネル機能の発現に関与している可能性がある。

本研究は、AQPの中の1群に存在する2ヶ所のアミノ酸配列(Fig. 1Bの"I"、"II")とチャネル機能との関係を明らかにすることを目的とした。対象として、AQP-CE1、AQP3、グリセロール輸送体(GlpF)を用いた。これらはいずれもI、IIのアミノ酸配列を有するMIPファミリー蛋白である。AQP-CE1は線虫(*Caenorhabditis elegans*)においてわれわれが最初に同定した水チャネルであり、水の他に尿素透過性を有することが判明した。哺乳類のAQPでは、AQP3との間に44%の最も高いアミノ酸相同性を有している。GlpFは大腸菌のグリセロール輸送体であり、グリセロール透過性はあるが水透過性はない。したがってGlpFは水チャネルではないが、AQPと同じくMIPファミリーに属し、しかもAQPと高いアミノ酸相同性を持っている。特に、AQP3とは42%の最も高い相同性がある。本研究では、AQP-CE1のI、II配列をAQP3、GlpFのI、II配列で置換したキメラ体を作製した。そしてアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いてキメラ体の機能の変化を検討した。

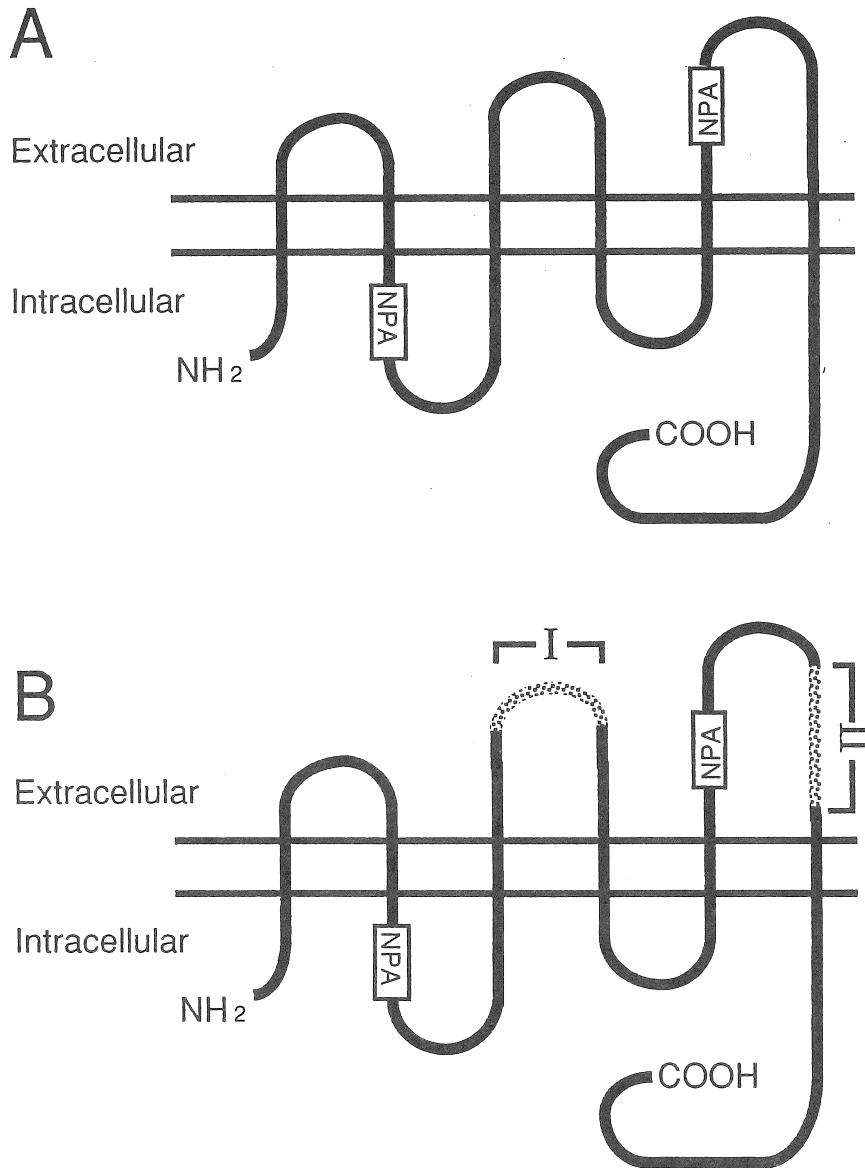


FIG. 1. Membrane topology of two types of MIP family proteins (A, B). In one type (B), extra amino acid residues (~15 amino acid) are present at the second and the third extracellular loops. These extra segments are designated as "segment I" and "segment II" in this paper. In the other type (A), these segments are absent. Both types possess six presumed transmembrane segments, five connecting loops, and two conserved Asn-Pro-Ala (NPA) motifs.

## 研究方法

### 1. キメラ体の作製

AQP-CE1のcDNAはMIPファミリー蛋白の1つをコードしており、Genebankに "C01G6.1"として登録されている(accession No. Z35595)。われわれは、このcDNAを小原雄治先生からいただき、アフリカツメガエル卵母細胞発現用ベクター(pXBG-ev1)に組み込んだ。この野性型AQP-CE1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。Table 1にあげたオリゴプライマーを用いて、AQP-CE1におけるIのアミノ酸配列(DGGVRTVG)とIIのアミノ酸配列(SIFYGGAVFTK)をAQP3のI、IIのアミノ酸配列(それぞれADNQLFVSとALAGW GSAVFTGQH)およびGlpFのI、IIのアミノ酸配列(それぞれEQTHHIVR WLAGW GNVAFTGGRDIP)で置換した。さらに、発現ベクターのHindIII認識部位とXbaI認識部位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後、cRNAをT3 RNA polymeraseを用いて作製した。

### 2. 浸透圧水透過性、グリセロール透過性、尿素透過性の測定

アフリカツメガエル卵母細胞に、40 nlの水または5ngのAQP-CE1とそのキメラ体のcRNA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。浸透圧水透過性(Pf)を求めるため、20°Cにて卵母細胞を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)、尿素透過性(Purea)は、それぞれ<sup>14</sup>C-グリセロール、<sup>14</sup>C-尿素的取り込みから求めた。卵母細胞を2分間<sup>14</sup>C-グリセロールまたは<sup>14</sup>C-尿素とインキュベーションし、液体シンチレーションカウンターにて<sup>14</sup>Cを測定した。

### 3. イムノプロット

卵母細胞の細胞膜蛋白分画を採取し、SDS-PAGEにて展開した、蛋白をナイロンフィルターに移した。フィルターをAQP-CE1のC末端15アミノ酸を認識する抗AQP-CE1抗体(1:200希釈)とインキュベーション後、さらに<sup>125</sup>I-プロテインAと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

Fig. 2にAQP-CE1のアミノ酸配列を示した。AQP-CE1は290のアミノ酸よりなり、計算上では31.4-kDaであった。比較のため、AQP3、GlpF、AQP1、AQP2の配列を同時に示した。このFig. 2からも明らかなように、AQP-CE1、AQP3、GlpFはAQP1、

TABLE 1. Oligonucleotide primers for mutagenesis of AQP-CE1

Mutant name		Oligonucleotide
AQP3 I	sense	5'-GCCGACAACCAGCTTTTTGTTTCGGGAC CAAAGGACACCGCCGGA-3'
	antisense	5'-CCCGAAACAAAAGCTGGTTGTCGGCAA ACACATTGATGGCGTCATT-3'
AQP3 II	sense	5'-GGGGCTCTGCAGTCTTCACGACCGGCC AGCATTGGTTCTGGGTTCCAATT-3'
	antisense	5'-CGTGAAGACTGCAGAGCCCCAGCCCCG AAGGGCGGTGAAGAGACGTGGTGC-3'
GlpF I	sense	5'-GAGCAGACTCATCACATTGTTTCGCGGA CCAAAGGACACCGCCGGA-3'
	antisense	5'-CCGCGAACAATGTGATGAGTCTGCTCA AACACATTGATGGCGTCATT-3'
GlpF II	sense	5'-GGGGCAATGTCGCCTTACCGGCGGCAG AGACATTCCTTGGTTCTGGGTTCCAATT-3'
	antisense	5'-GCCGCCGGTAAAGGCGACATTGCCCCAG CCCGCCAGCCAGGTGAAGAGACGTGGTGC-3'

AQP2には認められないI、IIのアミノ酸配列を有している。AQP-CE1のアミノ酸相同性はAQP3(44%)が最も高く、その他ではGlpF(38%)、AQPZ(36%)、AQP1(34%)、AQP2(36%)、AQP4(32%)、AQP5(34%)であった。

次に、野性型のAQP-CE1、AQP3、GlpFを卵母細胞発現させて機能を解析した(Fig. 3)。水を注入した対照卵母細胞のPfは $17 \pm 2$  (SE)  $\times 10^{-4}$  cm/sであったが、AQP-CE1 cRNAを注入した卵母細胞のPfは10.9倍に上昇した(Fig. 3A)。0.3mMの塩化第二水銀で5分間インキュベーション後もPfは減少せず(+Hg)、水銀感受性が認められなかった。AQP3を発現させた卵母細胞でもAQP-CE1と同程度のPfが認められたが、GlpFを発現させた卵母細胞のPfは対照と変わらなかった。Fig.には示していないが、Arrheniusの式を用いてPfの活性化エネルギーを求めるために4°Cと30°CにてPfを測定した。これらの結果より求めたPfの活性化エネルギーは3.9kcal/molであり、水チャネルと考えられる値の範囲内(<6kcal/mol)であった。

AQP-CE1 cRNAを注入した卵母細胞のPglyは対照と同等であったが(Fig. 3B)。Pureaは4.7倍に増加し、しかもPfと同様に水銀の阻害作用は認められなかった(Fig. 3C)。AQP3発現細胞では、PglyとPureaがそれぞれ4.8倍、3.7倍に増加した。GlpF発現細胞では、Pglyが6.7倍に増加したが、Pureaは1.6倍の増加にとどまった。

I、IIのアミノ酸配列(Figs. 1, 2)の意義を検討するため、AQP-CE1のI、II配列を

AQP-CE1	1	-----MILDK	LRA <b>RF</b> H <b>IR</b> KE	L <b>LR</b> AV <b>LA</b> E <b>FT</b>	G <b>TY</b> L <b>LC</b> L <b>IG</b> L	S <b>V</b> VA <b>Q</b> K <b>V</b> L <b>ER</b>	50
AQP3	1	MGRQ <b>KEL</b> VSR	CGEM <b>L</b> H <b>IR</b> Y <b>R</b>	L <b>LR</b> Q <b>AL</b> A <b>E</b> Q <b>L</b>	G <b>TL</b> L <b>LM</b> M <b>FG</b> C	G <b>S</b> VA <b>Q</b> V <b>LS</b> R	50
GlpF	1	-----	-----MS <b>Q</b> T <b>S</b> T	L <b>K</b> G <b>O</b> C <b>I</b> A <b>E</b> F <b>L</b>	G <b>T</b> G <b>LL</b> I <b>F</b> E <b>GV</b>	G <b>CV</b> A <b>-</b> A <b>L</b> K <b>V</b> A	50
AQP1	1	-----MAS	E <b>FK</b> <b>L</b> K <b>L</b> F <b>W</b> R <b>A</b>	V <b>VA</b> E <b>F</b> L <b>AT</b> T <b>L</b>	F <b>VF</b> I <b>S</b> I <b>S</b> G <b>AL</b>	G <b>FK</b> Y <b>P</b> V <b>G</b> N <b>Q</b>	50
AQP2	1	-----	-----M <b>W</b> E <b>L</b> F	S <b>I</b> A <b>F</b> S <b>R</b> A <b>V</b> A	E <b>F</b> L <b>AT</b> L <b>L</b> I <b>V</b> F	F <b>G</b> L <b>G</b> S <b>A</b> L <b>N</b> P	50
AQP-CE1	51	PE <b>V</b> NE <b>F</b> I <b>G</b> V <b>N</b>	V <b>G</b> F <b>G</b> I <b>A</b> I <b>V</b> F <b>G</b>	V <b>AV</b> S <b>A</b> K <b>L</b> S <b>G</b> G	H <b>LN</b> P <b>AV</b> S <b>F</b> A <b>F</b>	L <b>SV</b> G <b>C</b> I <b>L</b> I <b>V</b> Q	100
AQP3	51	G <b>TH</b> G <b>G</b> F <b>L</b> T <b>IN</b>	L <b>A</b> F <b>G</b> F <b>A</b> V <b>T</b> L <b>G</b>	I <b>L</b> I <b>A</b> G <b>Q</b> V <b>S</b> G <b>A</b>	H <b>LN</b> P <b>AV</b> I <b>E</b> A <b>M</b>	S <b>F</b> L <b>A</b> R <b>D</b> P <b>W</b> I <b>K</b>	100
GlpF	51	G <b>A</b> S <b>F</b> G <b>W</b> E <b>IS</b>	V <b>I</b> W <b>G</b> L <b>G</b> V <b>A</b> M <b>A</b>	I <b>Y</b> L <b>T</b> A <b>G</b> V <b>S</b> G <b>A</b>	H <b>LN</b> P <b>AV</b> T <b>I</b> A <b>L</b>	W <b>L</b> F <b>A</b> C <b>F</b> D <b>K</b> R <b>K</b>	100
AQP1	51	T <b>AV</b> Q <b>D</b> N <b>V</b> K <b>V</b> S	L <b>A</b> F <b>G</b> L <b>S</b> T <b>AT</b> L	A <b>Q</b> S <b>V</b> G <b>H</b> I <b>S</b> G <b>A</b>	H <b>LN</b> P <b>AV</b> T <b>L</b> G <b>L</b>	L <b>LS</b> C <b>C</b> I <b>S</b> I <b>F</b> R	100
AQP2	51	C <b>AL</b> P <b>S</b> V <b>L</b> C <b>IA</b>	M <b>A</b> F <b>G</b> L <b>C</b> I <b>G</b> T <b>L</b>	V <b>Q</b> A <b>L</b> G <b>H</b> I <b>S</b> G <b>A</b>	H <b>LN</b> P <b>AV</b> T <b>V</b> A <b>C</b>	L <b>V</b> G <b>CH</b> V <b>S</b> V <b>L</b> R	100
AQP-CE1	101	F <b>I</b> A <b>Y</b> F <b>V</b> A <b>Q</b> F <b>F</b>	G <b>A</b> F <b>G</b> A <b>A</b> T <b>V</b> Y	A <b>V</b> Y <b>N</b> D <b>A</b> I <b>N</b> V <b>F</b>	D <b>G</b> G <b>V</b> R <b>T</b> V <b>G</b> G <b>P</b>	K <b>D</b> I <b>T</b> --- <b>A</b> G <b>I</b> F	150
AQP3	101	L <b>P</b> I <b>Y</b> T <b>L</b> A <b>Q</b> I <b>L</b>	G <b>A</b> F <b>L</b> G <b>A</b> C <b>I</b> V <b>F</b>	G <b>L</b> Y <b>D</b> A <b>I</b> W <b>H</b> F	A <b>D</b> N <b>Q</b> L <b>F</b> V <b>S</b> G <b>P</b>	N <b>G</b> I <b>T</b> --- <b>A</b> G <b>I</b> F	150
GlpF	101	V <b>I</b> P <b>F</b> I <b>V</b> S <b>Q</b> V <b>A</b>	G <b>A</b> E <b>C</b> A <b>A</b> L <b>V</b> Y	G <b>L</b> Y <b>Y</b> N <b>L</b> F <b>D</b> E	E <b>Q</b> T <b>H</b> I <b>V</b> R <b>G</b> S	V <b>E</b> S <b>V</b> D <b>L</b> A <b>G</b> I <b>F</b>	150
AQP1	101	A <b>LM</b> Y <b>I</b> A <b>Q</b> C <b>V</b>	G <b>A</b> I <b>V</b> A <b>T</b> A <b>IL</b> S	A <b>Q</b> T <b>S</b> S <b>L</b> T <b>G</b> N <b>S</b>	-----	-----L <b>G</b> R <b>N</b>	150
AQP2	101	A <b>A</b> F <b>Y</b> V <b>A</b> A <b>Q</b> L <b>L</b>	G <b>A</b> V <b>A</b> G <b>A</b> A <b>L</b> L <b>H</b>	E <b>I</b> T <b>P</b> A <b>D</b> I <b>R</b> G <b>D</b>	-----	-----L <b>A</b> V <b>N</b>	150
<div style="text-align: center;"> <span style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; width: 100px; display: inline-block;"></span> <span style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">I</span> </div>							
AQP-CE1	151	A <b>S</b> Y <b>P</b> A <b>P</b> H <b>L</b> G <b>L</b>	V <b>N</b> G <b>F</b> V <b>D</b> C <b>F</b> V <b>A</b>	T <b>A</b> V <b>F</b> V <b>F</b> L <b>I</b> A <b>H</b>	I <b>V</b> D <b>K</b> R <b>S</b> Y <b>P</b> T	W <b>L</b> Q <b>P</b> I <b>L</b> -- <b>V</b> G	200
AQP3	151	A <b>T</b> Y <b>P</b> S <b>G</b> H <b>L</b> D <b>M</b>	I <b>N</b> G <b>F</b> F <b>D</b> C <b>F</b> I <b>G</b>	T <b>A</b> S <b>L</b> I <b>V</b> C <b>V</b> L <b>A</b>	I <b>V</b> D <b>P</b> Y <b>N</b> N <b>P</b> G <b>P</b>	R <b>G</b> L <b>E</b> A <b>F</b> - <b>T</b> V <b>G</b>	200
GlpF	151	S <b>T</b> Y <b>P</b> N <b>P</b> H <b>I</b> N <b>F</b>	V <b>Q</b> A <b>F</b> A <b>V</b> E <b>M</b> V <b>I</b>	T <b>A</b> I <b>I</b> M <b>G</b> L <b>I</b> A	L <b>I</b> D <b>D</b> - <b>G</b> N <b>G</b> V <b>P</b>	R <b>G</b> P <b>L</b> A <b>P</b> L <b>I</b> I <b>G</b>	200
AQP1	151	D--L <b>A</b> D <b>G</b> V <b>N</b> S	G <b>C</b> G <b>L</b> G <b>I</b> E <b>I</b> I <b>G</b>	T <b>L</b> C <b>L</b> V <b>I</b> C <b>V</b> L <b>A</b>	T <b>I</b> D <b>R</b> R <b>R</b> R <b>D</b> L	- <b>G</b> C <b>S</b> A <b>P</b> L <b>A</b> I <b>G</b>	200
AQP2	151	A--L <b>S</b> N <b>S</b> T <b>T</b> A	G <b>Q</b> A <b>V</b> T <b>V</b> E <b>L</b> F <b>L</b>	T <b>L</b> C <b>L</b> V <b>I</b> C <b>I</b> F <b>A</b>	S <b>I</b> D <b>E</b> R <b>R</b> R <b>G</b> E <b>N</b> -	- <b>P</b> G <b>T</b> P <b>A</b> L <b>S</b> I <b>G</b>	200
<div style="text-align: center;"> <span style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; width: 100px; display: inline-block;"></span> <span style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">II</span> </div>							
AQP-CE1	201	T <b>G</b> F <b>V</b> A <b>I</b> G <b>A</b> A <b>F</b>	G <b>Y</b> N <b>C</b> G <b>Y</b> P <b>V</b> N <b>P</b>	A <b>R</b> D <b>F</b> A <b>P</b> R <b>L</b> F <b>T</b>	S <b>I</b> F <b>Y</b> G <b>G</b> - <b>A</b> V <b>F</b>	T----- <b>K</b> W <b>F</b> W	250
AQP3	201	A <b>V</b> V <b>L</b> V <b>I</b> G <b>T</b> S <b>M</b>	G <b>F</b> N <b>S</b> G <b>Y</b> A <b>V</b> N <b>P</b>	A <b>R</b> D <b>F</b> G <b>P</b> R <b>L</b> F <b>T</b>	A <b>L</b> A <b>G</b> W <b>G</b> S <b>A</b> V <b>F</b>	T <b>I</b> C-- <b>Q</b> H <b>W</b> W	250
GlpF	201	L <b>L</b> I <b>A</b> V <b>I</b> G <b>A</b> S <b>M</b>	G <b>P</b> L <b>I</b> G <b>F</b> A <b>M</b> N <b>P</b>	A <b>R</b> D <b>F</b> G <b>P</b> K <b>V</b> E <b>A</b>	W <b>L</b> A <b>G</b> W <b>G</b> N <b>V</b> A <b>F</b>	T <b>G</b> C <b>R</b> D <b>I</b> P <b>Y</b> F <b>L</b>	250
AQP1	201	L <b>S</b> V <b>A</b> I <b>G</b> H <b>L</b> I <b>A</b>	I <b>D</b> Y <b>I</b> G <b>C</b> G <b>I</b> N <b>P</b>	A <b>R</b> S <b>E</b> G <b>S</b> A <b>V</b> I <b>T</b>	-----	--- <b>H</b> N <b>F</b> S <b>N</b> H <b>W</b>	250
AQP2	201	F <b>S</b> V <b>A</b> L <b>G</b> H <b>L</b> L <b>G</b>	I <b>H</b> Y <b>I</b> G <b>C</b> S <b>M</b> N <b>P</b>	A <b>R</b> S <b>L</b> A <b>P</b> A <b>V</b> I <b>T</b>	-----	--- <b>G</b> K <b>E</b> D <b>D</b> H <b>W</b>	250
<div style="text-align: center;"> <span style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; width: 100px; display: inline-block;"></span> </div>							
AQP-CE1	251	V <b>P</b> I <b>V</b> G <b>F</b> F <b>V</b> G <b>A</b>	V <b>V</b> G <b>I</b> W <b>L</b> Y <b>F</b> E <b>L</b>	I <b>G</b> F <b>H</b> I <b>P</b> C <b>D</b> A <b>E</b>	E <b>K</b> Y <b>V</b> V <b>L</b> I <b>G</b> N <b>Q</b>	E <b>L</b> K <b>P</b> L <b>I</b> A <b>K</b> E <b>T</b>	300
AQP3	251	V <b>P</b> I <b>V</b> S <b>P</b> L <b>I</b> G <b>S</b>	I <b>A</b> G <b>V</b> F <b>V</b> Q <b>L</b> M	I <b>G</b> C <b>H</b> L <b>E</b> O <b>P</b> P	S <b>N</b> B <b>E</b> E <b>N</b> V <b>K</b> L <b>A</b>	H <b>V</b> K <b>H</b> K <b>E</b> Q <b>I</b> ..	300
GlpF	251	V <b>P</b> L <b>F</b> G <b>P</b> I <b>V</b> G <b>A</b>	I <b>V</b> G <b>A</b> F <b>A</b> Y <b>R</b> K <b>L</b>	I <b>G</b> R <b>H</b> L <b>E</b> C <b>D</b> I <b>C</b>	V <b>V</b> E <b>K</b> E <b>T</b> I <b>T</b> F	S <b>E</b> Q <b>K</b> A <b>S</b> L...	300
AQP1	251	I <b>F</b> W <b>V</b> G <b>P</b> F <b>I</b> C <b>G</b>	A <b>L</b> A <b>V</b> L <b>I</b> Y <b>D</b> E <b>I</b>	L <b>A</b> P <b>R</b> S <b>S</b> D <b>L</b> T <b>D</b>	R <b>V</b> K <b>V</b> W <b>T</b> S <b>C</b> O <b>V</b>	E <b>E</b> Y <b>D</b> L <b>D</b> A <b>D</b> D <b>I</b>	300
AQP2	251	V <b>F</b> W <b>I</b> G <b>P</b> L <b>V</b> G <b>A</b>	I <b>L</b> G <b>S</b> L <b>L</b> Y <b>N</b> Y <b>V</b>	L <b>F</b> P <b>P</b> A <b>K</b> S <b>L</b> S <b>E</b>	R <b>L</b> A <b>V</b> L <b>K</b> G <b>L</b> E <b>F</b>	D <b>T</b> D <b>W</b> E <b>B</b> R <b>E</b> V <b>R</b>	300
AQP-CE1	301	V <b>D</b> E <b>E</b> E <b>A</b> ....	.....	.....	.....	.....	350
AQP3	301	.....	.....	.....	.....	.....	350
GlpF	301	.....	.....	.....	.....	.....	350
AQP1	301	N <b>S</b> R <b>V</b> E <b>M</b> K <b>P</b> K.	.....	.....	.....	.....	350
AQP2	301	R <b>R</b> Q <b>S</b> V <b>E</b> L <b>H</b> S <b>P</b>	Q <b>S</b> L <b>P</b> R <b>G</b> T <b>K</b> A.	.....	.....	.....	350

FIG. 2. Amino acid sequence of AQP-CE1 (C01G6.1) aligned with human AQP3, GlpF, human AQP1, and human AQP2. Gaps (-) are inserted to maximize the matching. White letters in black boxes denote conserved amino acid residues.

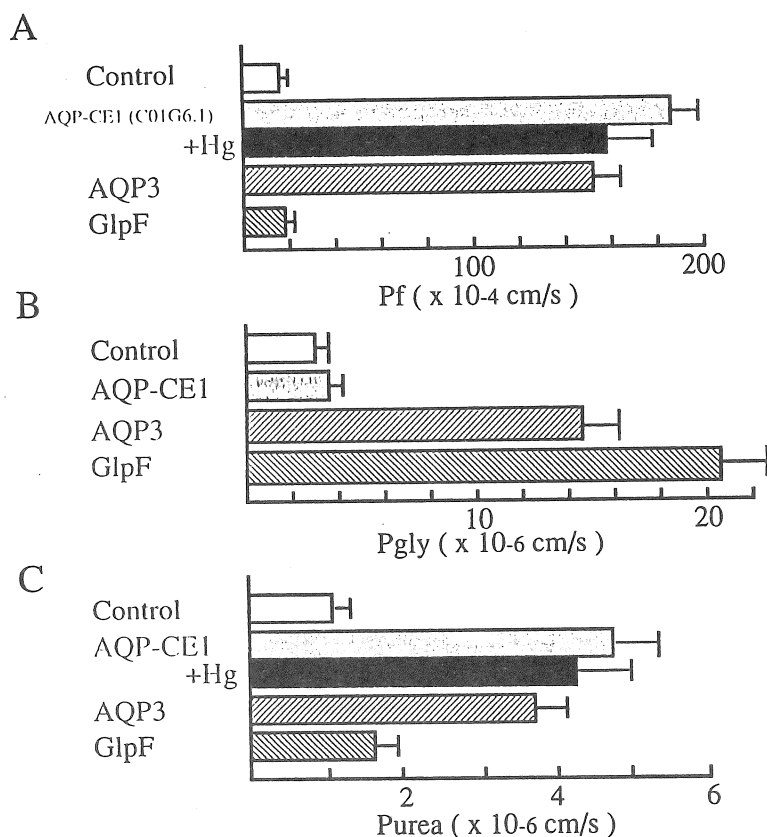


FIG. 3. Function of AQP-CE1 (C01G6.1), AQP3, and GlpF expressed in *Xenopus oocytes*. A, osmotic water permeability (Pf); B, glycerol permeability (Pgly); C, urea permeability (Purea). Oocytes were injected with 40 nl of water (Control) or 5 ng of cRNAs of AQP-CE1, human AQP3, and GlpF. Pf was calculated from the time course of osmotic cell swelling of the oocytes. Pgly and Purea were measured from the initial 5-min uptake of glycerol and urea into oocytes, respectively. Where indicated, the oocytes were preincubated with 0.3 mM HgCl<sub>2</sub> (+Hg). Each bar represents means  $\pm$  SE of 14 - 21 measurements.

AQP3、GlpFのI、II配列で置換したキメラ体を作製して卵母細胞に発現させた。AQP-CE1の配列をAQP3の配列Iで置換したキメラ体(AQP3 I)のPfは野性型AQP-CE1のPfより66%減少した(Fig. 4A)。また、AQP-CE1の配列をGlpFの配列Iで置換したキメラ体(GlpF I)のPfは野性型AQP-CE1のPfより70%減少した。しかし、AQP3 IとGlpF IのPfは依然として対照の2.7-3.2であり、水チャネル機能は保持されていた。AQP-CE1の配列IIをAQP3、GlpFの配列IIで置換したキメラ体(AQP3 II、GlpF II)では野性型AQP-CE1のPfに比して39-42%のPf減少が認められた。しかし、依然として対照の5.3-5.7倍のPf値であった。さらに、AQP-CE1の配列I、IIを同時に置換したキメラ体(AQP3



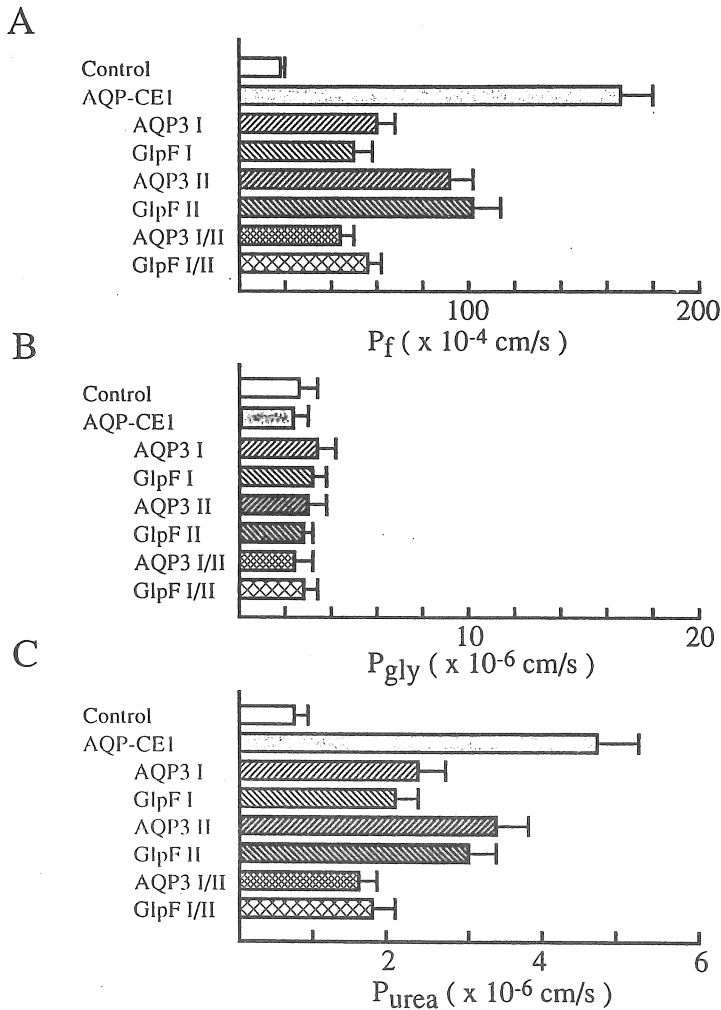


FIG. 4. Pf, Pgly, and P<sub>urea</sub> of wild-type and mutated AQP-CE1s expressed in oocytes. Segments I and II of AQP-CE1 were replaced by those of human AQP3 ("AQP3 I" and "AQP3 II", respectively) and/or those of GlpF ("GlpF I" and "GlpF II", respectively). Each bar represents means $\pm$ SE of 12 - 20 measurements.

I/II、GlpF I/II)においてもPfは67-74%減少したが、やはりPf値は対照の2.4-3.1倍と水チャネル機能は残されていた。

Pglyは6種のすべてのキメラ体発現細胞で対照のPglyと同等であった(Fig. 4B)。6種のキメラ体発現細胞のP<sub>urea</sub>は野性型に比して28-64%減少したが、対照のP<sub>urea</sub>より2.3-6.0倍の透過性を保持していた(Fig. 4C)。野性型と6種のキメラ体AQP-CE1を発現させた卵母細胞膜のイムノブロットでは、すべて27-kDaの位置にバンドを認めた(Fig. 5)。

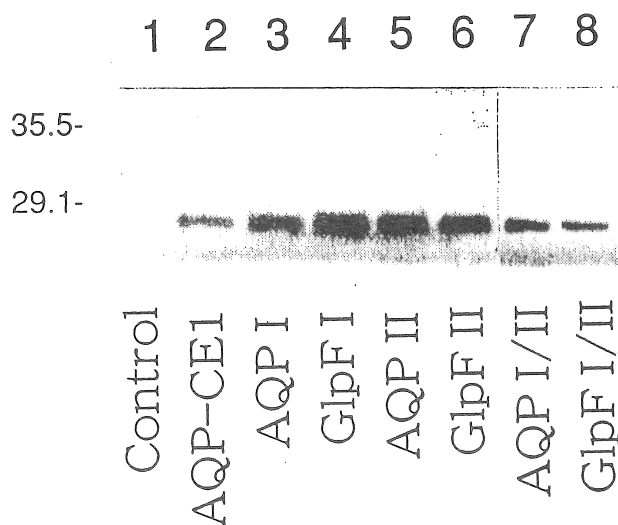


FIG. 5. Immunoblot of the oocyte plasma membrane fractions probed with an affinity-purified antibody against AQP-CE1. Oocytes were injected with water (Control) or cRNA of wild-type or mutated AQP-CE1s. Segments I and II of AQP-CE1 were replaced by those of human AQP3 ("AQP3 I" and "AQP3 II", respectively) and/or those of GlpF ("GlpF I" and "GlpF II", respectively). Samples of the plasma membrane fraction from 20 equivalent oocytes were loaded in each lane.

#### 考察

われわれが線虫 (*Caenorhabditis elegans*) で最初に同定した水チャネルである AQP-CE1 は、水の他に尿素透過性を有していた (Fig. 3)。AQP-CE1 は哺乳類の AQP である AQP3 との間に 44% の最も高いアミノ酸相同性が認められた (Fig. 2)。系統発生からみると AQP3 は他の AQP の分枝と異なり、GlpF と同じ分枝に分類される。この分枝は、I、II のアミノ酸配列を有することが特徴である (Figs. 1B, 2)。したがって、AQP-CE1 もこの分枝に属するものと考えられる。

われわれは以前ヒト AQP3 において、Tyr-212 (このアミノ酸は AQP1、AQP2 における水銀感受性 Cys に相当する) を Cys に置換することで、卵母細胞膜に発現した Pf および Pgly の水銀感受性が高まることと、Tyr-212 の Trp 置換で Pf および Pgly が対照と同等まで低下すること、さらに Pgly の活性化エネルギーが 4.5 kcal/mol であることを報告した。水銀感受性 Cys の Trp 置換で Pf が低下することは、AQP1、AQP2 において、水銀感受性 Cys は水チャネル孔の形成に関わっていて、Trp の大きな側鎖がチャネル孔の構造を変化させることによって水透過を阻害するためと解釈される。したがって、われわれが AQP3 の検討で得た結果は、水とグリセロールは AQP3 に存在する共通のチャネル孔を通り、しかも AQP3 のチャネル孔の部位が AQP1、AQP2 と同一であることを示唆している。

一方Echevarriaらの結果では、Pfは水銀で阻害されるがPglyは水銀で阻害されず、Pgly、Pureaの活性化エネルギーが  $>12$  kcal/mol高かった。これらの結果から彼らは、I、IIのアミノ酸配列が水チャネル孔とは全く別の小分子の通過するチャネル孔を形成しているという仮説を提唱した。われわれは、I、IIのアミノ酸配列を有し、しかも互いに相同性の高い3種のMIPファミリー蛋白、AQP-CE1、AQP3、GlpFを用いてAQP-CE1キメラ体を作製した。もしEchevarriaらの仮説が正しいならば、キメラ体のAQP3 I、AQP3 II、AQP3 I/IIはグリセロール透過性を獲得し、キメラ体のGlpF I、GlpF II、GlpF I/IIは水透過性と尿素透過性を失う代わりにグリセロール透過性を獲得するはずである。しかし今回のわれわれの検討では、これらのすべてのキメラ体は、野性型AQP-CE1と同様に水透過性と尿素透過性を認め、グリセロール透過性は認められなかった。したがってI、IIのアミノ酸配列が直接小分子チャネル孔を形成していないことが示唆された。しかし、キメラ体AQP-CE1のPf、Pureaは野性型AQP-CE1に比してそれぞれ39-74%、28-65%の低下がみられたことから、I、IIのアミノ酸配列はチャネル機能の調節に働いていることが示唆された。本研究とわれわれが以前AQP3について行った検討結果から、MIPファミリー蛋白のチャネル孔は1種類であり、水と小分子は同一のチャネル孔を共有すると考えられる。

#### 今後の課題

MIPファミリー蛋白のチャネル孔の部位をさらに詳細に同定する必要がある。また、チャネル孔の選択性を規定している部位を明らかにする必要がある。

#### 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. 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.
3. 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.

4. Ishibashi K., Sasaki S., Fushimi K., Yamamoto T., Kuwahara M., and Marumo F. Immunolocalization and effect of dehydration on AQP3, a basolateral water channel of kidney collecting ducts. *Am. J. Physiol.* 272: F235- F241, 1997.

5. Sasaki S., Uchida S, Kuwahara M., Fushimi K., and Marumo F. Aquaporins and ion conductance. *Science* 275:1490- 1491, 1997.

6. Ishibashi K., Kuwahara M., Gu Y., Kageyama Y., Tohsaka A., Suzuki F., Marumo F., and Sasaki S. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J. Biol. Chem.* 272:20782- 20786, 1997.

7. Ishibashi K., Kuwahara M., Kageyama Y., Tohsaka A, Marumo F., and Sasaki S. Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:714- 718, 1997.

8. Kuwahara M., Gu Y., Ishibashi K., Marumo F., and Sasaki S. Mercury-sensitive residues and pore site in AQP3 water channel. *Biochemistry* 36:13973- 13978, 1997.

9. Ishibashi K, Kuwahara M., Gu Y., Marumo F., and Sasaki S. Cloning and functional expression of a new aquaporin abundantly expressed in the peripheral leukocyte permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:268- 274, 1998.

10. Goji K, Kuwahara M., Gu Y., Matsuo M., Marumo F., and Sasaki S. Novel mutations in the aquaporin-2 gene in female siblings with nephrogenic diabetes insipidus: Evidence of disrupted water channel function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* in press.

## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF WATER CHANNEL

Michio Kuwahara<sup>1</sup>, Kenichi Ishibashi<sup>2</sup>, and Kiyohide Fushimi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Second Department of Internal Medicine, School of Medicine,  
Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>Ohme General Hospital,  
Tokyo, Japan

Water channels are now called aquaporins (AQPs) and widely distributed in mammalian tissues. AQPs belong to the major intrinsic protein (MIP) superfamily, and there is functional difference among MIP proteins. For example, AQP1 and AQP2 are water-selective and exclude solutes; AQP3 is permeable to water, glycerol, and urea; AQP-CE1 (the first water channel which we identified in the nematode *Caenorhabditis elegans*) is permeable to water and urea, but exclude glycerol; glycerol facilitator (GlpF) is glycerol-selective and excludes water and urea. It has been speculated that the MIP family may be separated into two large subfamilies based on the presence or absence of two segments of extra amino acid residues (~15 amino acid) at the second and third extracellular loops. Because AQP3, AQP-CE1, and GlpF all have these two segments, we replaced the segments of AQP-CE1 with those of AQP3 and GlpF to identify their roles. The functional characteristics of these mutants were principally similar to that of wild-type AQP-CE1, although the values of Pf and urea permeability were decreased by 39~74% and 28~65%, respectively. In summary, the two segments of extra amino acid residues at the second and third extracellular loops may not contribute to the channel selectivity or the formation of the route for small solutes.