

9835 水チャネルのチャネル孔部位の同定

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：伏見 清秀 (東京医科歯科大学 第2内科)

石橋 賢一 (自治医科大学 薬理学)

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質の総称である。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。これらのAQP蛋白質の構造は共通性があり、6回膜貫通型で3つの細胞外ループ(loop A, C, E)と2つの細胞内ループ(loop B, D)を有している。さらに、保存されたAsn-Pro-Ala配列(NPA motif)がloop Bとloop Eに存在する。眼のレンズに存在するMajor Intrinsic Protein (MIP)は、vasopressin感受性水チャネルであるAQP2とのアミノ酸相同性が58%ときわめて高いが、水透過性はAQP2のおよそ1/5である。この事実は、AQP2に存在しMIPと異なる一部のアミノ酸配列が水チャネル機能を高めていることを示している。AQPにおいて、今まで水チャネル機能との関連が示唆されている部位は、loop B, C, D, Eである。そこで本研究ではMIPのこれらのloopをAQP2の同等の部位で置換したキメラ体を作製し、AQP2のどのアミノ酸配列が水チャネル機能の発現に重要であるかを検討した。

アフリカツメガエル卵母細胞発現系および酵母細胞発現系を用いて浸透圧水透過性(Pf)を測定した結果、AQP2はMIPより5.1倍も高い水透過性を有していた。loop B、loop C、loop DのキメラのPfはMIPと同等であり、これらのloopが水透過性を高めている可能性は否定的であった。これに対してloop E前半部キメラとloop EキメラではPfがわずかではあるが有意に増加した。以上から、われわれはloop E付近のアミノ酸配列がAQP2の水チャネル機能発現に重要であると推定した。そこで、当初の予定にはなかったがloop Eに連なる部分であるhelix 5の役割について検討した。loop Eとhelix 5後半部(アミノ酸残基168~177)を同時に置換すると、驚いたことに野生型と同等までPfが上昇した。また、helix 5後半部(H5)のみを置換したキメラ体のPfはMIPの2.7倍であったことから、高い水チャネル機能の発現に関するH5の重要性が示唆された。

以上、MIPとAQP2のキメラ体の機能解析によって、helix 5後半部とloop E前半部(アミノ酸残基168~189)がAQP2の水チャネル機能発現に必要であることが示唆された。われわれは、この部分が水チャネル孔形成に関わっていると推定している。

9 8 3 5 水チャネルのチャネル孔部位の同定

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：伏見 清秀 (東京医科歯科大学 第2内科)
 石橋 賢一 (自治医科大学 薬理学)

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は全身の組織に分布し、水輸送に役立っている。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。これらのAQP蛋白の構造は共通性があり、6回膜貫通型で3つの細胞外ループ(loop A, C, E)と2つの細胞内ループ(loop B, D)を有している(図1A)。さらに、保存されたAsn-Pro-Ala配列(NPA motif)がloop Bとloop Eに存在する。最近の電子顕微鏡による結晶解析からは、水チャネル孔の形成にloop Bとloop Eの関与が示唆されているが、これ以上の詳細な検討はなされていない。

AQP2は伏見らがクローニングしたvasopressin感受性水チャネルである(1)。AQP2は腎集合管の管腔側膜直下に局在しており、vasopressinによる尿濃縮機構に重要な役割を果たしている。眼のレンズに存在するMajor Intrinsic Protein (MIP, 別名AQP0)はAQP2とのアミノ酸相同性が58%ときわめて高いが、水透過性はAQP2のおよそ1/5である。この事実から、AQP2に存在しMIPと異なる一部のアミノ酸配列が水チャネル機能を高めると推定される。AQPにおいて、今まで水チャネル機能との関連が示唆されている部位は、loop B, C, D, Eである(2,3)。そこで本研究ではMIPのこれらのloopをAQP2の同等の部位で置換したキメラ体を作製し、どのアミノ酸配列が水チャネル機能の発現に重要であるかを検討した。

研究方法

1. AQP2-MIPキメラ体の作製

MIP発現ベクター(pMIP/ev1)を鋳型として、loop B, C, D, EをAQP2の同等部位と置換した。表1に示したプライマーを用い、変異を含んだDNAフラグメントをpolymerase chain reaction (PCR)を用いて作製してAQP3発現ベクターのClaIおよびXbaI認識部位間を変異を含むフラグメントで置換した。作製したキメラ体を図1C~1Nに示した。cRNAはT3 RNA polymeraseを用いて作製した。

2. アフリカツメガエル卵母細胞における浸透圧水透過性の測定

卵母細胞に、40 nlの水または10ngのcRNAを注入し、Barth's buffer中で20°Cにて

TABLE 1. Oligonucleotide primers for the construction of AQP2-MIP chimera.

Chimera		Oligonucleotide	
Name		-----	
	Number	Sequence	
LB AQP2-MIP (replacement of residues 67 ~ 83)			
Sense	1.	5'-GGAGCCCATATCAACCCTGCAGTCACTGTC GCCTGCCTTGTGGGCTC-3'	
Antisense	2.	5'-GAGCCCACAAGGCAGGCGACAGTGA CTGCA GGGTTGATATGGGCTCC-3'	
Sense	3.	5'-TGCCTTGTGGGCTGCCACGTGTCCGTGCTT CGTGCC-3'	
Antisense	4.	5'-GCACGAAGCACGGACACGTGGCAGCCCACA AGGCA-3'	
LC AQP2-MIP (replacement of residues 110 ~ 127)			
Sense	5.	5'-GTCAATGCTCTCAGCAACAGCACGACGGCT GGCCAGGCCACCATAGTGGAGATCTTC-3'	
Antisense	6.	5'-GTCGTGCTGTTGCTGAGAGCATTGACTGCT AGGTTTCCTCGGACGGCAGGTGGGGTAAC-3'	
Sense	7.	5'-TACAGTGTTACCCCAGCTGACATCCGAGGA GACCTAGCAGTCAATGCTCT-3'	
Antisense	8.	5'-AGAGCATTGACTGCTAGGTCTCTCGGATG TCAGCTGGGGTAACACTGTA-3'	
LD AQP2-MIP (replacement of residues 154 ~ 157)			
Sense	9.	5'-TACGACGAGAGGCGGGGTGAGAACCCGGGC TCCGTGGCCCTG-3'	
Antisense	10.	5'-AGGGCCACGGAGCCCGGGTTCTCACCCCGC CTCTCGTCGTA-3'	
LE AQP2-MIP (replacement of residues 181 ~ 200)			
Sense	11.	5'-ATGTATTATACTGGTTGCAGCATGAACCCT GCCCGCTCCCTTGCTCCTGC-3'	
Antisense	12.	5'-AGAATGGCAGGAGCAAGGGAGCGGGCAGGG TTCATGCTGCAACCAGTATAATACAT-3'	
Sense	13.	5'-CTTGCTCCTGCCGTTGTTACCGGAAAAATTC GACGACCACTGGGTGTA CTGGGT-3'	
Antisense	14.	5'-ACCCAGTACACCCAGTGGTCGTGCAATTTT CCGGTAACAACGGCAGGAGCAAG-3'	
H5 AQP2-MIP (replacement of residues 168 ~ 177)			
Sense	15.	5'-GCCGTTGGCTTCTCCGTCGCCCTGGGGCAC CTCCTTGGGATCCATTATACTGG-3'	
Antisense	16.	5'-CCAGTATAATGGATCCCAAGGAGGTGCCCC AGGGCGACGGAGAAGCCAACGGC-3'	

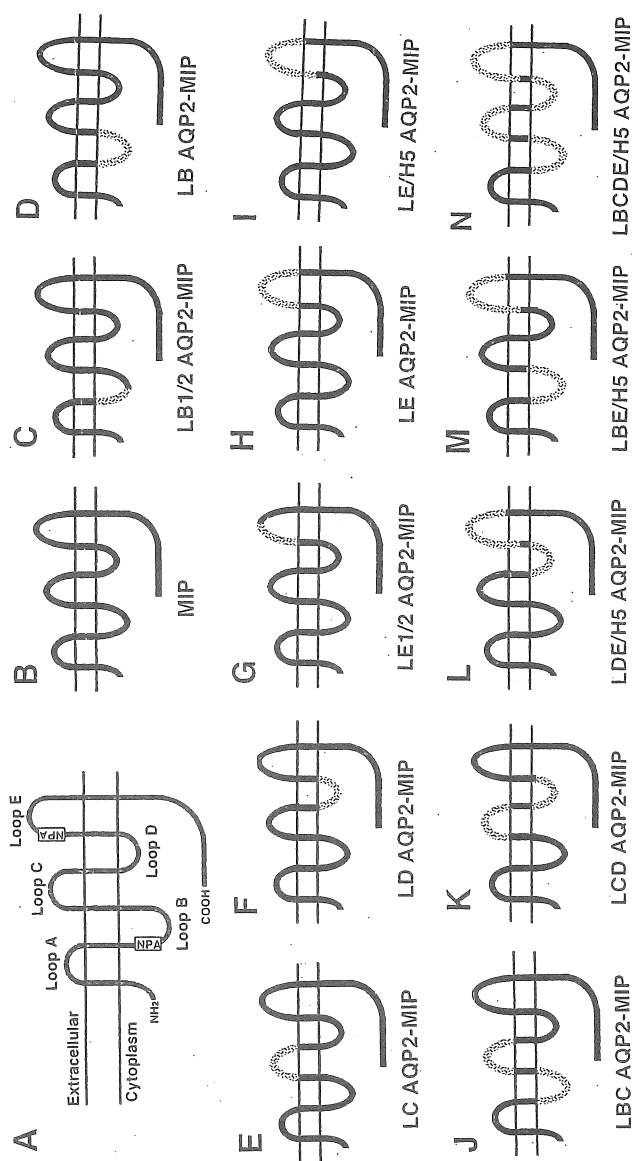


FIG. 1. Topology of MIP/AQP and scheme of chimera proteins. A: Membrane topology of MIP/AQP family proteins. MIP/AQP possesses six presumed transmembrane helices with five connecting loops (Loops A~E), and two conserved Asn-Pro-Ala (NPA) motifs in loops B and E. B~N: Scheme of MIP (B) and chimeras of AQP2 and MIP made in the present study (C~N). Loops B~E and a part of transmembrane helix 5 of MIP were replaced by the corresponding parts of AQP2 shown with dotted lines. LX AQP2-MIP: substitution of AQP2 loop X for MIP loop X. LX1/2 AQP2-MIP: Substitution of the front half of loop X of AQP2 for that of MIP. H5 AQP2-MIP: substitution of AQP2 helix 5 for that of MIP.

48時間インキュベーションした後に測定を行なった(4)。浸透圧水透過性(Pf)を求めるため、酵母細胞を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。

3. 酵母細胞小胞体における浸透圧水透過性の測定

酵母発現ベクターであるpYES2のHindIIIとXbaI認識部位にAQP2-MIPキメラ体を挿入し、酵母細胞(*Saccharomyces cerevisiae*)のプロテアーゼ欠損株であるBJ3505に発現させた。新保らの変法で得られた細胞小胞体のPfを、ストップフロー装置を用いて光散乱法にて求めた(5)。そのため、小胞体周囲の浸透圧を急激に上昇させて容積減少の時間経過を観察した。

4. ウェスタンブロット

水またはcRNAを注入後48時間の酵母細胞溶解、形質細胞膜分画を採取し、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MIPのC末端15アミノ酸を認識する抗MIP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。同様の方法で酵母細胞小胞体のウェスタンブロットを行った。

研究結果

図2Aに示した酵母細胞溶解物のウェスタンブロットでは、MIPおよびそのキメラ体において26~27kDaの位置にバンドが同定された。これらのバンド強度は、おおよそ同等であった。loop Bとloop Cを含んだキメラではさらに~2kDa大きなバンドを認めたが、このバンドはendoglycosidase Hとのインキュベーションで消失した。したがってこのバンドは糖鎖付加型のキメラ体蛋白であり、endoplasmic reticulumに留まっていることが示唆された。図2Cに示した酵母細胞形質膜分画のウェスタンブロットでは、MIPおよびloop Dとloop Eを含んだキメラでは明瞭なバンドが同定されたが、loop Bとloop Cを含んだキメラのバンド強度は非常に弱く、プロセッシング障害によって細胞形質膜への発現が障害されていることが再度示唆された。

Pfの測定結果を図3に示した。水を注入した対照酵母細胞のPfは $17 \pm 2(\text{SE}) \times 10^{-4}$ cm/sであったが、AQP2とMIPのcRNAを注入した酵母細胞のPfは、それぞれ14.4倍、2.8倍に上昇した。したがって、AQP2はMIPより5.1倍も高い水透過性を有していた。loop B

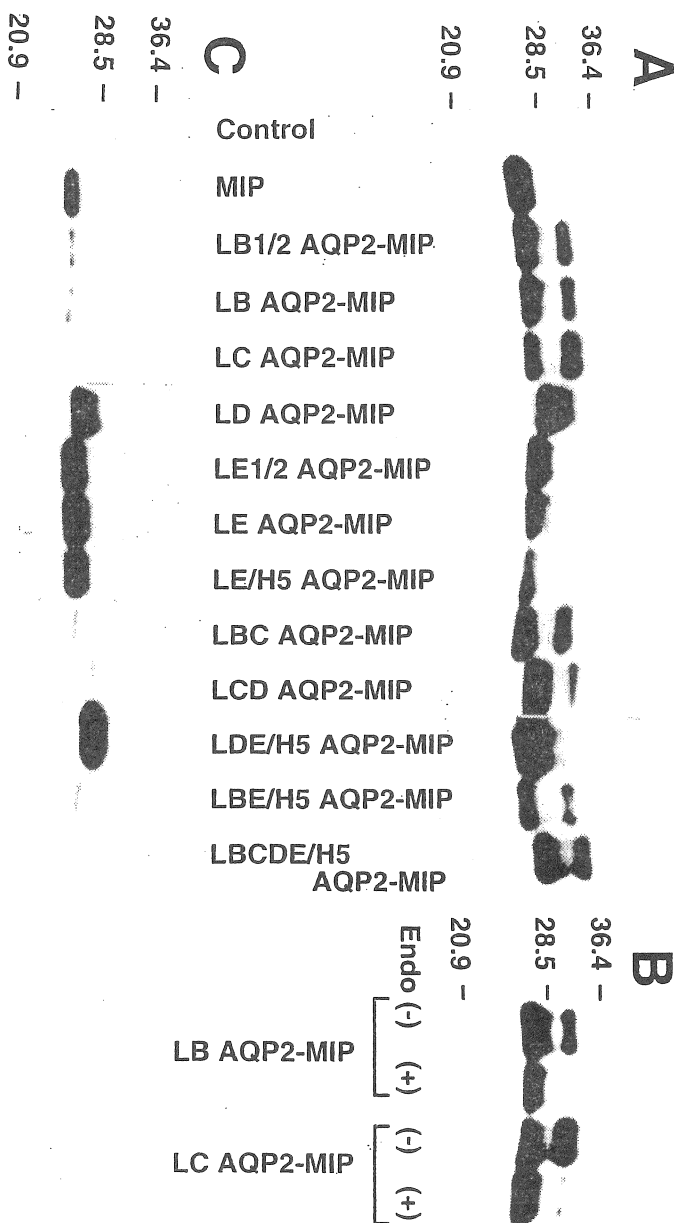


FIG. 2. Immunoblot of oocytes probed with an affinity-purified antibody against bovine MIP. Oocytes were injected with water (Control) or 10 ng cRNA of wild-type AQP2, MIP, or their chimeras. A: Samples of the oocyte lysates. The lysates from the equivalent 0.2 oocytes were loaded in each lane. B: Oocyte lysates before and after an incubation with endoglycosidase H. C: Samples of the plasma membrane fractions. The membranes from 20 equivalent oocytes or were loaded in each lane.

とloop Cを含んだキメラのPfは対照と同等で、ウエスタンブロットで示唆されたキメラ蛋白のプロセシング障害に一致する結果であった。loop DキメラのPfはMIPと同等であった。これに対してloop E前半1/2キメラとloop EキメラではPfが有意に増加した。しかし増加はわずかであって、これらのPf値は野生型の29～31%にすぎなかった。以上から、われわれはloop E付近のアミノ酸配列がAQP2の水チャネル機能発現に重要であると推定した。そこで、当初の予定にはなかったがloop Eに連なる部分であるhelix 5の役割について検討した。loop Eとhelix 5の後半を同時に置換したキメラのPfは、驚いたことに野生型と同等であった。したがってhelix 5が水透過性に重要であることが示唆された。

卵母細胞発現系では、loop Bとloop Cを含んだキメラは蛋白のプロセシング障害が細胞形質膜への発現低下の原因と考えられた。そこで、プロセシングの関与しない酵母発現系を用いてloop Bとloop Cの役割を検討した。酵母細胞小胞体を高浸透に暴露して直後の初期容積減少率からPfを求めた。図4Aに示したように、MIP発現酵母細胞では対照より容積減少率が大きく、AQP2やhelix 5/loop Eキメラ体ではさらに大きくなった。酵母細胞小胞体で求めたPfの結果を図4Bにまとめた。MIPおよびAQP2発現によってPfは、それぞれ2.4倍、9.0倍に増加した。helix 5/loop Eキメラ体のPfはAQP2のPfと同等であり、卵母細胞発現系で得られた結果と一致した。loop Bキメラ体とloop Cキメラ体のPfはどちらもMIPと同等であった。ウエスタンブロットでは、いずれも26～27kDaの位置にバンドが同定された(図4C)。

最後に、helix 5の機能についてより詳細に検討した。図5Aに示したようにhelix 5後半部(H5)をさらに前半(H5')と後半(H5'')に分けたキメラ体やH5のみを置換したキメラ体を作製した。これらのPf測定結果を図5Bにあげた。H5キメラ体のPfはMIPの2.7倍であった。loop E前半1/2/H5キメラ体のPfはAQP2と同等であった。一方、loop E前半1/2/H5'キメラ体とloop E前半1/2/H5''キメラ体のPfは、H5キメラ体とloop E前半1/2/H5キメラ体の中間の値を示した。

考察

AQPチャネル孔の構造解明は、膜蛋白における小分子の輸送を理解する上で非常に重要である。解明のための1つの方法として、今回われわれはアミノ酸配列の相同性が高い(58%)にもかかわらず、水チャネル機能が大きく異なったMIP、AQP2という2つの蛋白のキメラ体を作製して機能解析を行った。キメラ体の機能解析で問題となるのは、機能が低下または喪失した場合における結果の解釈である。すなわち、置換したアミノ酸部位が機能発現に重要であるという解釈も成り立つが、同時に、非特異的な構造変化、キメラRNAまたは蛋白の不安定化、キメラ蛋白のendoplasmic reticulumから細胞形質膜上発

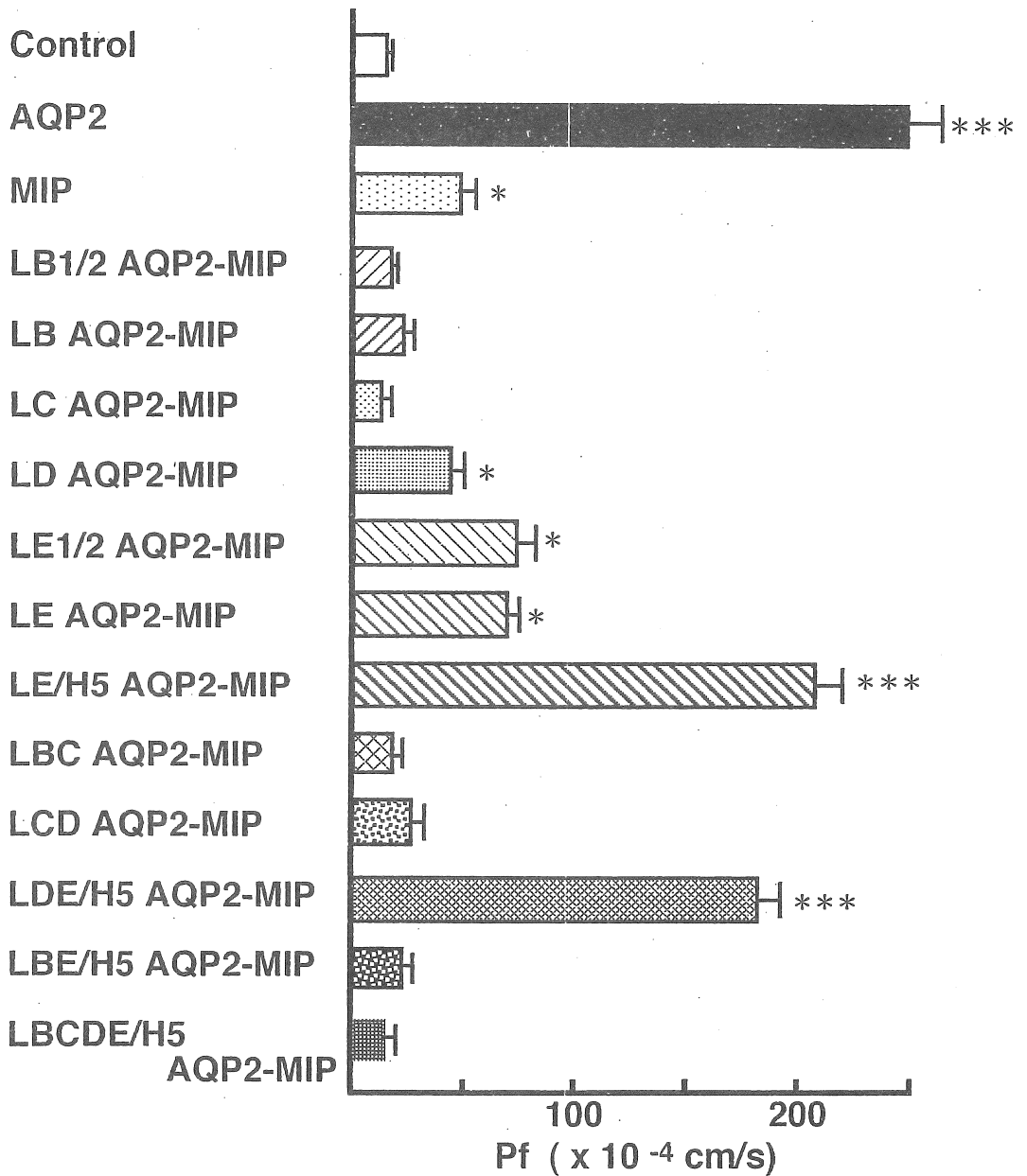


FIG. 3. Oocyte Pf measurement. Oocytes were injected with 40 nl of water (Control), or 10 ng cRNA of wild-type AQP2, MIP, or their chimeras. Pf was calculated from the time course of osmotic cell swelling of the oocytes. See Fig. 1 for the structure of chimeras. Each bar represents means+SE of 20 - 26 measurements. *, **, ***, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively, compared with the control by ANOVA.

現までのプロセシング障害などの可能性も否定できない。そこで本研究では、MIPの構造の一部を相当するAQP2で置換して水チャネル機能が増加するキメラ体(gain-of-function chimera)の作製を目指した。

卵母細胞のウエスタンブロットとPf測定の結果から、loop Bとloop Cを含んだキメラ体は卵母細胞形質膜上の発現が障害されていることが示唆された。しかし、これらのキメラ体の酵母発現系を用いた検討ではPfはどちらもMIPと同等であり、機能を有していることが判明した。しかし、PfがMIP以上に増加しなかったことから、AQP2の高い水チャネル機能にloop Bとloop Cの関与は否定的であった。loop Dキメラは卵母細胞で発現が認められたが、PfがMIPと同様の値を示したことから、やはりAQP2の水透過性に対するloop Dの関与はうすいと考えられた。

loop E前半1/2またはloop Eの置換でPfは有意に増加したことから、loop E前半1/2の部分に水チャネル機能を刺激する部分が存在することが示唆された。この部位でMIPとAQP2で異なるアミノ酸残基は181、182、189の3つである。特に、AQP2のC181は、第2 NPA motifの3個手前に位置しており、水銀感受性シスチンとして知られている(3)。このシスチンを側鎖の大きなトリプトファンと置換するとPfが大きく低下することから、C181は水チャネル孔の形成に関わっていて、トリプトファン側鎖がチャネル孔を閉塞させるという仮説が提唱された。われわれの実験結果も、loop E前半1/2の構造がチャネルの水透過性を規定するという点においては、先の仮説と同様である。しかしながら、loop E前半1/2キメラとloop EキメラのPf値はせいぜい野生型の29～31%にすぎなかったことから、明らかにAQP2のチャネル機能発現に他の部位の関与が示された。

われわれは、loop E周辺のhelix 5後半部(H5)に注目し、この部位についての検討を加えた。予想外の結果であったが、loop EとH5を同時に置換したキメラのPfは野生型と同等であった。H5のみを置換したキメラ体のPfはMIPの2.7倍であり、新ためてこの部位の重要性が示唆された。さらに、H5を前半(H5')と後半(H5'')に分けたキメラ体のPfがMIPとAQP2の中間の値を示したことから、H5'とH5''はそれぞれ水チャネル機能発現に寄与していることが示唆された。中でも、H''に含まれる168番目のアミノ酸はMIPではLであるが、MIPと相同性が高くしかもPfの高いAQP1、AQP2、AQP4、AQP5ではVである(図5A)。同様に、H'に含まれる176番目のアミノ酸はMIPではMであるが、MIPと他のPfの高いAQPではIである。よって、V168とI176がAQP2の水透過性に関わる可能性が考えられた。

以上、MIPとAQP2のキメラ体の機能解析によって、helix 5後半部とloop E前半部がAQP2の水チャネル機能発現に必要であることが示唆された。われわれは、この部分が水チャネル孔形成に関わっていると推定している。

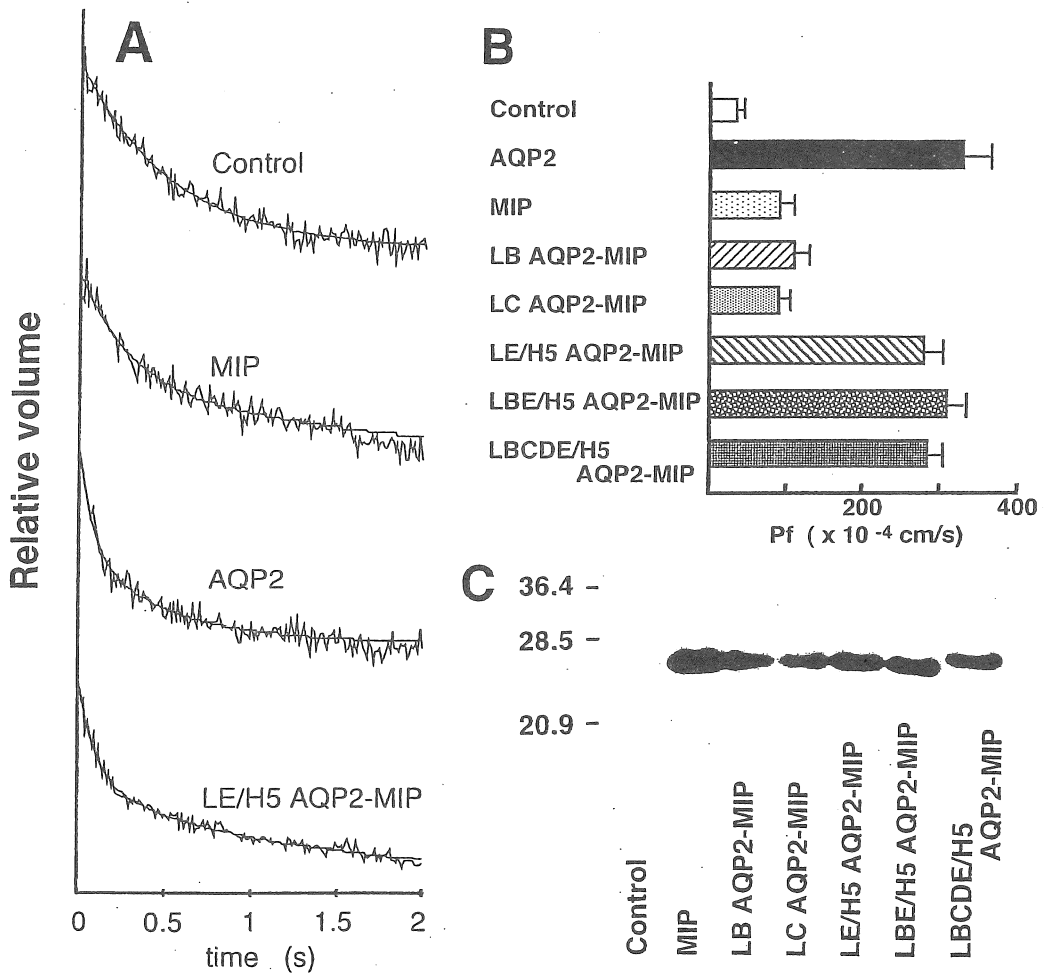


FIG. 4. Pf measurement and immunoblot of yeast cells. Wild-type AQP2, MIP, or their chimeras were expressed in yeast cells. A: Representative traces of yeast vesicle volumes in response to the osmotic shock. B: Summary of Pf measurement. Pf was calculated from the rate of volume decrease. Each bar represents means + SE of 6 - 8 measurements. See Fig. 1 for the structure of chimeras. C: Immunoblots probed with affinity-purified antibody against bovine MIP. A 2.5 μ g portion of protein was loaded in each lane.

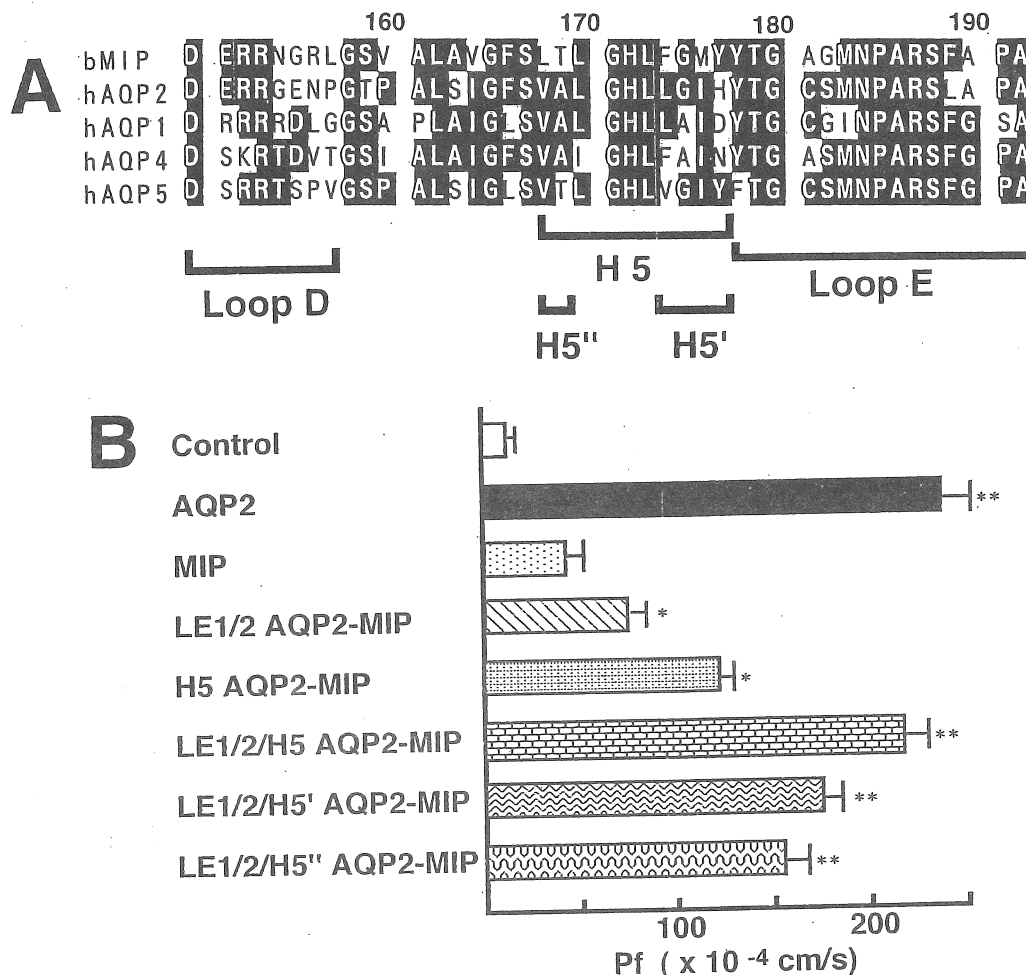


FIG. 5. Detailed examination of transmembrane helix 5. A: amino acid alignment around helix 5 in MIP with AQP2, AQP1, AQP4, and AQP5. White letters in black boxes denote conserved amino acid residues. H5, H5', and H5'' indicate residues 168 ~ 177, 174 ~ 177 and 168 ~ 169 in helix 5, respectively. Note that the number of the amino acid residues refers to those of MIP and AQP2. B: Pf of oocytes expressing MIP and AQP2 chimeras at loop E and helix 5. Oocytes were injected with 40 nl of water (Control) or 10 ng cRNA. Each bar represents means+SE of 17 ~ 22 measurements. *, **; $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively, compared with MIP by ANOVA.

今後の課題

AQPの中でも、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5は水選択的チャネルであるが、水の他に、AQP3、AQP7は尿素とグリセロール透過性を有し、AQP9は尿素透過性を有する。これはチャネル孔の構造の相違によると考えられるので、その原因を確かめたい。

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. Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, and Agre P: Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP: the hourglass model. *J Biol Chem* 269:14648-14654, 1994.
3. Bai L, Fushimi K, Sasaki S, and Marumo F: Structure of aquaporin-2 vasopressin water channel. *J Biol Chem* 271:5171-5176, 1996.
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.
5. Shinbo I, Fushimi K, Kasahara M, Yamauchi K, Sasaki S, and Marumo F. Functional analysis of aquaporin-2 mutants associated with nephrogenic diabetes insipidus by yeast expression. *Am J Physiol*, in press.

TRANSMEMBRANE HELIX 5 AND LOOP E ARE CRITICAL FOR THE HIGH WATER PERMEABILITY OF AQUAPORIN-2

Michio Kuwahara,¹ Kiyohide Fushimi,¹ and Kenichi Ishibashi,¹

¹Second Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University, and ²Department of Pharmacology, Jichi Medical School

Aquaporin-2 (AQP2), a vasopressin-regulated water channel, and the major intrinsic protein (MIP) of lens fiber are highly homologous (58% amino acid identity) and share a topology of six transmembrane helices connected by five loops (loops A ~ E). However, the water channel function of AQP2 is much higher than that of MIP. To determine the site responsible for this difference, several parts of MIP were replaced by corresponding parts of AQP2. When expressed in *Xenopus* oocytes, the osmotic water permeability (Pf) of MIP and AQP2 was 48 and 245 x 10⁻⁴ cm/s, respectively. Substitutions of loops B, C, and D failed to increase Pf, whereas substitution of loop E significantly increased Pf 1.5-fold. A similar increase of Pf was observed with the substitution of the front half of loop E. However, Pf values of these loop E chimeras were only ~30% of that of AQP2. Simultaneous exchanges of loop E and a distal half of transmembrane helix 5 just proximal to loop E increased Pf to the level of AQP2. Moreover, replacement of helix 5 alone stimulated Pf 2.7-fold. Pf measurements in a yeast vesicle expression system also confirmed that loop E had a complementary effect, whereas loops B, C, and D did not. Our findings suggested that the distal half of helix 5 and loop E are necessary for maximum water channel function in AQP2. We speculate that this portion contributes to the formation of aqueous pore and determination of the flux rate.