
基礎教育講演

アクアポリン 5 自然発生遺伝子変異の水チャネル機能におよぼす影響

細井 和雄

キーワード：アクアポリン，水チャネル，外分泌腺，遺伝子変異

Effects of a Naturally Occurring Mutation in Rat Aquaporin 5 on its Water Channel Functions

Kazuo HOSOI

Abstract : The aquaporin (AQP) family in mammals is composed of 13 members (AQP0-12) of water channel proteins. One of them, AQP5, is expressed in the various exocrine glands such as the lachrymal, parotid, and submandibular gland, and also in lung. We found the presence of G>A point mutation at position 308 in the rat AQP5 mRNA as well as the genome DNA. This mutation resulted in replacement of Gly¹⁰³ with Asp¹⁰³ in the AQP5 protein molecule, and led to various phenotypic alterations in the salivary gland. The point mutation localized in the 3rd trans-membrane domain, which is remote site from the water pore. As expected, the water permeability of the mutant molecule was almost same as that of the wild type molecule, indicating that the mutation does not affect the water permeability. In the submandibular gland, membrane expression of the mutant molecule was extremely reduced; and the secretion of saliva in the mutant rat was reduced also as compared to the wild-type animals. By confocal immunohistochemistry, an increased association of AQP5 and lysosomal markers, Lamp2 and/or cathepsin D was observed in the cytoplasmic area of acinar cells of mutant rats, implying the accelerated metabolism of the mutant molecule by the lysosomal system.

はじめに

アクアポリン (AQP) は膜タンパク質で、セルペンチン型構造をとる水チャネルである。微生物から動植物まで生物界に広く分布し、生体において必須の水代謝に深くかかわる。最初の AQP は 1992 年、Agre らのグループにより赤血球からはじめてクローニングされ、CHIP28 (channel forming integral protein 28) の名称で報告された¹⁾。続いて、Sasaki らのグループは第 2 番目の AQP, AQP2 を腎臓よりクローニングした²⁾。Fujiyoshi らのグループは、AQP1 分子の X 線結晶解析に成功し、その分子構造の全容を明らかにした³⁾。現在、哺乳類の AQP ファミリーには 13 分子種 (AQP0-12) が存在すること

が明らかにされている。また、いまのところ、AQP による生体膜を隔てた水移動は、単純に浸透圧勾配依存的に行われると考えられている。このチャネル分子の特徴は、(1) 細胞膜 6 回貫通型でタンデムリピート構造をとる。通常四量体で存在する；(2) 分子の 2 箇所ファミリ間で保存された Asp-Pro-Ala 配列 (NPA モチーフ) が存在し、ヘミチャネル構造をとる。ヘミチャネルは細胞内外から互いに向き合い、水分子の通路を形成する；(3) AQP 分子中にはグリコシレーション部位の他、リン酸化モチーフが存在し、機能調節に関与している可能性が考えられる；(4) AQP3, 7, 9, 10 はグリセリンも通過させる；などである。最近では、AQP ファミリー

表1 主な AQP の生理機能

AQP 分子種	主な発現組織	AQP 機能と生理作用
AQP0	眼のレンズ組織	水または浸透圧物質の輸送を調節し、水晶体の含水量を調節していると考えられている。遺伝子異常により白内障を発症する。発症頻度は加齢と共に増加する。
AQP1	赤血球	役割不明
	血管内皮	KO マウスでは移植癌の発育が悪い。また KO マウスから得た内皮細胞の遊走も遅い。
	腎臓近位尿管およびヘンレ係蹄下行脚 肺（肺胞血管内皮）	欠損により尿の濃縮障害が現れる。 出生時、肺における羊水吸収に重要。肺水腫におい欠損は保護作用がある。
AQP2	腎臓（集合管腔側）	バソプレッシンは長期的作用によって cAMP を介して AQP2 の遺伝子発現を調節している。短期的作用によって AQP2 を結合している小胞の細胞内から管腔膜へのトラフィッキングを惹起する。
	内耳（内リンパ嚢）	バソプレッシンあるいはその受容体の異常上昇が内耳 AQP2 のトラフィッキングなどに影響し、内リンパ水腫症（メニエール病）となる可能性が推測されている。
AQP3	皮膚（表皮の基底層角化細胞の細胞膜）	グリセロール輸送に関与する。正常な皮膚において、アトピー性湿疹などのストレスによってその発現が増加する。皮膚に水分を補給し弾力性を与える。欠損は創傷治癒と皮膚新生に障害をもたらす。
AQP4	脳（毛細血管、シナプス周辺空間、ランビエ絞輪と接する星状膠細胞の終足）	脳において脳浮腫の生成と消失に関与する。星状膠細胞の AQP4 は脳虚血、外傷、炎症、および代謝障害に続く脳浮腫において重要な役割を演じている。細胞毒性脳浮腫は AQP4 の欠損マウスにおいては軽度で済むが、脳脊髄液漏出による血管原性浮腫を悪化させる。
AQP5	唾液腺、肺	本文参照。
AQP7	脂肪組織	グリセロール輸送に関与する。血清グリセロールレベルの変化と一致して脂肪組織の AQP7 mRNA は摂食時減少し、絶食状態で上昇する。この変化は血中インスリン濃度の変化と相反する。AQP9 は肝臓へのグリセロールチャネルと考えられる。AQP7 および AQP9 の転写活性はいずれもインスリンによって負に調節されている。
AQP9	肝臓（肝門脈に接するシヌソイド細胞膜）	

文献5より転載

の分子は水やグリセリン以外の溶質のチャネルでもあることが明らかになっている。例えば、AQP6がイオンを、AQP1はCO₂を、AQP8はH₂O₂を、そして多くのアクアグリセロポリン（AQP3, 7, 9）は砒素を通過させる。さらに最近では、ある種のAQPは細胞接着、細胞運動、細胞分裂にも関与していることが明らかにされている⁴⁾。主なAQPとその生理作用を表1にまとめた⁵⁾。

唾液腺や涙腺などの外分泌腺における水分泌、肺における肺胞からの水移動は、これら臓器の最も重要な生理機能の一つであり、AQP2と相同性の高いAQP5が組織に発現している。AQP5をノックアウトした遺伝子改変マウスが作成され、解析された。外見は正常に見えるが、AQP5 null マウスの出生率と成長速度はともに低い。また、コリン刺激性気管支収縮に過敏である⁶⁾。

唾液腺ではAQP5は腺房細胞の細胞膜に発現し、この部位での水移動（分泌）に関与する。唾液腺（顎下腺）のAQP5は腺を支配している鼓索神経（副交感神経）の切除によって減少するので、副交感神経はAQP5レベルの維持に必要である⁷⁾。神経切除は腺房細胞のオートファジーとリソソーム系の活性化を惹起し、これらの経路を経てAQP5が代謝・分解される⁸⁾。AQP5 null マウスでは唾液の分泌量の低下（正常の50%）と粘性の上昇が報告されている⁹⁾。唾石症、唾液腺炎など、一定の

病態下で唾液腺AQPの遺伝子発現も影響される可能性がある。唾液腺からのサイトカインや水の分泌は、外界に直接さらされている口腔の生体防御において重要であり、唾液腺の水分泌障害は口腔衛生上も重要な問題である。実際、内毒素であるリポ多糖（LPS）の投与により惹起した実験的炎症により、炎症性サイトカイン等が唾液腺において誘導され¹⁰⁻¹²⁾、あるものは口腔へ分泌される¹²⁾。

一方、AQP遺伝子の異常はよく知られており、種々の疾患・病態を引き起こす。それらの例は表2に示した。外分泌腺に発現するAQP5の遺伝子ノックアウトは外分泌腺機能異常をもたらすが、実際にヒトのAQP5遺伝子異常はまだ報告されていない。私たちはラットにおいて自然発症AQP5変異遺伝子が存在することを見出した。将来ヒトにおいてAQP5遺伝子異常が発見された際、その治療等の参考になると考え、自然発症AQP5変異遺伝子の産物であるラットAQP5変異遺伝子・蛋白質の解析を行った。

AQP5変異体の発見

最初、別の目的で雄性ラット顎下腺のAQP5ウェスタンブロットティングを行ったところ、個体によってAQP5発現レベルが異なることを見出した¹³⁾。この多

表2 アクアポリン遺伝子異常・ノックアウトに基づく疾患および病態

遺伝子	疾患あるいは病態
(遺伝子異常)	
AQP0 (MIP)	白内障
AQP1	尿濃縮障害、知覚障害、脂肪吸収障害
AQP2	腎性尿崩症
AQP7	グリセリン代謝異常
(ノックアウトマウス)	
AQP3	尿濃縮障害、皮膚乾燥
AQP4	尿濃縮障害、聴覚・視覚異常、脳浮腫軽減
AQP5	外分泌障害

MIP: major intrinsic protein

形は同じ動物が週齢を重ねても変わらず、また雌においても見られた（図1 A）。しかし、同じ動物の顎下腺AQP1の発現レベルには個体間で差はなかった。AQP5高産生ラットと低産生ラットを別々に交配し、3代目において顎下腺の他、耳下腺、肺、涙腺においてその発現レベルを調べると、これら臓器のAQP5産生量は、AQP5高産生ラットでは高く、低産生ラットでは低かった（図1 B）。これらの結果から、AQP5産生量の個体による差は遺伝的に定まったものであることが示唆された。

AQP5変異体の唾液分泌に及ぼす影響

AQP5高産生ラット及び低産生ラットの唾液分泌量を調べた。無刺激時における唾液分泌量はAQP5低産生ラットでは有意に低く、高産生ラットの8分の1であった（図2 A）。また、ピロカルピン刺激時においても同様にAQP5高産生・低産生のラットの間で刺激直後の唾液分泌量に差が見られた（図2 B, C）。さらに、飲水量はAQP5低産生ラットでは高産生ラットより有意に多かった（図2 B）。これらの結果はAQP5が唾液分泌に深く関係していることを示す¹⁴⁾。

AQP5変異蛋白質の唾液腺における局在、変異AQP5 mRNAレベル、および遺伝子解析

次にAQP5変異蛋白質の唾液腺における局在、mRNAレベル、および変異体のAQP5遺伝子の解析を行った（図3）。図3 A aに示すように、野生型ラットでは、AQP5は腺房細胞の細胞膜全体に局在したが、変異体ではAQP5の発現部位は一見、制限されていた（図3 A b）。AQP5変異体において、腺房細胞の細胞膜にはきわめて低レベルのAQP5が発現している（図3 A d）のみであった¹⁵⁾。この結果及び上記ウェスタンブロットティングの結果から変異体においてAQP5蛋白質の産生量が低下していることは明らかであるので、変異体においてはmRNAレベルが低下したためにAQP5蛋白質産生が低下した可能性について調べた。即ち、野生型と変異体のAQP5 mRNAレベルを、ノザンブロットティング、

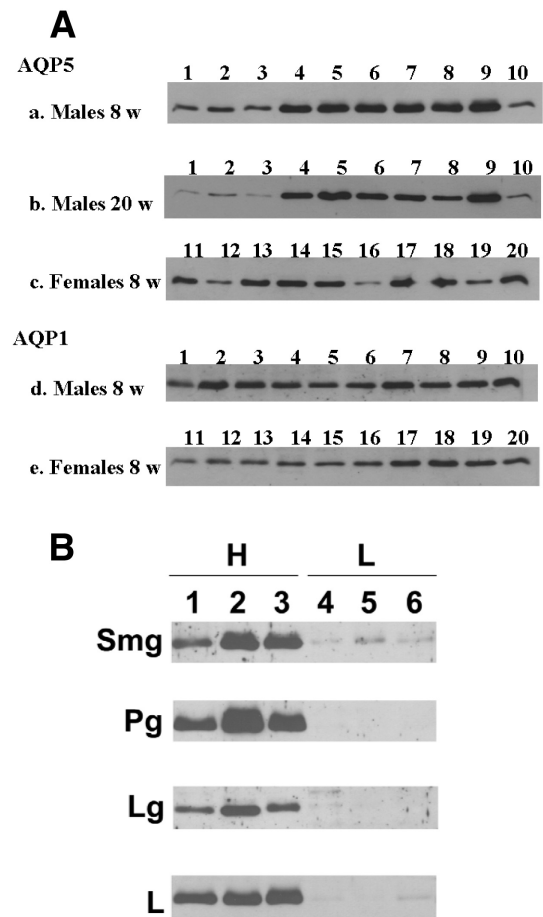


図1 Western blotting による SD ラット顎下腺の AQP5 および AQP1 の検出（文献13 より）

A, SD ラット顎下腺の AQP5 および AQP1 の検出。a, b, d の各サンプルはそれぞれ同一個体。同様に c および e の各サンプルもそれぞれ同一個体。

B, 高発現 (H) 及び低発現 (L) ラットより得た、顎下腺 (Smg), 耳下腺 (Pg), 涙腺 (Lg), および肺 (L) の各サンプルの Western blotting。

およびリアルタイム RT-PCR により解析した（図3 B, C）。図に示すように、AQP5 mRNA の発現レベルに野生型と変異体の間で有意な差を認めなかった。また、翻訳開始シグナルの直前 (Kozak 配列, GCCRCCaugG) も野生型と変異体はともに、GGCACCAugA であった。これらの結果は変異体における AQP5 蛋白質産生量の減少は転写活性の低下によるものではないことが明白となった。また変異体において Kozak 配列は野生型と同様であることから翻訳活性もおそらく影響されていないと考えられた。著しい AQP5 蛋白質レベルの減少および腺房細胞における異常局在から変異体蛋白質分子は細胞の品質管理系により速やかに代謝・分解された可能性が考えられた（後述）。

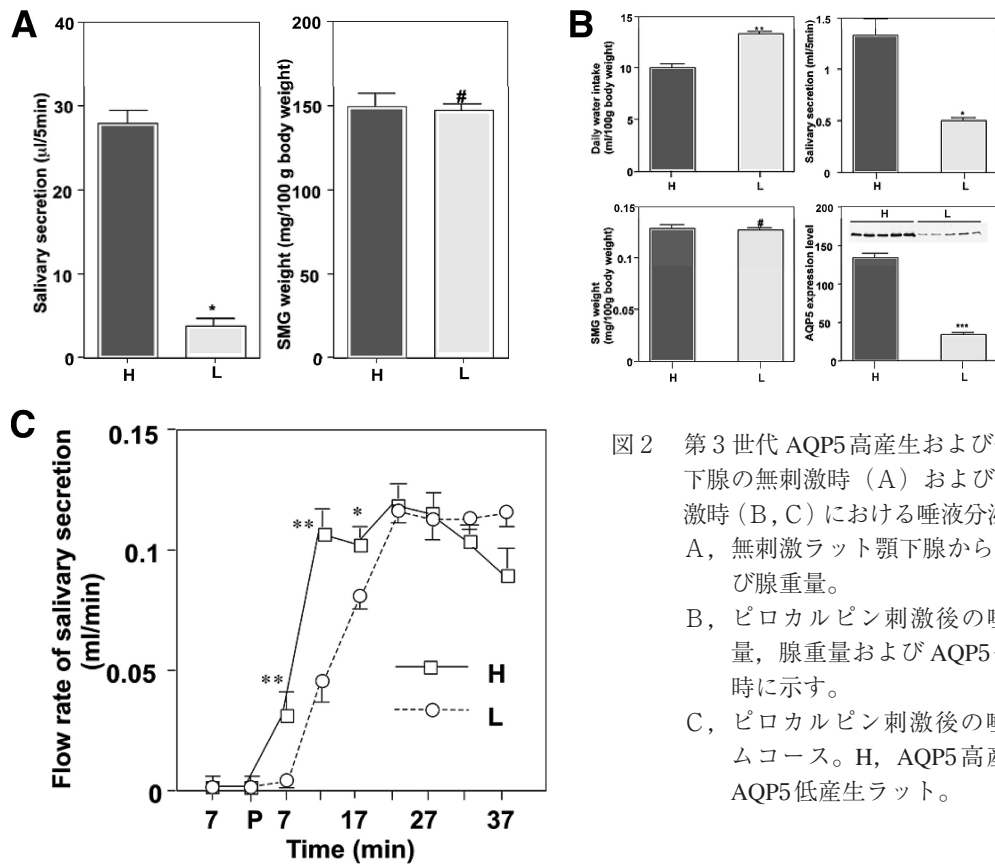


図2 第3世代 AQP5 高産生および低産生ラット顎下腺の無刺激時 (A) およびピロカルピン刺激時 (B, C) における唾液分泌 (文献14より) A, 無刺激ラット顎下腺からの唾液分泌および腺重量。B, ピロカルピン刺激後の唾液分泌。飲水量, 腺重量および AQP5 発現レベルを同時に示す。C, ピロカルピン刺激後の唾液分泌のタイムコース。H, AQP5 高産生ラット, L, AQP5 低産生ラット。

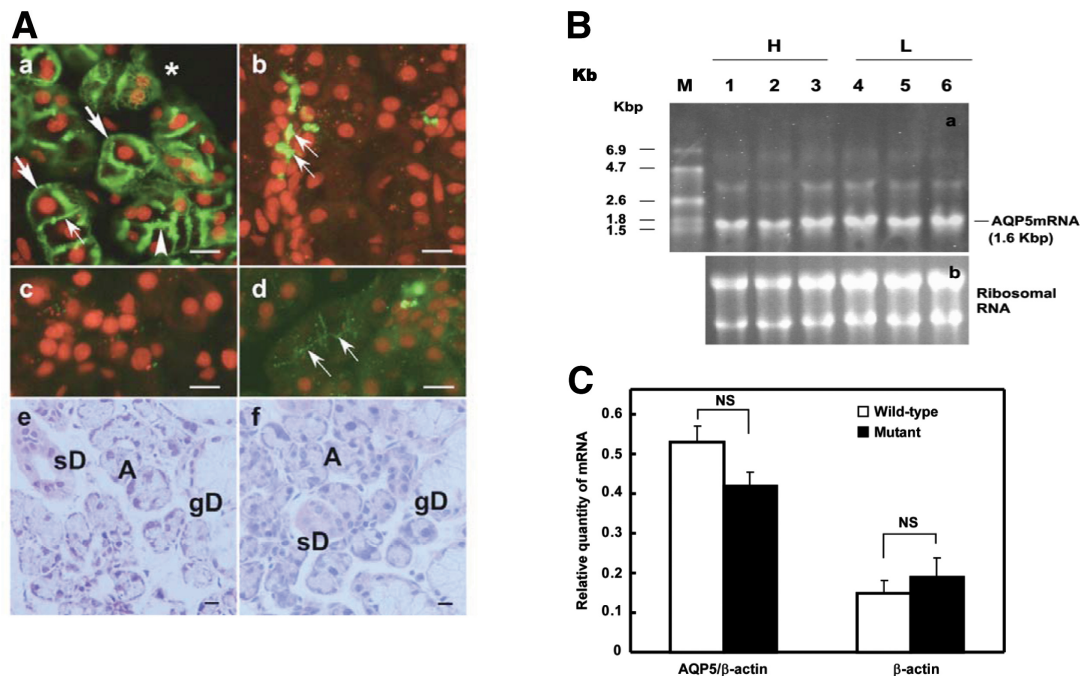


図3 AQP5 高産生及び低産生ラットの顎下腺における AQP5 の免疫組織化学的局在 (A), および同組織における AQP5 mRNA レベル (B, C)

A, a, c, e 高産生ラット, b, d, f 低産生ラット, a, b, d, 抗 AQP5 抗体, c, peptide 吸収抗 AQP5 抗体, d, 低産生ラット, 長時間露光。e, f, ヘマトキシリン・エオシン染色 (文献14より)。

B, H, AQP5 高産生ラット; L, AQP5 低産生ラット。a, AQP5 ノザンブロットティング, b, リボゾーム RNA (文献14より)。

C, AQP5 mRNA リアルタイム RT-PCR (文献15より)。

A Location of a point mutation in rat AQP5

	101	G	A	G	I	L	105
high AQP5 producer	301	GGGGCAGG	CATCCTG				315
low AQP5 producer	301	GGGGCAGAC	CATCCTG				315
	101	G	A	D	I	L	105

B Rat mutant AQP5

1	MKKEVCSLAFFKAVFAEFLATLIFVFFGLGSALKWPSALP	40
41	TILQISIAFGLAIGTLAQALGPVSGGHINPAIPLALLIGN	80
81	QISLLRAVFYVAAQLVGAIAAGADILYWLAPLNARGNLAVN	120
121	ALNNNTTPGKAMVVELILTFQLALCIFSSDTSRRTSPVGS	160
161	PALSIGLSVTGLGHLVGIYFTGCSMNPARSFGPAVVMNRFS	200
201	PSHWVFWVGPIVGAMLAAILYFILLFPSSLSLHDRVAVVK	240
241	GTYEPEEDWEDHREERKKTIELTAH	266

C Human AQP1

1	MASEFKKKLFWRAVVAEFLATTLFVFIISIGSALGFKYPVG	40
41	NNQTAVQDNVKSALFGLSIATLAQSVGHISGAHINPAVT	80
81	LGLLLSCQISIFRALMYIIAQCVGAIVATAILSGITSSLT	120
121	GNSLGRNDLADGVNSGQGLGIEIIGTLQLVLCVLATTDRL	160
161	RRDLGGSAPLAIGLSVALGHLLAIDYTCGGINPARSFGSA	200
201	VITHNFSNHWIFWVGPFIGGALAVLIYDFILAPRSSDLTD	240
241	RVKVWTSQGVEEYDLADADDINSRVEMKPK	269

図4 ラット AQP5 cDNA における点変異の位置および、ラット AQP5 ペプチド配列とヒト AQP1 ペプチド配列の比較 (文献14より)

A, ラット AQP5 点変異の位置とアミノ酸置換。

B, ラット AQP5。

C, ヒト AQP1。

膜貫通ドメインのアミノ酸をボールドで示す。赤ハイライトは点変異によりグリシンからアスパラギン酸への置換を示す。黄色ハイライトは点変異が存在した第3膜貫通ドメイン。ブルーはチャネルの内部で水通過孔に向いているアミノ酸を示す (文献3より)。

AQP5変異体より得た cDNA の塩基配列を解析し、変異体遺伝子には G308A の点変異が存在することが明らかになった (ゲノム DNA も同様であった)¹⁴⁾。この結果、変異体においては Gly¹⁰³ > Asp¹⁰³ のアミノ酸置換が生じている (図4 A, B)。図4 Bに示すように、この部位は第3膜貫通領域に存在し、疎水性アミノ酸の親水性アミノ酸への置換によりその高次構造に大きな影響が発生している可能性が考えられる。一方、ヒト AQP1 との比較から第3膜貫通ドメインには水の通路に面したアミノ酸が存在しない¹⁴⁾。このことはこの変異が水の透過活性に影響を与えない可能性を示唆する。事実、*Xenopus* oocyte を用いた osmotic water permeability assay により変異分子の水透過性は野生型のそれと比較し、有意差は認められなかった (次節参照)。

AQP5 変異蛋白質の水透過能

上記のように AQP5 G308A の点変異によって水透過活性は影響されないと予想された。そこでこれを検証する目的で *Xenopus* oocyte を用いた osmotic water permeability assay を行った (図5 A - C)¹⁵⁾。まず、*Xenopus* oocyte に野生型、AQP5 G308A 変異型 cRNA、および水を注入し、定法に従い、osmotic water permeability

assay を行った。さて、図5 Aに示すように、cRNA (または水) 注入後、72時間のインキュベーションを行うと、いずれの cRNA 注入も水注入群に比較し有意に osmotic water permeability (Pf) 値を上昇させた。また野生型と AQP5G308A 変異型の cRNA の間には有意差は認められなかった。これは AQP5 特異的阻害剤である Hg²⁺ 存在下でも同様であった。なお、cRNA 注入により、図5 Bに示すように野生型、AQP5 G308A 変異型の AQP5 はいずれも oocyte 細胞膜に発現した。AQP5 の oocyte における発現はウェスタンブロッティングによっても確認された (図5 C)。以上のことから、AQP5 の水透過性は G308A 変異 (G103D 変異) によって低下しないことが明らかになった。

AQP5 変異蛋白質のトラフィッキングと代謝

先に述べたように、変異分子の水透過性は野生型と比べて大きな変化はないので *in vivo* における水分分泌 (唾液分泌) の減少は、変異 AQP5 のインタクトな顎下腺組織の腺房細胞細胞膜における発現が減少していることによると考えられた。そこで極性を有する MDKII 細胞に発現させた野生型および変異 AQP5 のトラフィッキングを調べた。細胞機能に影響する各種阻害剤の存在下、腺

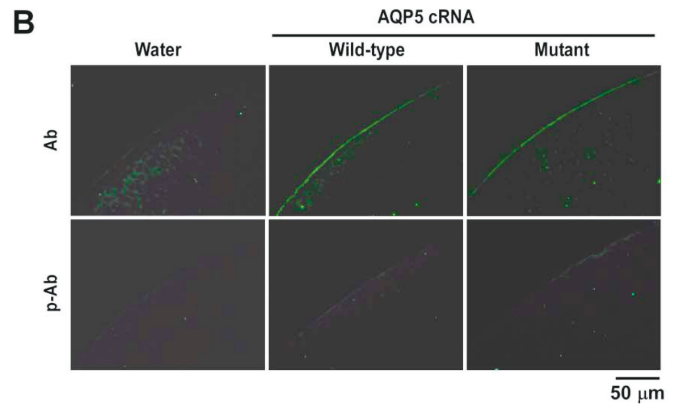
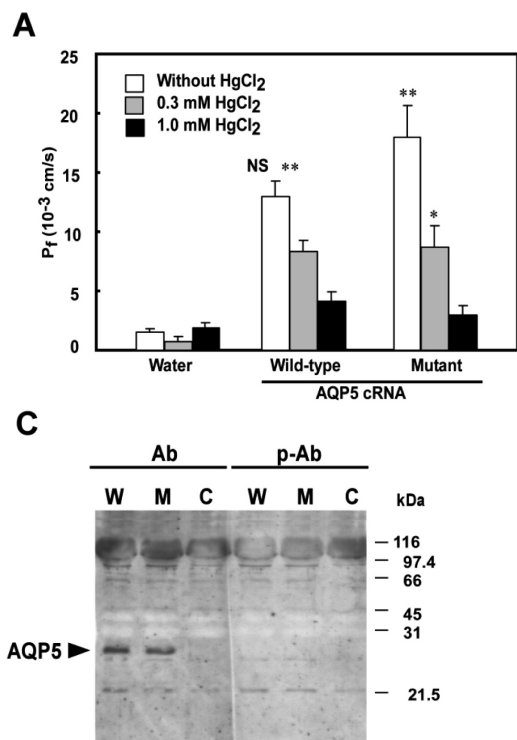


図5 アフリカツメガエル卵母細胞による AQP5 の P_f (osmotic water permeability) 値の測定 (文献15より)

A, 水, 野生型または変異型 AQP5 cRNA を投与した卵母細胞の水透過活性。

B, 水, 野生型または変異型 AQP5 cRNA を投与した卵母細胞の免疫組織化学。

C, 水, 野生型または変異型 AQP5 cRNA を投与した卵母細胞の Western blotting。

Ab, 抗 AQP5 抗体, p-Ab ペプチド吸収抗 AQP5 抗体。

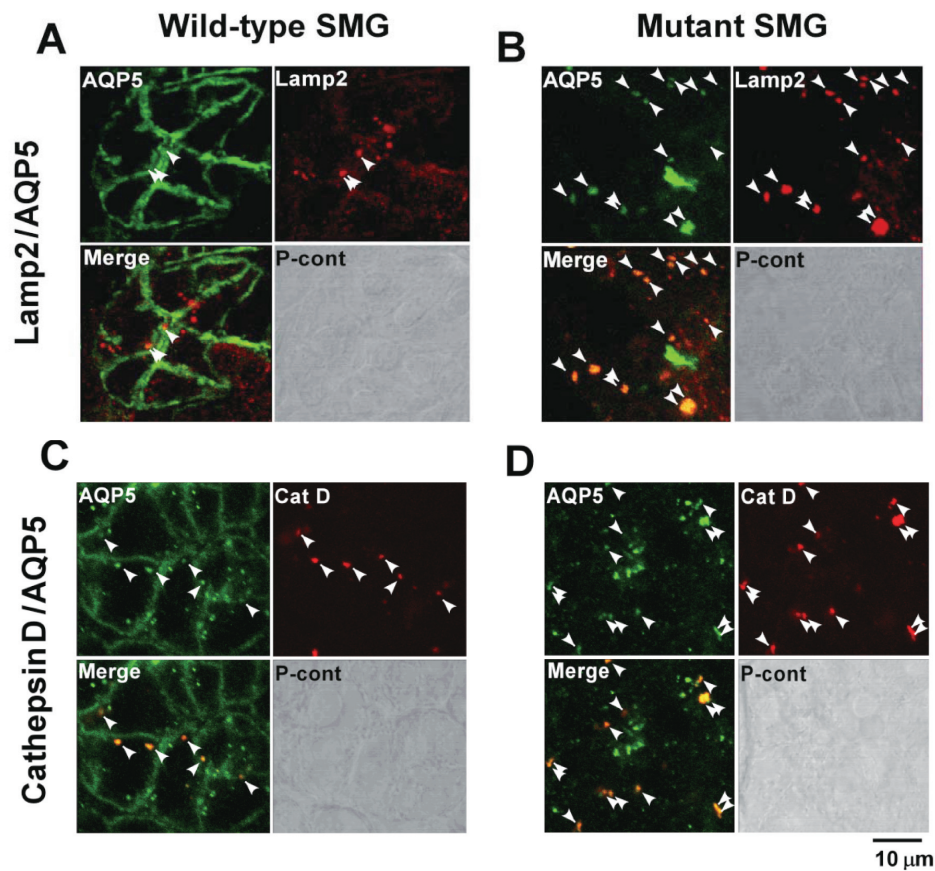


図6 顎下腺における AQP5, Lamp2 およびカテプシン D の免疫組織化学的局在 (文献15より)
 緑, FITC (AQP5), 赤, Alexa Fluor 594 (Lamp2 およびカテプシン D)。P-cont, 位相差画像。

A, B, AQP5 と Lamp2 の 2 重染色。C, D, AQP5 とカテプシン D の 2 重染色。

A, C, 野生型ラット, B, D, 変異型ラット。

腔側膜への AQP5 の移動は常に変異体は野生型より少ないことが明らかになった。即ち、変異はトラフィックに影響を与えると考えられた¹⁵⁾。さらに AQP5 の細胞内における局在を調べると、AQP5 とリソゾームマーカー、Lamp2 との共局在は野生型では少なく、変異体では多いことが明らかになった（図 6 A, B）。同じくリソゾームマーカーであるカテプシン D と AQP5 の共局在も同様に野生型に比べて変異体では増加していることが明らかになった（図 6 C, D）¹⁵⁾。これらの結果からおそらく変異体分子は細胞の品質管理系により速やかにリソゾーム系によって代謝分解されたのではないかと考えられた。

おわりに

本研究で明らかになった、AQP5 G308A 変異体は、実際は SNP である。そして変異体がホモで出現する頻度もきわめて高い。ヒトでは現在のところ AQP5 の変異は報告されていないが先に述べたように 3'UTR に SNP が存在し、喘息などの発症と一定の相関がある。一方、AQP5 変異体はこの水チャネル分子の機能に関する基礎研究を行うのに優れたモデルである。現在、水輸送の活性化エネルギーを測定し、唾液腺からの水分分泌における傍細胞経路と経細胞経路の関係を調べている。

文 献

- 1) Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., and Agre, P.: Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385-387 (1992)
- 2) 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)
- 3) Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., and Fujiyoshi, Y.: Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407, 599-605 (2000)
- 4) Ishibashi, K., Koike, S., Kondo, S., Hara, S., and Tanaka, Y.: The role of a group III AQP, AQP11 in intracellular organelle homeostasis. *J. Med. Invest.* 56 (Suppl), 312-317 (2009)
- 5) 細井和雄, 姚陳娟: 転写因子クロスカップリングを介した内毒素によるアクアポリン5の発現制御. *生化学* 83, 632-638 (2011)
- 6) Krane, C.M., Fortner, C.N., Hand, A.R., McGraw, D.W., Lorenz, J.N., Wert, S.E., Towne, J.E., Paul, R.J., Whitsett, J.A., and Menon, A.G.: Aquaporin 5-deficient mouse lungs are hyperresponsive to cholinergic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 14114-14119 (2001)
- 7) Li, X., Azlina, A., Karabasil, M.R., Purwanti, N., Hasegawa, T., Yao, C., Akamatsu, T., and Hosoi, K.: Degradation of submandibular gland AQP5 by parasympathetic denervation of chorda tympani and its recovery by cevimeline, an M3 muscarinic receptor agonist. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G112-G123 (2008)
- 8) Azlina, A., Javkhlan, P., Hiroshima, Y., Hasegawa, T., Yao, C., Akamatsu, T., and Hosoi, K.: Roles of lysosomal proteolytic systems in AQP5 degradation in the submandibular gland of rats following chorda tympani parasympathetic denervation. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G1106-G1117 (2010)
- 9) Ma, T., Song, Y., Gillespie, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J., and Verkman, A.S.: Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J. Biol. Chem.* 274, 20071-20074 (1999)
- 10) Yao, C., Wei, W., Li, X. and Hosoi, K.: Acute phase protein induction by experimental inflammation in the salivary gland. *J. Oral Pathol. Med.* 34, 364-367 (2005)
- 11) Javkhlan, P., Hiroshima, Y., Azlina, A., Hasegawa, T., Yao, C., Akamatsu, T., Kido, J., Nagata T., and Hosoi, K.: Lipopolysaccharide-mediated induction of calprotectin in the submandibular and parotid glands of mice. *Inflammation* (2011) in press
- 12) Yao, C., Li, X., Murdiastuti, K., Kosugi-Tanaka, C., Akamatsu, T., Kanamori, N., and Hosoi, K.: Lipopolysaccharide-induced elevation and secretion of interleukin-1 β in the submandibular gland of male mice. *Immunology* 116, 213-222 (2005)
- 13) Murdiastuti, K., Miki, O., Yao, C., Parvin, M.N. Kosugi, C., Akamatsu, T., Kanamori N. and Hosoi, K.: Divergent expression and localization of aquaporin 5, an exocrine-type water channel, in the submandibular gland of Sprague-Dawley rats. *Pflügers Arch.: Eur. J. Physiol.* 445, 405-412 (2002)
- 14) Murdiastuti, K., Purwanti, N., Karabasil, M.R., Li, X., Yao, C., Akamatsu, T., Kanamori, N., and Hosoi, K.: A naturally occurring point mutation in the rat aquaporin 5 gene, influencing its protein production by and secretion of water from salivary glands. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G1081-G1088 (2006)
- 15) Karabasil, M.R., Hasegawa, T., Azlina, A., Purwanti, N., Yao, C., Akamatsu, T., Tomioka, S., and Hosoi, K.: Effects of naturally occurring G103D point mutation of AQP5 on its water permeability, trafficking, and cellular localization in the submandibular gland of rats. *Biol. Cell* 103, 69-86 (2011)