慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | アクアポリン4の蛋白複合体とアレイ構造による機能制御に関する研究 |
| Sub Title | Regulation of aquaporin-4 by formation of protein complex and orthogonal array |
| Author | 安井, 正人(Yasui, Masato)<br>中尾, 和貴(Nakao, Kazuki)<br>阿部, 陽一郎(Abe, Yoichiro)<br>行武, 良哲(Yukutake, Yoshinori) |
| Publisher | |
| Publication year | 2012 |
| Jtitle | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2011. ) |
| JaLC DOI | |
| Abstract | AQP4M1アイソフォーム特異的ノックアウトマウス、AQP4完全ノックアウトマウス両系統とも9代の戻し交配を終了した。各系統についてホモ個体を作製し、8週齢のマウス小脳におけるAQP4タンパク質の発現をウェスタンブロット法で野生型マウスと比較したところ、AQP4完全ノックアウトマウスではM1及びM23アイソフォームに相当するバンドが消失している事が確認できた。これに対し、AQP4M1アイソフォーム特異的ノックアウトマウスの小脳ではM23アイソフォームのバンドのみが検出され、M1アイソフォームが特異的にノックアウトされていた。しかしながらAQP4タンパク質の総量は野生型マウスの40%程度まで減少していた。この結果から、ゲノムの遺伝子操作に起因するmRNAの発現レベルの低下の可能性、あるいはM1アイソフォームの消失がAQP4タンパク質の安定性に影響を及ぼす可能性等が示唆される。現在この現象の分子メカニズムについて解析を行っている。また、AQP4M1アイソフォーム特異的ノックアウトマウスの小脳の凍結割断電子顕微鏡法による観察の結果、野生型と比較して遥かに巨大なアレイ構造を形成している事も明らかとなった。これら2種類のノックアウトマウスは、1年以上の長期にわたって飼育しても肉眼的には野生型マウスとの差異は認められないが、理研BRCとの共同研究により網羅的表現型解析を開始している。 |
| Notes | 研究種目：基盤研究(B)<br>研究期間：2009～2011<br>課題番号：21390061<br>研究分野：医歯薬学<br>科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般 |
| Genre | Research Paper |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21390061seika |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

# 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2009～2011
課題番号：21390061
研究課題名（和文）　アクアポリン 4 の蛋白複合体とアレイ構造による機能制御に関する研究

研究課題名（英文）　Regulation of aquaporin-4 by formation of protein complex and orthogonal array

研究代表者
安井　正人（YASUI MASATO）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90246637

研究成果の概要（和文）：
（現在論文投稿中のため発表見合わせ）

研究成果の概要（英文）：
（現在論文投稿中のため発表見合わせ）

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 2009 年度 | 6,900,000 | 2,070,000 | 8,970,000 |
| 2010 年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 2011 年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 総　計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般
キーワード：アクアポリン・蛋白複合体・構造機能相関・水分子・脳浮腫

## １．研究開始当初の背景

AQP１の発見以来、体内水分調節、分泌･吸収の多くが、分子レベルで理解できるようになってきた。現在までに哺乳類では 13 種類の AQP の存在が確認されている(AQP0-AQP12)。AQP は、ほぼ全身にわたって分布しているが、各々ユニークな組織分布を示しており、それぞれに特有の生理的意義が示唆されている。哺乳類の脳では、主に AQP4 が発現している。AQP4 は、神経細胞にはその発現を認めず、グリア細胞、特にアストロサイトに発現している。アストロサイトは、神経細胞が形成するシナプスを取り囲んでいる以外に毛細血管の周囲を取り囲んでいることが知られている。AQP4 は、この毛細血管周囲のアストロサイトの足突起に特に限局して発現している。その他、脳室周囲の上衣細胞や脳表面の軟膜直下のアストロサイトの突起にもその発現を認める。これらの発現パターンから AQP4 は、脳脊髄液の循環、とくにその吸収に関与していると考えられている。AQP4 独自の特徴として、(1) ジストロフィン複合体の一部として、nNOS

等と共存している、(2)4 量体が更に重合し、碁盤の目のようなアレイ構造を形成する、などが挙げられる。蛋白複合体に関しては、C 末の PDZ 認識サイトが重要な働きをしている可能性が高い。一方、アレイ構造の生物学的意義に関してはまだ謎が多い。アレイ形成には、M1,M23 という２つのアイソフォームの発現パターンが重要ということが、藤吉らの構造解析で明らかになってきた。臨床的にも AQP4 に対する認識は高まってきている。AQP4 は多くの脳疾患に伴って現れる脳浮腫の病態生理に深く関与しているのみならず、カリウムのクリアランスや痙攣の病態生理にも関与している可能性が考えられている。大変興味深いことに、躁うつ病などの感情障害と AQP4 の関連を示唆する報告も出てきている。更に、自己免疫疾患として特徴づけられる多発性硬化症亜系患者（NMO）の自己抗体に対する抗原として AQP4 が同定されたことは注目に値する。AQP4 の高次機能を理解するためには、どうしても *in vivo* による解析が必須となる。我々は、AQP4 の特徴であるアレイ構造に着目し、単に AQP4 完全ノックアウトマウスを作成・解析するのみならず、アレイ構造に影響を与える可能性が高い AQP4 M1 アイソフォーム特異的ノックアウトも作成することで、AQP4 の生理的役割をより深く理解できると考えた。

２．研究の目的

AQP4 のアレイ構造と蛋白複合体に着目して、AQP4 の高次脳機能を理解するため、以下の３つの項目を期間内に明らかにしていく予定である。

**(1) AQP4 完全ノックアウトマウスに加え、AQP4M1 アイソフォーム特異的ノックアウトマウスを作成する。**

これまでの *in vitro* の解析から、M1 ノックアウトはより大きなアレイを形成することが予測される。その場合、AQP4 タンパク複合体の変化やアストロサイトにおける局在に影響を及ぼすか検討する。また、このマウスは、AQP4 のプロモーター下で GFP あるいはβガラクトシダーゼを発現するようなしくみになっているので、特に胎児期の脳の発生過程や再生過程における AQP4 の発現パターンを詳細に解析していく。最初は脳浮腫をおこすモデルから解析していく。

**(2)脳浮腫をおこすモデルを作成し、上記マウスの表現系の解析も行う**

AQPM1 特異的ノックアウトと完全ノックアウトを比較検討することで、様々な病態における AQP4 の制御機構とその役割を明らかにしていきたいと考えている。

**(3) Blue Native PAGE 等を用いて、アレイ構造と蛋白複合体の関係を生化学的に解析する**

我々は、すでに Blue Native PAGE を用いることで、AQP4 が 4 量体以上の高次構造が解析できることを見出している。上記マウスに様々なストレスを与え、AQP4 を発現している各臓器別に解析していくことで、AQP4 のアレイ構造と複合体の組織特異性や病態時における変化等を調べていく。また、二次元電気泳動を組み合わせていくことで複合体に含まれる未知のタンパク質の分離・同定も試みる。

３．研究の方法

**(1) AQP4 M1 アイソフォーム特異的ノックアウト**

AQP4 遺伝子は、M1 が exon 0 から、M23 が exon 1 から別々のプロモーターによって転写され、また、exon 0 はスプライシングにより exon 1 と連結するため、M23 の発現量

を変化させることなく M1 のみをノックアウトするには AQP4 遺伝子の構造を可能な限り維持しつつ遺伝子改変を行う必要がある。まず、exon 0 上にある M1 アイソフォームの開始コドンに変異を導入することでここから翻訳が起こらないようにした。M1 アイソフォームの 23 番目のメチオニンは、M23 アイソフォームの開始コドンであり、周辺の構造が Kozak のコンセンサス配列に良くマッチしているため、M1 アイソフォームの mRNA からも M23 アイソフォームが産生される可能性がある。実際に我々は M1 アイソフォームの cDNA から M23 アイソフォームも産生されることを、培養細胞を用いた一過性発現系で確認している。従って、M1 アイソフォームの mRNA が開始コドンの変異以外は極力野生型と同様になるように塩基の欠損は行わず、exon 0 内の開始コドンの 5' 側にカセットを挿入し、カセットのほぼすべてが後に Cre リコンビナーゼを発現させることで除去できるように２つの loxP 配列ではさんだ。また、このカセットの薬剤耐性マーカー（PGK-neo）の 5'側にはβガラクトシダーゼ cDNA（LacZ）が挿入されている。薬剤耐性マーカーは２つの FRT 配列で挟まれているため、Flp リコンビナーゼを発現させることで除去でき、この結果内在性プロモーターの制御下にβガラクトシダーゼを発現させることができるため、M1 アイソフォームの発現する組織を標識することが可能である。ES 細胞は TT2 細胞を用い、PCR によるスクリーニングの後サザンブロット解析により相同組換えが確認できたクローンを ICR マウスの胚にインジェクションする。我々は既に相同組換えクローンを複数有しており、直ちにキメラマウス作製に入れる状況である。キメラマウスが誕生したら C57BL/6 の雌と交配し F1 マウスを得る。サザンブロット解析により F1 マウスにヘテロ個体が存在することを確認した上で、Cre リコンビナーゼ、Flp リコンビナーゼを全身で発現するトランスジェニックマウスとそれぞれ交配し、M1 アイソフォーム特異的ノックアウトアリルを有するマウス、βガラクトシダーゼを AQP4 M1 プロモーター制御下に発現するアリルを有するマウスを作製し、数代のもどし交配の後、については最終的にホモ個体とし、解析に供する。

（2）AQP4 完全ノックアウト

AQP4の全てのアイソフォームはexon 1を含んでおり、またM23アイソフォームの開始コドンがexon 1にあることから、M23の開始コドンを含む約250塩基をexon 1から欠失させ、そこにカセットを挿入した。カセットには上述のように２つのFRT配列により挟まれた薬剤耐性マーカーの5'側にEGFPを挿入することでAQP4発現細胞を生かしたまま同定可能となるようにした。これは従来のAQP4ノックアウトマウスには無かった新たな点である。完全ノックアウトはこのアリルのホモ個体を作製することで達成できるが、もし蛍光タンパク質の発現が不要な場合はこれも除去できるようにEGFPのcDNAを２つのloxP配列で挟んだ。しかし、Creリコンビナーゼ発現によるEGFP cDNA除去後もポリA配列は残るように設計してあるため、いかなる転写産物もexon 1で終結する。<u>既に相同組換えクローンを複数得ており、キメラマウスの作製及び繁殖はM1特異的ノックアウトマウスに準じて行う。</u>

４．研究成果

（現在論文投稿中のため発表見合わせ）

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計１件）

①Abe Y, Ikeshima-Kataoka H, Goda W, Niikura T. and Yasui M, An astrocyte-specific enhancer of aquaporin-4 gene functions through a consensus sequence of POU transcription factors in concert with multiple upstream elements, J. Neurochem., 査読有, 120(6), 2012, 899-912

〔学会発表〕（計１４件）

①安井　正人, Roles of AQP4 in brain disorders, THE FIRST WORLD CONGRESS ON WATER CHANNEL PROTEINS (AQUAPORINS AND RELATIVES) CELEBRATING THE 25TH ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF THE FIRST WATER CHANNEL PROTEIN(LATER CALLED AQUAPORIN 1), 平成 23 年 10 月 27 日-29 日, CLUJ-NAPOCA, ROMANIA

②安井　正人, Water Biology:水分子ナノ動態から高次脳機能に迫る, 第５回トランスポーター研究会九州部会, 平成 23 年 9 月 17 日, ホテル JAL シティ 宮崎

③安井　正人, Water Biology:水分子ナノ動態から高次脳機能に迫る, 創薬薬理フォーラム第 19 回シンポジウム,平成 23 年 9 月 13 日

④安井　正人, Roles of aquaporins in water dynamics of the cells, International Conference "Water and Nanomedicine", 平成23年8月30日, Academy of Sciences and Arts of Republic of Srpska Banja Luka

⑤安井　正人, AQP と脳水腫, 北京大学医学部特別講演会, 平成 23 年 8 月 16 日, 北京大学医学部

⑥安井　正人, Perinatal dynamism of water balance and role of aquaporin, 第 11 回アジア小児腎臓学会学術集会, 第 46 回日本小児腎臓病学会学術集会, 平成 23 年 6 月 2 日－4 日, 福岡国際会議場

⑦安井　正人, アクアポリンとドライシンドローム,日本ドライシンドローム学会設立記念講演会, 平成 23 年 3 月 4 日

⑧安井　正人, Aquaporin and Water Seen by Two Photon Microscopy, WINPTech2009 Workshop on Information, Nano and Photonics Technology 2009, 平成 21 年 12 月 2 日, KOBE University Centennial Hall and Takikawa Memorial Hall, Kobe University

⑨安井　正人, アクアポリン-4 の調節機構, 第 39 回慶應ニューロサイエンス研究会, アクアポリン-4 と神経疾患 新たな病態メカニズムの展開と治療への戦略, 平成 21 年 10 月 31 日, 慶應義塾大学医学部　北里講堂

⑩安井　正人, Clinical relevance of water channel aquaporin, The First International Meeting on Japan - China - Korea Traditional Medicine, 平成 21 年 10 月 25 日, 昭和薬科大学記念講堂

⑪安井　正人, Aquaporins in brain disorders, 北京大学医学部, 平成 21 年 9 月 16 日, 北京大学

⑫安井　正人, Regulation, structure, and function of brain aquaporins, The 22nd Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the Asian Pacific Society for Neurochemistry(APSN), Busan, Korea, 平成 21 年 8 月 24 日, BEXCO, Busan, Korea

⑬安井　正人, 水代謝の生理と病態に関する最新の話題ーアクアポリンの構造機能相関と分子標的創薬, 第４４回日本小児腎臓病学会学術集会, 平成21年6月26日, 一橋記念講堂

⑭安井　正人, 中枢神経におけるアクアポリン-4 (AQP4)の役割, 第５０回日本神経学会総会, 平成 21 年 5 月 22 日, 仙台国際センター

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
http://web.sc.itc.keio.ac.jp/pharm/

６．研究組織
(1)研究代表者
安井　正人（YASUI MASATO）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90246637

(2)研究分担者
中尾　和貴（NAKAO KAZUKI）
独立行政法人理化学研究所・動物実験支援ユニット・ユニットリーダー
研究者番号：20217657

(3)連携研究者
阿部　陽一郎（ABE YOICHIRO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10317331

行武　良哲（YUKUTAKE YOSHINORI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80449016