

＜シンポジウム 5—1＞ 大脳白質の脳機能画像—オーバービュー—

## アクアポリン-4

谷 一寿 廣明 洋子 藤吉 好則

(臨床神経, 48 : 941—944, 2008)

Key words : 水チャネル, アクアポリン-4, 極低温電子顕微鏡, 二次元結晶, SDS-フリーズレプリカラベリング法

ヒトでは, アクアポリン-0から12までの計13種類の水チャネルがみつかり、そのうちのいくつかは疾患にかかわることが知られている<sup>1)</sup>。これまでの立体構造解析からイ

オンやプロトンを通さずに水を選択的に通すメカニズムは明らかにされてきたが<sup>2)</sup>、各アイソフォームの生体内での性質を明らかにする上で、それぞれ立体構造をできるかぎり生理的

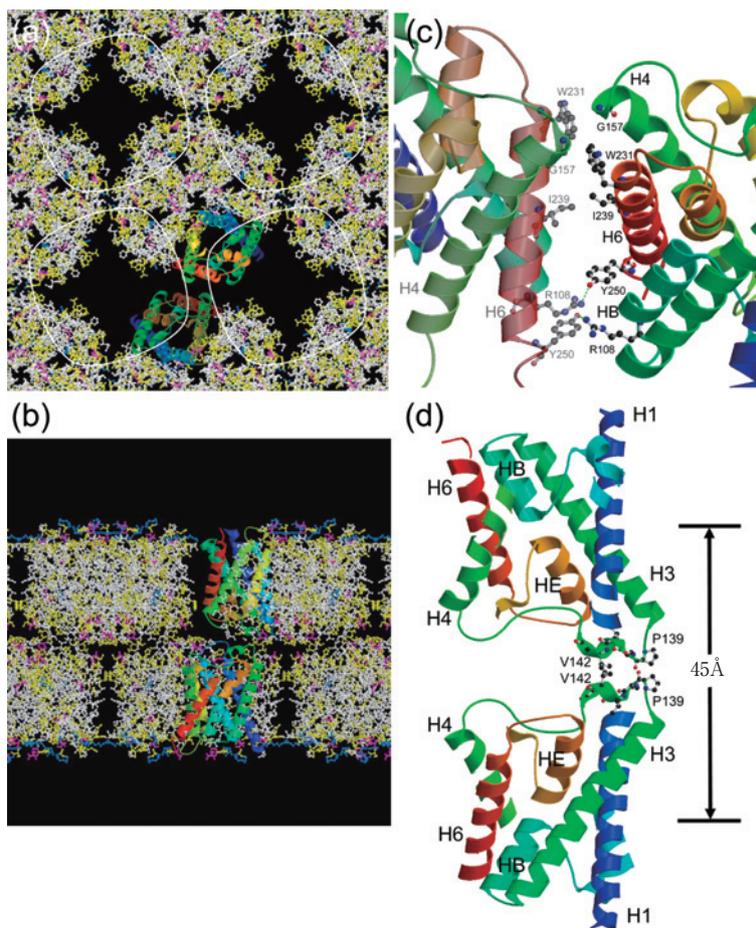


Fig. 1 二次元結晶内における AQP4 の相互作用。

(a) 結晶中の1層内に含まれる AQP4 の棒球モデル図。細胞外側領域を真上から見た図に相当し、1層内で相互作用している1組の AQP4 をリボンモデルで示している。2層型二次元結晶のため、もう1層に含まれる AQP4 の四量体を白線の輪郭で示す。(b) (a) を横から、つまり脂質二重膜を横から見た方向に対応している。2層型結晶が棒球モデルで表示されている。(a) とは異なり2層間で相互作用している1組の AQP4 に関してリボンモデルで表示。(c) (a) の1層内で隣接した四量体同士のリボンモデルを拡大したもの。(d) (b) の上下で隣接する2層間の AQP4 単量体同士の図。特に相互作用している3<sub>10</sub>ヘリックス中に存在するアミノ酸残基Pro139およびVal142を棒球モデルで表わしている。(文献9より引用)

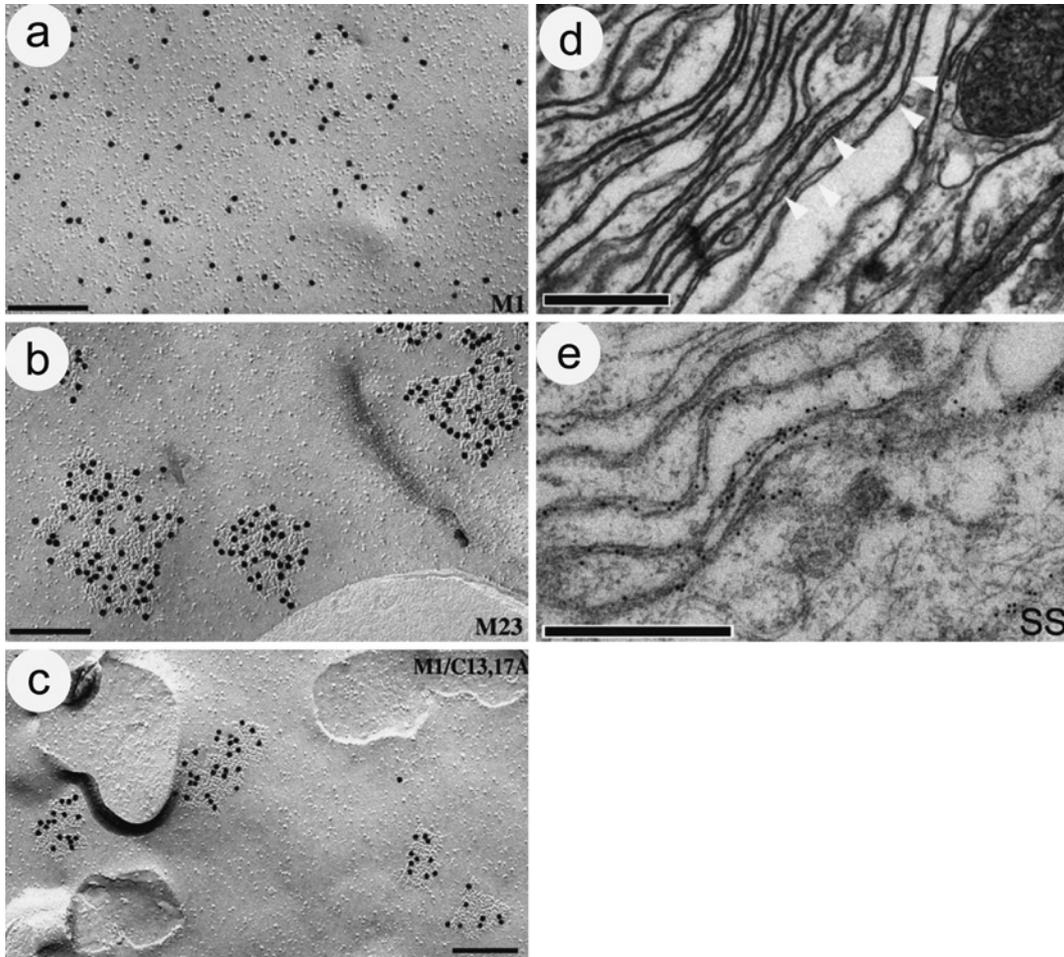


Fig. 2 電子顕微鏡を用いた生体内における AQP4 の観察。

(a～c) SDS-FRL 法による電子顕微鏡観察像。黒い粒は、金粒子標識に相当し一次抗体には抗 AQP4 抗体を使用。金粒子サイズは 15nm。(a) AQP4M1 を発現した CHO 細胞の P-face 像。(b) AQP4M23。(c) AQP4M1 のシステイン 13 番と 17 番を共にアラニンに置換した遺伝子を発現させたもの。(d) 成体ラット視床下部の電子顕微鏡による切片観察像。グリア細胞のラメラ状構造中で、優位に膜結合が起こっていることが認められるが、いくつかの白矢尻によって示された領域では分離しているのが見受けられる。クモ膜下腔は、右下隅に位置する。(e) AQP4 の免疫ラベルによるグリア細胞中のラメラ状構造内での位置は、膜が離れた場所だけでなく、結合した場所でも局在化している。クモ膜下腔 (SS で示されている) は、右下隅に位置する。スケールバーは、全て 200nm。(文献 9, 10 より引用)

に近い条件で決定していくことは重要である<sup>3)</sup>。

私たちは、とくに脳に多く発現しており、脳神経系の疾患と関連していることが知られているアキアポリン-4 (AQP4) に注目して立体構造の決定をおこなった。AQP4 は、脳浮腫<sup>4)</sup>、視神経脊髄炎<sup>5)</sup>などとの関連が知られている。更に多く発現している部位にも特徴があり、たとえば血液脳関門を形成している脳の毛細血管に近接するアストロサイトのエンドフィートや、浸透圧の調節で重要な視床下部ではグリア細胞が層状に重なったラメラ状構造をとっている部分に多く発現していることが知られている<sup>6)7)</sup>。とくに、アストロサイトのエンドフィートでは格子状のアレイ構造を形成し、このアレイの大きさは、2種類のスプライシングバリエーションの発現割合に応じて変化することが知られているが<sup>8)</sup>、機能との関連は明らか

でない。

このような状態で天然の状態で脳にふくまれることから、天然でえられるタンパク質量が少なく、更に2種類のスプライシングバリエーションが混入することで二次元結晶形成に影響を与える可能性が高いことが予想された。そこで N 末端が短くアレイを形成しやすいアイソフォームであるラット AQP4M23 遺伝子を昆虫細胞 (Sf9) で大量に発現させ、結晶化に十分なタンパク質量を精製することに成功した。えられた AQP4 を、大腸菌の脂質と混合し透析により界面活性剤濃度を下げていくことで二次元結晶を作製して構造解析の試料とした。作製した二次元結晶をヘリウム温度の試料ステージを備えた極低温電顕をもちいて氷包埋法で観察し、電子線結晶学に基づいた解析をおこなうことで、AQP4 の 3.2Å 分解能

での原子モデルをえることができた (Fig. 1)<sup>9)</sup>. えられたモデルから2層型の結晶で、上下の2層は細胞外領域同士で接触していることがわかった。AQP4全体の立体構造は、AQP1に非常によく似ており、ともに四量体を形成し、膜貫通ヘリックスの並びも同じである。大きくことなる点は、ヘリックス3と4の間にあるループCのヘリックス3側の $3_{10}$ ヘリックスであり、この部分が2層間の接触部位となっている (Fig. 1d)。

二次元結晶の各1層内では、四量体は脂質膜に対してすべて同じ向きで配向している。隣接する四量体間の相互作用部位に関して、細胞外領域では疎水性のアミノ酸残基で形成されており、これらのアミノ酸残基は他のAQPファミリーでも保存されている。一方、細胞質側の相互作用部位である2つの極性アミノ酸残基は、AQP4に特有なアミノ酸残基により構成されている (Fig. 1c)。この1層内の四量体間の間隔は、生体内でみられる格子状アレイの格子間距離に相当することから、えられた二次元結晶内の相互作用が、天然の膜上でみられるものと同じである可能性が示唆された。

まず2つのスプライシングバリエーション (M1, M23) と二次元結晶の関係を考えてみる。N末端が短いM23のばあい、電子回折を与えるような非常に良く並んだ二次元結晶が形成されるが、N末端が長いM1では顕著な結晶の並びは形成されなかった。この結果は、M23によって形成されるアレイのサイズがM1によって縮小するという現象と一致した。原因の1つとしては、M1に存在するN末端22アミノ酸残基長が単にアレイの形成を阻害するために十分な立体障害となることが考えられる。しかしながら二次元結晶でもちいたM23のコンストラクトでは、元の配列にくらべてヒスチジンタグとリンカー配列の合計35アミノ酸残基をN末端に付加しており、M1のN末端より長い。そのためアレイ形成の阻害は、M1のN末端部位のアミノ酸配列に特徴があると考えられた。

N末端のどの部分にアレイ形成を阻害する因子がふくまれるのかをしらべるために、種々のN末端欠損変異体を作製し、Chinese hamster Ovary (CHO) 細胞に一時的に発現させてAQP4の発現をフリーズレプリカラベリング法 (FRL) で観察したところ、 $\Delta 2-17$ 変異体のばあいには必ずアレイが形成されることが明らかになった。N末端の17番目までのアミノ酸配列の特徴として、13番目と17番目のシステインの保存性が高いことから、パルミトイル化による可逆的な脂質修飾を受ける可能性が示唆された。そこでトリチウムで放射性ラベルしたパルミチン酸をもちいた実験から、13番目や17番目にシステインがあるばあいAQP4が修飾されることを確認した (Fig. 2a~c)。これらからM1のばあい脂質修飾をうけてN末端部分が膜近傍へ近づけられることで、位置の制限を受け互いに立体障害をおこし、アレイ形成を阻害することが示唆された<sup>10)</sup>。

上下2層間の相互作用に関しては、AQP4の細胞外領域にあるループCに存在する短い $3_{10}$ ヘリックスによって、2層型AQP4二次元結晶中の2つの層は接触している。更に $3_{10}$ ヘリックスは $\alpha$ ヘリックスにくらべ構造的に不安定であるこ

とから、AQP4が非常に弱い細胞接着を作る可能性があることを推測した (Fig. 1d)<sup>9)</sup>。とくに、2層中の四量体は単位胞半分がずれた対称性になっているため (Fig. 1a)、水の通路が上下の層でずれており、水の流入出に抵抗がともなう状態にあることが予想された。

視床下部中のグリア細胞のラメラ状構造にあたる切片を電子顕微鏡で観察した像には、大きな膜結合がとところどころ小さく分離した膜領域によって中断されており、免疫抗体ラベルにより、AQP4分子は膜結合領域と離れている領域双方においても局在していることが示されている (Fig. 2d, e)。更にAQP4の内在的な接着性を確認するために、細胞接着性をもたないL-cellへAQP4M23を安定的に発現させると、弱い細胞接着能が現れることを実験で確認できた<sup>9)</sup>。

今回の結果からAQP4は水チャネルの機能以外に、弱い細胞接着や格子状アレイ形成などの多機能性を備えていることを明らかにすることができた。それゆえ、AQP4が関連する脳内の水調節は、高次構造の変化をともなう複雑な機構が存在する可能性が示唆される。

謝辞：Fig. 2の作製にあたって、鈴木博視博士と西川幸希氏に電子顕微鏡像を提供していただき感謝いたします。

## 文 献

- 1) Agre P, King LS, Yasui M, et al: Aquaporin water channels — from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 2002; 542: 3—16
- 2) Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, et al: Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000; 407: 599—605
- 3) Gonen T, Walz T: The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* 2006; 39: 361—396
- 4) Papadopoulos MC, Verkman AS: Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 778—784
- 5) Lennon VA, Kryzer TJ, Pittcock SJ, et al: IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2005; 202: 473—477
- 6) Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, et al: Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 1997; 17: 171—180
- 7) Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP: The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 991—1001
- 8) Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, et al: Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11981—11986
- 9) Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa A, et al: Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhe-

sion. *J Mol Biol* 2006; 355: 628—639  
10) Suzuki H, Nishikawa K, Hiroaki Y, et al: Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-

terminal cysteine residues. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 1181—1189

### Abstract

#### Aquaporin-4

Kazutoshi Tani, Ph.D., Yoko Hiroaki, Ph.D. and Yoshinori Fujiyoshi, Ph.D.  
Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University

In human body, there are thirteen water channels but their expression patterns are tissue specific. Aquaporin-4 (AQP4) is a predominantly expressed water channel in the mammalian brain and an important drug target for treatment of cerebral edema, bipolar disorder, and mesial temporal lobe epilepsy. Recently it was reported that IgG of optic-spinal multiple sclerosis patients bound to AQP4. In order to reveal the function of AQP4, we determined the atomic structure of AQP4 by electron crystallography of double layered two-dimensional crystals. In double layered crystal, each single layered crystal contacts by a short  $3_{10}$  helix in the extracellular loop C. It would suggest that AQP4 shows the weak adhesive activity between adjoining membranes. This is correlated to immunogold labeling of AQP4 in glial lamellae localizing the protein areas where the membranes are separated but also all along junctional regions. Furthermore, from the freeze fracture replica labeling and the mutational experiment, the palmitoylation of N-terminal cysteine residues makes orthogonal array structure unstable on Chinese hamster Ovary (CHO) cell membrane. These findings suggest that there must be the complicated mechanism for control of water content relevant to AQP4 within the brain.

(*Clin Neurol*, 48: 941—944, 2008)

**Key words:** water channel, aquaporin-4, cryo-electron microscopy, two-dimensional crystal, SDS-freeze fracture replica labeling (SDS-FRL)

---