

<教育講演 5>

中枢神経系におけるアクアポリン-4 (AQP4) の役割

安井 正人

要旨：体内水分バランスは、生体の恒常性維持機能のもっとも重要な調節機構である。水分バランスの不均衡は、様々な病態にもなってみえられ、その補正が治療上有効となることが多い。水チャネル、アクアポリンの発見は、体内水分バランスや分泌・吸収に対するわれわれの理解を分子レベルまで深めることとなった。腎臓における尿の濃縮・希釈はもちろんのこと、涙液・唾液の分泌にも重要な働きをしている。アクアポリンの結晶構造が解明されたことで、水分子がいかにしてアクアポリンのポアを選択的に通過するか、分子動力学シミュレーションを駆使して再現することも可能となった。アクアポリンの調節機構に対する理解も進みつつあり、アクアポリンを標的とする創薬への期待が高まっている。脳においても水バランスの重要性は例外ではない。アクアポリンの分布から考えて、神経細胞ではなくグリア細胞がその役割を担っていると考えられている。グリア細胞に発現しているアクアポリン-4 (AQP4) は、脳浮腫の病態生理に関与している事が明らかになったのみならず、最近では NMO の患者に特異的にみとめられる NMO-IgG の抗原として AQP4 が同定されるなど、AQP4 は臨床的にも大変注目を集めている。AQP4 の立体構造も解明され、分子標的創薬の面からも期待が高まっている。

(臨床神経, 49 : 786—788, 2009)

Key words : アクアポリン, NMO, 構造・機能相関, 創薬

はじめに

われわれのからだの約 7 割近くが水分で占められている。地表の 7 割が海で占められているのと同様、多くの生物もその 7 割以上が水でできている。地球上の生物が、海の中から発生してきたことを考えると、なんとなくうなずけるが、大変興味深い一致である。いずれにせよ、われわれの体の構成分子のうち、水分子(H₂O)がもっとも多いということになる。また、この 7 割を占める体内の水は、日々入れ替わり続けている。成人では、一日あたり約 2~3 リットルの水を摂取し、同程度の水を、尿、便、汗、呼吸などとして排泄している。われわれは無意識のうちに水分摂取量を調節したり、汗をかいいたり、尿量を調節することで、体内の水分量を一定に保とうとしている。われわれの体の水分量は、ダイナミックな平衡状態に保たれているわけだ。細胞内外においても同様に水分量に関するダイナミックな平衡状態が成り立っている。一方、水バランスの平衡が崩れ、体内水分含量が 15% 程度増減すると重篤な状態に陥る。その重要性にもかかわらず、つい最近まで水分調節の詳細な分子メカニズムに関して十分な説明がなされずにきた。これから紹介するアクアポリン (AQP) の発見は、水分調節、分泌・吸収のメカニズムを分子レベルで理解することを可能とした¹⁾。

AQP の種類と役割

現在まで、哺乳類では 13 種類の AQP (AQP0~AQP12) が

確認されている。それぞれの AQP は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²⁾。たとえば、AQP0 とレンズ透過性、AQP2 と尿の濃縮、AQP5 と唾液の分泌などである。最近では、AQP と疾患との関連も徐々に明らかになりつつある。たとえば、白内障、尿崩症(尿が濃縮できない病気)、口腔内乾燥症、乾燥肌などがある。中でもその調節や、病気との関連がもっともよく理解されているのは、腎臓にある AQP2 である。AQP2 の遺伝子に異常があると、先天性の尿崩症になる。また、躁うつ病の治療でリチウムが長期にわたって投与されると AQP2 が減少し、二次性の尿崩症になる。逆に妊娠ともなう浮腫や高血圧、うつ病、心不全などでは、AQP2 が増えすぎることによって体内に余分な水分が貯留してしまう。したがって、AQP2 に対する拮抗薬が開発されれば、大きな治療効果をもたらすことが期待されている。

AQP の構造と機能 (水分子選択性)

最近、AQP1 (ヒト由来) の 3 次元的立体構造が解明され、水分子に対する選択的透過性の機序が説明可能となった。また、これらの構造を基盤に水分子がいかにして AQP を通過するか、コンピューター上で再現できるようになった。水分子がこの穴を通るスピードは予想以上に速く、計算上、一秒間に 3×10^9 個の水分子が AQP 一つの穴を通過すると考えられている。なぜ、この穴が他の分子を通さず、水分子のみを通すことができるのか？実はそのほぼ全貌が解明されつつある³⁾。水分子の特徴として、双極子(電氣的にプラスに偏っている部位

とマイナスに偏っている部位の両方を兼ね備えている) であること、お互い水素結合でつながっていることがあげられる。AQP は、こうした水分子の性質を巧みに利用して、水分子を選択的に通す穴を作り上げたものと思われる。水分子の膜透過に関する最大の謎は、なぜ細胞膜が、プロトン (H_3O^+) の通過は阻止するのに、水分子 (H_2O) のみは通過できるのかという点にある。AQP のポアをみると、細胞外膜よりの所でポアの直径はもっとも狭くなっているが、この直径は、まさに水分子が通過できるぎりぎりの大きさに相当している。そして、そのもっとも直径の狭い部位にあるアルギニン残基の側鎖のプラスの電荷が、水分子間の水素結合を分断し、プロトン (H^+) を排除する重要な役割を果たしている。また、ポアの中央部位にもプラスの電荷が存在しており、プロトンの排除を補完していることがわかってきた。

脳の AQP : AQP4

哺乳類の脳では、主に AQP4 が発現している⁴⁾。AQP4 は、様々な脳損傷や脳疾患にともなう脳浮腫の病態に関与している⁵⁾。脳室周囲の上皮細胞にも発現しており、脳脊髄液循環にも関与していると考えられている。また、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。最近、自己免疫疾患として特徴づけられる 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、とくに注目に値する⁶⁾。しかしながら、NMO-IgG そのものに病原性があるのか、あるいは病態の結果として NMO-IgG が出てくるのか、未だ定かではない。病症と抗体価の間にある程度の相関があることは確認されている。

AQP4 の特徴として、1) 中枢神経系では、アストロサイトに限局して発現している (神経細胞にはその発現をみとめない)、2) ジストロフィン複合体の一部として、nNOS などと共存している、3) 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。更に興味深いことに、AQP4 には水チャネルとしての機能に加え、細胞接着能があることが最近確認された⁷⁾。AQP4 と最も相同性が高い遺伝子として、ショウジョウバエの big brain 遺伝子 (*bib*) が知られている。*bib* 遺伝子欠損のハエは、神経細胞が異常に増殖し、致死的となる。*bib* 遺伝子の詳細な解析は、哺乳類の脳の発生・分化や高次脳機能における AQP4 の役割を理解していく上で非常に重要と思われる。

AQP4 の制御機構や生理的役割に関しては、まだ謎が多い。その理由として、アクアポリンの場合、単チャネル活性を測定する方法が確立されていないこと、高次機能の予測が難しく、実験モデルの選定がきわめて困難であることなどが挙げられる。高次脳機能の更なる理解へ向けて、そして、脳浮腫や精神疾患、脳脊髄疾患の創薬へ向けて、AQP4 に対するより深い理解が必須である。

AQP4 の調節機構

多くの AQP は水銀で抑制されるが、AQP4 は水銀に抑制されないと考えられてきた。しかしながら、われわれは最近 AQP4 精製蛋白をリボソームに組み込んだ系を用いて、AQP4 も水銀で抑制されることを示した⁸⁾。また、水銀のみならず、他の金属によって抑制されることもわかってきた。これらの調節機構が生体内でも働いているか否か、今後の検討が必要である。AQP4 は、リン酸化によっても調節されている。細胞内ループにあるセリン残基がリン酸化されると活性が変わる。また、C 末端のセリン残基がリン酸化されると細胞内局在にも影響を与えることもわかってきた⁹⁾。

AQP4 ノックアウトマウスの解析

AQP4 のノックアウトマウスは、とくにきわだった異常な表現系を示さない。興味深いことに AQP4 のノックアウトマウスは、神経原性脳浮腫をおこすようなストレスでは、正常マウスにくらべ、浮腫の程度が軽減する。一方、血管原性の脳浮腫モデルでは、その回復が正常マウスにくらべて遅れる事が確認された。したがって、もし AQP4 の拮抗薬が開発されれば、虚血性疾患や低酸素ストレスにおける浮腫を軽減できると考えられている。最近、AQP4 のノックアウトマウスは、正常マウスにくらべて、脳内の細胞外スペースが広がっていることが確認された。そのため、シナプス興奮時に細胞外へ放出されたカリウムの除去が遅れ、一度痙攣がおこるとなかなかとまらないと考えられている。AQP4 はどうやら細胞外環境を変えることで間接的に神経活動にも関与しているらしい。

全身麻酔の作用機序：ポーリングの仮説

AQP が細胞膜を介する水の移動を調節している重要なチャネルであることは、うたがいの余地がない。しかしながら、AQP を介する水分子の移動が、周囲の膜直下における水のナノ環境におよぼす影響に関しては、まだほとんど知られていない。高分子周辺の水は、いわゆる自由水でなく結合水 (構造水) として存在すると考えられている。高分子の立体構造や機能を考える上で、水のナノ環境の重要性が認識されるようになってきている。また、無極性物質は分子周辺において水を構造化し、結晶化可能な非常に安定な構築物を形成することが知られている。1959 年以来、Pauling は疎水性物質である麻酔剤は、隣接する高分子の構造水を奪って、麻酔剤が自らのまわりにクラスレート (包接化合物) を形成することにより作用すると提唱した¹⁰⁾。しかしながら、50 年近く過ぎた今日でも、彼の説を実証するまでいたっていない。これらの問題解決には、水分子の可視化や分子力学シミュレーションを駆使した、ナノレベルの水分子動態に関する多角的な解析が必須と思われる。

おわりに

われわれは、現在 AQP4 の高次機能の解析を中心に研究を進めているが、全身麻酔薬によるクラスレートハイドレートの形成、細胞膜近傍における構造水の変化への影響などを分子力学シミュレーションも用いて検討している。シミュレーションの成果が、AQP の制御機構や水分子の可視化へ向けた技術開発につながれば、ポーリングの仮説を詳細に検証できると考えている。

文 献

- 1) Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, et al: Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 1992; 256: 385—387
- 2) Agre P, King LS, Yasui M, et al: Aquaporin water channels — from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 2002; 542(pt 1): 3—16
- 3) Kozono D, Yasui M, King LS, et al: Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest* 2002; 109: 1395—1399
- 4) Nielsen S, Naqelhus 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

- 5) Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al: Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 2000; 6: 159—163
- 6) Misu T, Fujihara K, Nakamura M, et al: Loss of aquaporin-4 in active perivascular lesions in neuromyelitis optica: a case report. *Tohoku J Exp Med* 2006; 209: 269—275
- 7) Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa T, et al: Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J Mol Biol* 2006; 355: 628—639
- 8) Yukutake Y, Tsuji S, Hirano Y, et al: Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4 reconstituted proteoliposomes. *Biol Cell* 2008; 100: 355—363
- 9) Kadohira I, Abe Y, Nuriya M, et al: Phosphorylation in the C-terminal domain of Aquaporin-4 is required for Golgi transition in primary cultured astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 463—468
- 10) Pauling L: A molecular theory of general anesthesia. *Science* 1961; 134: 15—21

Abstract

Regulation, structure and function of brain aquaporin

Masato Yasui, M.D., Ph.D.

Department of Pharmacology, Keio School of Medicine

Discovery of aquaporin water channel proteins has provided insight into the molecular mechanism of membrane water permeability. In mammalian brain, Aquaporin-4 (AQP4) is the main water channel and is distributed with highest density in the perivascular and subpial astrocyte end-feet. AQP4 is a critical component of an integrated water and potassium homeostasis. Indeed, AQP4 has been implicated in several neurologic conditions, such as brain edema, seizure and even mood disorders. Expression and regulation of AQP4 have been studied to understand the roles of AQP4 in physiological and pathological conditions. Here we discuss about the mechanisms how AQP4 is dynamically regulated at different levels; channel gating, subcellular distribution, phosphorylation, protein-protein interactions and orthogonal array formation. Interestingly, AQP4 has been identified as a target antigen of autoimmune attack in neuromyelitis optica (NMO). We have evaluated putative epitopes on AQP4 for NMO-IgG binding. We have also studied *Drosophila* Big Brain (Bib), since Bib has high sequence homology to AQP-4, and play an important role for *Drosophila* neurogenesis. AQP4 may be a potential therapeutic target in several neurologic conditions. Further studies from different aspects are required to develop new drugs against AQP4.

(Clin Neurol, 49: 786—788, 2009)

Key words: aquaporin, NMO, structure-function relationship, drug development