

Aquaporin 4 water channel 인산화에 의한 수분 투과도의 조절

박권희 · 정동근 · 정진섭¹ · 이재숙 · 예운해 · 서덕준 · 배혜란*

동아대학교 의과대학 생리학교실
¹부산대학교 의과대학 생리학교실

Phosphorylation of AQP4 Water Channel Regulates Water Permeability

Kweon-Hee Park, Dong-Keun Jung, Jin-Sup Jung¹, Jae-Suk Lee, Woon-Hae Ye,
Duk-Joon Suh, Hae-Rahn Bae*

Dept. of Physiology, Dong-A University College of Medicine, Pusan 602-103, Korea
¹Pusan National University College of Medicine, Pusan 602-103, Korea

Abstract

Aquaporin 4 (AQP4) is the mercurial-insensitive water channel expressed abundantly in brain, especially the region related with cerebrospinal fluid reabsorption and osmoregulation. The primary structure of AQP4 water channel was elucidated but the molecular mechanism of AQP4 channel regulation is still unknown. To investigate the possible regulation of AQP4 water channel by phosphorylation via various protein kinases, osmotic water permeability of AQP4 expressed in *Xenopus* oocytes was measured by videomicroscopy technique.

Forskolin (10 μ M) did not affect osmotic water permeability of oocytes injected with AQP4 cRNA, excluding the regulation of AQP4 water channel by protein kinase A. Osmotic water permeability (P_f) of AQP4-expressed oocytes was inhibited by the pretreatment of BAPTA/AM (up to 500 μ M), an intracellular Ca^{2+} chelator, and calmidazolium (100 μ M), a specific Ca^{2+} /calmodulin antagonist, in a dose-dependent manner. The inhibition of osmotic water permeability (P_f) by the calmidazolium treatment was completely reversed by the addition of calyculin A (0.1 μ M), a nonspecific phosphatase inhibitor. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a protein kinase C activator, had biphasic effects on osmotic water permeability in AQP4 cRNA injected oocytes depending on its concentration; 21% increase by 100 nM PMA, 35% decrease by 1 μ M PMA. These effects were reversed with 2 μ M staurosporine, a nonspecific PKC inhibitor.

These results suggest that phosphorylation of AQP4 water channel by Ca^{2+} /calmodulin kinase and protein kinase C might regulate the osmotic water permeability.

Key Words — aquaporin 4; osmotic water permeability; *Xenopus* oocyte; protein kinase

서 론

수분은 살아 있는 모든 생명체의 생존에 필수적이며,

세포내액 및 외액의 가장 중요한 구성성분이다. 우리의 신체는 소화, 호흡, 순환, 체온조절, 독소제거, 신경계의 항상성유지 등 여러 본질적인 기능을 유지하는 동안 세포 안팎으로 수분의 이동이 항상 동반되어야 한다. 세포막을 통한 수분의 이동은 크게 두 가지 경로로 일어나는데, 첫

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: 051-240-2927, Fax: 051-246-6481
E-mail: hrbae@daunet.donga.ac.kr

제는 이전부터 잘 알려져 있는 지방이중막을 통해 단순확산되는 경로이다. 그러나 어떤 특정 세포들에서 실제 측정된 수분투과도가 단순확산에 의하여 일어났을 경우 보다 훨씬 크게 나타나며 그 활성화에너지도 아주 낮아 단순확산 이외에 세포막에 수분 투과를 위한 특정 단백질인 channel이 존재하여 이를 통하여 수분이 이동될 것이라고 하는 두 번째 경로의 존재 가능성이 실제로 channel protein의 존재와 그 구조가 밝혀지기 훨씬 전부터 추측되어 왔다[7,31,33].

그 후 실제로 적혈구, 신장 근위세뇨관 및 기타 조직의 세포막에 수분 투과를 담당하는 water channel protein이 존재함이 증명되었는데, 제일 먼저 인체 적혈구 Rh polypeptide 32-kDa subunit와 동시에 정제되는 28-kDa protein이 세포막을 통해 수분을 투과시키는 channel 구조를 가진 integral protein인 것으로 밝혀져 CHIP28 (channel-forming integral protein)이라고 명명하였다[26,30]. 현재까지 포유류 세포에 존재한다고 밝혀진 water channel은 모두 10가지 종류가 있다[2,3,34]. Aquaporin (AQP) 1은 Preston과 Agre 등[1]이 제일 처음 적혈구에서 존재한다고 밝힌 CHIP28로 알려진 water channel이며 이는 신장 근위세뇨관[21,28] 및 다른 수분투과성 상피세포[22]에 분포한다. AQP2는 신장집합관 세포에서 cloning되었고, 항이노호르몬에 의해 조절되는 water channel로 이의 mutation 시 신성 요붕증을 발생시킬 수 있다[4,5,24]. AQP3는 신장 수질 집합관의 basolateral membrane에 존재하며 glycerol도 통과시키는 성질이 있어 일명 glycerol intrinsic protein (GLIP) 이라고도 불린다[10,18]. AQP4는 주로 신경계에 고농도로 존재하며[12], 다른 AQP들과 달리 대표적인 water channel 억제제인 mercury에 의해 억제되지 않아 일명 mercurial-insensitive water channel (MIWC)로 불린다[29,32]. AQP5는 타액선, 누선, 폐조직 등에 존재하는 water channel이다[16,19]. 그외 AQP6은 신장 근위세뇨관에[35], AQP7은 고환에[8], AQP8은 간 및 췌장에[14], AQP9는 지방세포에[9], AQP0는 안구수정체에 각각 존재하고 있다[20].

이 중 AQP4는 Jung 등[12]이 homology cloning에 의해 rat brain에서 처음 발견하였으며, 그 구조를 보면 6개의 membrane spanning domain과 5개의 loop (A-E)로 연결되어 있으며, loop B와 loop E에 모든 aquaporin family

에 공통적으로 존재하는 asparagine-proline-alanine (NPA) 아미노산 서열 motif를 가지고 있으나[11,12], mercury inhibitory site에 해당되는 A210 부위에 cysteine이 없어 mercury에 의해 억제되지 않는 특징을 가진다[27,29]. AQP4 cDNA sequence와 그에 따른 아미노산 구조 및 AQP4 water channel의 단백질 구조는 이미 밝혀져 있는데 반하여, 현재까지 second messengers 등에 의한 AQP4 water channel의 활성조절에 대해서는 아직 밝혀지지 않았고, 또한 이러한 channel 활성화의 조절로 인해 AQP4 water channel이 고농도로 발현되는 뇌에서 담당하는 기능과 어떤 관련이 있는지는 전혀 모르는 상태에 있다. 하지만 이미 밝혀져 있는 AQP4 water channel의 아미노산 서열을 보면 loop B와 loop D에 multiple phosphorylation consensus sequence를 가지고 있어 protein kinase에 의한 water channel의 인산화를 통해 그 기능이 조절 받을 가능성이 있음을 높이 시사하고 있다. 최근 Han등[6]이 protein kinase C가 AQP4의 활성을 감소시킨다고 보고된바 있어 그 가능성을 더욱 뒷받침해주고 있다.

따라서 본 연구는 protein kinase가 AQP4 water channel의 활성을 조절할 수 있는지, 조절한다면 실제로 어떤 protein kinase에 의해 조절되는지를 밝히고자 시행하였다.

재료 및 방법

1. Xenopus Oocyte에서 AQP4 cDNA의 발현

가. *In vitro*에서 AQP4 cDNA 합성

Expression vector에 삽입된 DNA를 competent cell (*E. coli* DH-5a)에 transformation시켜 ampicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 든 LB agar에 plating하였다. Transform된 single colony를 LB broth (10% NaCl, 10% Bacto tryptone, 5% yeast extract, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin)에 inoculation하여 overnight 배양하였다. 배양한 cell에서 miniprep protocol에 따라 plasmid DNA를 분리하였다. 이 DNA를 Bam H I 효소로 1시간 처리하여 자르고 잘린 product는 1% agarose gel에 전기영동하여 200 base pair (bp), 1.2 kb, 4 kb의 band로 확인하였다. 확인된 DNA는 phenol extraction하여 purity를 높였다. AQP4 cDNA 1 μg 을 Xba I으로 37°C 90분간 자르고 proteinase K (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 42°C 30분간 처리한 뒤 phenol : chloroform : isoamylalcohol (PCI)과

chloroform으로 extract하여 3 M sodium acetate와 ethanol로 침전시켜 pellet을 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 H₂O에 녹였다. 이 DNA를 1% agarose gel electrophoresis하여 4.5 kb의 band를 확인하고, 이것을 template로 하여 T3 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro*에서 AQP4 cRNA를 합성하였다. 합성시 cRNA는 그 안정성을 높이고 *Xenopus* oocyte에서 protein으로 translation되는 효율을 높이기 위해 5' end에 m⁷G(5')ppp(5')G를 capping시켰다[36]. 합성된 cRNA에 RNase free DNase I을 처리하여 남아있는 DNA를 완전히 제거하고 위 방법과 같이 PCI과 chloroform으로 extract하여 sodium acetate와 ethanol로 침전시켜 pellet을 DEPC로 처리한 H₂O에 녹였다. 이 cRNA는 spectrophotometer에서 260nm와 280nm의 wavelength에서 optical density (OD)를 측정하였고 formaldehyde agarose RNA gel에 전기영동하여 확인하고, OD값과 비교하여 정량하였다.

나. *Xenopus* oocyte 분리 및 AQP4 cRNA 주입

암늪 *Xenopus laevis*를 얼음에 30분 방치하여 동면상태를 유발시킨 뒤 복강을 열어 oocyte follicle을 적출해내어 Type IA collagenase (2 mg/ml)가 포함된 Ca²⁺-free solution에 넣고 90분간 shaker로 진탕시킨 뒤 다시 새로운 collagenase를 처리하여 90분간 진탕을 반복하여 개개의 oocyte로 분리하였다[17]. 분리된 oocyte는 Ca²⁺-free solution으로 5회 세척하고 modified Barth's solution으로 다시 5회 세척한 뒤 stereoscope 하에서 stage V-VI에 해당하는 oocyte만 선별하여 18°C incubator에서 overnight 시킨 후 다음날 AQP4 cRNA를 stereoscope 하에서 micromanipulator와 microinjector를 이용하여 oocyte당 50 nl (1-10 ng RNA)의 AQP 혹은 AQP4 cRNA를 주입하였다. RNA를 주입한 oocyte는 매일 medium을 교환시키면서 18°C incubator에 3일간 배양한 뒤 실험에 사용하였다.

2. AQP4 expressed oocyte에서 삼투적 수분 투과도의 측정

cRNA 주입 후 3일 된 oocyte를 videomicroscopy를 이용하여 수분투과도를 측정하였는데, 수분이동의 원동력으로 3배의 hyposmotic shock (200 mosm-70 mosm)을 주어서 oocyte를 swelling시켜 시간경과에 따른 oocyte의 용적변화로서 수분투과도를 계산할 수 있다. 시간에 따른

oocyte image변화를 phase-contrast microscope에 연결된 CCD camera를 통해 computer에 digitalized data로 저장시킨 뒤 pixel 수를 계산하는 program을 이용하여 oocyte의 surface area를 얻을 수 있으며, 이렇게 얻은 surface area는 아래 공식을 이용하여 용적으로 전환시킬 수 있다[36].

$$V = (4/3) \times (\text{area}) \times (\text{area}/\pi)^{1/2}$$

시간에 따른 oocyte volume의 상대적인 변화량 즉 d(V/V₀)/dt는 computer에서 지수함수로 curve fitting시킨 swelling되는 초기속도로 전환시킬 수 있으며, 수분의 투과도 (P_i)는 아래공식을 이용하여 계산할 수 있다[17].

$$P_i = [V_0 \times d(V/V_0)/dt] / [S \times V_w \times (Osm_m - Osm_{out})]$$

V₀ = initial oocyte volume
V = oocyte volume
S = oocyte surface area
V_w = molar ratio of water

3. 실험재료에 사용된 용액 및 시약

실험에 사용된 용액의 조성은 다음과 같다 : Barth's solution (87.7 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 15 mM Tris-Cl, 0.3 mM Na(NO₃)₂, 0.7 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 100 µg/ml Na penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulfate pH 7.6), Ca²⁺-free solution (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM Hepes-tris pH 7.5).

실험에 사용된 시약은 다음과 같다 : BAPTA/AM (1,2-bis (2-aminophenoxy) ethan -N,N,N',N'-tetraacetic acid)는 Molecular Probes (Eugene, OR)사에서, mMessage mMachine T3 Kit는 Ambion (Austin, TX)사에서 Xba I, Bgl II, Hind III 및 Bam H I은 Promega (Madison, WI)사에서, calmidazolium, calyculin 및 W-7은 Calbiochem (La Jolla, CA)사에서, PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), staurosporine 및 나머지 시약은 Sigma (St. Louis, MO)사에서 구입하여 사용하였다.

결 과

Fig. 2는 AQP4 cRNA (4 ng) 혹은 동량 (50 µl)의 물을

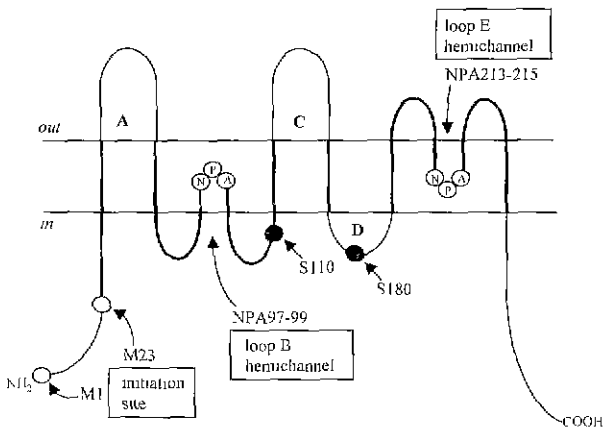


Fig. 1. Proposed membrane topology of AQP4 water channel based upon the hourglass model for aquaporins.

AQP4 is comprised of six presumed membrane bilayer-spanning domains and five connecting loops (A-E). NPA amino acid sequence motif and two initiation sites, upstream (M1) and downstream (M23), are indicated. S110 and S180 are the potential sites of phosphorylation by protein kinases.

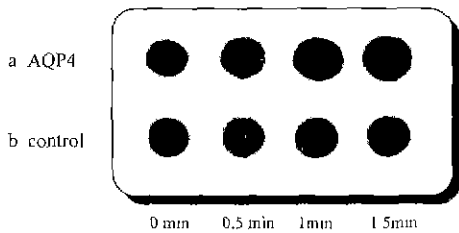


Fig. 2. Increased osmotic water permeability of AQP4 RNA-injected *Xenopus* oocytes.

Oocytes were injected with 5 ng of *in vitro* transcribed AQP4 cRNA (a) or 50 nl of water (b) at indicated intervals after transferring from 210 to 70 mOsm buffer.

주입한 후 3일 경과한 oocyte에 3배의 hypotonic shock (70/200 mosm)을 가한 뒤 videomicroscope를 이용하여 oocyte의 크기 변화를 기록한 것으로 50 nl의 물만 주입한 경우 oocyte의 크기 변화가 전혀 관찰되지 않았으나(Fig. 2b), AQP4 cRNA를 주입한 oocyte는 3배의 hypotonic shock 노출시 그 크기가 계속 증가하여 90초 경과시 처음 크기의 1.15배 정도로 증가되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2a). AQP4 cRNA를 주입한 oocyte의 경우 2~3분 경과 후에는 과도한 부피 증가로 대부분 파열되는 것을 관찰할

수 있었다(자료 미제시). 이후 모든 자료는 이와 같이 기록한 oocyte 형태의 변화를 computer program을 이용하여 방법에서 설명한 바와 같이 수분 투과도 (P_f)로 전환하여 나타내었다.

이미 밝혀진 AQP4 cDNA의 염기서열과 그에 따른 아미노산 서열을 볼때 AQP4 water channel은 loop B, loop D에 multiple phosphorylation consensus sequence를 가지고 있어 AQP4 water channel이 여러 protein kinase들에 의한 phosphorylation을 통해 그 활성이 조절받을 가능성을 시사하고 있다. AQP4 water channel의 활성도 조절에 어떤 특정 protein kinase가 관여하는지를 알아보고자 먼저 protein kinase A가 AQP4 water channel을 통한 수분 투과도에 미치는 효과를 관찰하였다. Fig. 3은 forskolin (10 μ M)을 10 분 전처치한 후 3배의 hypotonic shock 노출시 시간 경과에 따른 oocyte swelling의 초기속도를 기록한 것으로, AQP4 cRNA를 주입한 oocyte에서 forskolin을 전처치한 경우 전처치 하지 않은 군에 비해 수분 투과도의 유의한 변화는 관찰되지 않았으므로 AQP4 water channel의 활성조절에 있어서 protein kinase A의 관련성은 배제하였다.

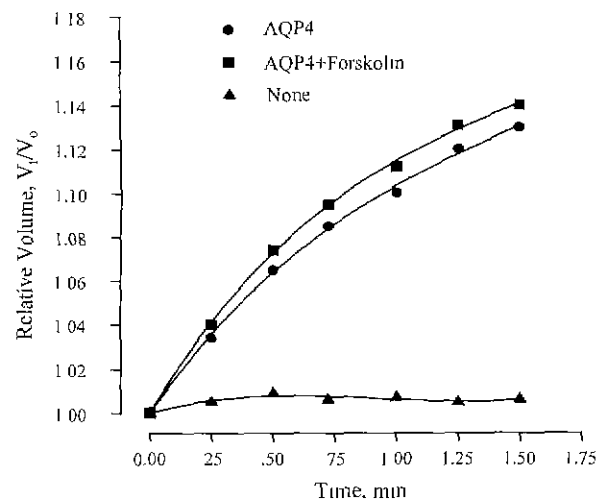


Fig. 3. The effect of protein kinase A on osmotic water permeability in AQP4 expressed oocytes.

AQP4 expressed (AQP4) or water injected (None) oocytes were incubated for 10 min in modified Barth's solution alone (AQP4) or containing 10 μ M forskolin (AQP4 + forskolin) followed by exposure to the hypotonic shock. Data represent mean of 5 experiments

AQP4 cDNA sequence에서 예견되는 phosphorylation consensus sequence 중 특히 loop B에 있는 phosphorylation site는 Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase의 작용을 받는 부위일 가능성이 높다. 따라서 Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase가 AQP4 water channel의 활성 조절에 관여하는 지를 알아보기 위해 먼저 세포내 Ca^{2+} 농도를 변화시켜 보면서 Ca^{2+} 농도변화가 oocyte swelling의 초기속도를 변화시키는지 관찰하였다. 즉, Ca^{2+} -free solution에서 세포내로 들어가 세포내 Ca^{2+} 을 chelating 시키는 BAPTA/AM을 처리하여 세포내의 Ca^{2+} 을 고갈시켜 보면서 세포내 Ca^{2+} 농도가 AQP4 water channel의 활성에 미치는 효과를 알아 보았다(Fig. 4). BAPTA/AM (1,2-bis (2-amino-phenoxy) ethan -N,N,N',N'-tetraacetic acid) 100 μ M을 30 분간 전처리한 경우 AQP4 cRNA expressed oocyte의 수분 투과도가 50% 정도 억제되었으며, BAPTA/AM 농도를 500 μ M까지 증가시키기에 따라 수분 투과도가 70%로 억제됨을 관찰하였다. 이와 같이 세포내 Ca^{2+} 이 고갈됨에 따라 AQP4 water channel을 통한 수분 투과도가 감소되는 결과는 세포내 Ca^{2+} 농도가 AQP4 water channel의 활성에 유의한 영향이 있음을 시사한다. 한편 Ca^{2+} 함유하고 있는 용액에 Ca^{2+} ionophore인 ionomycin (4 μ M)을 10분전처리 하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시킬 경우 AQP4 water channel을 통한 수분 투과도가 증가됨으로써 이와 같은 사실을 더욱 뒷받침해 주었다(Fig. 6).

Fig. 4에서와 같이 세포내 Ca^{2+} 농도가 AQP4 water channel을 통한 수분 투과도에 영향을 미침을 관찰하였으므로 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase가 직접 이러한 작용을 매개하는지를 알아보기 위해 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase의 선택적 억제제로 알려진 calmidazolium이 AQP4 water channel을 통한 수분투과도에 미치는 효과를 관찰 하였다. Fig. 5는 calmidazolium의 농도를 변화시키면서 30 분간 전처리한 후 oocyte의 수분투과도를 측정 한 것으로서, calmidazolium의 농도를 1 μ M에서 200 μ M로 증가시키기에 따라 농도에 비례하여 수분투과도는 감소하였으며 calmidazolium 200 μ M 처리시 수분투과도는 대조군에 비해 92% 감소하였다.

AQP4 water channel을 통한 수분 투과도의 조절에 있어서 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase의 관련 사실을 더욱 확인하기 위해서 calmidazolium의 억제효과

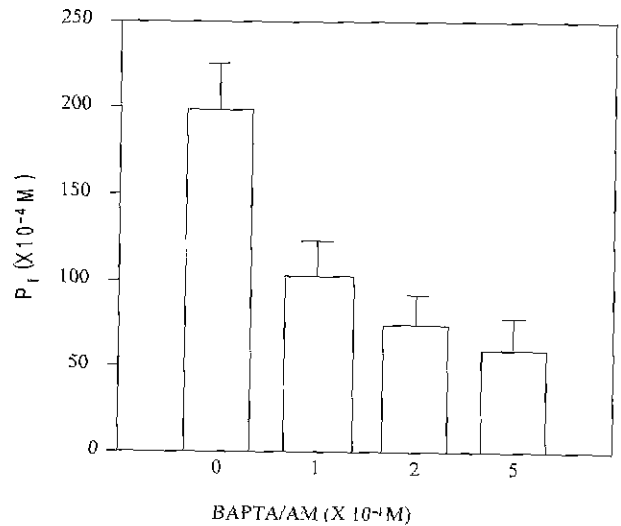


Fig. 4. The effect of intracellular Ca^{2+} level on osmotic water permeability in AQP4 water channel expressed oocytes.

AQP4-expressed oocytes were incubated with various concentrations of BAPTA/AM for 30 min and exposed to the hyposmotic shock. Data represent mean \pm SEM of 5 experiments.

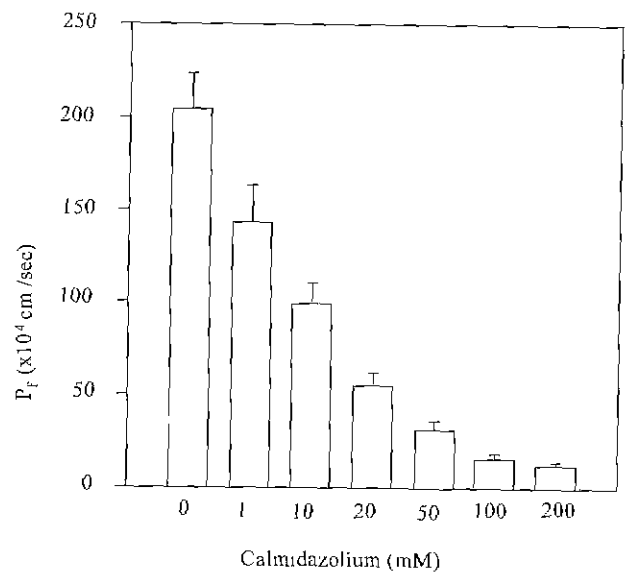


Fig. 5. The effect of various concentrations of calmidazolium on water permeability of AQP4 expressed oocytes.

AQP4-expressed oocytes were incubated for 10 min in buffer containing various concentrations of calmidazolium, followed by exposure to the hyposmotic shock. Data represent mean \pm SEM of 10 experiments.

가 type 1A protein phosphatase inhibitor인 calyculin에 의해 역전되는지를 알아 보았다(Fig. 6). 100 μ M calmidazolium 단독으로 30분간 전처치한 경우 AQP4 water channel을 통한 수분 투과도를 90% 감소시켰으며, calyculin 0.1 μ M을 100 μ M calmidazolium과 함께 동시에 30분 전처치하였을 때는 calmidazolium에 의한 수분 투과 억제효과가 상쇄되어 대조군의 수분 투과도의 85%로 회복됨을 관찰하였다. Calyculin 단독 처치시 대조군에 비해 수분 투과도가 23% 증가됨으로써 constitutive phosphorylation이 어느 정도 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase에 의한 phosphorylation이 AQP4 water channel의 수분 투과도를 촉진시킬 수 있음을 의미한다.

Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase 이외에 또 다른 protein kinase가 AQP4 water channel 활성 조절에 관여하는지를 알아보기 위해 protein kinase C를 활성화시키는 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)가 AQP4 cRNA를 주입한 oocyte의 수분 투과도에 미치는 효과를

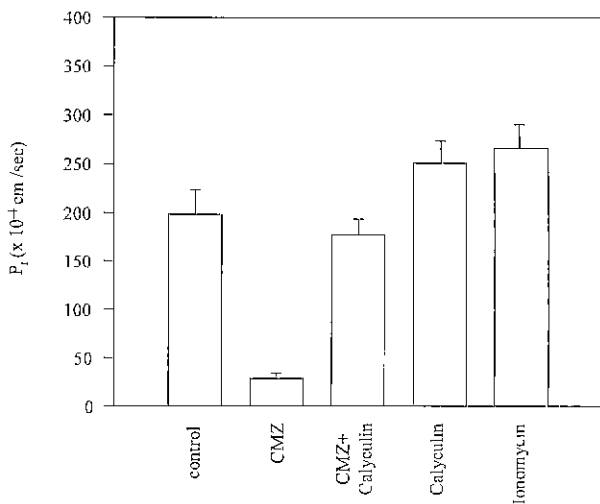


Fig. 6. The effect of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase on the osmotic water permeability in AQP4 expressed oocytes.

AQP4-expressed oocytes were incubated for 30 min in buffer alone (control), containing either 100 μ M calmidazolium (CMZ) or 0.1 μ M calyculin, or both (CMZ+calyculin), and ionomycin (5 μ M), followed by exposure to the hyposmotic shock. Data represent mean \pm SEM of 13 experiments.

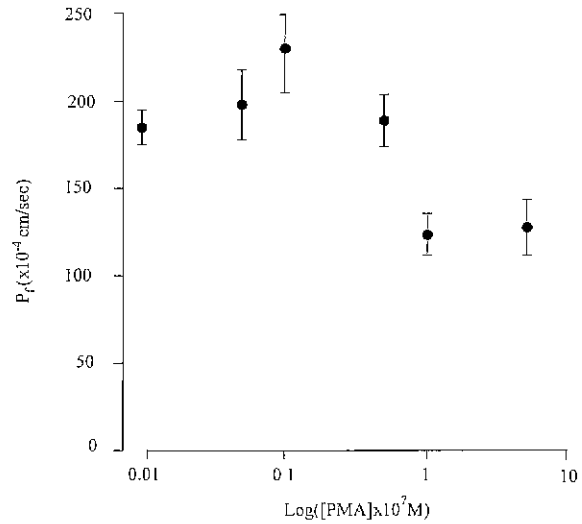


Fig. 7. The effect of PMA on osmotic water permeability in AQP4 expressed oocytes.

AQP4-expressed oocytes were incubated for 10 min in modified Barth's solution containing various concentrations of PMA, followed by exposure to the hyposmotic shock. Data represent mean \pm SEM of 19 experiments.

관찰하였다(Fig. 7). PMA (100 nM)를 10분 전처치할 경우 AQP4 cRNA expressed oocyte에서 수분 투과도가 control에 비해 21% 증가하였으며, 흥미롭게도 PMA를 1 μ M 이상으로 증가시켰을 때는 수분 투과도가 오히려 35% 감소되는 PMA의 biphasic effect를 관찰할 수 있었다.

이러한 PMA 농도에 따른 AQP4 water channel의 수분 투과도에 대한 효과의 차이가 PMA 자체의 효과인지 protein kinase C를 통한 phosphorylation에 의한 결과인지를 알아보기 위해서 protein kinase C 억제제인 staurosporine에 의해 PMA의 효과가 봉쇄되는지 관찰하였다(Fig. 8). Staurosporine 2 μ M을 PMA와 동시에 10분 전처치 하였을 때 100nM PMA의 수분투과도의 증가효과 뿐 아니라 PMA 1 μ M에서의 억제효과도 상실되었다. 이러한 결과는 protein kinase C가 AQP4 water channel의 phosphorylation을 통해 수분 투과도를 조절함을 시사한다. PMA의 AQP4 water channel의 수분투과도에 대한 효과가 AQP1 water channel을 통한 수분투과도에도 동일하게 나타나는지를 알아보기 위해 두 농도의 PMA가 AQP1-expressed oocyte의 수분투과도에 미치는 영향을 관찰하

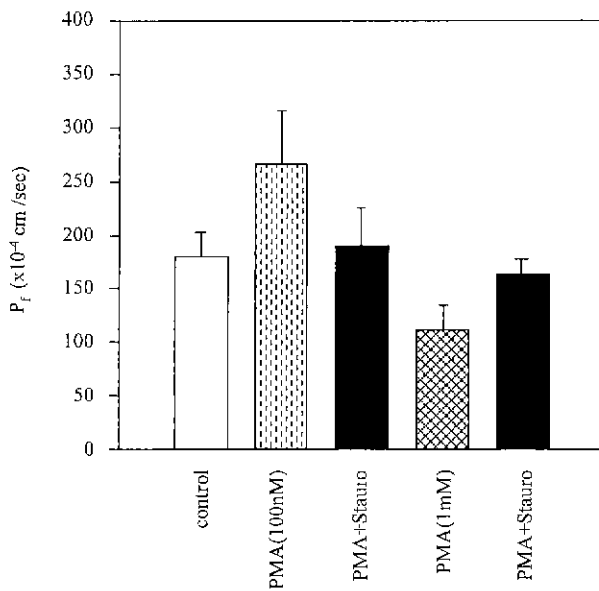


Fig. 8. The effect of staurosporine on the osmotic water permeability in AQP4 expressed oocytes.

AQP4 water channel expressed oocytes were incubated for 10 min in buffer alone (control), containing either 100 nM or 1 µM PMA alone, or both PMA and 2 µM staurosporine, followed by exposure to the hypotonic shock. Data represent mean ± SEM of 15 experiments.

였다(Fig. 9). 그 결과 AQP1-expressed oocyte을 통한 수분의 이동에는 100 nM과 1 µM의 PMA농도 모두에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

고 찰

두개골은 아주 제한된 공간이므로 포유동물에서 뇌가 정상적인 기능을 유지하기 위해서는 수분과 염분의 균형 조절이 필수적으로 선행되어야 한다. 더구나 뇌내 신경하수체는 시상하부의 상시신경핵 및 측뇌실핵 부위의 국소적인 미세한 삼투압변화에 반응하여 축색돌기를 따라 운반된 vasopressin을 혈액으로 분비함으로써 신체 전반의 수분대사 및 삼투질조절에 중심적인 역할을 담당하고 있다.

AQP4는 water channel family의 일종으로 Jung 등[12]이 homology cloning에 의해 처음 발견하였으며 주로 뇌에 고농도로 존재한다. Rat brain에서 AQP4 mRNA 분포를 알아보기 위한 in situ hybridization한 실험결과를 보면 AQP4 cRNA는 brain 전체에 걸쳐 다양한 농도로 존재

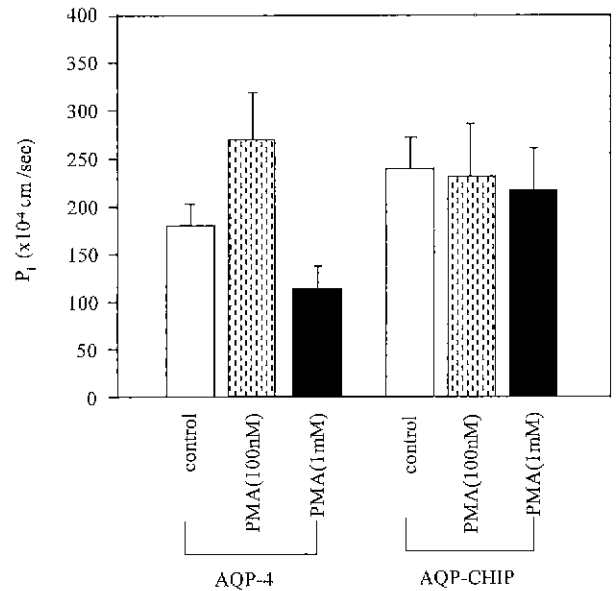


Fig. 9. The effect of PMA on the osmotic water permeability in AQP4 or AQP-CHIP expressed oocytes. AQP4 or AQP-CHIP water channel expressed oocytes were incubated for 10 min in buffer alone (control), or containing either 100 nM or 1 µM PMA, followed by exposure to the hypotonic shock. Data represent mean ± SEM of 10 experiments.

하며 특히 수분 대사조절에 중요한 부위인 갈증 중추, 즉 상시신경핵과 측뇌실핵에 고농도로 분포하고 있으며, 기타 뇌가 지주막하강 내에 있는 뇌척수액과 접하고 있는 pial surface, aqueduct system의 ependymal cell lining, dentate gyrus의 granule cell layer, 소뇌의 Purkinje cell 등에도 고농도로 분포한다고 한다. 여러 조직에 가장 널리 분포하고 있는 AQP1은 뇌내에 맥락막층에는 풍부하지만 다른 뇌부위, 특히 삼투압조절에 중요한 상시신경핵 및 측뇌실핵에는 전혀 분포하지 않고 있으며, 이 부위는 AQP4 water channel만 선택적으로 고농도로 분포하고 있다. 이러한 사실은 AQP4가 뇌실질 조직과 액체 구획 사이의 수분균형을 유지시키는데 있어서 중요한 수분통로로 작용하며, 이는 vasopressin을 합성하는 상시신경핵 및 측뇌실핵에 다량 존재함으로써 AQP4를 통한 수분 이동이 이 부위의 magnocellular secretory cell의 국소적인 세포 외부 삼투압 변동에 반응하여 신속하게 부피의 변동을 유발시키고, 이러한 세포의 swelling이 모종의 mechanosensitive ion channel을 통해 vasopressin의 합성과 분

비를 유발시킴으로써[25], 이 부위의 세포가 osmoreceptor로서의 기능을 할 수 있도록 하여 신경계 내의 삼투 평형 뿐만 아니라 신체 전체의 수분 대사조절에도 크게 기여할 것임을 시사하고 있다.

Aquaporin을 통한 수분투과도의 조절은 AQP-CD에서 주로 연구되어 있어 protein kinase A에 의한 이 단백질 기능의 조절이 보고 되어 있다[15,23]. AQP4 water channel의 조절기전에 대한 구체적인 연구는 보고된 바가 없다. 이미 밝혀져 있는 AQP4 water channel의 구조를 보면 6개의 membrane spanning domain과 5개의 connecting loop (A-E)로 연결되어 있으며, amino terminal과 carboxyl terminal을 모두 세포질내에 가지고 있는 형태이다. Loop B와 loop E에는 모든 aquaporin family에 공통적으로 존재하는 NPA amino acid sequence motif를 각각 하나씩 가지고 있으나[8,12,25], mercury inhibitory site에 해당되는 NPA motif의 근위부에 위치한 G94와 A210 부위에 cysteine이 결핍되어 일반적인 water channel 억제제인 mercury에 의해서는 AQP4를 통한 수분 투과가 억제되지 않는 것으로 알려져 있다[27,29]. AQP4 water channel의 아미노산 서열을 보면 loop B와 loop D에 multiple phosphorylation consensus sequence를 가지고 있어 protein kinase에 의한 water channel의 phosphorylation을 통해 그 기능이 조절 받을 가능성이 있음을 높이 시사하고 있다.

이에 착안하여 시행한 본 연구에서 AQP4 water channel을 통한 수분 투과도는 protein kinase A에 의해 영향을 받지 않았으나, BAPTA/AM이나 ionomycin에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도 변화시 영향을 받고 Ca^{2+} /calmodulin kinase inhibitor에 의해 억제되며, 이에 의한 억제가 phosphatase inhibitor에 의해 역전되었다. 이러한 결과는 AQP4 water channel이 세포내 Ca^{2+} 농도 변화에 의한 Ca^{2+} /calmodulin kinase의 활성변화에 의해 조절될 수 있음을 나타낸다. Ca^{2+} /calmodulin kinase에 의한 AQP4의 활성변화는 신경활동로 증가시 관찰되는 neuronal swelling이나 insertion에 의한 neuronal swelling이 세포내 Ca^{2+} 농도 증가와 밀접한 관계가 있다는 점과 관련시켜 볼 때 Ca^{2+} 에 의한 AQP4 기능 조절의 가능성을 간접적으로 시사할 수 있다.

실험 결과 AQP4 water channel의 활성은 Ca^{2+} /calmo-

dulin kinase 뿐만 아니라 protein kinase C에 의해서도 조절되었는데, 100 nM PMA에서는 활성화되었으며, 1 μ M PMA는 오히려 활성을 억제시켰다. 이러한 결과는 부분적으로는 Han 등이 보고한 결과와 일치한다고 볼 수 있다[6]. 그러나 Han 등은 protein kinase C activator로 phorbol 12,13-dibutyrate를 사용하여 10 μ M 농도에서 수분투과도가 87% 감소함을 관찰하였으며, 40초 동안의 난자 용적 변화로 수분투과도를 관찰하였으나 저자들은 90초까지 관찰한 점에서 차이를 찾아볼 수 있다. 본 연구에서 protein kinase C가 AQP4의 활성화에 미치는 효과는 그 농도에 따라 복합적인 양상으로 나타났는데, 이에 대한 생리학적 의미는 차후 면밀한 조사로 규명되어야 할 것이다.

한편 protein kinase A에 의한 AQP2의 조절은 직접적인 단백질의 인산화에 의한 활성 증가 뿐만 아니라 membrane trafficking에 의한 AQP2 water channel의 luminal membrane으로도 관여하는 것으로 알려져 있다[13]. 최근 immunoblot을 이용하여 신장 inner medullar membrane에서 AQP4의 cellular localization을 관찰한 결과 AQP4가 형질막에 풍부하게 존재함과 동시에, 소량은 세포내 vesicle 내에도 존재하는 것으로 밝혀져[32] vasopressin에 의해 AQP2 활성이 증가되는 것과 같이 AQP4의 활성도 세포내 vesicle과 형질막 사이의 membrane trafficking을 통해 조절될 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 본 실험에서 *Xenopus oocyte*에 발현시킨 AQP 4 water channel을 통한 수분투과도가 Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase와 protein kinase C에 의해 조절될 수 있다고 볼 때, AQP4 water channel의 직접적인 인산화에 의한 활성증가 뿐만 아니라 membrane trafficking에 관여하는 여러 구성성분이 인산화됨으로써 수분투과도가 증가될 가능성도 배제할 수는 없다.

따라서 AQP4 water channel의 조절기전을 밝히려는 본 연구는 AQP4 water channel의 기본적인 특성과 기능을 이해하는데 초석이 될 뿐만 아니라, 같은 family에 속하는 다른 type의 water channel의 특성과 그 차이를 비교하는데 도움이 될 것이다. 또한 우리 몸의 수분대사 조절과정에 있어서 상시신경핵 및 측뇌실핵에서의 국소적 삼투압 변화에 대한 이 magnocellular neurosecretory cell의 수분투과도의 조절에 의해 어떻게 변화하는지를 vaso-

pressin의 분비양상이 밝히는데 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

AQP4 water channel의 기능과 그 조절기전을 밝히는 것은 hyperglycemia, uremia 혹은 postischemic swelling과 같은 병적상황에서 초래될 수 있는 뇌내 삼투평형 및 체액평형의 장애에 있어서 AQP4의 역할과 질병의 병태생리를 이해하고 치료제 개발을 위한 기반을 확립하는데 기여할 것이다. 차후 연구를 통해 *in vitro* phosphorylation study등으로 Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase와 protein kinase C가 AQP4 water channel의 직접적인 인산화를 통해 수분 투과도에 영향을 미치는지를 확인하고, site-directed mutagenesis 등을 이용하여 AQP4의 loop B와 loop D의 multiple consensus sequence 중 어떤 위치의 serine/threonine residue가 인산화되어 AQP4 water channel의 활성을 조절하는지를 조사해야 할 것이다.

요 약

AQP4는 water channel family의 일종으로 주로 뇌에 고농도로 존재하여 신경계 내의 삼투평형 뿐만 아니라 신체 전체의 수분대사 조절에 기여할 것으로 추측된다. AQP4 cDNA sequence와 그에 따른 아미노산 및 단백질 구조는 이미 밝혀져 있으나, AQP4 water channel의 조절 기전에 대하여서는 아직 모르고 있다.

본 연구에서는 AQP4 cRNA를 개구리 난자에 주입하여 발현시킨 후 videomicroscope를 이용하여 인산화가 AQP4를 통한 수분투과도에 미치는 효과를 관찰하였다. 실험 결과 AQP4 water channel을 통한 수분투과도는 protein kinase A에 의해서는 영향을 받지 않았으나, BAPTA 처리로 세포내 Ca^{2+} 을 고갈시키거나 Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase의 억제제인 calmidazolium에 의해서 수분 투과도가 억제되었으며, 이 억제 효과는 비특이적 phosphatase 억제제인 calyculin A에 의해 상쇄되었다. Protein kinase C를 활성화시키는 PMA는 복합적인 양상으로 수분 투과도에 영향을 미쳤는데 100nM 농도에서 21%의 수분투과도 증가를 보였으며, 1 μ M에서는 오히려 35% 감소하였으며, 이러한 효과는 staurosporine에 의해 소실되었다.

이러한 결과는 AQP4 water channel의 활성을 통한 수

분투과도는 Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase 및 protein kinase C에 의한 인산화에 의해 조절됨을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 교육부 기초의학 학술연구조성비(1996)의 지원을 받아 진행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Agre, P., G. M. Preston, B. L. Smith, J. S. Jung, S. Raina, C. Moon, W. B. Guggino and S. Nielson. 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol.* **265**, F463-476.
2. Agre, P., D. Brown and S. Nielsen. 1995. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **7**, 472-483.
3. Connolly, D. L., C. M. Shanahan and P. L. Weissberg. 1996. Water channels in health and disease. *Lancet* **347**, 210-212.
4. Deen, P. M., M. A. Verdijk, N. V. Knoers, B. Wieringa, L. A. Monnens, C. H. van Os and B. A. van Oost. 1994. Requirement of human renal water channel aquaporin 2 for vasopressin-dependent concentration urine. *Science* **264**, 92-95.
5. Fushimi, K., S. Uchida, Y. Hara, Y. Hirata, F. Marumo and S. Sasaki. 1993. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* **361**, 549-552.
6. Han, Z., M. B. Wax and R. V. Patil. 1998. Regulation of aquaporin-4 water channels by phorbol ester-dependent protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **273**, 6001-6004.
7. Harris, H. W., K. Strange and M. L. Zeidel. 1991. Current understanding of the cell biology and molecular structure of the antidiuretic hormone-stimulated water transport pathway. *J. Clin. Invest.* **88**, 1-8.
8. Ishibash, K., M. Imai and S. Sasaki. 2000. Cellular localization of aquaporin 7 in the rat kidney. *Exp. Nephrol.* **8**, 252-257.
9. Ishibash, K., M. Kuwahara, Y. Gu, Y. Tanaka, F. Marumo and S. Sasaki. 1998. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 268-274.

10. Ishibashi, K., S. Sasaki, K. Fushimi, T. Yamamoto, M. Kuwahara and F. Marumo. 1994. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6269-6273.
11. Jung, J. S., G. M. Preston, B. L. Smith, W. B. Guggino and P. Agre. 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. *J. Biol. Chem.* **269**, 14648-14654.
12. Jung, J. S., R. V. Bhat, G. M. Preston, W. B. Guggino, J. M. Baraban and P. Agre. 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 13052-13056.
13. Knepper, M. A. and T. Inoue. 1997. Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 560-564.
14. Koyama, Y., T. Yamamoto, D. Kondo, H. Funaki, E. Yaoita, K. Kawasaka, N. Sato, K. Hatakeyama and I. Kihara. 1997. Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver. *J. Biol. Chem.* **272**, 30329-30333.
15. Kuwahara, M., K. Fushimii, Y. Terada, L. Bai, F. Marumo and S. Sasaki. 1995. cAMP-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.* **270**, 10384-10387.
16. Lee, M. D., K. Y. Bhakta, S. Raina, R. Yonescu, C. A. Griffin, N. G. Copeland, D. J. Gilbert and N. A. Jenkins. 1996. The Human Aquaporin-5 Gene (Molecular characterization and chromosomal localization). *J. Biol. Chem.* **271**, 8599-8604.
17. Lu, L., C. Montrose-Rafizadeh, T. C. Hwang and W. B. Guggino. 1990. A delayed rectifier potassium current in *Xenopus oocytes*. *Biophys. J.* **57**, 1117-1123.
18. Ma, T., A. Frigeri, H. Hasegawa and A. S. Verkman. 1994. Cloning of a water channel Homolog expressed in brain meningeal cells and kidney collecting duct that functions as a stilbene-sensitive glycerol transporter. *J. Biol. Chem.* **269**, 21845-21849.
19. Matsujaki, T., T. Suzuki, H. Koyama, S. Tanaka and K. Takata. 1999. Aquaporin-5 (AQP-5), a water channel protein, in the rat salivary and lacrimal glands: immunolocalization and effect of secretory stimulation. *Cell Tissue Res.* **295**, 513-521.
20. Mulders, S. M., G. M. Preston, P. M. Deen, W. B. Guggino, C. H. van Os and P. Agre. 1995. Water channel properties of major intrinsic protein of lens. *J. Biol. Chem.* **270**, 9010-9016.
21. Nielsen, S., B. L. Smith, E. I. Christensen, M. A. Knepper and P. Agre. 1993. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell Biol.* **120**, 371-383.
22. Nielsen, S., B. L. Smith, E. I. Christensen and P. Agre. 1993. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *J. Cell Biol.* **120**, 7275-7279.
23. Nielsen, S., C. L. Chou, D. Marples, E. I. Christensen, M. A. Knepper and H. W. Harris. 1995. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1013-1017.
24. Nielsen, S., S. R. DiGiovanni, E. I. Christensen, M. A. Knepper and H. W. Harris. 1993. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin regulated water channel in rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11663-11667.
25. Oliet, S. H. and C. W. Boueque. 1993. Mechano-sensitive channels transduce osmosensitivity in supra-optic neurons. *Nature* **364**, 341-343.
26. Preston, G. M. and P. Agre. 1991. Molecular cloning of red cell integral membrane protein Mr 28,000: a member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11110-11114.
27. Preston, G. M., J. S. Jung, W. B. Guggino and P. Agre. 1993. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 Water Channel. *J. Biol. Chem.* **268**, 17-20.
28. Sabolic, I., G. Valenti, J. M. Verbavatz, A. N. Van Hoek, A. S. Verkman, D. A. Ausiello and D. Brown. 1992. Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **263**, C1225-1233.
29. Shi, L. B. and A. S. Verkman. 1996. Selected cysteine point mutations confer mercurial sensitivity to the mercurial-insensitive water channel MIWC/AQP-4. *Biochemistry* **35**, 538-544.
30. Smith, B. L. and P. Agre. 1991. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exist as a multi-subunit oligomer similar to channel proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 6407-6415.
31. Spring, K. 1991. Mechanism of fluid transport by

- epithelia. In: Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. *Am. Physiol. Soc.* **6**, 195-207.
32. Terris, J., C. A. Ecelbalger, D. Marples, M. A. Knepper and S. Nielsen. 1995. Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am. J. Physiol.* **269**, 775-785.
33. Terwilliger, T. C. and A. K. Solomon. 1981. Osmotic water permeability of human red cells. *J. Gen. Physiol.* **77**, 549-570.
34. Verkman, A. S. and A. K. Mitra. 2000. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**, F13-28.
35. Yasui, M., T. H. Kwon, M. A. Knepper, S. Nielsen and P. Agre. 1999. Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5808-5813.
36. Yisraeli, J. K. and D. A. Melton. 1989. Synthesis of long, capped transcripts in vitro by SP6 and T7 RNA polymerases. *Methods Enzymol* **180**, 42-50.
37. Zhang, R., K. A. Logee and A. S. Verkman. 1990. Expression of mRNA coding for kidney and red cell water channels in *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.* **265**, 15375-15378.