

## 腎臓と唾液腺における細胞膜水チャネル, アクアポリン Water Channel Aquaporins in the Kidney and Salivary Glands

松崎 利行<sup>a</sup>, 高田 邦昭<sup>b</sup>, 小澤 一史<sup>a</sup>  
Toshiyuki Matsuzaki, Kuniaki Takata and Hitoshi Ozawa

<sup>a</sup> 日本医科大学大学院医学研究科生体制御形態科学分野

<sup>b</sup> 群馬大学大学院医学系研究科生体構造学分野

**要旨** アクアポリン (aquaporin, AQP) はおもに水チャネルとして機能する膜タンパク質で, 哺乳類では AQP0 から AQP12 の 13 種類が知られている. 水の移動が盛んな器官にはこのうちいずれかの AQP の発現がみられることが多い. 腎臓には AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP6, AQP7, および AQP11 が発現し尿濃縮において重要な役割を担っている. なかでも集合管細胞の AQP2 はバソプレッシンに反応して細胞内小胞から細胞膜へと移行し, 水の再吸収を調節している. 唾液腺には腺房細胞の頂部細胞膜に AQP5 があり, 唾液分泌に重要な役割を果たしている. 水の分泌量の変化に伴う AQP5 の細胞内分布の変化が示唆されていたが, 組織化学的検討からは否定的である. 一方で, 分泌果粒の放出により細胞膜と果粒の膜が融合すると AQP5 の分布にも変化が見られる. これはエキソサイトーシスとエンドサイトーシスの際の細胞膜の動態を理解するうえで興味深い.

キーワード: アクアポリン, 水チャネル, 腎臓, 唾液腺, 膜動態

### 1. はじめに

細胞膜は脂質二重層からなり水の透過性は低いので, 多量の水が細胞膜を瞬時に透過するには, 水チャネルが必要である. 細胞膜の水チャネルが最初に同定されたのは 1992 年のことであり, その業績は 2003 年, Peter Agre のノーベル化学賞受賞につながった. 筆者らはこれまで水チャネルの生体内分布の解析に携わってきた. ここでは水の再吸収をおこなう腎臓と, 水の分泌をおこなう唾液腺を中心に, 水チャネルの分布とその役割を紹介したい.

### 2. 水チャネルの発見

ヒトの腎臓の糸球体で濾過される原尿は 1 日に約 180 リットルにも上るが, 実際に尿として排出されるのは 1.5~2 リットルほどに過ぎない. 尿細管から集合管にかけて, 多量の水が再吸収されているわけである. このことから, 尿細管から集合管にかけての上皮細胞の細胞膜には, 水を透過させる特別な仕組みがあることが想定されていた. 1992 年, Peter Agre らのグループは, 赤血球の細胞膜タンパク質として単離した 28 kDa の膜タンパク質, CHIP28 (channel-like integral membrane protein of 28 kDa) が水を透過させる水チャネルであることを発見した<sup>1)</sup>. 特異抗体を用いた研究で, この

水チャネルは赤血球のほかに腎臓の近位尿細管上皮細胞の細胞膜に分布することが明らかとなった. 1993 年には, 腎臓の集合管に分布する水チャネル, WCH-CD (water channel of collecting duct) がクローニングされた<sup>2)</sup>. 水チャネルは後にアクアポリン (aquaporin; AQP) と命名され, CHIP28 はアクアポリン 1 (AQP1), WCH-CD はアクアポリン 2 (AQP2) と呼ばれるようになった. その後次々と新たなアイソフォームがクローニングされ, 水チャネルは細菌から哺乳類, さらに植物にまで普遍的に存在していることがわかってきた.

### 3. 哺乳類のアクアポリン

哺乳類では, 現在までに 13 種類のアクアポリンアイソフォーム (AQP0-AQP12) が確認されている. 図 1 にアクアポリンの構造を示した. いずれのアイソフォームも膜を 6 回貫通し, N 末端と C 末端は細胞質側に伸びている. 細胞内の loop B と細胞外の loop E は脂質二重層に入り込み, チャネルの透過路を形成している. 透過路を形成する部分にはアスパラギン-プロリン-アラニンからなり, ほぼすべてのアイソフォームで保存されている NPA ボックス (アミノ酸の一文字表記から名付けられた) が存在し, 水の透過性を規定している. アクアポリンは「チャネル」とはいえ, 水の透過路の開閉はおこらないとされる. 水の透過は両方向に可能で, 浸透圧や静水圧が原動力となり受動的におこなわれる. また, アクアポリンは 1 つの分子が 1 つの透過路を形成するが, 膜では通常 4 量体を形成しているとされる. アクアポリンは通常は細胞表面の細胞膜に存在するが, AQP2, AQP6, AQP11 などは細胞内に分布する. なかでも腎臓の集合管の細胞に発

<sup>1)</sup> 〒 113-8602 文京区千駄木 1-1-5  
TEL: 03-3822-2131 内線 5319; FAX: 03-5685-6640  
E-mail: matoshi@nms.ac.jp (松崎利行)  
2009 年 3 月 2 日受付

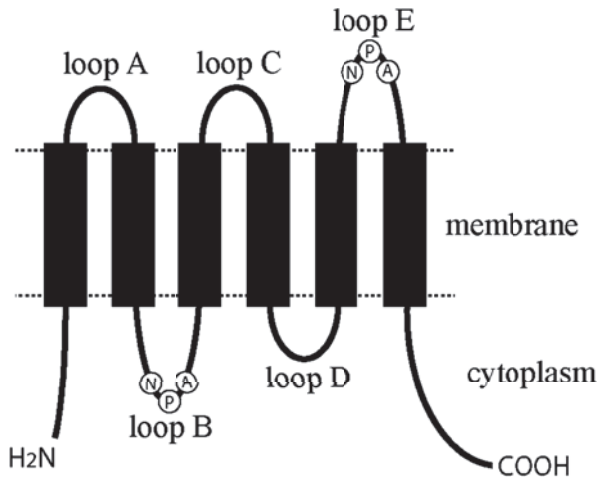


図1 アクアポリンの構造.

アクアポリンはアミノ酸にして300以下の短い1本のポリペプチド鎖からなり、膜を6回貫通する。N末端とC末端はいずれも細胞質側に伸びている。細胞内のloop Bと細胞外のloop Eには、アスパラギン-プロリン-アラニン（アミノ酸の一字表記によりNPA）からなる保存された領域（NPAボックス）がある。文献4より転載。

現するAQP2は、細胞内小胞と細胞膜との間をトラフィックキングするアクアポリンとして非常に興味深い。アクアポリンは大きく3つのグループに分けられる。すなわち、水を選択的に透過させるclassical aquaporins（AQP1, AQP2, AQP4, AQP5）と、水のほかにグリセリンや尿素などの小分子を透過させるaquaglyceroporins（AQP3, AQP7, AQP9, AQP10）、さらには、いずれにも分類されがたいunorthodox aquaporins（AQP6, AQP8, AQP11, AQP12）である<sup>3)</sup>。生体内で水の移動が盛んにおこなわれる器官には、いずれかのアクアポリンアイソフォームが分布していることが多い<sup>4,5)</sup>。

#### 4. 腎臓のアクアポリン

##### 4.1 アクアポリンアイソフォームの分布局在と生理的役割

腎臓ではAQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP6, AQP7, およびAQP11の発現が確認されている。これらのアイソフォームはおもに近位尿細管と集合管に分布する<sup>6)</sup>（図2A）。近位尿細管と集合管の間に位置する遠位尿細管は、水の透過性が極めて低いことが知られており、いずれのアクアポリンアイソフォームもみられない。

##### 4.1.1 近位尿細管、ヘンレのループの細い下行脚

近位尿細管曲部から近位尿細管直部およびヘンレのループの細い下行脚にかけて、上皮細胞の細胞膜全周性にAQP1が分布している<sup>7)</sup>。腎臓での水の再吸収の約60%は近位尿細管でおこなわれる。近位尿細管ではナトリウムイオンの再吸収が盛んにおこなわれており、それによって生ずる管腔内の原尿と間質液との間の浸透圧勾配が原動力となり水が移動する。すなわち、水は管腔から管腔側細胞膜のAQP1を通過して細胞内へ入り、基底側壁部細胞膜のAQP1を通過して間質へと再吸収される。またヘンレのループの細い下行脚に分布する

AQP1は、直細動脈内皮細胞の細胞膜全周性に分布するAQP1とともに、対向流増幅系の確立にあずかっている。

近位尿細管直部では、その管腔側細胞膜にAQP1に加えてAQP7も分布している<sup>8)</sup>。AQP7はaquaglyceroporinに分類され、水のほかにグリセロールや尿素を通過させる。AQP7ノックアウトマウスでは尿濃縮障害がみられない一方、尿中へのグリセロールの排泄が上昇することが報告されており、AQP7はグリセロールの吸収にはたらくと考えられるが明らかではない。

さらに近位尿細管ではunorthodox aquaporinsに分類されるAQP11が発現している。筆者らはAQP11の特異抗体を作製し、免疫組織化学によりその局在を検討した<sup>9)</sup>。その結果、近位尿細管に分布する他のアイソフォームは細胞膜に局在するのに対して、このAQP11は細胞内に分布することが判明した。さらにAQP11ノックアウトマウスを作製し、解析した結果、AQP11ノックアウトマウスは腎臓に嚢胞を多数形成し、重度の腎不全に陥り生後1か月程度で死に至ることがわかった<sup>9)</sup>。腎臓の形態変化を詳細に検討した結果、嚢胞を形成する前段階として、近位尿細管細胞の小胞体の内腔が拡張し、細胞が壊死に陥ることが判明した。このことからAQP11は小胞体内外の水の移動に関与することが推測されるが、詳細はわかっていない。免疫電顕によるAQP11の細胞内分布の詳細な解析は今後の検討課題である。

##### 4.1.2 結合尿細管、集合管

集合管ではバソプレッションのコントロールのもとで尿の濃縮がおこなわれる。ここで極めて重要なはたらきをするのがAQP2である。AQP2は結合尿細管および皮質から髄質にかけての集合管主細胞に分布する。AQP2は血中のバソプレッシン濃度が低いときには、細胞内の小胞により多く分布し（図2B, D）、血中のバソプレッシン濃度が上昇すると、小胞のエキソサイトーシスによって管腔側細胞膜により多く分布するようになる<sup>10)</sup>（図2C, E）。これにより管腔側細胞膜の水透過性が著しく上昇する。

一方、AQP2が分布する集合管主細胞の基底側壁部細胞膜にはAQP3が、さらに皮質から髄質にかけての集合管主細胞の基底側壁部細胞膜にはAQP4も分布しており、管腔の水は管腔側細胞膜のAQP2を通過して細胞に入り、基底側壁部細胞膜のAQP3およびAQP4を通過して間質へと再吸収されていく<sup>11,12)</sup>。AQP3およびAQP4は、血中のバソプレッシン濃度とは関係なく常に基底側壁部細胞膜上に分布している。バソプレッシンは、管腔側細胞膜の水透過性をコントロールすることで水の再吸収をコントロールしているわけである。

皮質から髄質外層にかけての集合管には、AQP2, AQP3, AQP4を発現する主細胞（明調細胞）のほかに介在細胞（暗調細胞）が存在する。介在細胞は酸を分泌し、体液の酸塩基平衡を調節しているとされる。介在細胞にはAQP2, AQP3, AQP4の発現は見られないがAQP6が細胞内に分布する<sup>13)</sup>。AQP6は常に細胞内に留まり、細胞膜に移行することはないとされている。AQP6の水透過性は低く、酸性環境下では

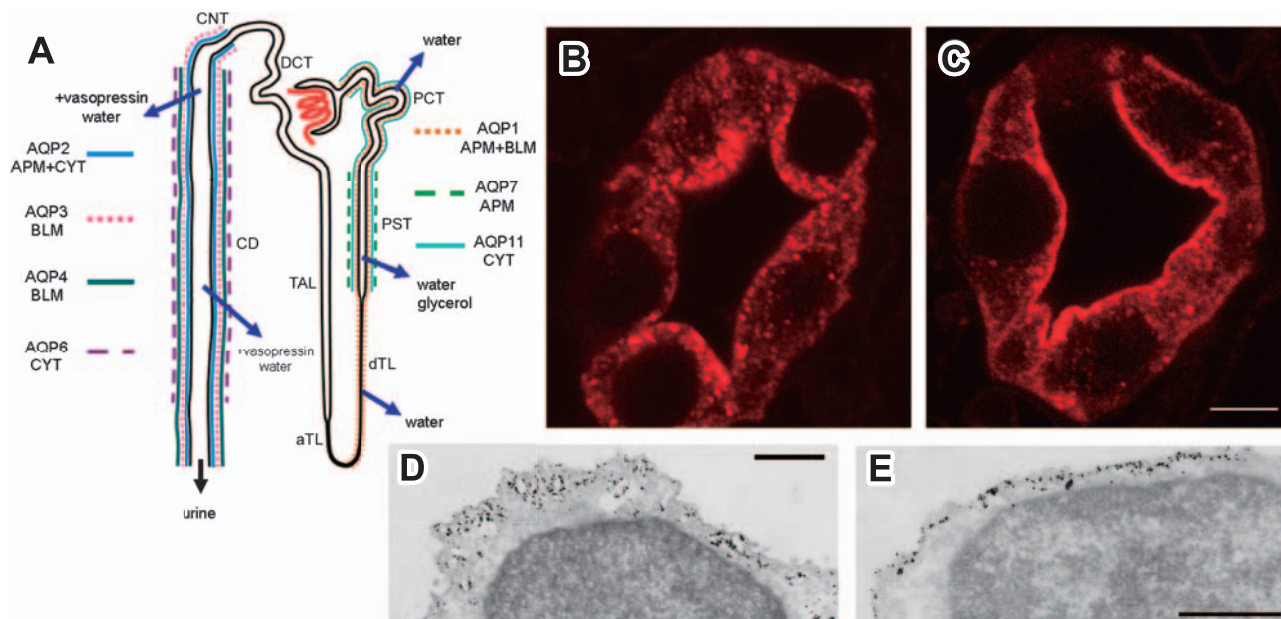


図2 腎臓のアクアポリン

A: 尿細管および集合管におけるアクアポリンの分布の模式図。PCT 近位尿細管曲部, PST 近位尿細管直部, dTL ヘンレのループの細い下行脚, aTL ヘンレのループの細い上行脚, TAL ヘンレのループの太い上行脚, DCT 遠位尿細管曲部, CNT 結合尿細管, CD 集合管, APM 頂部(管腔側)細胞膜, BLM 基底側壁部細胞膜, CYT 細胞内コンパートメント。B-E: ラットに多量の水を摂取させ、血中ナトリウム濃度を低下させた状態(B, D)と、多量の水を摂取させた後にナトリウムを投与して1時間後(C, E)の髓質集合管のAQP2細胞内分布の変化。蛍光抗体法(B, C)とナノゴールド標識二次抗体を銀増感した免疫電顕プレエンベッディング法(D, E)。B, Dでは細胞内に、C, Eでは管腔側細胞膜により多くAQP2が分布する。スケールバーは5 μm (B, C), 1 μm (D, E)。A, B, Cは文献6より許可を得て転載。D, Eは文献10より転載。

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>やCl<sup>-</sup>といった陰イオン類を透過することが示され、介在細胞の持つ体液の酸塩基平衡調節機能と関係する可能性が示唆されている。

## 5. 唾液腺のアクアポリン

### 5.1 アクアポリンアイソフォームの分布局在と生理的役割

ヒトでは1日あたり約1.5リットルにも及ぶ唾液の分泌がおこなわれている。唾液腺の腺房ではイオンが腺腔に分泌され、浸透圧勾配が原動力となって水が腺腔に移動し、ほぼ等張な原唾液が産生される。導管ではイオンが再吸収されるが水は再吸収されないため、低張な唾液となって口腔内に分泌される。唾液腺からは1995年、AQP5がクローニングされた<sup>14)</sup>。筆者らはAQP5の特異抗体を作製し、ラット唾液腺における分布局在を検討した<sup>15)</sup>。三大唾液腺である耳下腺、顎下腺、舌下腺ではいずれも腺房細胞の腺腔側(頂部側)と細胞間にAQP5が認められた。タイトジャンクション構成タンパク質であるoccludinとの二重染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡で解析したところ、AQP5はoccludinに沿うように腺腔から細胞間に分布することがわかった(図3A)。つまりAQP5は腺腔側および細胞間分泌細管の細胞膜に分布することが明らかとなった。腺腔側および細胞間分泌細管の細胞膜はいずれも頂部細胞膜ドメインで、分泌がおこる細胞膜である。腺房では浸透圧勾配が原動力となり水が腺腔へと移動するが、その際にAQP5が重要な役割を果たすと考えられる。

水透過性が低いとされる導管にはAQP5は分布しないが、顎下腺では腺房と導管の間に位置する介在部導管に限り、非常に強いAQP5の発現がみられた。介在部導管は腺房で産生された原唾液の導管への通路として考えられていたが、積極的に水の分泌をおこない腺房細胞に近いはたらきをしていることが示唆された。耳下腺および舌下腺では介在部導管にAQP5の分布は認められない。

筆者らはさらにラットの消化管の外分泌腺を中心にスクリーニングし、AQP5が口腔内の小唾液腺、胃の幽門腺、十二指腸の十二指腸腺に分布することを明らかにした<sup>16)</sup>。いずれも分泌細胞の頂部細胞膜に分布したが、発現量の多い小唾液腺では基底側壁部細胞膜にもわずかながら分布が認められた。さらにマウスの唾液腺ではAQP5の発現量が非常に多く、頂部細胞膜に加え基底側壁部細胞膜にもAQP5が分布することが判明した<sup>17)</sup>。つまりAQP5は、主として頂部細胞膜に分布する水チャネルであるが、発現量が多くなると基底側壁部細胞膜にも分布すると考えられる。

筆者らのアイソフォーム特異的な抗体を用いた検討では、唾液腺でAQP5以外のアイソフォームの発現は確認されなかった。他の研究グループからも確かな報告はない。

### 5.2 分泌果粒放出にともなうAQP5の分布の変化

耳下腺をはじめとする唾液腺の腺房細胞は分泌果粒を豊富に含み、刺激に応じて細胞間分泌細管および腺腔に放出している。放出が次々とおこり、果粒膜と細胞膜とが融合してい



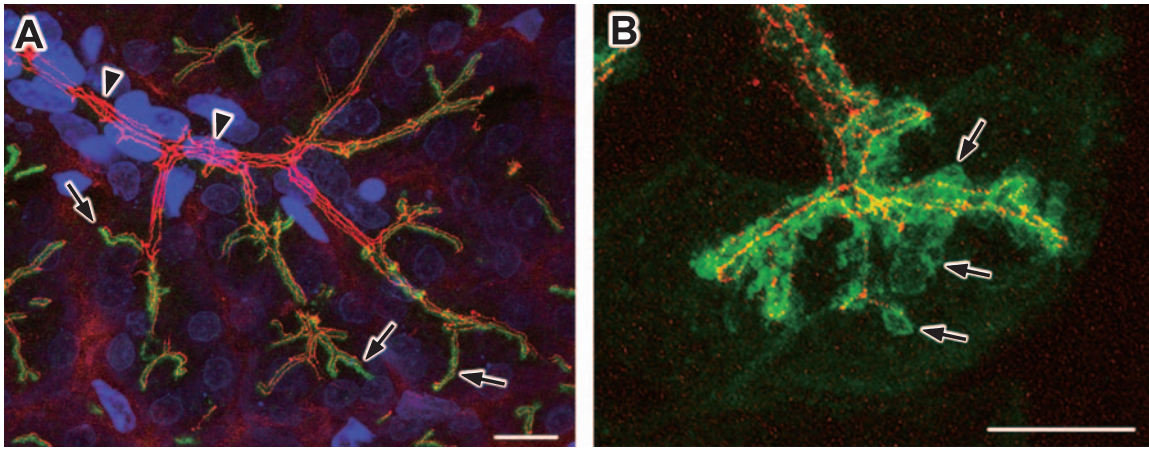


図3 ラット唾液腺におけるAQP5の分布。

AQP5 (緑) とタイトジャンクション構成タンパク質の occludin (赤) を二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡による連続したスライスを重ね合わせた像。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。A: 耳下腺。AQP5は occludin に沿うように頂部細胞膜に分布する(矢印)。矢尻は導管を示す。青は核。B: 舌内の小唾液腺。頂部細胞膜から細胞内に入り込んだようなAQP5の分布が見られる(矢印)。

くと果粒の内腔と腺腔が連続し、拡張した腺腔が細胞内に陥入したような像として電子顕微鏡で観察される<sup>18)</sup>。一方で頂部細胞膜の表面積を保つために、果粒放出と同時にエンドサイトーシスによって膜が細胞内に小胞として回収される。果粒由来の膜構成成分は頂部細胞膜の構成成分と混ざることなく、果粒由来の膜構成成分だけが選択的に回収されるとの報告<sup>19)</sup>もあるが、頂部細胞膜のAQP5は膜の回収と同時に小胞として取り込まれるのか？それとも頂部細胞膜に留まるのか？筆者らはこの点に興味を持った。

唾液腺腺房細胞の頂部細胞膜のAQP5分布を詳細に観察すると、その分布は常に細胞の輪郭を描くようなきれいなラインとして見られるわけではなく、細かく入り組んだ状態や分散したような状態として観察されることもしばしばある。図3Bはラット小唾液腺であるが、AQP5は所々で細胞内に向かって入り込むように分布していて、エンドサイトーシスによるAQP5の細胞内への取り込みを示唆している。そこで筆者らは果粒の放出を促進させることを試みた。ラットおよびマウスで試みたが、詳細な検討はAQP5の発現量が多いマウスを用いた。マウスを一晩絶食にして耳下腺腺房細胞内に果粒を十分に蓄積させてから、イソプロテレノールの投与により果粒の分泌を促進し、AQP5分布の変化を観察した<sup>17)</sup>。ここでイソプロテレノールについて説明を加えておく。唾液の分泌は果粒放出によるタンパク質成分の分泌と、水・電解質成分の分泌がおおよそ別々に調節されている。耳下腺における果粒放出は、ベータアドレナリン受容体を介して交感神経のはたらきで促進されることが知られており、その作動薬であるイソプロテレノールは果粒放出の目的で広く用いられている。イソプロテレノールは水分泌を促進しないので、水チャネルであるAQP5に直接作用を及ぼすことはないと考えられる。まず一晩絶食にしたマウス耳下腺を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、AQP5はほぼ細胞の輪郭に沿うように頂部細胞膜に分布していた(図4A)。イソプロテレノール

を投与して5分後にはAQP5は分散し、一部細胞内に入り込んだような分布として観察され(図4B)、60分後には多数の大きな空胞状の分布として認められた(図4C)。さらに詳細な解析は電子顕微鏡を用いた。アルデヒドによる固定組織では抗原の検出が著しく低下するというAQP5抗体の特性から、凍結切片を抗原賦活化し、プレエンベディング法による免疫電顕を試みた。抗原賦活化による形態の変化を抑えるために、25 mM 塩化カルシウムを含む4%パラホルムアルデヒド固定液で固定し、凍結切片を抗原賦活化ののちにDAB反応を用いた酵素抗体法により免疫染色をおこなった<sup>20)</sup>。一晩絶食にしたマウス耳下腺ではAQP5は頂部細胞膜および基底側壁部細胞膜に分布し、腺腔の拡張は目立たなかった(図4D, E)。イソプロテレノール投与後5分では果粒が細胞膜と融合し、果粒の内腔と腺腔が連続した像が認められ、融合した果粒由来の膜にもAQP5の免疫反応が認められた(図4F)。イソプロテレノール投与後60分が経過すると、拡張した腺腔が細胞内へ大きく陥入したような像が認められ、その膜にもAQP5の免疫反応が認められた(図4G)。しかし細胞内小胞の同定は困難で、エンドサイトーシスによる膜の回収に伴うAQP5の細胞内への取り込みを裏付ける電顕像は得られなかった。つまり果粒放出に伴い、頂部細胞膜のAQP5は融合した果粒由来の膜へと拡散すると考えられるが、エンドサイトーシスに伴うAQP5の小胞への取り込みの有無は明らかにできなかった。DAB反応を用いたプレエンベディング法ではこれ以上の解析は困難なようである。

### 5.3 唾液の水分泌とAQP5

前項では分泌果粒放出時の細胞膜の動態に伴うAQP5分布の変化について述べたが、ここでは唾液腺の水分泌の調節とAQP5について述べたい。

AQP5はアクアポリンファミリーの中では腎臓の集合管に分布するAQP2とホモロジーが高い。AQP2はバソプレッシンに応答しAキナーゼによるリン酸化を受け、細胞内の小

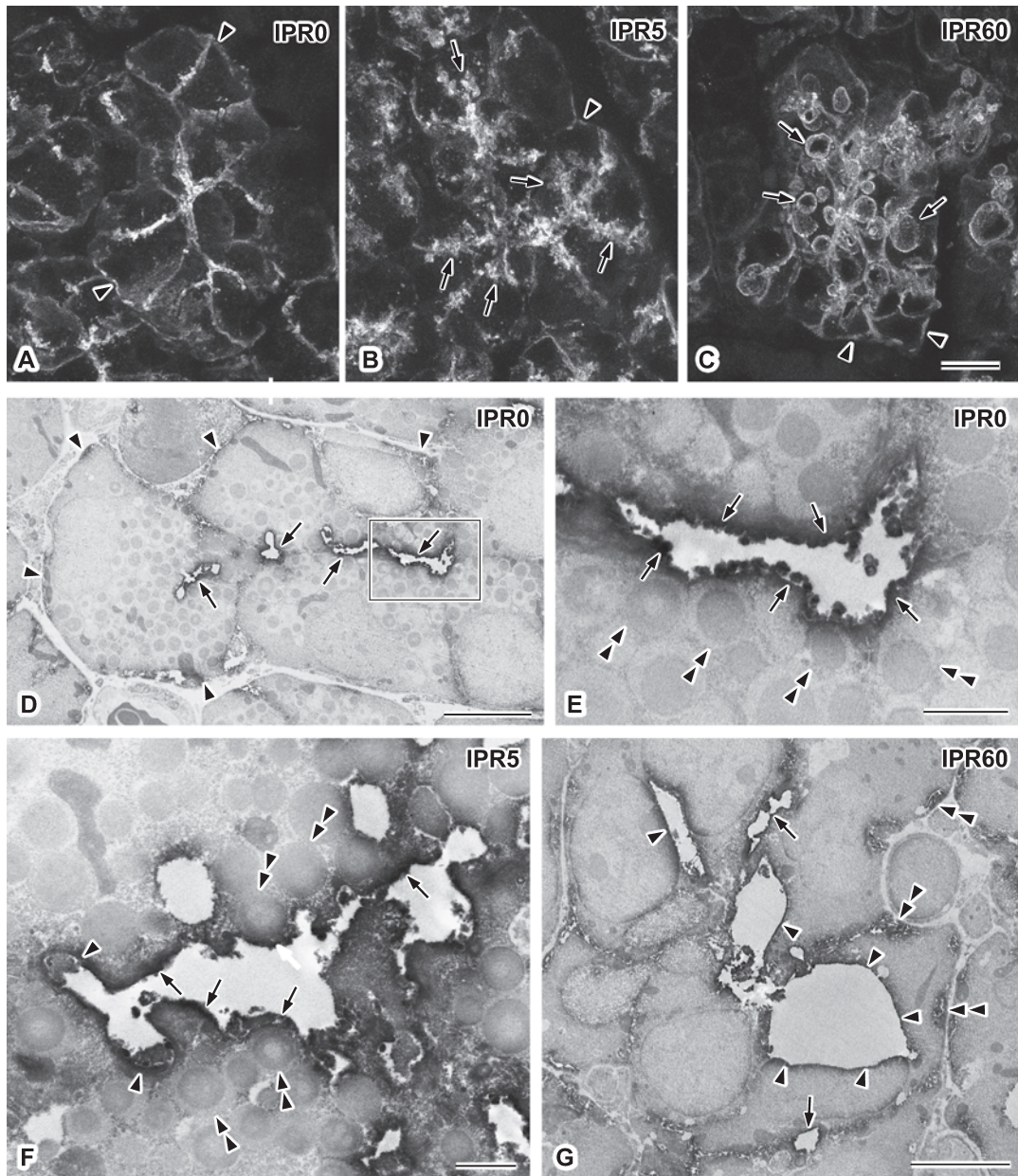


図4 イソプロテレンールで果粒放出を促進したマウス耳下腺における AQP5 の分布の変化。

A-C: 蛍光抗体法で染色し、共焦点レーザー顕微鏡による連続したスライスを重ね合わせた像。イソプロテレンール投与前 (A) に比べ、投与後 5 分では頂部細胞膜の AQP5 が分散して見られ (B, 矢印)、60 分後では細胞内に入り込む空胞状の分布として見られる (C, 矢印)。基底側壁部細胞膜にも AQP5 のシグナルが見られるが、イソプロテレンール投与による変化は見られない (矢尻)。D-G: DAB 反応を用いた酵素抗体法による免疫電顕像。イソプロテレンール投与前 (D, E) には AQP5 は頂部細胞膜 (矢印) と基底側壁部細胞膜 (矢尻) に分布し、細胞内の分泌果粒 (二重矢尻) にはみられない。四角で囲まれた頂部細胞膜の高倍率像を E に示す。イソプロテレンール投与後 5 分 (F) では分泌果粒の放出がみられ、頂部細胞膜 (矢印) とそれに融合した果粒由来の膜 (矢尻) に AQP5 が分布する。細胞内の分泌果粒 (二重矢尻) には見られない。投与後 60 分 (G) では頂部細胞膜 (矢印) と腺腔から細胞内に入り込む空胞状に陥入した部分 (矢尻) に AQP5 が分布する。基底側壁部細胞膜の AQP5 (二重矢尻) に変化は見られない。スケールバーは 5  $\mu$ m (D, G), 1  $\mu$ m (E, F)。文献 17 より転載。

胞膜から頂部細胞膜へと細胞内分布を変化させる水チャンネルである (図 2B-E)。その AQP2 とホモロジーが高く、A キナーゼによるリン酸化ドメインを有する AQP5 についても、唾液の分泌が盛んなときには頂部細胞膜により多く分布し、唾液の分泌が低下した状態では細胞内に分布する可能性が指摘されていた<sup>14)</sup>。Ishikawa らは生化学的手法でラット耳下腺を細

胞内画分と頂部細胞膜画分とに分けて免疫プロットをおこない、水・電解質分泌を促進すると頂部細胞膜画分により多くの AQP5 が検出されることを報告している<sup>21)</sup>。一方で、筆者らのマウス耳下腺における免疫電顕による検討では、絶食にして唾液の分泌を抑制した状態でも AQP5 は頂部細胞膜に分布し、細胞内に分布する様子は認められなかった。Gresz



らはラット顎下腺, 耳下腺でAQP5の免疫電顕をおこない, より詳細な検討をおこなった<sup>22)</sup>. Greszらは水・電解質分泌を促進させるために, ムスカリン受容体作動薬であるピロカルピンやアルファアドレナリン受容体作動薬であるエピネフリンを投与したラットを用いた. さらに水・電解質分泌を抑制させるために, 一晩絶食ラットのほかにムスカリン受容体拮抗薬であるアトロピン, あるいはアルファアドレナリン受容体拮抗薬であるフェントラミンを投与したラットを用いた. その結果, いずれの状態でもAQP5は主として頂部細胞膜に分布し, その分布に変化は生じないことを示した<sup>22)</sup>. つまり免疫組織化学的解析からは, AQP5の細胞内分布の変化による唾液分泌の調節は起こらないと考えられる.

## 6. おわりに

水の移動が盛んな器官の細胞には, いずれかのアクアポリンアイソフォーム, あるいは複数のアイソフォームの発現が見られることが多い. 本稿では水の再吸収をおこなう腎臓と, 唾液の分泌をおこなう唾液腺におけるアクアポリンの分布局在を中心に解説した. 唾液腺では分泌果粒放出による細胞膜の変化に伴うAQP5分布の変化についても解説した.

## 謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費の補助を受けた.

## 文 献

- 1) Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. and Agre, P.: *Science*, **256**, 385-387 (1992)
- 2) Fushimi, K., Uchida, S., Hara, Y., Hirata, Y., Marumo, F. and Sasaki, S.: *Nature*, **361**, 549-552 (1993)
- 3) Rojek, A., Praetorius, J., Frokiaer, J., Nielsen, S. and Fenton, R.A.: *Annu. Rev. Physiol.*, **70**, 301-327 (2008)
- 4) Matsuzaki, T., Tajika, Y., Tserentsoodol, N., Suzuki, T., Aoki, T., Hagiwara, H. and Takata, K.: *Anat. Sci. Int.*, **77**, 85-93 (2002)
- 5) Takata, K., Matsuzaki, T. and Tajika, Y.: *Prog. Histochem. Cytochem.*, **39**, 1-83 (2004)
- 6) 松崎利行: 日本医科大学医学会雑誌, **5**, 118-124 (2009)
- 7) Nielsen, S., Smith, B.L., Christensen, E.I., Knepper, M.A. and Agre P.: *J. Cell Biol.*, **120**, 371-383 (1993)
- 8) Nejsun, L.N., Elkjaer, M.L., Hager, H., Frokiaer, J., Kwon, T.H. and Nielsen, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 164-170 (2000)
- 9) Morishita, Y., Matsuzaki, T., Hara-Chikuma, M., Andoo, A., Shimono, M., Matsuki, A., Kobayashi, K., Ikeda, M., Yamamoto, T., Verkman, A., Kusano, E., Ookawara, S., Takata, K., Sasaki, S. and Ishibashi, K.: *Mol. Cell Biol.*, **25**, 7770-7779 (2005)
- 10) Takata, K., Matsuzaki, T., Tajika, Y., Ablimit, A. and Hasegawa, T.: *Histochem. Cell Biol.*, **130**, 197-209 (2008)
- 11) Ishibashi, K., Sasaki, S., Fushimi, K., Uchida, S., Kuwahara, M., Saito, H., Furukawa, T., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Gojobori, T. and Marumo, F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6269-6273 (1994)
- 12) Terris, J., Ecelbarger, C.A., Marples, D., Knepper, M.A. and Nielsen, S.: *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.*, **269**, F775-F785 (1995)
- 13) Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T.H., Nielsen, S., Guggino, W.B. and Agre, P.: *Nature*, **402**, 184-187 (1999)
- 14) Raina, S., Preston, G.M., Guggino, W.B. and Agre, P.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 1908-1912 (1995)
- 15) Matsuzaki, T., Suzuki, T., Koyama, H., Tanaka, S. and Takata, K.: *Cell Tissue Res.*, **295**, 513-521 (1999)
- 16) Matsuzaki, T., Tajika, Y., Suzuki, T., Aoki, T., Hagiwara, H. and Takata, K.: *Arch. Histol. Cytol.*, **66**, 307-315 (2003)
- 17) Matsuzaki, T., Ablimit, A., Suzuki, T., Aoki, T., Hagiwara, H. and Takata, K.: *J. Electron Microsc.*, **55**, 183-189 (2006)
- 18) Amsterdam, A., Ohad, I. and Schramm, M.: *J. Cell Biol.*, **41**, 753-773 (1969)
- 19) De Camilli, P., Peluchetti, D. and Meldolesi, J.: *J. Cell Biol.*, **70**, 59-74 (1976)
- 20) Yamashita, S. and Okada, Y.: *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 1421-1432 (2005)
- 21) Ishikawa, Y., Skowronski, M.T., Inoue, N. and Ishida, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 94-100 (1999)
- 22) Gresz, V., Kwon, T.H., Gong, H., Agre, P., Steward, M.C., King, L.S., and Nielsen, S.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **287**, G151-G161 (2004)