総説

肺とアクアポリン

福田 典正, 吉原 重美, 有阪 治
(獨協医科大学小児科)

要旨： アクアポリン (水チャンネル) は近年発見された膜蛋白であり, 特異的に水分子を透過させ, 腎臓, 気道, 中枢神経系の上皮, 内皮を介した水の移動に関与しているとされ注目されている。最近の研究の進展は, アクアポリンが種々の臓器で様々な病態生理に関わることを強く示唆している。アクアポリンは肺・気道にも分布することが知られており, 分子生物学的手法の進歩によりアクアポリンのノックアウトマウスを用いた検討が可能となった。我々はアクアポリン 1, 4, 5 のノックアウトマウスを用いて肺の active water transport, passive water transport, acute lung injury でのアクアポリンの関与を検討した。Active water transport, acute lung injury に対するアクアポリンの関与は重要ではないことが明かとなったが, 浸透圧由来の passive water transport ではアクアポリンは水の透過性を規定する重要な因子の一つであることが判明した。今後, アクアポリンと気道, 肺の病態生理との更なる研究の進展が期待される。

Review, Aquaporin in lung and airway

Norimasa Fukuda, Shigemi Yoshihara, Osamu Arisaka
Department of Pediatrics, Dokkyo University School of Medicine

Abstract : The aquaporins (water channels) are novel molecular water transporters that permit water to across the epithelial and endothelial plasma membrane. Several recent studies strongly suggest that important roles of aquaporins in different pathological situations. This review evaluates the manifestations that aquaporin like water channels contributes fluid transport at distal airway and lung. AQP1 expresses in microvascular endothelia, AQP3 and AQP4 expresses at vasolateral side of large and small airways. AQP5 is mainly at alveolar type I cell. Novel developed biophysical and physiological methodologies enable to evaluate active and passive water transport in lung. Transgenic mice lacking aquaporin receptor make it possible to estimate a physiological role of aquaporins in each pathophysiological conditions. Aquaporins make an important contribution in water permeability in lung, despite there is little contribution in active ion and water transport in the distal lung. Further study of aquaporin should provide new insights into normal and pathological mechanisms of airway and lung function.

Key words : Aquaporin, acute lung injury, ion transport, water transport, and alveolar fluid clearance

Abbreviation AQP : aquaporin, AFC : Alveolar Fluid Clearance,

MIP : Major Intrinsic Protein, ERK : Extracellular signal-regulated kinase,

KGF : Keratinocyte Growth Factor, ENaC : Epithelial Sodium Channel

はじめに

アクアポリン(Aquaporin: AQP)は water channel とも呼ばれ, major intrinsic protein (MIP) family に属する細胞膜蛋白である。1992年に AQP1 が赤血球表面より単離同定されて以来¹⁾現在までに9つのアクアポリンファミリーが同定されており¹⁻¹⁰⁾, 選択的に水を通過させる機能を持つことが報告されている。臨床的にも腎性尿崩症への AQP2 の関与¹¹⁾¹²⁾¹³⁾や浸透圧変化由来の実験的急性脳症への AQP4 の関与¹⁴⁾など, 現在 functional geomics の領域で興味深い話題を提供し続けている分野である。一方, 肺, 気道では AQP1 の発現確認以来¹⁵⁾, 現在までに AQP1¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾, AQP3¹⁸⁾¹⁹⁾, AQP4¹⁸⁾¹⁹⁾, AQP5²⁰⁾²¹⁾, AQP8⁸⁾⁹⁾, AQP9¹⁰⁾の局在が報告されている。

肺ではアクアポリンは気道, 肺胞上皮, 間質の血管内皮に発現し¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾, 肺胞からの水の吸収, 肺循環, リンパ系への水の移動に関与する可能性がある。近年, アクアポリンは周産期の肺での発現量の変動²²⁾²³⁾²⁴⁾やウイルス感染時の肺での発現量の変化²⁵⁾が報告され, 更にグルココルチコイド投与時の気道上皮での AQP3 の発現誘導²⁶⁾²⁷⁾や ERK を介した signal transduction²⁸⁾など肺の病態生理との関わりが徐々に明らか

になりつつある。

2. アクアポリンとは

アクアポリンは MIP family に属する膜蛋白質であり¹⁾²⁷⁾, 6 回膜貫通構造をなし, 分子量は 30kDa 前後である。(図 1) アクアポリンは最初に赤血球膜より単離同定され¹⁾, CHIP28 (channel-like-membrane-Intrinsic-protein 28) と命名されたが, その後類似の構造を持つ蛋白が次々に同定され, 現在はアクアポリンファミリーとして一括して分類されている²⁹⁾³⁰⁾。アクアポリンは血管内皮, 毛様体, 腎, 肺, 気管, 気管支, 皮膚, レンズなどに幅広く分布していることが確認されている²⁹⁾(表 1)。AQP3 は水のみならずグリセリン, 尿素なども透過させる性質があることが明らかになり³⁾, 他のアクアポリンと異なりグリセリン輸送体から分化した可能性も示唆されている。また AQP4 は水銀への感受性を有さず⁴⁾, AQP9 は尿素は透過させるもののグリセリンは透過させない¹⁰⁾といったアクアポリンファミリー内での多様性も徐々に明らかになりつつある。近年 AQP1 の三次元構造が判明し³¹⁾³²⁾, 現在は 6 本の右巻き alpha-helix 構造の内側を水が通過するものと考えられている(図 1)。

表 1 アクアポリンの分布と機能(文献29)より一部改変)

	Location	Function	Effect of mutation
MIP (AQPO)	Lens of the eye	Strutural?	Cataract
AQP1 (CHIP28)	Erythrocytes, capillaries, renal proximal tubule and descending thin limb various epithelia including choroid plexus, alveolar type II cell.	Constitutively expressed water channel, facilitating "isotonic" fluid movement	None in man? Knockout mice unable to concentrate their urine
AQP2 (WCH-CD)	Renal collecting duct (apical plasma membrane and vesicles of principal cells)	Vasopressin-regulated water channel	Profound nephrogenic diabetes insipidus
AQP3 (GLIP)	Renal collecting duct (basolateral plasma membrane). Basolateral membrane in various epithelial cells.	Water channel (also glycerol permeable)	Moderate polyuria, but near-normal urinary concentrating capacity
AQP4 (MIWC)	Glial cells, especially around capillaries. Renal collecting duct (basolateral plasma membrane). Basolateral membrane in various epithelial cells.	Water channel	Decreased susceptibility to cerebral oedema in mice
AQP5	Apical plasma membrane of glandular cells, alveolar type I cell.	Water channel, facilitating production of isotonic secretions	Saliva scanty and viscous in mouse model
AQP6	Intracellular vesicles in the intercalated cells of the renal collecting duct.	Chloride channel, involved in the acidification process?	?
AQP7	Testes (late spermatids), renal proximal tubule.	Water channel (also glycerol permeable)	?
AQP8	Pancreas, colon and lung.	Water channel	?
AQP9	Liver, lung	Channel for water and small uncharged molecules?	?

図1 アクアポリンの構造

(Agre P, et al J Biol Chem, 273, 14660, 1998より引用)

3. 肺でのアクアポリンの分布

肺, 呼吸器におけるアクアポリンの分布は気道と肺胞において異なっている^{20) 33) 34)}。肺胞

では肺胞上皮Ⅱ型細胞にAQP1が^{15) 16) 17) 27)}, 肺胞上皮Ⅰ型細胞にはAQP5が発現している^{21) 35) 36)}。また, 肺間質の血管内皮細胞にはAQP1が分布している^{15) 16) 34) 37)}。一方, 気管にはAQP3と少量のAQP4が, 気管支にはAQP4が, いずれも basolateral side に分布している^{18) 19) 27) 36) 37)} (図2)。AQP8, AQP9は肺での少量の発現は確認されている^{8) 10)}が, 厳密な発現部位や機能は現時点では不明である。

4. アクアポリンと肺の active ion/water transport

生体における水分の移動には, active ion transport に伴った様々なイオンの能動輸送とそれに引き続く組織間の浸透圧差の発生, それに付随して生じる二次的な水の受動的な移動が主要なメカニズムと考えられてきた^{34) 38) 39)}。水は transcellular pathway, paracellular pathway の一方または双方を経由して細胞間を移動すると考えられている^{40) 41)} (図4)。アクアポリンは, 肺では肺胞上皮, 肺間質の血管内皮に発現している^{34) 37)} (図2)。このことはアクアポリンが肺胞上皮を介した水の移動に直接的に関与するのみならず, 肺間質からの血管, リンパ組織への水の流入にも水の透過性を介して関与, 律速することによって肺間質からの二次的な水の移動にも影響を与えている可能性を示唆する。こ

図2 アクアポリンの肺, 気道での分布 (文献37) より一部改変)

図3 肺における水、イオントランスポート (文献38) より一部改変)

の肺間質への水貯留は間質の組織圧を亢進させる^{42) 43) 44)} ことにより肺の active ion/water transport である alveolar fluid clearance (AFC) に対して抑制的に作用する可能性も示唆されている⁴⁵⁾。一方、気管には AQP3、気管支には AQP4 が主に発現しており^{18) 19) 37)} (図2), distal airway の active ion/water transport への関与もまた興味深い問題である。

肺における active ion/water transport の研究は、1982年に初めてその存在が報告されて以来^{54) 55) 56)}, epithelial sodium Channel (ENaC)^{46) 47) 48)}, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase の発見^{49) 50)}, CFTR の同定^{51) 52) 53) 54)} など分子生物学的知見の蓄積やその生理的な制御機序の研究の進展を通してこの20年間目覚ましく解析が進んだ領域である³⁸⁾。In vivoでの active ion/water transport の評価法である alveolar fluid clearance (alveolar liquid clearance) は Matthay, Staub らのグループによって確立され^{54) 55)}, 主に動物モデルにおいて検討が進められて来た^{45) 57) 58) 59)}。ヒトにおいても同グループの Sakuma らがヒト摘出肺を用いて同様のメカニズムの存在を証明している^{60) 61)}。AFC の概念図を図3に、アクアポリンの関与の概念図を図2, 図4に示す³⁸⁾。この AFC は下記の式で求められる^{56) 57) 58)}。

図4 組織における水の transcellular, paracellular pathway (文献40) より一部改変)

$$\text{AFC} = (\text{Vix Fwi} - \text{Vfx Fwf}) / (\text{Vix Fwi}) \times 100$$

Vi , Vf : volume of initial and final alveolar fluid, Fwi , Fwf : water fraction of the volume of initial and final alveolar fluid

$$\text{Vf} = (\text{Vix Tpix Fr}) / \text{TPf}$$

Tpi , TPf : total protein concentration of initial and final alveolar fluid,

Fr : fraction of alveolar tracer protein concentration

$$\text{Excess lung water (E)} = \{ \text{We} / (\text{De} - \text{P}) - (\text{Wc} / \text{Dc}) \} \times (\text{De} - \text{P})$$

W, D: wet and dry weight of experimental (e) and control (c) lungs, P: weight of protein instilled into the lungs multiplied by the fraction of tracer radioisotope left in the lung

著者らは、従来困難とされてきたマウス肺での AFC の測定法を開発し報告した^{45) 59)}。また、共同研究者である UCSF の Verkman らはアクアポリンのノックアウトマウスの作成に成功し報告している^{62) 63) 64) 65)}。今回は AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP1/5 の各ノックアウトマウスを用いて AFC, extravascular lung water の検討を行なった。

その結果、active ion/water transport はマウス肺にも存在し、active ion transport は温度依存性で amiloride sensitive epithelial sodium channel, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase に依存する系であることが明らかとなった (図 5, 図 6)^{45) 62) 66)}。しかしながら AQP1, AQP4, AQP5 いずれのノックアウトマウスも AFC で測定される active ion/water transport を抑制せず^{62) 66) 67)}, lung

図 5 肺における active ion/water transport とアクアポリンの関与(1) (文献67) より引用)

図 6 肺における active ion/water transport とアクアポリンノックアウトの効果(2)
(文献34) より引用)

edema formation も差がなかった^{66) 67)} (図 5)。この傾向は KGF と beta-2 agonist の投与により AFC を最大化しても変わらなかった⁶²⁾ (図 6)。

以上の結果は in vivo マウス肺の active ion/water transport における肺胞上皮、血管内皮細胞上のアクアポリンの関与は重要な因子ではないことが示唆されたことになる。ただ、興味深いことに 3 時間 AFC を追跡した検討では、AQP1 ノックアウトマウスは wild type に比べて AFC が約 20% 抑制されていた (図 7, 未発表データ。) これは AQP1/4 ダブルノックアウトマウスも同様の傾向があった。この結果は、肺胞上皮細胞上に発現している AQP1 も水分子の通過しやすい “pore” を提供することにより active ion/water transport に部分的かつ間接的に関与している可能性があることを示唆するものと考えられる。

図 7 肺における active ion/water transport とアクアポリンノックアウトの効果(3)

5. アクアポリンと肺の passive water transport

肺における in vivo の passive water transport の測定には fluorescent dye を用いた方法と組織重量の変化を用いた gravimetric method が近年報告されている^{62) 66) 67) 68)}。今回我々はマウス単離肺還流モデルを作成し (図8), 還流液の浸透圧を500mOsm から300mOsm へ急速に変化させたときの osmotic change を driving force と

する passive water transport を AQP1, AQP4, AQP5 ノックアウトマウス, AQP1/5 ダブルノックアウトマウス, 及び wild type を用いて検討した。

AQP1, AQP5 ノックアウトマウスでは, 肺の osmolality dependent passive water transport は wild type に比べて90%以上抑制された^{62) 66) 67) 68)} (図9)。一方, AQP4 単独のノックアウトマウスは passive water transport に殆ど影響を与えず^{62) 67) 68)}, 気管支の basolateral side に存在す

図8 肺の passive water transport の評価法 (文献34) 67) 68) より一部改変)

図9 肺の passive water transport におけるアクアポリンの関与 (文献34) より引用)

る AQP4 を介した水の流入の影響は少ないものと考えられた。AQP1/AQP5 ダブルノックアウトマウスは各単独のノックアウトマウスに比べ、更に 50% 以上 passive water transport を抑制した^{62) 67)} (図 9)。このことは肺間質の血管内皮と肺胞上皮細胞の双方の水透過性に対してアクアポリンが律速因子として重要な働きをしていることが強く示唆された。また、この肺の osmolality dependent passive water transport の実験条件下では水は paracellular pathway よりも transcellular pathway を介して移動することが強く示唆された。

6. 周産期の肺におけるアクアポリンの変化

従来の小児科医にとっての周産期の肺に対する興味は Respiratory distress syndrome や Chronic lung disease に代表される疾患により多く向けられていた観がある。周産期の肺胞上皮細胞の機能解析も主にサーファクタントに焦点が当てられてきた^{70) 71) 72)}。近年の分子生物学の進歩により、周産期の肺はサーファクタントのみならず水や ion transport に関しても興味深い変化を生じていることを示唆する知見が得られてきた^{72) 73) 74) 75) 76)}。すでに周産期において ENaC の存在は生存のために必須であることが知られ^{76) 77)}、また周産期には ENaC の発現量が増加することが報告されており^{78) 79) 80)}、周産期の active ion/water transport の変化が強く示唆されていた^{75) 81)}。Umenishi らはラット周産期肺において AQP1, AQP4, AQP5 の mRNA の発現増強が見られること、この時期に一致して osmolality dependent passive water permeability が増加することを報告した²²⁾。更に近年、AQP と ion transport の関連を検討した報告もあり^{24) 82)} 注目される。

我々は出生直後の肺の wet/dry ratio を各アクアポリンノックアウトマウスごとに測定した。出産直後のマウス肺は極めて小さいため extravascular lung water ではなく wet/dry ratio で比較を行なった⁶⁸⁾。出生後一時間でマウス肺の wet/dry ratio は最初の 12 時間に減少する wet/dry ratio のおよそ 90% が減少する。我々は出生後 45 分の時点の wet/dry ratio を比較したがいずれの AQP ノックアウトマウスも wild type

と比較して有意差は認めなかった⁶⁸⁾ (図 10)。alpha subunit のノックアウトが致死的な変化を生じる ENaC と異なり⁷⁷⁾、現在までに得られている AQP ノックアウトマウスは他の疾患との関連こそあれ、いずれも周産期においては致死的不是な^{62) 63) 64) 65)}。以上の結果はアクアポリンは、周産期の肺胞の water clearance に対して、water permeability を亢進させて肺胞の乾燥とガス交換を維持するために合目的的に誘導されている channel transporter の一つであること、しかしながら life threatening factor ではなく、水の clearance の主幹をなす active ion/water transport を water permeability を介して support する因子の一つであることを示唆しているものと考えられる。

一方、Yasui らはラットにおいてアクアポリンの遺伝子発現に関与しうる因子として beta-adrenergic agent と endogenous glucocorticoid を挙げている²⁴⁾。現在までにアクアポリン遺伝子の upregulation に関与する可能性のある因子として、浸透圧の変化、glucocorticoid^{26) 83)}、secretin^{84) 85)} が、down regulation に関与しう

図10 出生後の肺乾湿重量比の変化とアクアポリンノックアウトの効果 (文献67) より引用)

る因子として growth factor の一つである keratinocyte growth factor (KGF)⁸⁶⁾ などが報告されている。これらの知見は、肺におけるアクアポリンが決して static なものではなく、様々な内因性、外因性因子によって dynamic に変化する receptor/transporter の一つであることを強く示唆しているものと考えられる。

7. Acute lung Injury とアクアポリン

Acute lung injury (ALI) は肺の炎症と血管透過性亢進を主体とする広範囲な疾患として近年提唱されている。実験的な acute lung injury は様々なモデルが報告されており、現在までに oleic acid⁸⁷⁾, acid^{88) 89)}, hyperoxia^{90) 91) 92)}, bacteria infection^{93) 94)}, endotoxin^{95) 96)}, bleomycin⁹⁶⁾, TNF-alpha^{97) 98)} などが多数が報告されてきている (表 2)。

著者らは、hyperoxia, acid aspiration による acute lung injury モデルを作成し、各アクアポリンノックアウトの効果を検討した⁶⁸⁾。PH1.2 の HCl 4 ml/kg の注入は 2 時間後 lung water の有意の増大を示したが、その程度は AQP1, AQP4, AQP5 の各ノックアウトマウス間で有意差を認めなかった (図11)。また95%酸素に暴露した際の lung edema formation, survival

time を比較検討したが、各 AQP ノックアウトマウス間で差を認めなかった (図12)。今回の著者らの検討は生理学的方法に限定されており⁶⁸⁾, mRNA, protein expression level での検討はまだ報告できる段階にない。最近 UCSF の Koyama, Verkman らのグループは microarray を用いた gene expression の解析方法を channel transporter に応用開発し報告している⁹⁹⁾。また、acute lung injury の分野では、最近 adenoviral infection により AQP1 が一過性に、また AQP5 は 2 週間以上持続的に発現が低下するとの報告が最近なされており²⁵⁾, これは呼吸器の病態生理とアクアポリンの関連を検討し

図11 acid-induced acute lung injury に対するアクアポリンノックアウトの効果

(文献67) より引用)

表 2 Acute lung injury の種類と肺 active ion/water transport に対する影響

(Carter, EP. et al Current Pulmonol Crit Care Med, 17, 365, 1996より一部改変)

Pathological condition	Species	Severity of lung injury		Alveolar epithelial fluid clearance
		Endothelium	Epithelium	
Saltwater aspiration	Rabbit	Mild	Mild	Normal
Hyperoxia	Hamster/rat	Moderate	Moderate	?
Endotoxin, intravenous	Sheep	Mild	None	Normal
Endotoxin, alveolar	Sheep	None	None	Normal
	Rat	None	None	Increased
Exotoxin, alveolar	Rat	None	None	Increased
Bacteria, intravenous	Sheep	Moderate/severe	Mild/severe	Increased/severe
	Rat	Mild	None	Increased
	Rabbit	Mild	None	Normal
bacteria, alveolar	Sheep	Mild	Mild	Normal
	Rat	Mild	Moderate/severe	Normal/decreased
	Rabbit	Mild	Moderate/severe	Normal/decreased
TNF- α , alveolar	Rat	None	None	Increased
TNF- α , alveolar	Mouse	None	None	Increased
Oleic acid, intravenous	Sheep	Moderate	Moderate	Normal
Acid aspiration	Rabbit	Severe	Severe	Decreased
No pulmonary blood flow	Sheep	None	None	Normal
No ventilation	Sheep	None	None	Normal
	Human	?	?	Normal
Severe cooling followed by rewarming (transplant)	Human	None	None	Normal (after rewarming)

図12 Hyperoxia-induced acute lung injury に対するアクアポリンノックアウトの効果 (文献67) より引用)

た最初の報告であり注目される。今後の acute lung injury とアクアポリンに関する更なる知見の蓄積が待たれる。

8. まとめ

1992年に発見されたアクアポリンは現在哺乳類でも0から9まで報告され、その機能が徐々に明らかにされつつある。現在までに疾患との関連では diabetes insipidus と AQP2 が有名である^{11) 12) 13)}が、AQP3 と diabetes insipidus⁶³⁾の関連も最近報告され注目されている。更には AQP5 と唾液腺分泌¹⁰⁰⁾、アクアポリンと涙腺分泌¹⁰¹⁾などアクアポリンの生理機能が検討される分野が急速に広がりつつある。また、AQP4 のノックアウトが acute water intoxication による brain edema formation を高度に抑制することが最近報告され¹⁴⁾アクアポリンの臨床応用の可能性を示唆したものとしても注目される。アクアポリンは発見されてからまだ10年が経過しておらず¹⁾、もっとも新しい AQP9 receptor は1998

年に報告されており¹⁰⁾、依然未知の領域と言っても過言ではない。従来この分野の研究をリードしてきたのは腎臓領域の研究者達であり、肺、気道に関するアクアポリンと病態との関連の研究は緒についたばかりである。これからの研究の進展が真に待たれている領域であることは論を待たないであろう。

9. 謝辞

稿を終えるに当たり、University of California San Francisco でご指導いただきました Professor Michael A. Matthay, A. S. Verkman に深謝いたします。また、Cardiovascular Research Institute fellow であった Yuanlin Song (宋元林), Pascal Barbry, Thomas Geiser に感謝いたします。最後に、常に最善の後方支援を惜しまなかった妻福田由紀美に心よりの感謝を捧げる。

References

- 1) Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11110-4, 1991.
- 2) Fushimi K, Uchida S, Hara Y, et al. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361: 549-52, 1993.
- 3) Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, et al. 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 [see comments]. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6269-73, 1994.
- 4) Hasegawa H, Ma T, Skach W, et al. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *Journal of Biol Chem* 269: 5497-500, 1994.
- 5) Raina S, Preston GM, Guggino WB, et al. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 270: 1908-12, 1995.
- 6) Ma T, Frigeri A, Skach W, et al. Cloning of a novel rat kidney cDNA homologous to CHIP28 and WCH-CD water channels. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 654-9, 1993.

- 7) Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, et al. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem* 272: 20782-6, 1997.
- 8) Ishibashi K, Kuwahara M, Kageyama Y, et al. Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 714-8, 1997.
- 9) Koyama N, Ishibashi K, Kuwahara M, et al. Cloning and functional expression of human aquaporin8 cDNA and analysis of its gene. *Genomics* 54: 169-72, 1998.
- 10) Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, et al. 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: 268-74, 1998.
- 11) Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, et al. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264: 92-5, 1994.
- 12) Deen PM, Croes H, van Aubel RA, et al. Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest* 95: 2291-6, 1995.
- 13) Deen PM, van Aubel RA, van Lieburg AF, et al. Urinary content of aquaporin 1 and 2 in nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 7: 836-41, 1996.
- 14) 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* 6: 159-63, 2000.
- 15) Hasegawa H, Zhang R, Dohrman A, et al. Tissue-specific expression of mRNA encoding rat kidney water channel CHIP28k by in situ hybridization. *Am J Physiol* 264: C237-45, 1993.
- 16) Hasegawa H, Lian SC, Finkbeiner WE, et al. Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by in situ hybridization and antibody staining. *Am J Physiol* 266: C893-903, 1994.
- 17) King LS, Nielsen S, Agre P. Aquaporins in complex tissues. I. Developmental patterns in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* 273: C1541-8, 1997.
- 18) Frigeri A, Gropper MA, Turck CW, et al. Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4328-31, 1995.
- 19) Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, et al. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci* 108: 2993-3002, 1995.
- 20) Lee MD, King LS, Agre P. The aquaporin family of water channel proteins in clinical medicine. *Medicine (Baltimore)* 76: 141-56, 1997.
- 21) Funaki H, Yamamoto T, Koyama Y, et al. Localization and expression of AQP5 in cornea, serous salivary glands, and pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol* 275: C1151-7, 1998.
- 22) Carter EP, Umenishi F, Matthay MA, et al. Developmental changes in water permeability across the alveolar barrier in perinatal rabbit lung. *Journal of Clin Invest* 100: 1071-8, 1997.
- 23) Umenishi F, Carter EP, Yang B, et al. Sharp increase in rat lung water channel expression in the perinatal period. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 673-9, 1996.
- 24) Yasui M, Serlachius E, Lofgren M, et al. Perinatal changes in expression of aquaporin-4 and other water and ion transporters in rat lung. *J Physiol (Lond)* 505: 3-11, 1997.
- 25) Towne JE, Harrod KS, Krane CM, et al. Decreased expression of aquaporin (AQP) 1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 34-44, 2000.
- 26) King LS, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, steroid-induced expression, and distribution in rat. *J Clin Invest* 97: 2183-91, 1996.
- 27) King LS, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Ann Rev Physiol* 58: 619-48, 1996.
- 28) Hoffert JD, Leitch V, Agre P, et al. Hypertonic induction of aquaporin-5 expression through an ERK-dependent pathway. *J Biol Chem* 275: 9070-7, 2000.
- 29) Marples D. Water channels: who needs them anyway? *Lancet* 355: 1571-2, 2000.
- 30) Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F13-28, 2000.
- 31) Cheng A, van Hoek AN, Yeager M, et al. Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature* 387: 627-30, 1997.
- 32) Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, et al. The

- three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* 387: 624-7, 1997.
- 33) Verkman AS, Yang B, Song Y, et al. Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice. *Exp Physiol* 85 Spec No: 233S-41S, 2000.
- 34) Verkman AS, Matthay MA, Song Y. Aquaporin water channels and lung physiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L867-79, 2000.
- 35) Lee MD, King LS, Nielsen S, et al. Genomic organization and developmental expression of aquaporin-5 in lung. *Chest* 111: 111S-3S, 1997.
- 36) Nielsen S, King LS, Christensen BM, et al. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* 273: C1549-61, 1997.
- 37) Effros RM, Jacobs ER, Schapira RM, et al. Response of the lungs to aspiration. *Am J Med* 108: 15S-9S, 2000.
- 38) Matthay MA, Flori HR, Conner ER, et al. Alveolar epithelial fluid transport: basic mechanisms and clinical relevance. *Proceedings of the Association of American Physicians* 110: 496-505, 1998.
- 39) Matthay MA, Folkesson HG, Verkman AS. Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *Am J Physiol* 270: L487-503, 1996.
- 40) Verkman AS. Lessons on renal physiology from transgenic mice lacking aquaporin water channels. *J Am Soc Nephrol* 10: 1126-35, 1999.
- 41) Verkman AS. Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 517-22, 2000.
- 42) Bhattacharya J, Gropper MA, Staub NC. Interstitial fluid pressure gradient measured by micropuncture in excised dog lung. *J Appl. Physiol.* 56: 271-7, 1984.
- 43) Bhattacharya J, Nanjo S, Staub NC. Micropuncture measurement of lung microvascular pressure during 5-HT infusion. *J Appl. Physiol.* 52: 634-7, 1982.
- 44) Shepard JM, Gropper MA, Nicolaysen G, et al. Lung microvascular pressure profile measured by micropuncture in anesthetized dogs. *J Appl. Physiol.* 64: 874-9, 1988.
- 45) Fukuda N, Folkesson HG, Matthay MA. Relationship of interstitial fluid volume to alveolar fluid clearance in mice: ventilated vs. in situ studies. *J Appl Physiol* 89: 672-9, 2000.
- 46) Matalon S, Bridges RJ, Benos DJ. Amiloride-inhibitable Na^+ conductive pathways in alveolar type II pneumocytes. *Am J Physiol* 260: L90-6, 1991.
- 47) Matalon S, Kirk KL, Bubien JK, et al. Immunocytochemical and functional characterization of Na^+ conductance in adult alveolar pneumocytes. *Am J Physiol* 262: C1228-38, 1992.
- 48) Matalon S, Bauer ML, Benos DJ, et al. Fetal lung epithelial cells contain two populations of amiloride-sensitive Na^+ channels. *Am J Physiol* 264: L357-64, 1993.
- 49) Schneeberger EE, McCarthy KM. Cytochemical localization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in rat type II pneumocytes. *J Appl Physiol* 60: 1584-9, 1986.
- 50) Chapman DL, Widdicombe JH, Bland RD. Developmental differences in rabbit lung epithelial cell $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. *Am J Physiol* 259: L481-7, 1990.
- 51) Rommens JM, Zengerling S, Burns J, et al. Identification and regional localization of DNA markers on chromosome 7 for the cloning of the cystic fibrosis gene. *Am J Hum Genet* 43: 645-63, 1988.
- 52) Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-65, 1989.
- 53) Tsui LC, Rommens JM, Burns J, et al. Progress towards cloning the cystic fibrosis gene. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 319: 263-73, 1988.
- 54) Matthay MA, Landolt CC, Staub NC. Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 53: 96-104, 1982.
- 55) Berthiaume Y, Staub NC, Matthay MA. Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 79: 335-43, 1987.
- 56) Matthay M. A., Berthiaume, Y., Staub, N. C.: Long-term clearance of liquid and protein from the lung of anesthetized sheep. *Journal of Applied Physiology* 59: 928-934, 1985.
- 57) Jayr C, Garat C, Meignan M et al. Alveolar liquid and protein clearance in anesthetized ventilated rats. *J Appl Physiol* 76: 2636-42, 1994.
- 58) Norlin A, Finley N, Abedinpour P, et al. Alveolar liquid clearance in the anesthetized ventilated guinea pig. *Am J Physiol* 274: L235-43, 1988.

- 59) Garat C, Carter EP, Matthay MA. New in situ mouse model to quantify alveolar epithelial fluid clearance. *J Appl Physiol* 84: 1763-7, 1998.
- 60) Sakuma, T., Okaniwa, G., Nakada, T., et al: Alveolar fluid clearance in the resected human lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150: 305-10, 1994.
- 61) Sakuma T, Folkesson HG, Suzuki S, et al. Beta-adrenergic agonist stimulated alveolar fluid clearance in ex vivo human and rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 506-12, 1997.
- 62) Ma T, Fukuda N, Song Y, et al. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice [see comments]. *J Clin Invest* 105: 93-100, 2000.
- 63) Ma T, Song Y, Yang B, et al. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4386-91, 2000.
- 64) Ma T, Yang B, Gillespie A, et al. Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *J Clin Invest* 100: 957-62, 1997.
- 65) Ma T, Yang B, Gillespie A, et al. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem* 273: 4296-9, 1998.
- 66) Bai C, Fukuda N, Song Y, et al. Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice. *J Clin Invest* 103: 555-61, 1999.
- 67) Song Y, Fukuda N, Bai C, et al. Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. *J Physiol* 525: 771-9, 2000.
- 68) Song Y, Ma T, Matthay MA, et al. Role of aquaporin-4 in airspace-to-capillary water permeability in intact mouse lung measured by a novel gravimetric method. *J Gen Physiol* 115: 17-27, 2000.
- 69) Kuroki Y, Voelker DR. Pulmonary surfactant proteins. *J Biol Chem* 269: 25943-6, 1994.
- 70) Kuroki Y, Shiratori M, Ogasawara Y, et al. Characterization of pulmonary surfactant protein D: its copurification with lipids. *Biochim Biophys Acta* 1086: 185-90, 1991.
- 71) Kuroki Y, Sano H. Functional roles and structural analysis of lung collectins SP-A and SP-D. *Biol Neonate* 76: 19-21, 1999.
- 72) Matalon, S., O'Brodovich, H.: Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Ann Rev Physiol*: 61, 627-61, 1999.
- 73) Finley N, Norlin A, Baines DL, et al. Alveolar epithelial fluid clearance is mediated by endogenous catecholamines at birth in guinea pigs. *J Clin Invest* 101: 972-8, 1998.
- 74) Walters DV. Dewatering of the lungs [letter]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 81: F78-9, 1999.
- 75) Barker PM, Nguyen MS, Gatzky JT, et al. Role of gammaENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism. *J Clin Invest* 102: 1634-40, 1998.
- 76) Bland RD, Nielson DW. Developmental changes in lung epithelial ion transport and liquid movement. *Ann Rev Physiol* 54: 373-94, 1992.
- 77) Hummler E, Barker P, Gatzky J, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 12: 325-8, 1996.
- 78) Talbot CL, Bosworth DG, Briley EL, et al. Quantitation and localization of ENaC subunit expression in fetal, newborn, and adult mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 398-406, 1999.
- 79) O'Brodovich H, Canessa C, Ueda J. Expression of the epithelial Na⁺ channel in the developing rat lung. *Am J Physiol* 265: C491-6, 1993.
- 80) O'Brodovich HM. Immature epithelial Na⁺ channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome. *Proc Assoc Am Physicians* 108: 345-55, 1996.
- 81) Marunaka Y, Niisato N, O'Brodovich H, et al. Regulation of an amiloride-sensitive Na⁺ - permeable channel by a beta2-adrenergic agonist, cytosolic Ca²⁺ and Cl⁻ in fetal rat alveolar epithelium. *J Physiol (Lond)* 515: 669-83, 1999.
- 82) Ruddy MK, Drazen JM, Pitkanen OM, et al: Modulation of aquaporin 4 and the amiloride-inhibitable sodium channel in perinatal rat lung epithelial cells. *Am J Physiol* 274: L1066-72, 1998.
- 83) Tanaka M, Inase N, Fushimi K, et al. Induction of aquaporin 3 by corticosteroid in a human airway epithelial cell line. *Am J Physiol* 273: L1090-5, 1997.
- 84) Marinelli RA, Pham L, Agre P, et al. Secretin promotes osmotic water transport in rat

- cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. Evidence for a secretin-induced vesicular translocation of aquaporin-1. *J Biol Chem* 272: 12984-8, 1997.
- 85) Marinelli RA, Tietz PS, Pham LD, et al. Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 276: G280-6, 1999.
 - 86) Borok Z, Lubman RL, Danto SI, et al. Keratinocyte growth factor modulates alveolar epithelial cell phenotype in vitro: expression of aquaporin 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 554-61, 1998.
 - 87) Wiener-Kronish JP, Broaddus VC, et al. Relationship of pleural effusions to increased permeability pulmonary edema in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 82: 1422-9, 1988.
 - 88) Folkesson HG, Matthay MA, Hébert CA, et al. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 96: 107-16, 1995.
 - 89) Folkesson HG, Nitenberg G, Oliver BL, et al. Upregulation of alveolar epithelial fluid transport after subacute lung injury in rats from bleomycin. *Am J Physiol* 275: L478-90, 1998.
 - 90) Wangenstein D, Piper R, Johnson JA, et al. Solute conductance of blood-gas barrier in hamsters exposed to hyperoxia. *J Appl Physiol* 60: 1908-16, 1986.
 - 91) Nici L, Dowin R, Gilmore-Hebert M, et al. Response of rat type II pneumocyte Na, K-ATPase to hyperoxic injury. *Chest* 99: 31S-3S, 1991.
 - 92) Yue G, Matalon S. Mechanisms and sequelae of increased alveolar fluid clearance in hyperoxic rats. *Am J Physiol* 272: L407-12, 1997.
 - 93) Pittet JF, Wiener-Kronish JP, McElroy MC, et al. Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *J Clin Invest* 94: 663-71, 1994.
 - 94) Pittet JF, Wiener-Kronish JP, Serikov V, et al. Resistance of the alveolar epithelium to injury from septic shock in sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1093-100, 1995.
 - 95) Garat C, Rezaiguia S, Meignan M, et al. Alveolar endotoxin increases alveolar liquid clearance in rats. *J Appl Physiol* 79: 2021-8, 1995.
 - 96) Nici L, Santos-Moore A, Kuhn C, et al. Modulation of bleomycin-induced pulmonary toxicity in the hamster by the antioxidant amifostine. *Cancer* 83: 2008-14, 1998.
 - 97) Borjesson A, Norlin A, Wang X, et al. TNF-alpha stimulates alveolar liquid clearance during intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L3-12, 2000.
 - 98) Fukuda N, Jayr C, Lazrak A, et al. TNF-alpha stimulated alveolar epithelial fluid transport requires amiloride sensitive sodium uptake. *Am J Physiol* in press.
 - 99) Koyama, N., Barbry, P., Verkman A. S.: Microarray analysis of perinatal lung membrane transporter expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*: 161, A745, 2000.
 - 100) Ma, T., Song, Y., Gillespie, A., et al: Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channel. *J Biol Chem*: 274, 20071-74, 1999.
 - 101) Moore, M., Ma, T., Yamg, B., et al: Tear secretion by lacrimal glands in transgenic mice lacking water channels AQP1, AQP3, AQP4 and AQP5. *Exp. Eye Res.* 70, 557-62, 2000.