

## 論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻  
平成 13 年度博士課程 進学  
氏 名 岡田晋治  
指導教官 阿部啓子

### 論文題目

消化管に発現するアクアポリンの生理機能に関する分子細胞生物学的研究

アクアポリン (AQP) は水を選択的に透過する水チャネルであり、大腸菌から高等動植物まで生物界に広く存在する。哺乳類では現在までに AQP0 から AQP10 の 11 種が同定されており、その内のいくつかは、水以外にもグリセロールや尿素といった小分子のほか塩化物イオンなども透過することが明らかになり、水・小分子を輸送するチャネル分子として注目されている。これまで様々な組織において AQP の発現が報告されているものの、腎臓における水の再吸収機構 (AQP2) や胃における酸分泌機構 (AQP4) のほかは、AQP の生理機能のほとんどが不明なままである。

我々が解析対象とした小腸は、生体の内部と外部の境界をなす消化系器官のうち最大の器官であり、栄養源の取り込みと異物の排除を上皮組織と腸管免疫系で総合的に行っている非常に重要な器官である。上皮組織では、水・栄養素の吸収や粘液の分泌など各種の細胞機能や、細胞内外の環境の変化に対する恒常性の維持に、AQP が重要な働きを担っていると推測されるが、詳細は不明である。

本研究では、小腸における AQP の役割を包括的に理解することを目的として、細胞種と発現する AQP 分子種との対応を明らかにし、AQP が担う細胞機能を考察した。

## 第1章 小腸に発現する AQP 分子種の同定

まず、マウス小腸に発現する AQP 分子種を解析した。偽遺伝子である AQP10 を除いて、AQP0 から AQP9 の各分子種に特異的なプライマーを作製し、total RNA を鋳型として RT-PCR を行ったところ、AQP1, 3, 4, 5, 7, 8, 9 の 7 種の cDNA 断片が増幅された。AQP9 を除く分子種中、AQP1, 3, 4, 5, 7, 8 が発現しており、AQP0, 2, 6 は発現していないという結果は、これまで断片的に報告されてきた結果と一致した。AQP9 についてはノーザン分析では小腸において発現が確認されていなかったが、RT-PCR および以下の *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) でその発現が初めて明らかとなった<sup>1)</sup>。

## 第2章 小腸各細胞種が発現する AQP 分子種の特定

小腸の細胞機能における AQP の役割を考察するために、各細胞種に発現する AQP 分子種を調べた。第1章で発現が確認された AQP の ISH 解析の結果、十二指腸には AQP1, 3, 4, 5, 7, 9 が、空腸・回腸には AQP1, 3, 4, 9 が発現していた。AQP8 のシグナルは観察されなかったが、RT-PCR によって cDNA は増幅されたことから、AQP8 の細胞当たりの発現量が低いことが示唆された。十二指腸にのみ発現が観察された AQP5, 7 は、十二指腸に特有の十二指腸腺を構成する細胞に特異的に発現していた。十二指腸腺には AQP1, 3 の発現も観察された。十二指腸・空腸・回腸で共通に存在する粘膜層は陰窩と絨毛に分けられ、陰窩にはパネート細胞および上皮の幹細胞が存在し、絨毛上皮にはそのほとんどを占める吸収上皮細胞と少数の杯細胞が存在する。このほか陰窩および絨毛部には内分泌細胞が極めて少数存在する。陰窩上皮では、AQP3, 4 が全体的に発現し、最底部の細胞では AQP1 も発現していた。絨毛上皮では、AQP3 がほとんど全ての細胞で、AQP1 が基部側の約半数の細胞で、AQP9 が散在的に少数の細胞で発現しており、3 種の AQP 分子の発現頻度は大きく異なっていた。上皮以外でも絨毛の中心部に存在する中心乳び腔周辺の細胞が AQP1 を発現していた。

以上のことから、小腸において、十二指腸腺には AQP1, 3, 5, 7 が、パネート細胞には AQP1, 3, 4 が、吸収上皮細胞には AQP1, 3 が発現していると推測された。杯細胞および内分泌細胞に発現する AQP の詳細は単一分子種の発現分布からは同定できなかった。そこで、次に、マーカー分子を用いてそれぞれの細胞で発現している分子種を解析した。その結果、杯細胞には AQP9 を発現している細胞と発現していない（もしくは発現量が非常に少ない）細胞が存在することが明らかとなった<sup>1)</sup>。現在のところ、内分泌細胞に関しては発現分子種の同定には到っていないが、小腸上皮においてはいずれの細胞種も複数種の AQP が発現していることが明らかとなった。

### 第3章 消化管における AQP9 の発現解析

発現する分子種が少なく、本研究で小腸での発現が初めて明らかになった AQP9 を発現している杯細胞に注目し、AQP の消化管における機能を解析した。

杯細胞は粘液分泌細胞であることから、まず、消化管の他の部位（胃および大腸）の粘液分泌細胞における発現を解析し、AQP9 が粘液分泌に共通の機能を担うかについてしらべた。その結果、大腸の杯細胞では強い AQP9 の発現が観察されたが、胃における粘液分泌細胞である表層粘液細胞では AQP9 の発現は観察されなかった。このことから、AQP9 は小腸および大腸の粘液分泌細胞種である杯細胞に特異的な機能を担っていると推定された<sup>1)</sup>。

ISH および免疫染色の結果から、AQP9 は杯細胞の一部に発現していると考えられたため、杯細胞での発現が知られている 10 種のマーカー分子の発現様式を解析し、AQP9 がどのような杯細胞に発現しているのかを解析した。絨毛上皮細胞は、絨毛基部から頂部にかけて分化が進行するが、AQP9 のシグナル分布からは、AQP9 の発現と分化との相関性は低いと推測された。一方、10 種のマーカー分子は、杯細胞の分化段階に依存的な発現を示し、それぞれの分化段階ではほとんど全ての細胞に発現していた。また、分化に依存せず、一部の杯細胞を識別できるアルシアンブルーと抗 AQP9 抗体による二重染色を行った。その結果、AQP9 はアルシアンブルーで染色される酸性粘液分泌杯細胞の一部および他の杯細胞で発現していることが明らかになった。これらのことから、AQP9 の発現は分化段階には依存しないこと、および杯細胞によっても明らかに強弱もしくは有無があることが示された。AQP9 が水以外の様々な小分子を透過させる分子種であることを考えると、AQP9 は粘液組成を多様させることに関与していると推察される。

最後に、粘液の分泌を促進する刺激および粘液組成の差を生じさせる外部環境変化が及ぼす AQP への影響を ISH、免疫組織染色およびウエスタン分析によって解析した。しかしながら、刺激や外部環境の違いによる AQP3, 9 の発現挙動の差は検出されず、杯細胞の粘液分泌機能と AQP の関連を示唆するデータは得られなかった。

本研究により、小腸には多くの AQP 分子種が発現しており、細胞種ごとに異なる組み合わせで AQP を発現していることが示された。具体的には、杯細胞は AQP3, 9 を、吸収上皮細胞は AQP1, 3 を、パネート細胞は AQP1, 3, 4 を、十二指腸腺の細胞は AQP1, 3, 5, 7 を発現していた（図 1）。

各細胞種がそれぞれ複数種の AQP を発現することから、小腸において AQP が非常に重要な役割を担っていることが示唆された。細胞種ごとに AQP が果たす役割についてはいくつ

か考えられ、それらを検証していくことが今後の課題である。これには、各細胞種のモデル系である培養細胞を用いることが有効であろう。また、AQP の機能破壊により小腸上皮細胞における AQP の役割を解析することも重要である。AQP は単量体で機能的なチャネルを形成するため、現在のところ機能破壊はジーンターゲティングによってのみ可能である。小腸上皮細胞は複数種の AQP を発現しているのです、各細胞種が発現する AQP の性質が補完できない場合、例えば、杯細胞における AQP3 と AQP9 や吸収上皮における AQP1 と AQP3 などにおいて有効であろう。

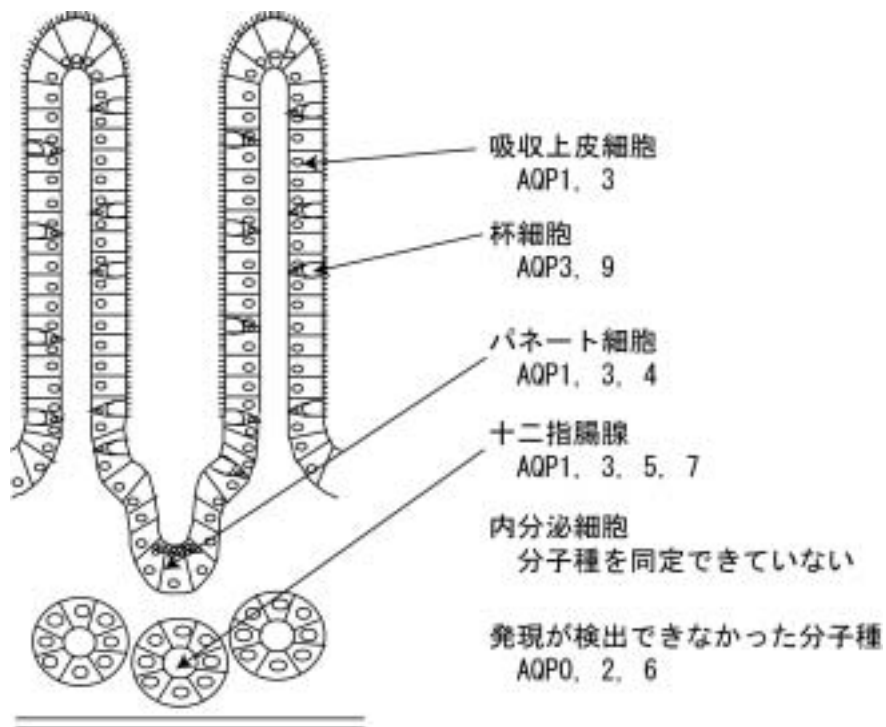


図1 小腸の各細胞種におけるAQPの発現

1) Okada S. *et al.* (2003) Aquaporin-9 is expressed in a mucus-secreting goblet cell subset in the small intestine. *FEBS Letters*, **540**, 157-162.