

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780090

研究課題名（和文）細胞内局在型水チャネルの消化器官における生理機能の解析

研究課題名（英文）Research on the biological function of intracellular aquaporins.

研究代表者

岡田 晋治 (OKADA SHINJI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：50376563

研究成果の概要（和文）：細胞内局在型水チャネルであるアクアポリン 11 (AQP11) 遺伝子の欠損マウスの腎臓、胃、小腸、肝臓、脾臓の表現型の解析を行った。その結果、AQP11 欠損マウスでは腎臓における嚢胞形成以外には顕著な形態変化が無いことが明らかになった。AQP11 欠損マウスの嚢胞形成時の腎臓においては発現遺伝子の約 20%に発現量変化が起こっていることを明らかにし、さらに、その遺伝子プロファイル解析から嚢胞形成の機構を解明した。これらの解析から、AQP11 の生理機能の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The phenotypes of Aquaporin-11 knockout mice were analyzed by histological methods. Cysts formation was observed in the kidney, but no apparent changes were observed in the stomach, small intestine, liver and spleen of the knockout mice. About 20% of the genes expressing in the kidney were changed in their expression in the knockout mice. By the profiling of the expression changes, the mechanisms of the formation of cysts in the kidney of Aquaporin-11 knockout mice were revealed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農学・農芸化学・食品科学

キーワード：アクアポリン、水チャネル、嚢胞症、組織化学、小胞体ストレス、細胞増殖、アポトーシス、AQP11

1. 研究開始当初の背景

アクアポリン (AQP) は、大腸菌から高等植物、脊椎動物に至るまで保存された水チャネル分子である。アクアポリンは水を透過するという固有の性質の他に、グリセロール、尿素などの様々な小分子を透過するという性質も有し、これらの物質の細胞膜を介した輸送を担い、細胞、さらには生体の恒常性維持に深く関与する分子であると考えられている。

哺乳類アクアポリンは、現在までにAQP0-AQP12の13サブタイプが同定されている。これらのうち、本申請研究において研究対象としているAQP11およびAQP12の2種は、他のサブタイプ (AQP0-AQP10) と大きく異なるいくつかの特徴を有している。1つに、AQP11/AQP12とAQP0-AQP10とは分子系統学的に大きく離れている (図1)。また、チャネルの選択性に関わるポア (孔) 付近の配列は、AQP0-AQP10で非常によく保存されているが、AQP11/AQP12では保存されていない。さらに、AQP0-AQP10が形質膜において機能するのに対し、AQP11/AQP12は細胞内に局在すると報告されている。このような特徴から、AQP11/AQP12は経細胞の物質輸送を担うAQP0-AQP10とは異なる生理的役割を担っていることが予想される。

最近、AQP11は小腸 (他には腎臓、肝臓) に、AQP12は膵臓特異的に、とそれぞれ消化

器官での発現が報告されたことから (Morishita, Y. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 2005, Itoh, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005)、AQP11/AQP12に着目し、これまでの研究を進展させ、消化器官に発現するアクアポリンについて、生体内外の物質輸送以外の生理的役割を解明したいと考えた。

2. 研究の目的

本申請研究では、以下の事項について解明を目指した。

- (1) 組織化学的解析によって小腸におけるAQP11発現細胞を同定する。
- (2) 免疫化学的解析によって、組織内在のAQP11/AQP12の細胞内局在を明らかにする。
- (3) AQP11/AQP12が他の分子と複合体を形成しうるか否か、形成しうるならば、どのような分子と複合体を形成するかを明らかにする。また、複合体が共同的に発揮する機能を明らかにする。
- (4) シミュレーションによる予測、アフリカツメガエル卵母細胞や培養細胞などの異種発現系を用いた解析や、供与を受けたAQP11ノックアウトマウスのトランスクリプトーム解析/プロテオーム解析、表現形解析によって、AQP11/AQP12の透過物質を明らかにする。

(5) AQP11については、ノックアウトマウスが作製されているが、表現形の解析は腎臓における形態学的解析に留まっており (Morishita, Y. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 2005)、腎臓以外での表現形や、AQP11の生理機能については不明である。AQP11ノックアウトマウスの表現形解析、トランスクリプトーム解析/プロテオーム解析によって、AQP11の普遍的な生理機能と、小腸特異的な生理機能について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *in situ*ハイブリダイゼーション

詳細な操作は投稿論文に記載している (Okada, S. *et al.*, 2008)。薄切した組織切片に対し、PFA 固定、DEPC 処理を行い、ハイブリダイゼーションバッファー中でDIG 標識プローブのハイブリダイゼーションを行った。アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を反応後、NBT/BCIP を基質として用いて染色を行った。

(2) トランスクリプトーム解析

詳細な操作は投稿論文に記載している (Okada, S. *et al.*, 2008)。AQP11 欠損マウス 9 匹および同腹仔の野生型マウス 7 匹から腎臓を摘出し、total RNA を抽出して、DNA マイクロアレイ解析に供した。マイクロアレイは Affymetrix 社製 Mouse genome 430 2.0 GeneChip を用いた。得られたデータは GCRMA 法で正規化を行い、Welch's *t*-test で有意差検定を行い、false discovery rate 5%未満を閾値に設定して、有意に発現変動した遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

(1) Aquaporin-11 欠損マウス表現型解析

消化管を含め、腎臓以外での AQP11 の生理機能を考察するために、AQP11 欠損マウスの胃、小腸、肝臓、脾臓の表現型の解析を行った。腎臓においては顕著に嚢胞が形成されている 3 週齢の AQP11 欠損マウスの胃、小腸、肝臓、脾臓に対し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織、細胞形態について観察を行ったところ、これらの組織においては野生型マウスと AQP11 欠損マウスの間には違いは見られなかった。次に、Hspa5 (Gpr78) を分子マーカーに用いて、これらの組織における小胞体ストレス誘導の観察を行った。腎臓では、欠損マウスにおいて、1 週齢と同様に嚢胞周辺の細胞内に空胞を有する細胞で小胞体ストレスの顕著な誘導が観察された。一方、その他の組織においては野生型マウスとの間に差異は見出されなかった。抗 Ki-67 antigen 抗体を用いた免疫組織染色によって、細胞増殖についても観察を行った。その結果、やはり腎臓以外の組織においては野生型マウスと欠損マウスとの間に違いはみられなかった。また、抗 cleaved caspase-3 抗体を用いた免疫組織染色によって、アポトーシス細胞の頻度についても解析を行ったが、同様に腎臓以外の組織においては野生型マウスと欠損マウスとの間に違いはみられなかった。以上の結果から、組織・細胞形態、小胞体ストレス誘導、細胞増殖、アポトーシスのいずれにおいても胃、小腸、肝臓、脾臓で AQP11 欠損の影響がみられないことが明らかになった。このことから、AQP11 が腎臓とそれ以外の組織とで異なる生理的役割を担っていることが示唆された。

(2) Aquaporin-11 欠損マウス腎臓における

嚢胞形成機構の解析

嚢胞形成機構の解明を目的に、1 週齢の Aqp11 KO マウスとその野生型同腹子の腎臓について、マイクロアレイ解析および組織化学的解析を行った。その結果、Aqp11 KO マウスでは腎臓に発現する遺伝子の約 20%が有意に発現変動していた。これら発現が変動した遺伝子の機能分類を行ったところ、細胞増殖、細胞外マトリックス、アポトーシス、分化、免疫応答などの項目に分類された。このような遺伝子プロファイルは、発症率が高く、症状が重篤な遺伝病である嚢胞腎症の病態の特徴と類似していた。また、組織化学的解析の結果、Aqp11 KO マウス腎臓において、嚢胞腎症と同様に、尿細管細胞の増殖および細胞外マトリックス関連遺伝子の発現変化が観察された。本研究から Aqp11 KO マウスの嚢胞形成機構は、嚢胞腎症の嚢胞形成機構と共通点を有することが明らかとなった。さらに、Aqp11 KO マウスの嚢胞形成に関わるアポトーシスの機構として、嚢胞腎症では報告のない小胞体ストレス誘導性のアポトーシスの関与を見出した。これらの結果は細胞内局在型アクアポリンの生理機能に新たな知見を与えるとともに、未だ不明な点の多い嚢胞腎症の発症機構の解明につながり、さらには、嚢胞腎症の治療法の開発にも寄与するものであると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Imada, T., Misaka, T., Fujiwara, S.,

Okada, S., Fukuda, Y., and Abe, K., Amiloride reduces the sweet taste intensity by inhibiting the human sweet taste receptor., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press. 査読あり

2. Okada, S., Misaka, T., Tanaka, Y., Matsumoto, I., Ishibashi, K., Sasaki, S., and Abe, K., Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation., *FASEB J.* **22**, 3672-3684, 2008. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

1. 岡田 晋治、中村 周吾、三坂巧、阿部 啓子、魚類 T2R 味覚受容体の発現様式、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010/3/27-30、東京
2. 高木 陽介、齊藤 健佑、岡田 晋治、小林 裕幸、市川 創作、安岡 顕人、三坂 巧、阿部 啓子、酸封入人工餌を用いたモデル魚類の酸味嗜好性評価系の開発、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010/3/27-30、東京
3. 阿生山 萌、岡田 晋治、成川 真隆、近藤 隆、中井 雄治、阿部 啓子、三坂 巧、食餌性亜鉛欠乏ラットの視床における遺伝子発現変化の解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010/3/27-30、東京
4. 家木 誉史、岡田 晋治、藍原 祥子、安岡 顕人、應本 真、三坂 巧、阿部 啓子、経シナプストレーサーを用いたメダカの味覚情報伝達経路の可視化、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010/3/27-30、東京
5. 湯浅 令子、應本 真、前田 尚廣、黒川 あずさ、岡田 晋治、阿部 啓子、藍澤 広行、三坂 巧、離乳食摂取後のマウス大脳

皮質味覚野における SNAP25 の蓄積、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010/3/27-30、東京

6. 岡田 晋治、三坂巧、松本一朗、石橋賢一、阿部啓子、アクアポリン 11 KO マウス腎臓の遺伝子発現プロファイル解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009/3/27-29、福岡
7. 胡 浩、岡田 晋治、三坂 巧、阿部 啓子、摂食刺激に伴うマウス胃のアクアポリンの発現変化の解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009/3/27-29、福岡
8. 高木 陽介、藍原 祥子、安岡 顕人、岩本 悟志、岡田 晋治、三坂 巧、阿部 啓子、摂食行動評価系を用いたモデル魚類の酸味受容機構の解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009/3/27-29、福岡
9. 阿生山 萌、岡田 晋治、成川 真隆、三坂 巧、阿部 啓子、食餌性亜鉛欠乏ラットにおける味覚シグナリング関連分子の発現解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009/3/27-29、福岡
10. 家木 誉史、岡田 晋治、藍原 祥子、安岡 顕人、三坂 巧、阿部 啓子、経シナプストレーサーを用いたメダカの味覚情報伝達経路の可視化、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009/3/27-29、福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/abe2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

研究者番号 :

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :