

平成 22年 5月 19日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780143  
 研究課題名（和文） バンドウイルカ消化管におけるアクアポリンを介した  
 水吸収機構に関する研究  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of water absorption through aquaporin  
 in the small intestine of bottlenose dolphins  
 研究代表者：鈴木 美和（SUZUKI MIWA）  
 日本大学・生物資源科学部・講師  
 研究者番号：70409069

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、周囲から真水を摂れない鯨類が餌に含まれる水分を小腸で直接吸収する機構を解明することを目指し、バンドウイルカを対象として研究を行った。その結果、陸上哺乳類と異なり、イルカの腸では細胞膜に穴をあけて水を通す「アクアポリン」というタンパク質を使って餌から水を吸収している可能性が高いことが分かった。また、水を移動させる駆動力となるナトリウムの勾配を生じさせるナトリウム輸送体も水吸収に関与していることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Generally in mammals, water is absorbed mainly through cell junction of the enterocyte (*paracellular* pathway) in these mammals, and *transcellular* pathway with aquaporin (AQP: water-selective channel) is thought not to be used. We hypothesized that cetaceans that cannot access fresh water might use transcellular pathway to maximize water absorption in intestine. To certify this hypothesis, some experiments were carried out using bottlenose dolphins.

In this study, expression of AQP 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 11 were certified in the small intestine of the dolphins. Immunohistological studies revealed that AQP1 was distributed in the apical membrane of enterocytes in the intestine. Furthermore, data suggesting the localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and expression of Na<sup>+</sup>/glucose transporters in enterocytes were also obtained. These data suggest that AQP1 is a channel protein responsible for water absorption in the small intestine of dolphins, and animals like dolphins living in chronic water-deprived conditions need to absorb water by *transcellular* pathway, maybe in addition to *paracellular* pathways, to maximize water injection in intestines.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般（生物）

キーワード：鯨類，浸透圧調節，水吸収，アクアポリン，小腸，チャネル

### 1. 研究開始当初の背景

過去に我々は、鯨類の餌の水分量と尿浸透圧との関連を調べ、相対的に水分の少ない表層性魚類を摂取する鯨種の尿浸透圧は高く、水分の多い深海性魚類を摂取する種の尿浸透圧が低いことを明らかにした。この結果は、水分の多い餌を食べる鯨種は腸で多くの水分を吸収できるため、低張の尿を排出できることを示唆している。このことを踏まえて我々は、鯨類の体内浸透圧は腸での餌からの積極的な水分吸収に大きく依存し調節されているのではないかと仮説を立てた。

次に我々は、鯨類が餌から水分吸収を行う機構を探るため、鍵となる分子としてアクアポリン（AQP）に着目した。AQPとは、水分子を細胞内外へ透過させる孔（あな）として細胞膜上に分布するタンパク質である。1991年にヒト赤血球においてAQP-1が発見されたことを契機に、哺乳類では13種類のAQPが同定され、生体内での水の移動にAQPが重要な役割を果たすことが明らかにされている。しかし、腸での水の吸収に対するAQPの関与については、砂漠にすむげっ歯類などごく一部の動物を除いて、陸上哺乳類においては否定されている。

本研究では、周環境から真水を摂れない鯨類においては、小腸における餌からの直接的な水吸収は重要であり、これを迅速かつ最大限に行なうためにAQPが関与する経細胞経路が重要な役割を果たすのではないかと考え、これを明らかにするための研究に着手した。

### 2. 研究の目的

本研究は、海洋に生きる鯨類がいかにして水分を摂取するのかという疑問に対し、消

化管でのアクアポリンを介した経細胞経路による水分の吸収に着目し、その機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

鯨類の消化管における餌からの水の吸収機構を解明するため、以下の実験を行なった。なお材料としては、2007～2009年度に和歌山県太地町における追込み漁にて捕獲されたバンドウイルカから得られた臓器を用いた。

(1) イルカ小腸で発現しているAQPについて、分子生物学的手法（RT-PCR, RACE）により明らかにする。

(2) まずイルカ小腸の組織構造を明らかにした上で、免疫組織化学染色を用いて発現が確認された各AQPが小腸のどの細胞に分布しているのかを特定し、餌からの水分子の吸収に関与するAQPを選び出す。また、AQPを介した細胞膜の内外への水の移動は、主としてナトリウムイオン濃度の勾配により生じる浸透圧差を利用して起こるため、膜内外にナトリウムイオンの勾配を生じさせる $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ 等のイオンチャネルの探索も併せて行ない、AQPがどの因子と協調し餌からの水の吸収を行なっているのかを明らかにする。

(3) バンドウイルカAQP1をアフリカツメガエル*Xenopus*の卵母細胞で強制発現させ、低張液中での膨張速度を調べることで、イルカ消化管で発現するAQP1が細胞内外へ水を透過させる性質（透水性）をもつことを証明する。

#### 4. 研究成果

本研究を遂行した結果、下記の通り、これまで全く知られていなかった鯨類小腸における AQP の発現分布、および小腸の組織学的知見、腸における水吸収機構の一端が明らかとなった。

(1) バンドウイルカ小腸から抽出した RNA を用いて cDNA を合成し、AQP の mRNA 発現を確認した結果、ほ乳類で知られる 13 種類の AQP のうち、バンドウイルカ小腸において AQP-1, 3, 4, 5, 6, 7, 11 の 7 種類の AQP の発現を確認した。このうち AQP1, 3, 4, 6, 7, 11 については mRNA 全長配列を決定し、AQP5 については開始コドン～polyA までを決定した。なお、この過程で、陸上哺乳類では発現の知られていない新たな AQP の配列を得たため、これについては現在解析中である。

(2) 組織学的研究の結果、バンドウイルカの小腸は陸上の肉食性哺乳類に比べて非常に長く、また過去の知見に反して絨毛を備えており、長い腸のほとんどが絨毛をもつ小腸であり大腸の構造が認められないことが判明した (図 1)。なお、絨毛は後方に行くほど太く長くなることが分かった。加えて、小腸の陰窩は非常に深いこと、および粘膜層には吸収細胞や杯細胞が豊富である一方で、パネート細胞が認められないことも判明した。

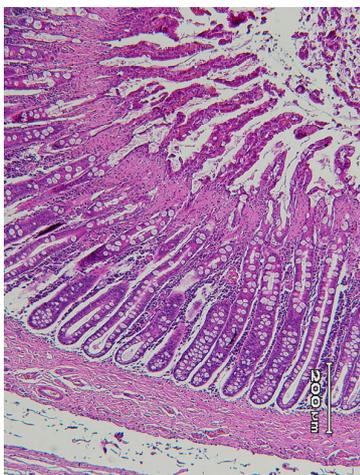


図 1. バンドウイルカ小腸の組織

(3) 4 - (1) で発現が認められた AQP について、免疫組織化学染色によりイルカ小腸での分布様式を調べた結果、AQP1 が水の吸収に関与する可能性が示された。すなわち AQP1 は空腸から回腸後方までの広範囲にわたり、水吸収に関与する吸収細胞の管腔膜に分布することが分かった (図 2)。また、小腸吸収細胞には糖と Na<sup>+</sup>の共輸送体である SGLT1 と Na<sup>+</sup>を体内へ輸送する Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase が発現分布していることを示す結果が得られた。

以上の結果から、イルカの長い小腸では上記のチャンネルにより生じる Na<sup>+</sup>勾配を駆動力として、AQP1 を通って水が吸収細胞に流入し体内へとさらに運ばれる「経細胞経路」を使って水吸収を行なっていることが示唆された。

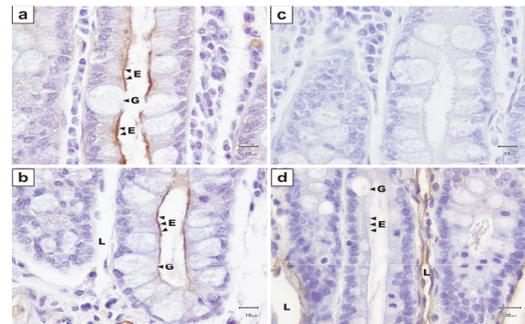


図 2. バンドウイルカ小腸での抗 AQP1 抗体を用いた免疫組織化学染色像。

a) イルカ小腸陰窩上部, b) イルカ小腸陰窩底部, c) Negative control, d) ラット小腸. イルカ小腸陰窩では吸収細胞管腔膜側に陽性反応が認められる一方、ラット小腸では乳び管に反応が認められ、吸収細胞には反応が認められない。E: 吸収上皮細胞, G: 杯細胞, L: 乳び管 (リンパ管). Scale bars=10μm.

(4) 4 - (1) で得たイルカ AQP1 mRNA 全長配列を基に、open reading frame 全域を含むようにプラスミドを作製し、これを用いてコンストラクトを構築した後、cRNA を合成して *Xenopus* 卵に微量注入し発現させた。この卵をカエルの生理的食塩水から低張液へ移して経時的に撮影し、透水性 (Pf 値) を算出した結果、AQP1 発現卵ではコントロールと比べ有意に大きい Pf 値が得られ、水銀処理によりこの有意差が消失したことから、イルカ AQP1 が水透過能をも

つことが証明された (図3).

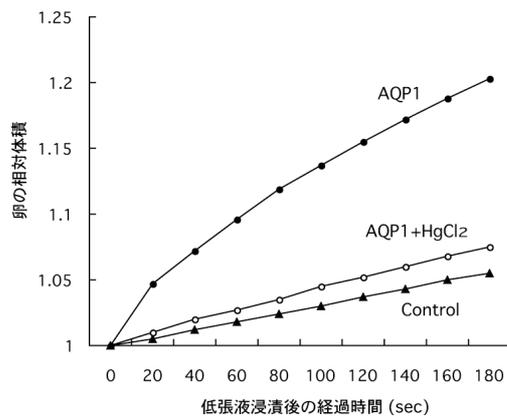


図3. *Xenopus* 卵での dolphin AQP1 の強制発現による機能解析.

*Xenopus* 卵に dolphin AQP1 を 10ng 注入したもの (AQP1), 超純水のみ注入したもの (Control), および dolphin AQP1 を 10ng 注入し 20 分間 0.3mmol/L HgCl<sub>2</sub> 処理したもの (AQP1+HgCl<sub>2</sub>) を, 各々低張液へ移した後の卵の容積の変化を示す. 縦軸は低張液へ移す前の卵の体積を 1 とした時の相対値を表す.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Suzuki M. 2010. Expression and localization of aquaporin-1 on the apical membrane of enterocytes in the small intestine of bottlenose dolphins. *J. Comp. Physiol. B* 180: 229-238. 査読有.
- ② 鈴木美和. 2009. 鯨類小腸でのアクアポリンを介した水吸収. *比較内分泌学* 35: 195-201. 査読無.

[学会発表] (計3件)

- ① 宮永智美, 鈴木美和, 他. “バンドウイルカ消化管の解剖学および組織学的研究” 2010年3月, 日本水産学会, 神奈川.
- ② 榎一史, 鈴木美和, 他. “バンドウイルカ抗利尿ホルモンに関する生理学的研究” 2010年3月, 日本水産学会, 神奈川.
- ③ Suzuki M. “Aquaporin-1 is involved in water absorption in the small intestine of bottlenose dolphins?” The 18th binneial conference on the biology of marine mammals, on Oct 14,2009 in Quebec, Canada.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

鈴木美和 (SUZUKI MIWA)

日本大学生物資源科学部・講師

研究者番号: 70409069