

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06816

研究課題名(和文) アクアポリン11の機能とノックアウトマウスの腎嚢胞形成機序の解明

研究課題名(英文) Studies on the physiological role of aquaporin-11 and molecular mechanism of cyst formation in aquaporin-11-deleted mice.

研究代表者

松崎 利行 (Toshiyuki, Matsuzaki)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30334113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：精子細胞に発現するAQP11を特異的にノックアウトするマウスを作製し、解析した。妊孕性は野生型と比較して差がなく、精巣の組織にも変化が認められなかった。しかし、作製したマウスではAQP11遺伝子が破壊される時期が遅かったために、AQP11タンパク質の発現が起こっていたことが判明した。腎臓でのAQP11の電顕レベルでの局在や全身発現を明らかにする目的で、モノクローナル抗体の作製を試みたが、陽性クローンを得ることができなかった。RNAscopeによるin situハイブリダイゼーションをおこなったところ、小腸の上皮細胞にAQP11の発現がみられ、免疫染色でも細胞内に陽性反応が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AQP11ノックアウトマウスでは腎臓に嚢胞を多数形成し、死に至ることからAQP11は腎臓で重要なはたらきをしていると考えられる。AQP11は腎臓以外に、例えば精巣にも発現している。そこでマウス精巣のAQP11を特異的に破壊して、精巣での役割を明らかにしようと試みたが、作製したマウスでは遺伝子の破壊時期が遅かったために、AQP11が破壊しきれなかった。より早い時期にAQP11遺伝子を破壊できるマウスを作製する必要があることがわかった。また、腎臓、精巣以外に小腸上皮細胞にもAQP11が発現することを明らかにできたので、今後遺伝子破壊などによって小腸でのAQP11の機能を解析することができる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the physiological role of aquaporin-11 (AQP11), we developed spermatocyte-specific AQP11-knockout mice and analyzed them. There was no obvious change in fertility as well as histology of testes in knockout male mice compared to those in wild mice. However, we noticed that AQP11 mRNA and protein was present in spermatocytes because of the time when AQP11 gene was deleted was late. We tried to make monoclonal anti-AQP11 antibody to clarify the ultrastructural localization of AQP11; however, we could not succeed it. On the other hand, we clarified the expression of AQP11 in enterocytes of small intestines by in situ hybridization using RNAscope technology and immunohistochemistry.

研究分野：組織細胞化学

キーワード：アクアポリン11 腎嚢胞 精巣 小腸 ノックアウトマウス 免疫組織化学 in situハイブリダイゼーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アキュアポリンはおもに細胞膜ではたらく水チャネルタンパク質で、脂質二重層の水の透過を可能にする重要な機能分子である。哺乳類で13種類のアイソフォームが存在するが、アイソフォームによってはグリセリンを透過するなど、性質と生体内分布が異なる。本研究ではアキュアポリン11(AQP11)に着目した。実施者はAQP11抗体を作製し、組織分布・細胞内分布を検討しつつ、共同研究でAQP11ノックアウトマウスの解析をおこなってきた。AQP11は腎臓の近位尿細管細胞の、おそらく細胞内膜系に分布するという特殊なアキュアポリンであることがわかっていった。さらにAQP11ノックアウトマウスは、近位尿細管細胞の小胞体拡張から腎臓に嚢胞を多数形成し、生後1か月以内にほとんどの個体が腎不全で死亡することも判明していた(Morishita et al. Mol Cell Biol 25: 7770-7779, 2005)。しかしAQP11ノックアウトによってなぜ嚢胞を形成するのか、さらにAQP11は水透過以外の重要な機能を果たしていると推測されるが、その分子機能は不明であった。まとめると、

- ・AQP11の生理的分子機能
- ・AQP11ノックアウトマウスでの腎嚢胞形成機序が未解明であり、本研究で取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的として大きく以下2つを掲げた。

- (1) AQP11の生理的分子機能の解明
- (2) AQP11ノックアウトマウスでの腎嚢胞形成機序の解明

3. 研究の方法

(1) 精子細胞特異的AQP11ノックアウトマウスの作製と妊孕性の解析

プロタミン1(Prm1)プロモーター下にパキテン期精母細胞で特異的にCreリコンビナーゼを発現するマウス(RBRC02182: Prm1-Cre、理化学研究所バイオリソース研究センターより入手)とAqp11flxマウス(MMRR037110-JAX, Mutant Mouse Resource & Research Centers (MMRRC)より入手)を交配し、Cre⁺;Aqp11flx/flxオスを得て、Cre⁻;Aqp11flx/flxオスをコントロールとして解析した。Cre⁺;Aqp11flx/flxオスとCre⁻;Aqp11flx/flxオスを野生型のメスとの交配を4か月以上繰り返し、産仔数について統計学的に解析をおこなった。

(2) 精子細胞特異的AQP11ノックアウトマウスの表現型の解析

Cre⁺;Aqp11flx/flxオスとCre⁻;Aqp11flx/flxオスで左側精巣の重量(mg)/体重(g)を算出し、統計学的に解析した。さらに精巣のHE染色、PAS染色で形態学的に解析した。

(3) in situハイブリダイゼーションによるAQP11 mRNAの解析

マウス精巣、小腸、胸腺のパラフィン切片からRNAscope(Advanced Cell Diagnostics)を用いてAQP11 mRNAの検出をおこなった。

(4) ウェスタンブロットによるAQP11タンパク質の解析

マウス組織ホモジネートを12.5%アクリルアミドでSDS-PAGEをおこない、PVDF膜へ転写後、自作のウサギAQP11抗体でウェスタンブロットをおこなった。

(5) AQP11ラットモノクローナル抗体の作製

マウスAQP11のアミノ酸配列のうちポリクローナル抗体作製に用いた抗原部位を含めて6か所を選定し、ペプチド抗原の混合物を免疫してラットモノクローナル抗体の作製を、重井医学研究所の松山誠博士の協力でおこなった。クローンのスクリーニングは腎臓組織での免疫染色と一部腎臓組織のウェスタンブロットを併用しておこなった。

(6) 免疫組織化学

マウス組織は4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液または3%パラホルムアルデヒド-25 mM CaCl₂-カゴジル酸緩衝液で固定し、パラフィン切片または凍結切片を作製し、蛍光抗体法またはHRP標識抗体を用いた酵素抗体法で免疫組織化学をおこなった。

4. 研究成果

(1) 精子細胞特異的AQP11ノックアウトマウスの解析

精子細胞特異的AQP11ノックアウトマウスの精子でAQP11遺伝子がノックアウトされていることの確認

Cre⁺;Aqp11flx/flxオスの精子でAQP11がノックアウトされていることを確認するためにCre⁺;Aqp11flx/flxオス10個体について野生型メスと交配をおこない、産仔のジェノタイプングをおこなったところ、各個体からの産仔についてヘテロの産仔数/総産仔数は、1/41、0/17、0/26、0/53、0/16、1/27、0/7、0/5、0/16、0/5であり、ほぼ確実に精子のAQP11はノックアウト

トされていることが確認できた。

さらに、Cre+;Aqp11flx/flx オス 1 個体の精巣上体から精子を回収して PCR で確認したところ、AQP11 遺伝子がノックアウトされていることを示す PCR 結果が得られた。以上より、Cre+;Aqp11flx/flx オスの精子ではほぼ確実に AQP11 遺伝子がノックアウトされていることが確認できた。

精子細胞特異的 AQP11 ノックアウトマウスの妊孕性の解析

Cre+;Aqp11flx/flx オス、Cre-;Aqp11flx/flx オスと野生型メスとの交配を4か月以上繰り返し、産仔数について統計学的に解析をおこなった。Cre-;Aqp11flx/flx オス 7 匹のペアから 31 回の出産があり 7.45 仔/出産、Cre+;Aqp11flx/flx オス 7 匹のペアから 35 回の出産があり 6.77 仔/出産の結果であり、統計学的に有意差がないことが確認された。以上から精子の AQP11 がノックアウトされても妊孕性には影響がないことが示された。

精子細胞特異的 AQP11 ノックアウトマウスの精巣の組織解析

左側精巣の重量 (mg) /体重 (g) を算出し、統計学的に解析したところ、Cre+;Aqp11flx/flx オスと Cre-;Aqp11flx/flx オスで有意差はなかった。さらに精巣の HE 染色、PAS 染色で形態学的に解析をおこなったが、Cre+;Aqp11flx/flx オスで明らかな変化は認められなかった。つまり精子細胞特異的 AQP11 ノックアウトマウスの精巣は形態学的に明らかな変化がないことがわかった。

精子細胞特異的 AQP11 ノックアウトマウスの精巣での AQP11 発現の解析

Cre+;Aqp11flx/flx オスの精子ではゲノムレベルで AQP11 遺伝子がノックアウトされていることはわかったが、精子で AQP11 がタンパク質レベルでも残っていないかを確認するために精巣のホモジネートでウェスタンブロットをおこなった。その結果 Cre+;Aqp11flx/flx オスの精巣で AQP11 と思われるバンドが検出され、精巣で AQP11 タンパク質が残存していると考えられた。次に、RNAscope を用いた in situ ハイブリダイゼーションをおこなったところ、Cre+;Aqp11flx/flx の精巣の精母細胞から精子細胞にかけて mRNA が検出された。以上より、Cre+;Aqp11flx/flx では AQP11 遺伝子が Cre によって切り出される時期が遅いため、mRNA ならびにタンパク質が発現していることがわかり、精子細胞での AQP11 遺伝子ノックアウトによる効果の解析はできないことが分かった。精子細胞での AQP11 発現を確実に落とすためには、Prm1 よりも早期に発現を開始する遺伝子のプロモーター下で Cre が誘導されるマウスを用いる必要があり、今後検討することとした。

(2) in situ ハイブリダイゼーションによる AQP11 mRNA の解析

AQP11 の生体内での役割を知るために組織、細胞レベルでの発現、局在を明らかにすることは重要である。しかし自作のポリクローナル抗体では腎臓以外の組織での免疫染色がうまくいかず、解析が進まなかった。そこでモノクローナル抗体の作製を進めつつ、RNAscope による in situ ハイブリダイゼーションで、mRNA レベルでの検出を試みた。臓器としては、ノーザンブロットで発現が確認されている小腸と胸腺で解析した。小腸では上皮細胞に、胸腺では皮質の上皮細胞に mRNA が検出された。

(3) ポリクローナル抗体による AQP11 の免疫組織化学的解析

in situ ハイブリダイゼーションの結果をもとに、自作抗体でマウス腸管と胸腺の免疫染色をおこなったところ、腸管では十二指腸から空腸にかけての上皮細胞の細胞内にシグナルが認められ、全身ノックアウトマウス組織ではシグナルはほぼ認められなかった。胸腺では特異的な染色は得られなかった。小腸上皮細胞の細胞内局在については今後免疫電顕を含めて検討する。

(4) AQP11 ラットモノクローナル抗体の作製

重井医学研究所の松山誠博士によりクローンを作製してもらい、実施者らが免疫染色とウェスタンブロットでスクリーニングをおこなった。49 クローンについて試したが、陽性クローンは得られなかった。

まとめ

AQP11 の生理的分子機能の解明のために、精子細胞特異的 AQP11 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、解析をおこなったが、作製したマウスでは AQP11 遺伝子が破壊される時期が遅かったためにタンパク質の発現が起こっていたことが判明した。つまり、妊孕性や精巣の組織変化について解析したが、それは AQP11 遺伝子ノックアウトの影響ではなかった。今後、より早期に Cre が発現するドライバーマウスを使う必要があることが分かった。

腎臓での AQP11 の電顕レベルでの局在や全身発現を明らかにする目的で、モノクローナル抗体の作製を試みたが、陽性クローンを得ることができなかった。

これまで用いていた自作のポリクローナル抗体では非特異的な反応が多く、正確な解析が困難であったが、RNAscope による in situ ハイブリダイゼーションの結果と照らし合わせて解析を進めることができそうであり、今後さらに解析していきたい。

< 引用文献 >

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 松崎利行、高田邦昭	4. 巻 94
2. 論文標題 水チャンネルの分布と機能	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 607-614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 松崎利行	4. 巻 154
2. 論文標題 培養細胞の蛍光多重染色法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 165～170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.154.165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mikoda Nobuyuki、Sonoda Hiroko、Oshikawa Sayaka、Hoshino Yuya、Matsuzaki Toshiyuki、Ikeda Masahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 A bell shaped pattern of urinary aquaporin 2 bearing extracellular vesicle release in an experimental model of nephronophthisis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14092～e14092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Takeshi、Hamada Toshiyuki、Matsuzaki Toshiyuki、Iijima Norio	4. 巻 524
2. 論文標題 Characterization of the circadian oscillator in the choroid plexus of rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 497～501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.01.125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Maiko Ikezawa, Hiroshi Kogo, Akiko Kogo, Kenichi Ishibashi, Toshiyuki Matsuzaki
2. 発表標題 Expression and localization of AQP11 mRNA in the mouse testis.
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎利行
2. 発表標題 蛍光抗体法の基礎と応用
3. 学会等名 第45回組織細胞化学講習会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Maiko Ikezawa, Hiroshi Kogo, Akiko Kogo, Kenichi Ishibashi, Toshiyuki Matsuzaki
2. 発表標題 Expression and localization of AQP11 mRNA in the mouse testis.
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎利行
2. 発表標題 蛍光抗体法の基礎と実際
3. 学会等名 第44回組織細胞化学講習会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎利行、高田邦昭
2. 発表標題 ペプチド抗体と免疫組織化学
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	向後 寛 (Kogo Hiroshi) (20282387)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	
研究分担者	向後 晶子 (Kogo Akiko) (20340242)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	池澤 麻衣子 (Ikezawa Maiiko)		
研究協力者	松山 誠 (Matsuyama Makoto)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	多鹿 幸子 (Tajika Yukiko)		
研究協力者	石橋 賢一 (Ishibashi Kenichi)		
研究協力者	池田 正浩 (Ikeda Masahiro)		
研究協力者	田中 靖子 (Tanaka Yasuko)		
研究協力者	飯島 典生 (Iijima Norio)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関