

助成番号 0745

消化管塩濃度調節機構におけるアクアポリンの役割の解明

岡田 晋治

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

概要 【目的】 体液中の塩は生体の様々な活動に関わっており、その濃度を厳密に調節する機構が存在する。その主な機構の一つは、摂取した食品中から塩および水を吸収する機構であり、消化物の塩濃度の調節は、主として胃においてなされるとされているが、その機構の詳細は不明である。胃においては、アクアポリンの発現およびその生理機能は解明されていない部分が多いが、この消化物の塩濃度の調節においてはアクアポリンが深く関わると推察される。そこで、本研究では、この胃における消化物塩濃度調節におけるアクアポリンの関与を解明することを目的とした。

【方法】 C57BL/6J マウス(オス, 8週齢)を用いた。胃を用いて、RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) を行った。また、摂食時 (Fed 群, Refed 群) および 24 時間絶食時 (Fast 群) のアクアポリン発現量について半定量的 RT-PCR によって検討した。

【結果】 マウス胃から抽出した全 RNA を鋳型に、*mAqp* 遺伝子の全サブタイプ (*Aqp0-Aqp12*) に特異的なプライマーセットを用いて、RT-PCR を行った。その結果、*Aqp1*、*Aqp2*、*Aqp3*、*Aqp4*、*Aqp5*、*Aqp7*、*Aqp8*、*Aqp9*、*Aqp11* および *Aqp12* の 10 サブタイプの断片が増幅された。マウス胃切片に対して、ISH を行った結果、胃体部および胃幽門部の上皮細胞における *Aqp3* の発現を見出した。摂食時に対し、絶食時において *Aqp3* および *Aqp5* の PCR 産物量が減少しており、*Aqp4* の PCR 産物量が増加していた。

【考察】 本研究の RT-PCR 解析によって、これまで胃における発現が報告されていなかった 6 サブタイプの発現が明らかとなった胃にターゲットを絞ったこと、および、RT-PCR という感度の高い検出法を採用したことによって、これまで発現が報告されていなかったサブタイプの胃における発現が検出できたと考えられる。絶食実験において、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* の 3 種全てが摂食時・絶食時で発現量が変化することが示唆された。このことは、この 3 種のアクアポリンサブタイプが胃における消化において、何らかの機能を担っていることを示唆する非常に興味深い結果である。*Aqp4* はこれまで壁細胞に局在するという特徴から、摂食時の酸分泌に関与すると考えられてきたが、本解析では絶食時に発現量が増加しており、壁細胞で酸分泌以外の機能に関する可能性が示唆された。

1. 研究目的

体液中の塩は生体の様々な活動に関わっており、その濃度を厳密に調節する機構が存在する。その主な機構の一つは、摂取した食品中から塩および水を吸収する機構であり、また一つは、尿や汗として、塩および水を排出する機構である。後者の排出では、体液の塩濃度に応じて排出量が調節されているのに対し、前者の吸収は、小腸においてほぼ一定の量が安定して吸収されている。小腸に

おける吸収量が一定であるのは、食品を摂取した後、小腸にいたるまでの過程において、その消化物の塩濃度を調節する機構が存在するからだと考えられている。消化物の塩濃度の調節は、主として胃においてなされるとされており、例えば、ジュースのような高塩濃度の食品を摂取した場合には、胃壁から水が分泌されて、消化物の塩濃度を下げ、逆に、水のような低塩濃度の食品を摂取した場合には、イオンが分泌されて、消化物の塩濃度を上げると考え

られている。しかしながら、その機構の詳細は不明である。塩の排出を担う腎臓においては、水を透過する性質を持つチャネル分子であるアクアポリンが尿細管の水透過の調節を介して、塩濃度調節の主たる部分を担っている。胃においては、アクアポリンの発現およびその生理機能は解明されていない部分が多いが、この消化物の塩濃度の調節においても同様に、アクアポリンが深く関わりと推察される。そこで、本研究では、この胃における消化物塩濃度調節におけるアクアポリンの関与を解明することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 実験動物

C57BL/6J マウスは埼玉実験動物供給所から購入した。12 時間周期で明暗が切り替わり、温度、湿度が一定に保持された飼育室で飼育を行った。マウスの利用に際しては東京大学実験動物利用規則に従った。

2.2 RT-PCR

2.2.1 マウス胃の摘出

C57BL/6J マウス(オス, 8 週齢)を頸椎脱臼によって安楽死させ、氷上で、胃を摘出した。氷冷した PBS 中に浸し、胃を切開し、内容物を良く洗い落とした。解剖用ハサミによって細かく切断した後、RNAlater (Ambion) で処理した。

2.2.2 マウス胃全 RNA の抽出

胃組織片から全 RNA を TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて抽出した。その後、RNeasy mini kit (Qiagen) および RNase-free DNase set (Qiagen) を用いて、全 RNA の DNase I 処理および精製を行った。全 RNA の質および量はアガロースゲル電気泳動と分光光度計による吸光度によって評価した。

2.2.3 1st strand cDNA 合成

1 μ g の全 RNA を SuperScript III First Strand SuperMix (Invitrogen) および oligo-dT プライマーを用いて逆転写し、一本鎖 cDNA を合成した。

2.2.4 PCR

各マウス AQP(mAQP) に特異的なプライマーセットおよび DNA polymerase (Phusion (NEB) もしくは PrimeStar (Takara)) を用いて、PCR を行った。プライマーセットはイントロンをはさむように設計した。増幅断片の解析はアガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色によって行った。

2.3 絶食実験

C57BL/6J マウス(オス, 8 週齢)を 1 週間の予備飼育の後、マウスは Fed 群、Fast 群、Refed 群の 3 群に分け、絶食実験を行った。絶食実験のスケジュールを図 1 に示した。

各群のマウスは上記 2.2.1-2.2.3 と同様に胃の摘出、全 RNA の抽出、および、1st strand cDNA 合成を行った。

2.4 *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)

ISH は、基本的には本研究者がこれまでに報告されている方法 (Ishimaru, Okada *et al.* 2005; Oike, Nagai *et al.* 2007) に従った。具体的な操作は以下に述べる。

2.4.1 マウス胃の摘出

マウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、氷上で、胃を摘出した。氷冷した PBS 中で、内容物を洗浄した。胃片を Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical) 中に移し、液体窒素で冷却して凍結ブロックを作製した。ブロックは使用時まで -80°C で保存した。

2.4.2 薄切

サンプルを凍結したブロックをクライオスタットで $7\ \mu\text{m}$ 厚

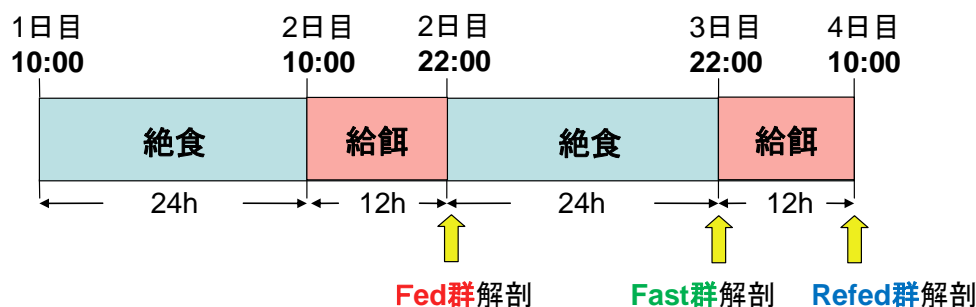


図 1. 絶食実験のスケジュール

に薄切し、切片は MAS コートスライドグラス (Matsunami Glass) に貼り付け、ドライヤーを用いて風乾後、使用時まで -80°C で保存した。

2. 4. 3 ジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プローブの作製

マウス AQP クローンを鋳型として用いた。Digoxigenin RNA labeling Mix (Roche Diagnostics)、T3 RNA ポリメラーゼまたは T7 RNA ポリメラーゼ (Stratagene) を用いて、DIG 標識 RNA プローブを作製した。RNA プローブは約 150 b に断片化した。

2. 4. 4 ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出

凍結切片をドライヤーを用いて常温に戻し、4% パラホルムアルデヒド (PFA) を含む PBS (4% PFA/PBS) 中、10 分間室温で固定した。1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) を含む PBS 中 15 分間 2 回室温で処理を行った後、20 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K/TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) 中 10 分間室温で処理し、5x SSC 中、15 分間室温で洗浄した。プレハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド, 5x SSC, 40 $\mu\text{g/ml}$ の変性サケ精巢 DNA (Sigma-Aldrich)) を載せ、2 - 3 時間 58°C でプレハイブリダイゼーションを行った後、適当な濃度 (20 - 200 ng/ml) の DIG 標識 RNA プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド, 5x SSC, 5x Denhardt's solution, 500 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精巢 DNA, 250 $\mu\text{g/ml}$ 変性 E.coli tRNA (Sigma-Aldrich), 1 mM DTT) に交換し、約 40 時間 58°C でハイブリダイゼーションを行った。その後、5x SSC 中、5 分間 2 回 58°C で、0.2x SSC 中、30 分間 2 回 58°C で、TBS 中、5 分間室温で洗浄を行った。0.5% Blocking reagent (Roche Diagnostics) を含む TBS を載せ、1 時間室温でブロッキングを行い、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗 DIG 抗体 Fab 断片 (Roche Diagnostics) を 1000 倍希釈で含む同溶液に交換し、1 時間室温で反応させた。TBS 中、15 分間 3 回室温で洗浄を行い、AP バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) に浸漬した後、nitroblue tetrazolium chloride (NBT) と 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) を発色基質として用い、2 - 30 時間室温でシグナルを発現させた。AP バッファーで洗浄して、発色を止めた後、数回 TBS 中で洗浄を行い、封入剤 Gel/Mount (Biomedica) とカバーガラス (Matsunami Glass) を用いて、プレパラートを作製した。

2. 4. 5 観察

プレパラート観察は光学顕微鏡 BX-51 (Olympus) およびデジタルカメラシステム DP-70 (Olympus) によって行い、得られた画像は画像処理ソフト Photoshop (Adobe Systems) によって処理した。

2. 5 半定量 RT-PCR

上記2. 2と同様に作製した一本鎖 cDNA を鋳型に、各 mAQP に特異的なプライマーセットおよび DNA polymerase (Phusion もしくは PrimeStar) を用いて、PCR を行った。予備実験を行って、それぞれのプライマーセットについて線形に増加するサイクル域をしらべ、サイクル数を決定した。

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行って可視化した。PCR 産物のバンドの定量は Image J ソフトウェア (NIH) を用いて行った。

3. 研究結果

3. 1 マウス胃に発現するアクアポリンの同定

現在までに、胃に発現するアクアポリンについてなされた報告は少ない。わずかになされた報告では、*Aqp1*、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* が発現することが示されている (Misaka, Abe *et al.* 1996; Koyama, Yamamoto *et al.* 1999; Bodis, Nagy *et al.* 2001; Matsuzaki, Tajika *et al.* 2003)。しかしながら、胃に着目し、網羅的にアクアポリンの発現をしらべた事例は無いため、さらに他の *Aqp* サブタイプが発現する可能性がある。そこで、本研究ではまず、RT-PCR 方によって、胃におけるアクアポリンの発現を網羅的に解析した。

マウス胃から抽出した全 RNA を鋳型に、*mAqp* 遺伝子の全サブタイプ (*Aqp0*-*Aqp12*) に特異的なプライマーセットを用いて、RT-PCR を行った。その結果、30 cycle の RT-PCR では、*Aqp1*、*Aqp3*、*Aqp4*、*Aqp5*、*Aqp7*、*Aqp8*、*Aqp9*、*Aqp11* および *Aqp12* の 9 サブタイプの断片が (図 2 上段)、40 cycle の RT-PCR では、それに加えて *Aqp2* の断片が増幅された (図 2 下段)。

本研究によって、これまで胃における発現が報告されていなかった *Aqp2*、*Aqp7*、*Aqp8*、*Aqp9*、*Aqp11* および *Aqp12* の 6 サブタイプの発現が明らかとなった。

3. 2 マウス胃におけるアクアポリン遺伝子の局在

次に、胃における各アクアポリンサブタイプの機能に関

する手掛かりを得るために、各サブタイプを発現する細胞種の特定を試みた。これまでに、胃においてアクアポリンを発現する細胞種については、当研究室を含めたいくつかのグループのマウスやラット、ヒトなどを用いた解析によって、胃底部の上皮細胞が *Aqp3* を発現すること、胃体部胃腺の壁細胞と主細胞が *Aqp4* を発現すること、胃幽門部の幽門腺細胞が *Aqp5* を発現することが報告されている (Misaka, Abe *et al.* 1996; Koyama, Yamamoto *et al.* 1999;

Bodis, Nagy *et al.* 2001; Matsuzaki, Tajika *et al.* 2003)。本研究では、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法によって、mRNA の局在をしらべることで、発現細胞の同定を行った。

RT-PCR (図2) によって、胃での発現が示された10サブタイプ (*Aqp1*, *Aqp2*, *Aqp3*, *Aqp4*, *Aqp5*, *Aqp7*, *Aqp8*, *Aqp9*, *Aqp11* および *Aqp12*) の各プローブを用いて、マウス胃切片に対して、ISHを行った。その結果、*Aqp3*、*Aqp4* およ

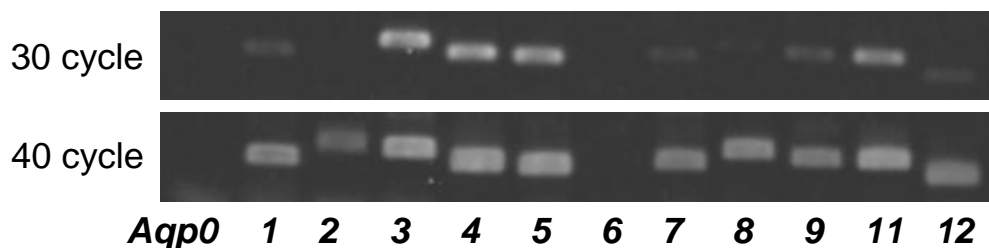


図2. マウス胃におけるアクアポリン遺伝子の発現

マウス胃から抽出した全 RNA を鋳型に、各 *mAqp* 遺伝子 (*Aqp0*-*Aqp12*) に特異的なプライマーセットを用いて、RT-PCR を行った。上段 30 cycle、下段 40 cycle。

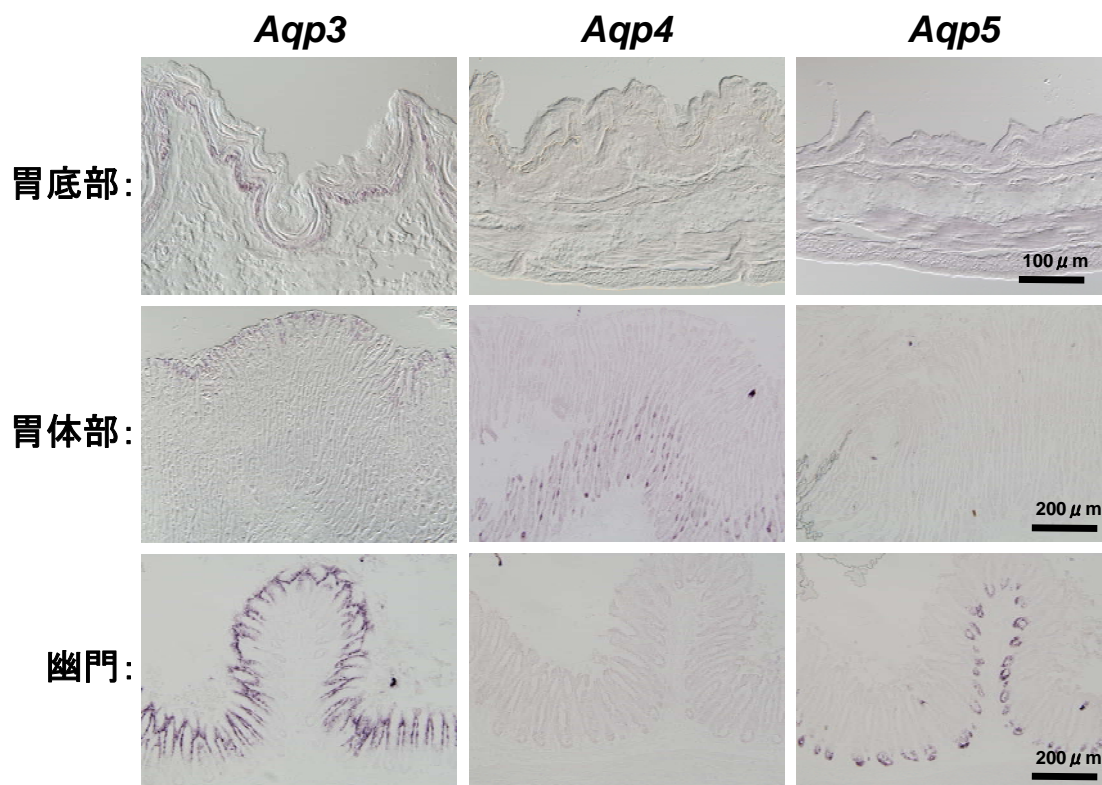


図3. マウス胃における *Aqp* 遺伝子の局在

マウス胃 (胃底部、胃体部、幽門部) 切片を用いて、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。シグナルは青紫。

び *Aqp5* の3プローブを用いた場合は、胃の切片にシグナルが観察されたが(図3)、*Aqp1*、*Aqp2*、*Aqp7*、*Aqp8*、*Aqp9*、*Aqp11* および *Aqp12* の7プローブを用いた場合は、胃の切片上でシグナルは観察されなかった。

胃の各細胞種に対するマーカー遺伝子のプローブを用いた ISH の染色結果(data not shown)と比較し、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* の発現細胞種の同定を行った。*Aqp4* のシグナルは胃体部胃腺の壁細胞に局在しており、これは既になされた報告(Misaka, Abe *et al.* 1996; Koyama, Yamamoto *et al.* 1999)と一致していた(図3)。また、*Aqp5* のシグナルは胃幽門部の幽門腺細胞に局在しており、これも既になされた報告(Matsuzaki, Tajika *et al.* 2003)と一致していた(図3)。一方、*Aqp3* のシグナルは、既報(Koyama, Yamamoto *et al.* 1999)と同様に、胃底部の上皮細胞に観察されたが、それ以外にも、シグナルは胃体部および胃幽門部の上皮細胞に観察された(図3)。

3.3 摂食時・絶食時の胃におけるアクアポリン遺伝子発現動態

アクアポリンは基本的にはチャンネルが開口したままであり、チャンネル活性の制御は、発現量の変化(発現誘導と分解)、細胞膜表面から細胞内への移行などによって行われることが知られている。腎臓においても、AQP1、AQP3などが前者のような制御を受け、AQP2が後者のような制御を受けることが知られている。胃において、アクアポリンが消化物塩濃度調節に関わるならば、食品の塩濃度によって、腎臓の場合と同様に、その発現様式が変化すると予想される。本研究では、消化物塩濃度調節に関わるアクアポリン同定の第一歩として、摂食時・絶食時において発現量が変化するアクアポリンの探索を行った。

図1のように、摂食群(Fed群およびRefed群)と24時間絶食群(Fast群)を設定し、絶食実験を行った。各群2匹のマウスの胃から全RNAを抽出し、半定量的RT-PCRによって、各アクアポリンサブタイプの遺伝子発現量変化を測定した。ISHで明確なシグナルが観察された*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* について解析を行った。まず、胃において絶食時に発現量が増加することが報告されているホルモン somatostatin (*Sst*) についてポジティブコントロールとして発現を解析したところ、本解析においても摂食時(Fed群およびRefed群)に対し、絶食時(Fast群)においてPCR産物の量が減少していた(図4、図5)。

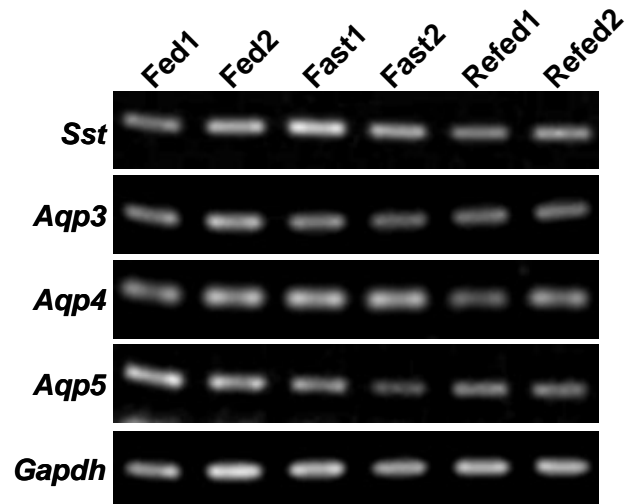


図4. 半定量 RT-PCR による摂食摂食時・絶食時の胃におけるアクアポリン遺伝子の発現解析

摂食時(Fed群(Fed1, Fed2)およびRefed群(Refed1, Refed2))、絶食時(Fast群(Fast1, Fast2))のマウス胃の全RNAを鋳型として、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* に対する特異的プライマーセット、および、ポジティブコントロールとして *Sst* に対するプライマーセットを用いて半定量 RT-PCR を行った。*Gapdh* は内部標準。

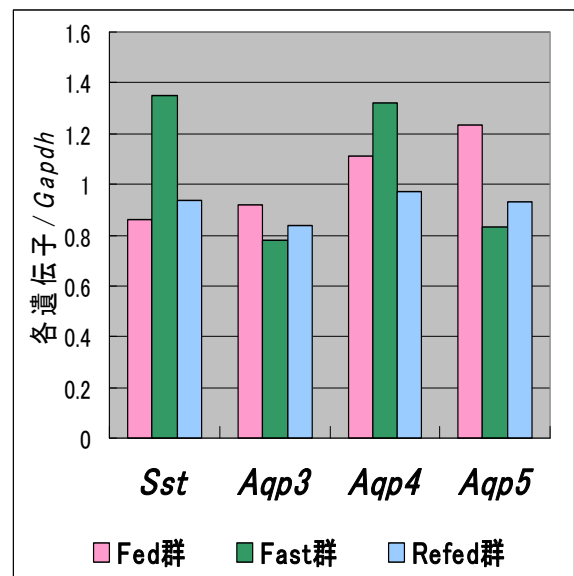


図5. 半定量 RT-PCR による摂食摂食時・絶食時の胃におけるアクアポリン遺伝子の発現解析の定量

摂食時(Fed群およびRefed群)、絶食時(Fast群)のマウス胃の全RNAを鋳型として行った半定量 RT-PCR の定量。各遺伝子の PCR 産物のバンド強度を *Gapdh* のバンド強度との比で表した。

一方、アクアポリン遺伝子では、摂食時(Fed 群および Refed 群)に対し、絶食時(Fast 群)において *Aqp3* および *Aqp5* の PCR 産物量が減少しており(図4, 図5)、*Aqp4* の PCR 産物量が増加していた(図4, 図5)。

このことから、摂食時(Fed 群および Refed 群)に対し、絶食時(Fast 群)に *Aqp3* および *Aqp5* の発現量が減少すること、および、*Aqp4* の発現量が増加することが示唆された。

4. 考 察

本研究の RT-PCR 解析によって、これまで胃における発現が報告されていなかった *Aqp2*、*Aqp7*、*Aqp8*、*Aqp9*、*Aqp11* および *Aqp12* の6サブタイプの発現が明らかとなった(図2)。胃にターゲットを絞ったこと、および、RT-PCR という感度の高い検出法を採用したことによって、これまで発現が報告されていなかったサブタイプの胃における発現が検出できたと考えられる。

一方、ISHにおいては、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* の3種のみがシグナルが検出されて、*Aqp1*、*Aqp2*、*Aqp7*、*Aqp8*、*Aqp9*、*Aqp11* および *Aqp12* の7種はシグナルが検出されなかった(図2)。シグナルが検出されなかった7種のサブタイプは、①*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* の3種に比べ、胃における発現量が少ないこと、②発現細胞が非常に少ないこと、もしくは、③今回、解析を行っていない胃の部位、例えば、噴門部などに発現していること、などが考えられる。

絶食実験において、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* の3種全てが摂食時・絶食時で発現量が変化することが示唆された(図4, 図5)。このことは、この3種のアクアポリンサブタイプが胃における消化において、何らかの機能を担っていることを示唆する非常に興味深い結果である。*Aqp5* は摂食時に発現量が増加しており、これは粘液分泌腺に共通して発現するという特徴と合わせて、消化時の幽門腺からの粘液分泌に AQP5 が関与することを示唆している。*Aqp3* は摂食時に発現量が増加しているが、摂食時の AQP3 の役割に関する他の知見はほとんどなく、更なる解析を行って、その機能を明らかにする必要がある。*Aqp4* はこれまで壁細胞に局在するという特徴から、摂食時の酸分泌に関与すると考えられてきたが(Wang, Komar *et al.* 2000; Carmosino, Procino *et al.* 2001; Huang, Tola *et al.* 2003; Carmosino, Procino *et al.* 2007)、本解析では絶食時に発現量が増加しており、壁細胞で酸分泌以外の機能に

関する可能性が示唆された。

5. 今後の課題

ISHにおいては、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* の3種のみしか発現細胞種を同定することが出来なかった。発現細胞の同定は各アクアポリンサブタイプの機能を類推する上で重要であり、今後、他の手法を用いて行う必要がある。いくつかのアクアポリンサブタイプについては特異的な抗体が入手可能なので、これを用いて、免疫組織染色を行うことが必要であると考えられる。

絶食実験では、興味深いことに、*Aqp3*、*Aqp4* および *Aqp5* の3種の発現量変化が観察された。今後は、同様の現象が他のアクアポリンサブタイプについても起こるのかを検討することが必要であろう。また、本解析では半定量 RT-PCR 法を用いたが、より定量性に優れたリアルタイム PCR などを用いて、詳細に発現量変化を検討する必要がある。

また、最終目標である胃における消化物塩濃度調節におけるアクアポリンの関与を明らかにするためには、塩濃度を可変した食餌の投与を行い、同様の解析を行う必要がある。解析対象としては、本研究の絶食実験で発現量変化が確認されたアクアポリンサブタイプが第1候補と考えられる。

文 献

- Bodis, B., G. Nagy, *et al.* (2001). "Active water selective channels in the stomach: investigation of aquaporins after ethanol and capsaicin treatment in rats." *J Physiol Paris* **95**(1-6): 271-5.
- Carmosino, M., G. Procino, *et al.* (2001). "Histamine treatment induces rearrangements of orthogonal arrays of particles (OAPs) in human AQP4-expressing gastric cells." *J Cell Biol* **154**(6): 1235-43.
- Carmosino, M., G. Procino, *et al.* (2007). "Trafficking and phosphorylation dynamics of AQP4 in histamine-treated human gastric cells." *Biol Cell* **99**(1): 25-36.
- Huang, Y., V. B. Tola, *et al.* (2003). "Partitioning of aquaporin-4 water channel mRNA and protein in gastric glands." *Dig Dis Sci* **48**(10): 2027-36.
- Ishimaru, Y., S. Okada, *et al.* (2005). "Two families of

- candidate taste receptors in fishes." Mech Dev **122**(12): 1310-21.
- Koyama, Y., T. Yamamoto, *et al.* (1999). "Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): C621-7.
- Matsuzaki, T., Y. Tajika, *et al.* (2003). "Immunolocalization of the water channel, aquaporin-5 (AQP5), in the rat digestive system." Arch Histol Cytol **66**(4): 307-15.
- Misaka, T., K. Abe, *et al.* (1996). "A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secretory cells of human stomach." FEBS Lett **381**(3): 208-12.
- Oike, H., T. Nagai, *et al.* (2007). "Characterization of ligands for fish taste receptors." J Neurosci **27**(21): 5584-92.
- Wang, K. S., A. R. Komar, *et al.* (2000). "Gastric acid secretion in aquaporin-4 knockout mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(2): G448-53.

No. 0745

Elucidation of the Role of Aquaporins in the Regulation of the Osmolality of Gastrointestinal Contents

Shinji Okada

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
the University of Tokyo

Summary

The salt in the body fluid is related to various activities of the body, and has the mechanism that strictly adjusts the osmolality. One of the main mechanisms is the absorption from the taken food. The adjustment of the salt level in digest is assumed to be performed mainly in the stomach. However, the mechanism of the adjustment is not clear.

In the stomach, it is suggested that aquaporins are related to the adjustment of the salt level of the digest. However, in the stomach, even the expression of aquaporins remains unknown. Then, we aimed to clarify the participation of aquaporins in the adjustment of the salt level of the digest in stomach.

RT-PCR experiments were performed using total RNA extracted from the murine stomach. As a result, the fragment of ten subtypes (*Aqp1*, *Aqp2*, *Aqp3*, *Aqp4*, *Aqp5*, *Aqp7*, *Aqp8*, *Aqp9*, and *Aqp11* and *Aqp12*) was amplified. *In situ* hybridization revealed the expression of *Aqp3* in the epithelial cell in the gastric body and the pyloric portion. Semi-quantitative RT-PCR revealed suggested that the expressions of *Aqp3* and *Aqp5* were decreased and that of *Aqp4* was increased in the fasting state.