

助成番号 0844

アクアポリン欠損マウスを用いたイオン恒常性維持に関する 食品・栄養科学的研究

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】 アクアポリン(AQP)は、細胞膜を介した物質輸送を担い、細胞の浸透圧維持、そして、消化、吸収、排出といった水が関与する生体活動の恒常性維持に深く関与する分子である。AQP11 は、精巣、肝臓、腎臓、さらには、胃、小腸などに発現しており、各細胞においては小胞体に局在する。AQP11 ノックアウト(KO)マウスは出生時より腎臓の近位尿細管細胞において小胞体に由来する空胞が生じ、その後皮質に多数の嚢胞が形成され、最終的に死に至る。このことから、AQP11 は生体にとって不可欠な分子だと考えられる。本申請研究では、AQP11 KO マウスを用いて、生体内イオン恒常性維持における AQP11 の役割を解析し、食物摂取の標的機能の一端を解明することを目的とする。

【方法】 1 週齢および 3 週齢の *Aqp11*^{+/+}、^{+/-}、^{-/-} マウスを用いた。3 週齢のマウスについては腎臓、肝臓、胃、空腸の薄切切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色、*in situ* ハイブリダイゼーション(ISH)、および免疫染色を行い、組織レベルで表現型を観察した。1 週齢のマウスについては、腎臓の薄切切片を用いて *Aqp* 遺伝子の ISH を行った。

【結果】 3 週齢の *Aqp11*^{-/-} マウスの腎臓、肝臓、胃、空腸について、組織形態、小胞体ストレス応答、細胞増殖、アポトーシスを観察したところ、腎臓以外の 3 臓器については野生型マウスとの差異は観察されなかった。

3 週齢の *Aqp11*^{-/-} マウスの腎臓について、水チャネル AQP ファミリー遺伝子の発現変動を解析したところ、トランスクリプトーム解析では *Aqp1* の発現が減少し、*Aqp2* および *Aqp3* の発現は増加していた。ISH では近位尿細管細胞における *Aqp1* の発現減少、集合管細胞における *Aqp2* 発現増加が観察された。

【考察】 腎臓以外の臓器において表現型の変化が起こっていないことが示され、AQP11 の生理的役割が腎臓と他の臓器とで大きく異なっていることが示唆された。今後は、*Aqp11*^{-/-} マウスの遺伝子発現プロファイルを臓器間で比較することで AQP11 の生理的役割解明の糸口となることが期待される。

Aqp11^{-/-} マウスにおいて水チャネルについて近位尿細管の機能不全を尿細管の他の部位で補完する発現変動が起きていることが示された。腎臓で物質の再吸収に関わる他のチャネル、トランスポーター群についても同様の発現変動が起きていることが示唆され、今後これらの遺伝子の発現解析が課題である。

1. 研究目的

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(AQP)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、細胞膜を介した物質輸送を担い、細胞の浸透圧維持、さらには、消化、吸収、排出といった水が関与する生体活動の恒常性維持に深く関与する分子である。

哺乳類アクアポリンの一つ AQP11 は、精巣、肝臓、腎臓などに発現しており、各細胞においては小胞体に局在する。AQP11 ノックアウト(KO)マウスは出生時より腎臓の近位尿細管細胞において小胞体に由来する空胞が生じ、その後皮質に多数の嚢胞が形成され、最終的に死に至る。このことから、AQP11 は生体にとって不可欠な分子だと考えられる。

申請者のグループは、最近、1 週齢 AQP11 KO マウス

の腎臓のトランスクリプトーム解析から、その囊胞形成機構の一端を明らかにしつつある。さらに、AQP11 KO マウス腎臓においてイオン輸送を担う分子群の発現が変動していること、また、RT-PCR 発現解析によって、胃および小腸においても AQP11 が発現していることを見出した。これらの結果から、AQP11 は吸収から排出に至る過程で、生体のイオン恒常性維持に重要な分子であることが強く提示された。とくに、小胞体に局在する AQP11 の欠損が形質膜で機能するイオン輸送分子の発現に影響を与えていることは興味深く、食品科学・栄養科学の新しい研究分野を拓きつつある。

本申請研究では、AQP11 KO マウスを用いて、生体内イオン恒常性維持における AQP11 の役割を解析し、食物摂取の標的機能の一端を解明することを目的とする。

2. 研究方法

2.1 実験動物

Aqp11^{+/+} マウス (Morishita *et al.*, 2005) は、C57BL/6J マウスに対し 10 世代以上バッククロスしたものを自治医科大学石橋賢一教授より分与いただいた。^{+/+} マウスの状態で継代し、*Aqp11*^{+/+} マウスは ^{+/+} マウス同士を掛け合わせて作出した。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 *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 *et al.*, 2005; Oike *et al.*, 2007) に従った。具体的な操作は以下に述べる。

2.1.2 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、臓器を摘出した。氷冷した PBS 中で洗浄し、4% paraformaldehyde (PFA) / PBS 中、一晚 4°C で固定した。その後、30% Sucrose / PBS で不凍処理し、Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetech) 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。

2.2.2 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 10 μm 厚に薄切し、切片は MAS コートスライドガラス (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。

2.2.3 ジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プローブの作製

pBluescript II SK-ベクター (Stratagene) に挿入した cDNA 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。

2.2.4 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% 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 μg/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 μg/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 μg/ml 変性サケ精巢 DNA, 250 μg/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 1,000 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 MgCl₂) 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 Fluoromount (Sigma) 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. 2. 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. 3 免疫組織染色

上記2. 2. 1、2. 2. 2と同様に作製した薄切切片を用いた。凍結切片をドライヤーを用いて常温に戻し、Taget Retrieval Solution (DAKO) 中 10 分 95°C で保温し、10 分自然冷却した。正常血清で 1 時間ブロッキング後、抗 Ki-67 抗体 (1 : 1,000, SantaCruz) もしくは抗 cleaved caspase-3 抗体 (1 : 400, Cell Signaling) を一晩 4°C で反応させた。二次抗体としてビオチン標識抗 IgG 抗体 (Vector) を使用し、ABC kit (Vector) および Metal enhanced DAB (Pierce) を用いて発色を行った。ヘマトキシリンで対比染色後、封入剤 Fluoromount (Sigma) とカバーガラス (Matsunami Glass) を用いて、プレパラートを作製した。観察は上記2. 2. 5と同様に行った。

3. 研究結果

3. 1 *Aqp11* KO マウス各臓器の表現型解析

マウスの各臓器における *Aqp11* 遺伝子の発現については、ノーザン解析によって腎臓、肝臓、精巣に発現していることが報告されている (Morishita *et al.*, 2005)。また、我々は RT-PCR によって胃および小腸においても *Aqp11* 遺伝子が発現していることを明らかにした。一方、*Aqp11*^{-/-} マウスの表現形について解析、報告されているのは腎臓のみであり (Morishita *et al.*, 2005)、他の臓器での表現型は明らかではない。そこで、*Aqp11* 遺伝子が発現している各臓器について *Aqp11*^{-/-} マウスにおける表現型を解析し、*Aqp11* 欠損の影響を検討した。

3. 1. 1 *Aqp11* KO マウス各臓器の組織形態解析

3 週齢の *Aqp11*^{+/+}、^{+/+}、^{-/-} マウスの腎臓、肝臓、胃、空腸について薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織の形態を観察した (図 1)。腎臓については、既に報告されているように *Aqp11*^{-/-} マウスにおいて顕著な嚢胞の形成が観察された (図 1C)。一方、^{+/+} マウスでは腎臓の組織形態について^{+/+} マウスとの差異は観察されなかった (図 1A, B)。肝臓については、^{+/+} マウス、^{+/+} マウス、^{-/-} マウスの三者間で組織形態の違いは観察されな

った (図 1D-F)。胃、空腸については、^{+/+} マウスと ^{-/-} マウスの間で胃腺、絨毛・陰窩の長さに違いは見られたが、それぞれの臓器を構成する各細胞種の比率や細胞の形態には違いは観察されなかった (図 1G, I, J, L)。^{+/+} マウスと ^{-/-} マウスの間では差異は観察されなかった (図 1G, H, J, K)。

3. 1. 2 *Aqp11* KO マウス各臓器における小胞体ストレス応答の解析

ヘマトキシリン・エオジン染色によっては *Aqp11*^{-/-} マウス腎臓以外で顕著な組織形態変化は観察されなかったが (図 1)、*Aqp11*^{-/-} マウスでは腎臓の近位尿細管細胞で見られるような小胞体の膨張が、野生型マウスにおいて *Aqp11* 遺伝子を発現している細胞で起きている可能性がある。そこで、小胞体の膨張を検出するため小胞体ストレス応答のマーカである小胞体シャペロン *Hspa5* (*Gpr78*) の発現解析を行った。

3 週齢の *Aqp11*^{+/+}、^{+/+}、^{-/-} マウスの腎臓、肝臓、胃、空腸の薄切切片に対して、*Hspa5* プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Aqp11*^{+/+} マウス、^{+/+} マウスでは腎臓全体で全くシグナルが観察されないのに対し (図 2A, B)、^{-/-} マウス腎臓では嚢胞の周辺の小胞体が膨張した近位尿細管細胞において非常に強いシグナルが観察され、この細胞において小胞体の膨張に伴って小胞体ストレス応答が起きていることが示された (図 2C, D)。一方腎臓以外の臓器、肝臓、胃、空腸では、^{+/+} マウス、^{+/+} マウス、^{-/-} マウスのいずれにおいてもシグナルは全く観察されなかった (data not shown)。*Aqp11* 欠損によっても、これらの臓器の細胞では小胞体ストレス応答を伴う小胞体の膨張が引き起こされることが示唆された。

3. 1. 3 *Aqp11* KO マウス各臓器における細胞増殖の解析

我々は最近、1 週齢の *Aqp11*^{-/-} マウス腎臓の近位尿細管細胞では、嚢胞形成の要因の一つだと考えられる細胞増殖の活性化が起きていることを明らかにした (Okada *et al.*, 2008)。そこで、嚢胞形成後の *Aqp11*^{-/-} マウスにおける細胞増殖の活性化について検討するため、3 週齢の *Aqp11*^{-/-} マウス腎臓を用いて抗 Ki-67 抗体染色を行った。また、肝臓、胃、空腸における細胞増殖についても観察を行った。

Aqp11^{+/+} マウス腎臓の尿細管細胞においては細胞内

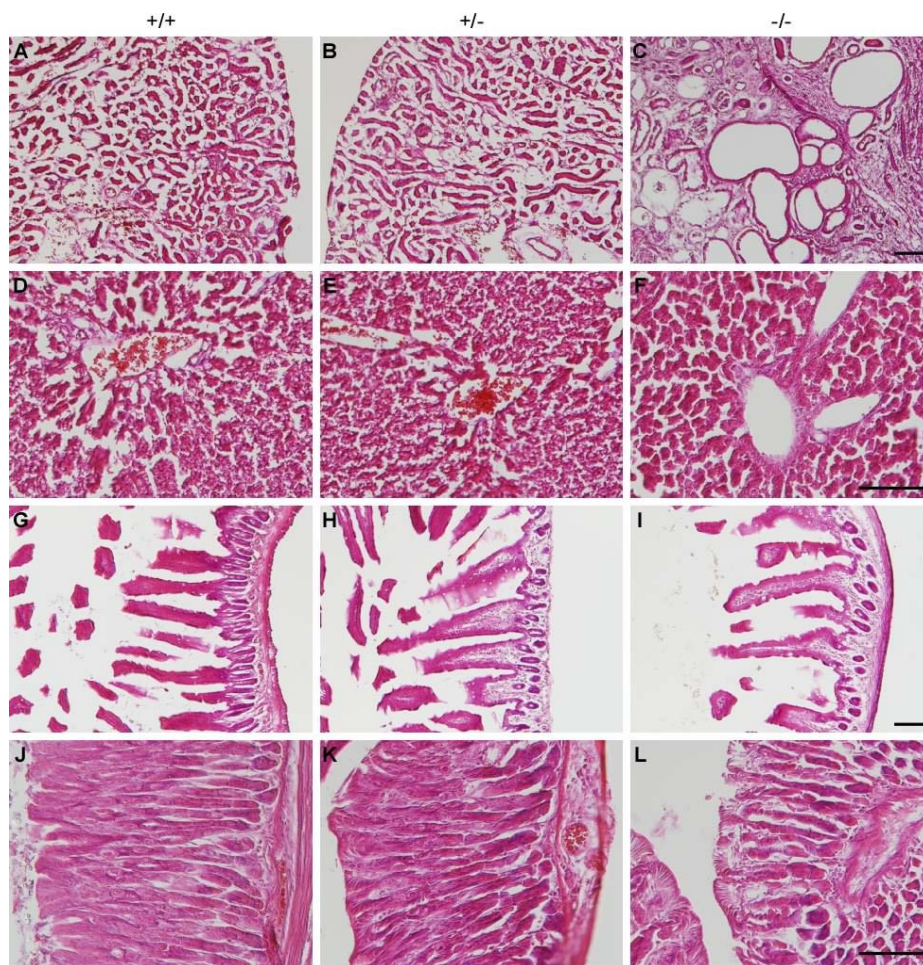


図1. $Aqp11^{+/+}$ 、 $+/+$ 、 $-/-$ マウス臓器のヘマトキシリン・エオジン染色像。 $Aqp11^{+/+}$ マウス(A, D, G, J)、 $+/+$ マウス(B, E, H, K)、 $-/-$ マウス(C, F, I, L)の腎臓(A - C)、肝臓(D - F)、空腸(G - I)、胃(J - L)の薄切切片をヘマトキシリン・エオジン染色した。スケールバーは100 μm 。

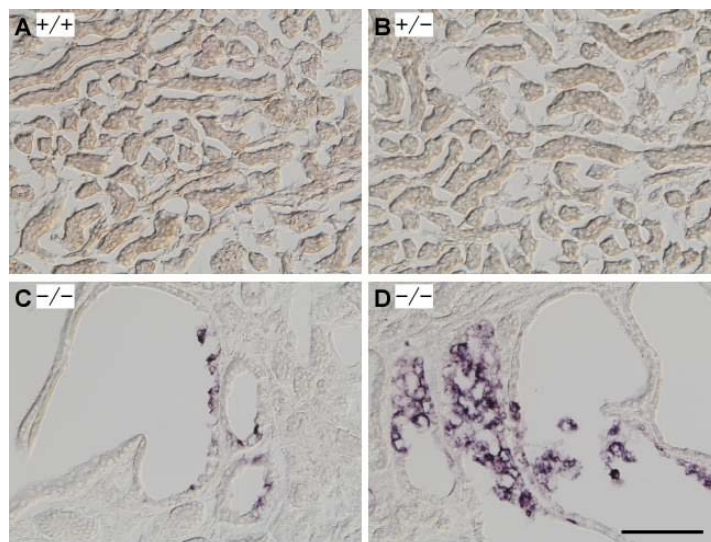


図2. $Aqp11^{+/+}$ 、 $+/+$ 、 $-/-$ マウス腎臓におけるHspa5 mRNAの発現。 $Aqp11^{+/+}$ マウス(A)、 $+/+$ マウス(B)、 $-/-$ マウス(C, D)の腎臓の薄切切片に対してHspa5プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った(青紫)。スケールバーは100 μm 。

の核が染色された Ki67-immunoreactive (IR) 細胞は数十細胞に1細胞程度の頻度なのに対し(図 3A)、*Aqp11*^{-/-} マウス腎臓の嚢胞周辺の細胞は約半数程度が Ki-67IR 細胞であった(図 3B)。一方、肝臓、胃、空腸では *Aqp11*^{+/+} マウスと *Aqp11*^{-/-} マウスとの間で陽性細胞の頻度、分布に違いは見られなかった(図 3C - H)。

3. 1. 4 *Aqp11* KO マウス各臓器におけるアポトーシスの解析

我々は最近、1 週齢の *Aqp11*^{-/-} マウス腎臓の近位尿細

管細胞では、アポトーシスが活性化しており、それが嚢胞形成の要因の一つであることを示唆した(Okada *et al.*, 2008)。そこで、嚢胞形成後の *Aqp11*^{-/-} マウスにおけるアポトーシスの活性化について検討するため、3 週齢の *Aqp11*^{-/-} マウス腎臓を用いて抗 cleaved caspase-3 抗体染色を行った。また、肝臓、胃、空腸におけるアポトーシスについても観察を行った。

Aqp11^{+/+} マウス腎臓の尿細管細胞においては陽性細胞は観察されなかった(図 4A)。*Aqp11*^{-/-} マウス腎臓の尿

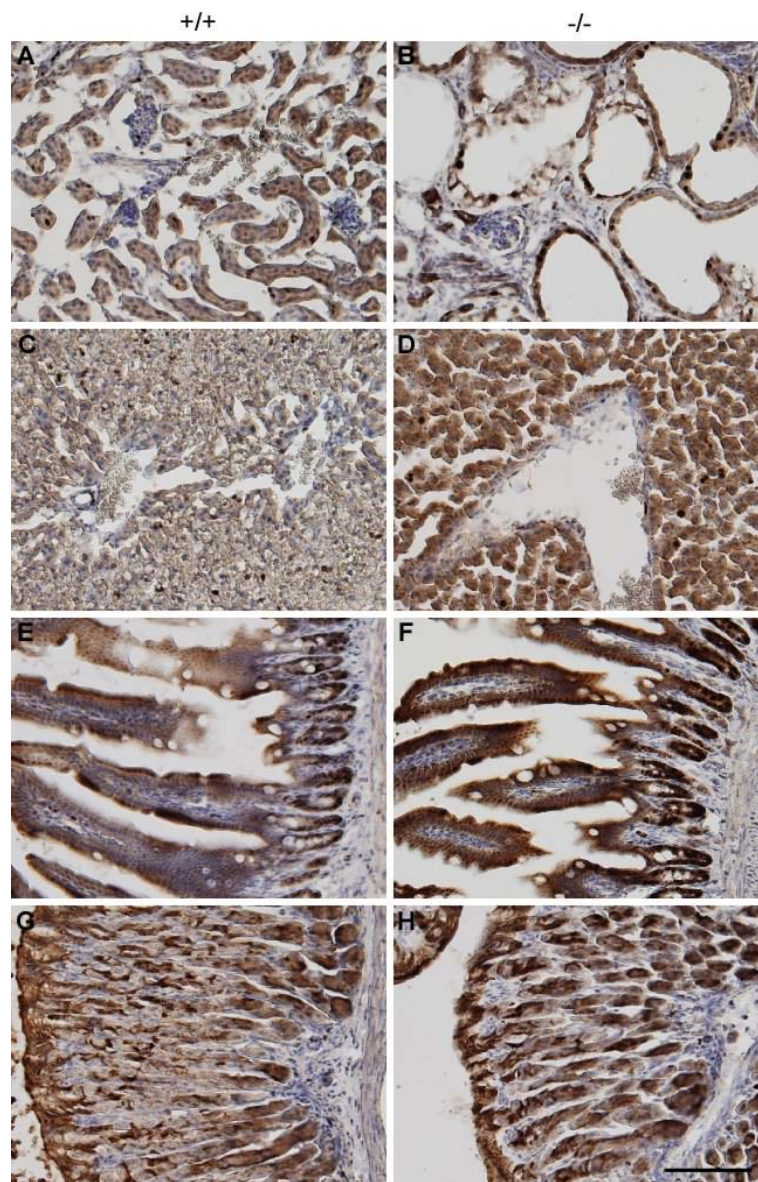


図 3. *Aqp11*^{+/+}、^{-/-} マウス臓器の抗 Ki-67 抗体染色像。*Aqp11*^{+/+} マウス(A, C, E, G)、^{-/-} マウス(B, D, F, H)の腎臓(A, B)、肝臓(C, D)、空腸(E, F)、胃(G, H)の薄切切片を抗 Ki-67 抗体を用いて染色した後(茶褐色)、ヘマトキシリンを用いて対比染色した(青)。スケールバーは 100 μ m。

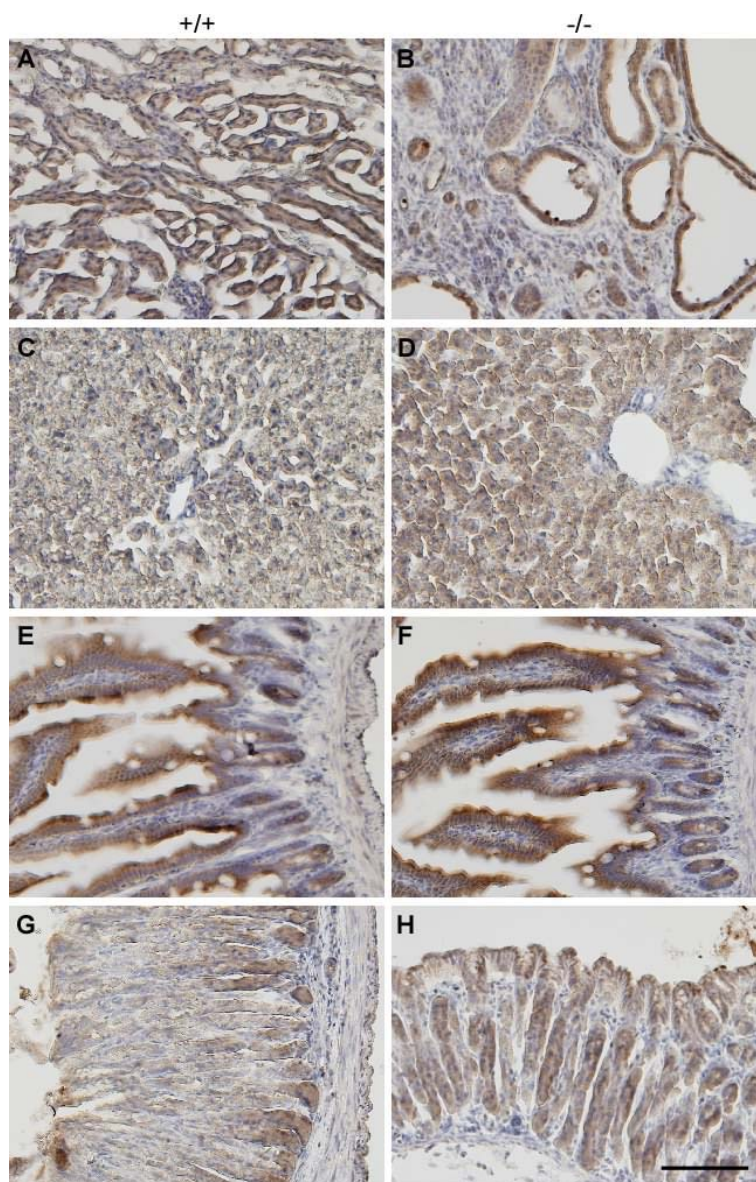


図4. $Aqp11^{+/+}$ 、 $^{-/-}$ マウス臓器の抗 cleaved caspase-3 抗体染色像。 $Aqp11^{+/+}$ マウス(A, C, E, G)、 $^{-/-}$ マウス(B, D, F, H)の腎臓(A, B)、肝臓(C, D)、空腸(E, F)、胃(G, H)の薄切切片を抗 cleaved caspase-3 抗体を用いて染色した後(茶褐色)、ヘマトキシリンを用いて対比染色した(青)。スケールバーは 100 μm 。

細管でもほとんど陽性細胞は観察されなかったが、囊胞の細胞のごく少数にシグナルが観察された(図 4B)。陽性細胞の頻度は1週齢の $Aqp11^{-/-}$ マウス腎臓の近位尿細管細胞に比べ(Okada *et al.*, 2008)、低いものであった。一方、肝臓、胃、空腸では $Aqp11^{+/+}$ マウスと $Aqp11^{-/-}$ マウスといずれにおいても陽性細胞は観察されなかった(図 4C-H)

3.2 $Aqp11$ KO マウス腎臓におけるアクアポリン水チャネル遺伝子の発現解析

我々は最近、1週齢 $Aqp11$ KO マウスの腎臓のトランス

クリプトーム解析から、その囊胞形成機構の一端を解明した(Okada *et al.*, 2008)。本研究では、取得したトランスクリプトームデータをより詳細に解析した。

$Aqp11$ が含まれるアクアポリンファミリーの遺伝子について発現変動を解析したところ、 $Aqp11$ 以外に $Aqp1$ 、 $Aqp2$ 、 $Aqp3$ の3遺伝子が $Aqp11^{-/-}$ マウス腎臓において有意に発現変動していた(表 1)。 $Aqp1$ の発現量は $Aqp11^{-/-}$ マウスにおいて減少しており、 $Aqp2$ および $Aqp3$ の発現量は増加していた(表 1)。

表 1. *Aqp11*^{-/-} マウス腎臓におけるアクアポリン遺伝子の発現

Gene Symbol	Probe Sets ID	FDR <i>q</i> -value	Ratio (KO/WT)	normalized signal value (mean ± SD.)	
				WT	KO
Mip/Aqp0	(1421039_at)	-	-	7.3 ± 1.3	7.5 ± 1.7
	(1435447_at)	-	-	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.3
Aqp1	1416203_at	1.5E-04	0.56	4295.3 ± 379.2	2398.8 ± 386.0
Aqp2	1418903_at	3.5E-03	1.98	1729.0 ± 475.2	3418.1 ± 741.2
Aqp3	1450460_at	4.0E-02	1.17	838.6 ± 71.4	982.8 ± 99.1
Aqp4	1422007_at	NS	1.24	905.7 ± 166.8	1124.9 ± 170.3
	1422008_a_at	NS	1.30	623.3 ± 117.1	808.0 ± 343.5
	1434449_at	NS	0.85	588.6 ± 40.9	497.9 ± 109.1
Aqp4	1425382_a_at	NS	0.90	383.8 ± 45.5	344.2 ± 63.2
	1447745_at	NS	0.92	137.1 ± 14.4	126.0 ± 24.3
Aqp5	(1418818_at)	-	-	13.0 ± 3.2	12.8 ± 2.4
Aqp6	1441978_at	NS	1.05	408.1 ± 67.3	430.1 ± 79.6
	1447974_s_at	NS	1.04	173.2 ± 17.9	179.6 ± 37.2
Aqp7	1418848_at	NS	0.70	39.5 ± 13.2	27.7 ± 7.5
	1418849_x_at	NS	0.77	30.3 ± 12.0	23.3 ± 10.1
Aqp8	(1417828_at)	-	-	8.8 ± 2.4	8.6 ± 2.7
Aqp9	(1421605_a_at)	-	-	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1
	(1424011_at)	-	-	5.1 ± 0.6	4.9 ± 0.3
Aqp11	1436630_at	3.1E-08	0.05	149.2 ± 34.5	7.9 ± 1.8
	1457141_at	1.6E-07	0.18	192.3 ± 33.0	35.3 ± 5.9
	1429254_at	2.0E-06	0.03	249.3 ± 46.7	6.8 ± 0.3
	1447606_x_at	1.3E-03	0.32	22.3 ± 7.5	7.2 ± 2.7
	(1455846_at)	-	-	7.6 ± 2.2	5.4 ± 0.3
Aqp12	(1434464_at)	-	-	8.1 ± 0.9	7.7 ± 0.9

括弧: 腎臓において発現していないプローブセット

FDR *q*-value: Welch's *t*-test with Benjamini and Hochberg false discovery rate multiple testing correction ($q < 0.05$)

Ratio: *Aqp11*^{+/+} vs *Aqp11*^{-/-} 間での平均シグナル値の比率

有意に発現変化した遺伝子(赤)。NS: not significant.

これらの遺伝子発現変動がどのような細胞で起きているかを明らかにするため、3 遺伝子のプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。*Aqp1* のシグナルは *Aqp11*^{+/+} マウスでは近位尿細管に局在していた(図 5A)。*Aqp11*^{-/-} マウスでは同様に近位尿細管細胞においてシグナルが観察されたが、細胞内の小胞体が膨張した近位尿細管細胞ではシグナルが観察されない、もしくは、弱くな

っていた(図 5B)。*Aqp2* のシグナルは *Aqp11*^{+/+} マウスでは集合管細胞に局在していた(図 5C)。*Aqp11*^{-/-} マウスでも同様に集合管細胞においてシグナルが観察され、そのシグナル強度は *Aqp11*^{+/+} マウスに比べ非常に強いものであった(図 5D)。*Aqp3* の染色像については *Aqp11*^{+/+} マウスと *Aqp11*^{-/-} マウスとの間で明確な差異は認められなかった(data not shown)。

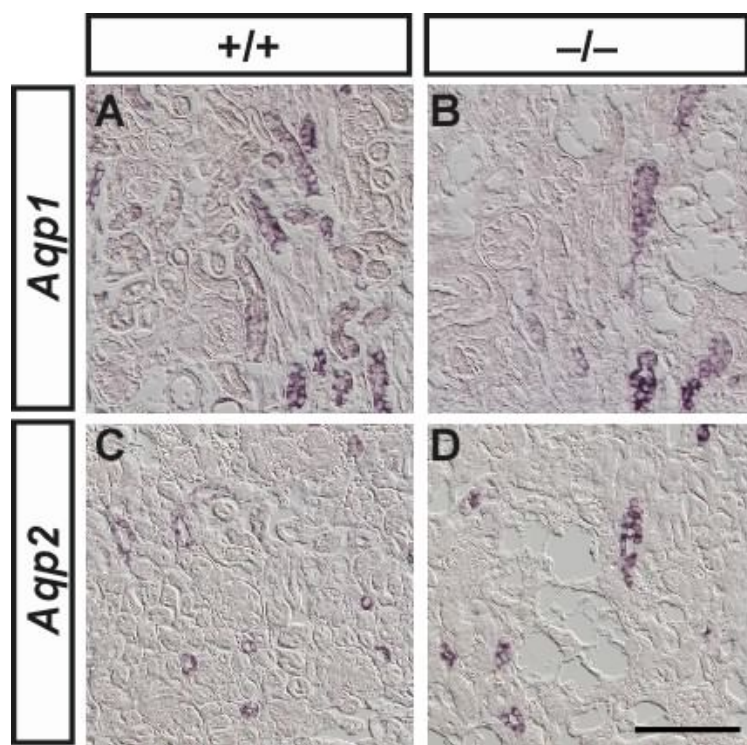


図5. *Aqp11*^{+/+} マウスと *Aqp11*^{-/-} マウスの腎臓尿細管におけるアクアポリン遺伝子の発現。1週齢の *Aqp11*^{+/+} (A, C) および *Aqp11*^{-/-} (B, D) マウスの腎臓切片に対し、*Aqp1* (A, B)、*Aqp2* (C, D) のプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った後 (dark blue)、nuclear fast red を用いて対比染色を行った (red)。皮質領域の拡大図を示した。Scale bar: 100 μ m.

4. 考察

4.1 *Aqp11* KO マウス各臓器の表現型について

本研究によって、*Aqp11* mRNA の発現量が半減している *Aqp11*^{+/+} マウスでは各臓器の表現型に変化が見られないことが示された。通常の飼育条件の場合は *Aqp11*^{+/+} マウスにおける発現量で十分に各発現細胞で要求される生理的役割を果たしていることが示唆された。

予想に反し、*Aqp11*^{-/-} マウスにおいて腎臓以外の臓器では表現型の変化が見られなかった。ノーザン解析では腎臓よりも肝臓の方が *Aqp11* mRNA の発現量が多いことが示唆されていたが、肝臓においても今回解析した範囲では *Aqp11*^{+/+} マウスとの違いは全く観察されなかった。これらの臓器において表現型が見られない理由は今のところ不明であるが、このことを利用し、表現型に顕著な変化がある腎臓とその他の臓器の違いを解析する、例えば、*Aqp11*^{-/-} マウスにおける肝臓の遺伝子発現変動を解析することなどによって、AQP11 の生理的役割を解明する糸口になると期待される。

4.2 *Aqp11* KO マウス腎臓におけるアクアポリン水チャネルの発現変動について

Aqp11^{-/-} マウス腎臓では *Aqp1* の発現量は減少しており、*Aqp2* および *Aqp3* の発現量は増加していた (表 1)。*Aqp1* の発現量の減少の原因としては、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果から小胞体の膨張に伴い近位尿細管細胞の総合的な細胞機能障害、もしくは、脱分化が起こり、*Aqp1* mRNA の転写量が減少したのだと考えられる。同様に腎臓に嚢胞が形成される嚢胞腎症 (polycystic kidney disease) における嚢胞形成時に尿細管の脱分化が観察されていること、我々が行った *Aqp11*^{-/-} マウス腎臓のトランスクリプトーム解析において分化に関わる遺伝子の発現変動が顕著なこと (Okada *et al.*, 2008) から *Aqp1* の発現量減少の原因としては近位尿細管細胞の脱分化の可能性が高いと推察される。*Aqp2* および *Aqp3* の発現量が増加していたことは、近位尿細管において細胞機能不全 (AQP1 発現量減少) による水の再吸収能低下が起き、集合管において水再吸収量の補完を行っていることを示唆している。

*Aqp3*よりも*Aqp2*の発現変動が大きいこと、また、集合管に発現する他のアクアポリン遺伝子の発現量には変化が見られないことは、集合管の水再吸収において主要な役割を担うのはAQP2, AQP3であり、中でもAQP2が最も重要な分子であることを示していると考えている。

現時点では、腎臓で各種の物質の再吸収を担うチャネル、トランスポーターの発現変動については、アクアポリン以外の遺伝子について十分な検討はできていないが、アクアポリンと同様に近位尿細管の機能不全を尿細管の他の部位で補完する発現変動が起きていると予想される。

5. 今後の課題

先に述べたように *Aqp11*^{-/-} マウスにおける肝臓の遺伝子発現変動の解析を行うことが、AQP11の生理機能解明の糸口になると考えられる。また、*Aqp11*^{-/-} マウス腎臓のトランスクリプトーム解析において腎臓で各種の物質の再吸収を担うチャネル、トランスポーターの発現変動について詳細に解析し、尿細管の機能補完機構を明らかにしたい。

参考文献

- Ishimaru, Y., Okada, S., Naito, H., Nagai, T., Yasuoka, A., Matsumoto, I., and Abe, K. (2005). Two families of candidate taste receptors in fishes. *Mech. Dev.* 122, 1310-1321.
- Morishita, Y., Matsuzaki, T., Hara-chikuma, M., Andoo, A., Shimono, M., Matsuki, A., Kobayashi, K., Ikeda, M., Yamamoto, T., Verkman, A., *et al.* (2005). Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7770-7779.
- Oike, H., Nagai, T., Furuyama, A., Okada, S., Aihara, Y., Ishimaru, Y., Marui, T., Matsumoto, I., Misaka, T., and Abe, K. (2007). Characterization of ligands for fish taste receptors. *J. Neurosci.* 27, 5584-5592.
- Okada, S., Misaka, T., Tanaka, Y., Matsumoto, I., Ishibashi, K., Sasaki, S., and Abe, K. (2008). Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation. *FASEB J.* 22, 3672-3684.

No. 0844

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

Aquaporins (AQPs) are a family of channel-forming membrane proteins that facilitate the transport of water and some low-molecular-weight solutes. They are suggested to be involved in the regulation of cellular osmolality and other important physiological activities. AQP11 is expressed in testis, liver, kidney, stomach, small intestine, etc.. We reported that *Aqp11*^{-/-} mice were fatal due to uremia resulting from a polycystic kidney. Interestingly, vacuoles were formed before cyst development. The vacuoles were derived from the endoplasmic reticulum (ER), where AQP11 is normally expressed. These results suggested the importance of AQP11. But the physiological roles of AQP11 still remain unknown.

To elucidate the phenotypes in the organs, kidney, liver, stomach and jejunum, of 3-weeks-old *Aqp11*^{-/-} mice, we investigated the tissue morphology, ER-stress-response, cell proliferation, and apoptosis using histochemical techniques. There were large histological differences in the kidney between *Aqp11*^{+/+} mice and *Aqp11*^{-/-} mice. In contrast, we could not find any histological difference in the liver, stomach and jejunum between *Aqp11*^{+/+} mice and *Aqp11*^{-/-} mice. This result suggested that the physiological roles of AQP11 were quite different between in the kidney and in the other organs.

We further analyzed the recently acquired gene expression profiles of the kidneys of 1-week-old *Aqp11*^{-/-} mice, and found that, except for *Aqp11*, three aquaporins, *Aqp1*, *Aqp2*, and *Aqp3*, were significantly changed. *Aqp1* was down-regulated, and *Aqp2* and *Aqp3* were up-regulated. *In situ* hybridization analyses confirmed that the expression of *Aqp1* was down-regulated in the proximal tubules and that of *Aqp2* was up-regulated in the collecting ducts. The lack of *Aqp11*, which is expressed in proximal tubules only, influenced the expression of aquaporins in collecting ducts as well as in proximal tubules.