

論文内容の要旨

論文提出者：

論文題目： Identification of a Novel Aquaporin, AQP12, Expressed in Pancreatic Acinar Cells
(膵臓腺房細胞に発現している新規 aquaporin (AQP12) の同定)

<要旨>

Aquaporin (AQP) は水チャネルは、様々な臓器に存在し、上皮細胞での水の透過に関与している。最近、水だけでなく、イオンなどの輸送にかかわる AQP も存在し、現在までに少なくとも 11 種類の AQP (AQP0-10) が哺乳類で発見されている。今回 BLAST サーチにより AQP12 を同定した。Northern blot により、AQP12 は膵臓にのみ存在する事が判明し、*in situ* hybridization や RT-PCR の結果により、膵臓の中でも膵臓腺房細胞に存在する事が判明した。AQP12 の細胞内局在と機能を解析するため、mouse AQP12 cDNA にタグをつけて、*Xenopus* oocyte や培養細胞に遺伝子導入して局在を調べた。免疫細胞染色の結果、mouse AQP12 は、細胞膜に発現を認めず、細胞内に局在した。膵臓の腺房細胞に存在する事、細胞内に局在する事から、AQP12 は、消化酵素分泌の調節、顆粒の成熟・放出に関与している事が示唆される。

<緒言>

膵臓は、消化臓器であると同時に外分泌臓器であり、人間では 1 日に消化酵素を含んだ膵液を、1 から 5 L の膵管に分泌している。膵臓の外分泌腺は、形態的・機能的に区別できる 2 種類の上皮細胞、腺房細胞と導管細胞で構成されている。腺房細胞は、消化酵素とクロライドイオンに富んだ溶液を産生し、導管細胞は、膵液・腸管の pH を調節するために、重炭酸イオンに富んだ溶液を産生している。腺房細胞と導管細胞はともに血漿の浸透圧と同程度の溶液を産生するので、膵液を腸管に分泌するにあたり、浸透圧勾配による水の移動は少量と考えられる。そのため、腺房細胞と導管細胞の基底膜・管腔側の水の透過性がかなり高いということが予想され、以前から AQP の関与が知られていた。また、外分泌臓器としての膵臓は、膵液を分泌する際、多量の水分の移動を必要とするために、AQP の研究は積極的に実施されてきた。Huybrechts は Northern blot で、膵臓に AQP1, 8 の存在を示した。AQP1 の発現は、腺房中心細胞の形質膜と導管細胞の基底側・管腔側の形質膜に、免疫組織染色によって確認されている。Cho らは、AQP1 が、分泌されたチモーゲン顆粒の細胞膜に存在して、消化酵素分泌に関与することを示した。松崎らは、AQP8 が、免

疫組織染色で、腺房細胞の管腔側近傍に発現することを示した。また、AQP5の発現が、介在部導管の管腔側近傍に認められている。しかし、これらAQPの発現場所は限られていること、多量の膵液の分泌を説明するには、まだ不十分である。したがって、膵臓ではまだ水輸送を担う未知のアクアポリンの存在が考えられる。

この論文では、新たなAQP、AQP12をクローニングし、それが膵臓の腺房細胞特異的に発現していることを証明している。

< 方法 >

human AQP12 cDNA を使用した BLAST サーチにより、human、mouse、rat の膵臓の EST クローンを同定した。これらのクローンをプローブとして使用し、全長 cDNA を、human、mouse cDNA ファージライブラリーから分離した。これは、新規の AQP と考えられ、AQP12 と命名した。mouse AQP12 cDNA の一部をプローブとして、mouse RNA dot blot (mouse の各臓器・胎芽 7-17days の mRNA が、それぞれリアソートにより固定されたメンブレンを使用) と、その結果陽性であった膵臓の Northern blot を実施した。膵臓内での発現部位を調べるために、mouse AQP12 cDNA exon 1 の一部をプローブとした *in situ* hybridization を実施した。また rat の膵臓の腺房細胞(腺房細胞・導管細胞・ラ氏島)に対して、RT-PCR を実施した。細胞内局在機能実験のために、mouse AQP12 cDNA の N 末あるいは C 末のどちらかにタグをつけて *Xenopus* oocyte に、遺伝子導入し、発現部位を確認した。また HEK293 細胞・COS-7 細胞に mouse AQP12 cDNA を、遺伝子導入した場合の局在を調べた。

< 結果 >

mouse、human AQP12 の cDNA の大きさは、それぞれ 1.24kb、1.1kb であり、open reading frame は、それぞれ 290、295 アミノ酸をコードし、推定タンパク質量は 31kDa と考えられた(GenBank accession number AB084104, AF040748)。

mouse RNA dot blot により、mouse AQP12 は膵臓での発現、胎生 7 日には、発現していない事が判明した。臓器の Northern blot では、予想通り、約 31kDa の single band を認めた。*In situ* hybridization は、腺房細胞で陽性だったが、導管細胞・ラ氏島では、反応がなかった。また RT-PCR では、腺房細胞で AQP12 の発現を認めたが、導管細胞、ラ氏島では発現が認めなかった。Mouse AQP12 cDNA の N 末、C 末のどちらかにタグをつけて、*Xenopus* oocyte に遺伝子導入して発現させた結果、mouse AQP12 は細胞内に局在した。また mouse AQP12 cDNA を、HEK293 細胞、COS-7 細胞に、遺伝子導入し、一過性に発現させた結果、mouse AQP12 は細胞内に局在した。

< 考察 >

今回新規に AQP12 を膵臓からクローニングした。AQP12 は膵臓腺房細胞に特異的に発現している事が、Northern blot、RT-PCR、*in situ* hybridization により判明した。*Xenopus* oocyte・HEK293 細胞や COS-7 細胞などの培養細胞に mouse AQP12 を発現させたが、形質膜には局在せず、電気生理学的検査を実施することが出来なかった。極性細胞である MDCK 細胞、LLC-K1 細胞に mouse AQP1 を発現させたが、mouse AQP12 は細胞膜には発現しなかった（データ未発表）。

AQP family の中で、多くの AQP が細胞形質膜に発現し、水の輸送に関与しているが、少数の AQP は、細胞膜タンパクとして機能していることが報告されている。AQP6 は、小胞体膜に存在し、小胞の酸性化に関与することが報告されている。また AQP1 は、膵臓の腺房細胞のチモーゲン顆粒膜に存在することが報告されている。

AQP12 が、膵臓の腺房細胞内に存在する事は、興味深い。膵液中の消化酵素は、腺房細胞の管腔側に存在するチモーゲン顆粒と呼ばれる分泌顆粒に貯蔵され、必要時に腺房細胞から分泌される。ER で合成された消化酵素は、ルン装置で凝縮顆粒と呼ばれる未成熟な分泌顆粒に、水分の多い状態で、パッケージされる。その後管腔側に向かいながら、容量を減少する成熟顆粒・チモーゲン顆粒となる。顆粒が形質膜に融合し、その内部の消化酵素を放出する時、顆粒は浸透圧性の腫大が必要と考えられている。未成熟な分泌顆粒がチモーゲン顆粒になる際に、容積が減少し、その内容が濃縮される過程については、はっきり判明されていない。チモーゲン顆粒が、管腔側の形質膜に融合した後、顆粒内の内容物が分泌されるのは、細胞内のカルシウムイオンの増加が、引き金となっており、その際チモーゲン顆粒は、急激に容積を増している。また分離されたチモーゲン顆粒は、その顆粒膜にクロライドイオンチャネルと ATP 感受性カリウムイオン選択性イオンチャネルを有し、GTP と NaF に反応して、急激に容積を増すことも判明している。これらのことから、チモーゲン顆粒の成熟・分泌には、水の輸送が重要な役割を果たしていることが考えられ、AQP12 の存在部位として、腺房細胞のチモーゲン顆粒膜は、重要な候補の一つである。AQP1 の遺伝子欠損モデルの膵臓での見解を微妙にすることから AQP12 が AQP1 と相補的な働きをしていることも考えらる。

< 結論 >

AQP12 をクローニングした。AQP12 は、膵臓の腺房細胞に特異的に発現し、*in vitro* の発現実験では、細胞内に局在した。