

## Reference for the summary of the paper's contents

参考

論文内容の要旨

Submitter's Name

論文提出者: ○ ○ ○ ○

### Thesis title

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)

### Abstract

<要旨>

Aquaporin (AQP) は水チャネルとして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、水チャネルは、イオン、糖、アルコール、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た。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、細胞内に存在し、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、消化酵素の分泌、顆粒の成熟・放出に関与している事が示唆される。

### Introduction

<緒言>

膵臓は、内分泌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、1~5L の管に分泌している。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、外分泌腺としての膵臓は、膵液を分泌する際、多量の水分子の移動を必要とする。そのため、AQP の研究は積極的に実施されてきた。Hudsonらは 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・小葉間導管の上皮細胞の基底側・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、

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、QP5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の発現箇所は限られていること、多量の唾液の分泌を説明するには、まだ不十分である。しかし、唾液にはまだ水輸送を担う未知のアクアポリンの存在が示唆されている。

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

## Materials and Methods

### <方法>

human AQP12 cDNA を使用した BLAST サーチにより、human、mouse、rat の唾液腺の 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固定されたメンブレンを使用) と、その結果陽性であった唾液腺の Northern blot を実施し、唾液腺内での発現部位を調べるために、mouse AQP12 cDNA の一部をプローブとした *in situ* hybridization を実施した。また rat の唾液腺細胞 (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 *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。

## Results

### <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、唾液腺での発現、胎生期には、発現していない事が判明した。唾液腺の Northern blot では、予期通り、約 31kDa の single band を認めた。In situ hybridization は、腺房細胞にのみ反応したが、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、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。

## Discussion

### <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、電気生理学的検査も実施し、この機能もなかった。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、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、ゴルジ装置で分泌顆粒と呼ばれる成熟な分泌顆粒に、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、容量を減少させ、成熟した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出す時、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（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、はっきり説明されていない。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担っていると考えられ、AQP12 の存在部位として、腺房細胞のチモーゲン顆粒は、水の補給の一つである。AQP1 の遺伝子欠損モデルの膵臓での観察、実験から AQP12 が AQP1 と相補的な働きをしていることも考えられる。

## Conclusions

### <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。