

消化器とAquaporin

小山 諭・Vladimir A. Valera・谷 達夫

野上 仁・北見 智恵

畠山 悟・畠山 勝義

新潟大学大学院消化器・一般外科

(主任：畠山勝義教授)

Aquaporins in Digestive Organs.

Yu KOYAMA, Vladimir A. VALERA,

Tatsuo TANI, Hitoshi NOGAMI, Chie KITAMI,

Satoru HATAKEYAMA and Katsuyoshi HATAKEYAMA

Division of Digestive and General Surgery,

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences.

(Director: Prof. Katsuyoshi HATAKEYAMA)

Abstract

In mammals, a family of water-selective channels, aquaporins (AQP0 ~ 10) has recently been identified and localized in various organs and tissues. In digestive organs, AQP1 and AQP3 were generally present from esophagus to colon. In contrast, AQP4 expression was selectively observed in the epithelium of lower stomach and small intestine and AQP8 in the epithelium of jejunum and colon. AQP8 mRNA expression was exclusive in the pancreas and liver. The wide distribution of AQP family members in digestive organs suggested their essential roles in water transport across plasma membranes of various cells, especially in epithelia of organs where marked water intake or outlet is presumed.

Key words: aquaporins, water channel, digestive organs, mRNA

Reprint requests to: Yu KOYAMA
 Division of Digestive and General Surgery
 Niigata University Graduate School of
 Medical and Dental Sciences
 1-757 Ashahimachi-dori,
 Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
 新潟大学大学院 消化器・一般外科 小山 諭

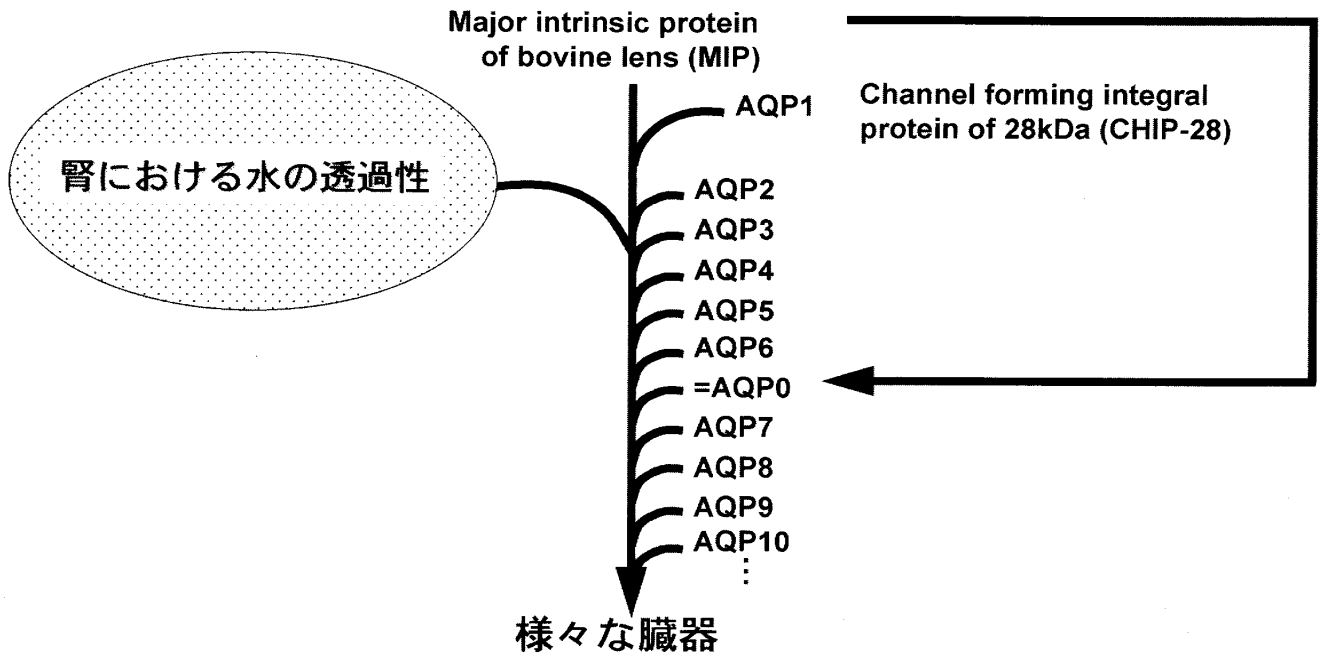


図1 Aquaporin 発現の歴史

はじめに

これまで、電解質、タンパク質、糖質などの様々な物質の細胞間の移動については、その移動に関わるトランスポーター、チャンネルやメカニズムに関する研究が行われてきた。水に関しては、様々な物質に対する溶媒としての認識が中心で、水がどのような経路を通して生体内で移動するかについてはあまり注目が集まらなかった。しかし約15年前に水を選択的に通過させるチャンネルの存在が明らかにされた。

水チャンネル (Aquaporin; AQP)

発見の推移 (図1)

1990年代に P. Agre らのグループが赤血球膜より 28kDa の分子量を有するチャンネル様膜蛋白を単離し Channel-like integrated protein of 28 kDa (CHIP-28) と名付け、さらに浸透圧勾配に従って水分子のみを通すチャンネルとしての機能を有することを発見¹⁾してから、水チャンネル (water channel) の研究は幕を開けた。CHIP-28

は後に Aquaporin1 (AQP1) と名前を改め、またそのアミノ酸構造として NPA box と呼ばれる Asn-Pro-Ala 配列が2ヶ所存在する特徴²⁾から、同配列をターゲットとした degenerate primer を用いた PCR クローニングにより、これまでにほ乳類においては11種類の AQP family が見つかった。AQP1 は血管内皮細胞、赤血球膜、腎尿細管上皮細胞など水の移動に関わる部位に最も広範に存在することが知られている²⁾。もともと腎には水を選択的に通過させるチャンネルの存在の可能性が考えられていたため、その後の研究は主に腎に注目して展開し、AQP2³⁾、AQP3⁴⁾⁻⁶⁾、AQP4⁷⁾⁸⁾、AQP6⁹⁾ は腎を中心にクローニングが行われてきた。また、以前にウシ水晶体より単離されていた MIP¹⁰⁾ も後に AQP family の一員であることが判り、AQP0 と名付けられた。腎以外にも水の移動に関係する臓器からのクローニングも行われ、唾液腺より AQP5¹¹⁾ が、精巣より AQP7¹²⁾ と AQP9¹³⁾ が見つかった。

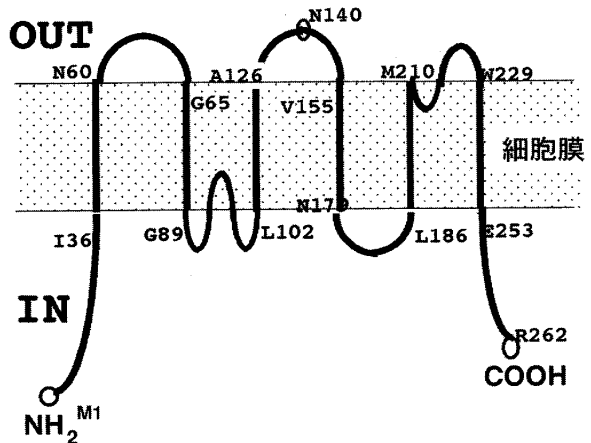
一方、消化器も水の移動が盛んに行われている臓器であり、脾からは AQP8¹⁴⁾ が、小腸からは AQP10¹⁵⁾ がそれぞれクローニングされた。

(A) cDNA配列

```

-164          GCAGAGTCTAGCGGACCAGTCTGAGTTCTGGAGTTAAGTGA
-60 GCACATCTCCCTCAGCTGGTGCAGCTCCTGGAGCTCTGACTCCCACCTCCGGAGCAGAT
  1 ATGTCGCGGGAGACGCCGATGTGTAGTATGGACCTACGTGAGATCAAGGGGAAGGAGACC
  1  M S G E T P M C S M D L R E I K G K E T
  61 AACATGGCTGACAGTTACCATGGCATGTCTGGTATGAGCAATACATACAACCGTGTGTG
  21 N M A D S Y H G M S W Y E Q Y I Q P C V
  121 GTGGAACCTTTTGGGCTCCGCTCTTCATCTTCATTTGGGTCTCTATCGGTCATCGGAAC
  41  V E L L G S A L F I F I G C L S V I E N
  181 AGTCCAAATACTGGGCTCCTGCAGCCTGCCCTGGCTCATGGCTGGCTGGGCTGCATC
  61  S P N T G L L L O P A L L A H G L A L L G L I
  241 ATTGTACCTTGGGGAACATCAGCGGTGGACACTTCAACCCCTGCTGTGTGCTGGCAGTC
  81  I A T L G N I S G G H F N P A V S L A V
  301 ACACCTGGTTGGAGGCCCTTAAGACCATGTCTGCTAAATCCCTACTGGGTCTCCAGCTGTTT
  101 T L V G G L K T M L L I P Y W V S O L F
  361 GGGGAATGATCGGAGCTGCCCTGGCTAAGGTGGTGTGAGTCCAGAGGAAGGTTCTGGAAAT
  121  G G M I G A A L A K V V S P E E R F W N *
  421 CGCTCGGGGACGCTTTGCCATAGTCCAGGACAGGAGCAGGTGGCAGAAAGCCCTGGGG
  141 A S G A A F A I V Q E Q E Q V A E A L G
  481 GTAGAGATCGTTATGACGATGCTGTGGTATTGGCTGTGTGTATGGTCCCGTCAATGAG
  161  V E I V M T M L L V L A V C M G A V N E
  541 AAGCAATGGGTCCCTAGCCCATTCCTCAATGGTTCCTGTCTATGTTGGATATCCTG
  181 K T M G P L A P F S I G F S V I V D I L
  601 GCAGGTGGTGGGATCTCTGGAGCCTGCATGAACCCCTGCTGTCCTTTGGACCTGCTGTG
  201  A G G G I S G A C M N P A R A F G P A V
  661 ATGGCTGGCTACTGGGACTTCCATTTGGATCTACTGGCTGGGCCCCACTCCTGGCTGGCCCTC
  221 M A G Y W D F H W I Y W L G P L L L A G L
  721 TTTGTGGACTGCTCATTAGCTCTTCATTGGAGATGAGAAAACCCGCTGATTCTAAG
  241  F V G L L I R L F I G D E K T R L I L K
  781 TCGAGGTGAAGAATCTCTGGCAGCATCCCACTGCTGGAGTCTCAGCTGTTTGTCTCTG
  261 S R *
  841 AGTTGAGGACAGGACAATTCATTATTTTCTGCAGGACCTGAGCTCAGAGGAGCCACTCT
  901 GACAGAGCAGACCTTGGCTGGCTTCCAGGAGGACAGGAGCTGCTGCTGCTGCTGAGC
  961 ATGCTCCTGGAACTCGGAACCTCTTGGCCCATGGACATGGGCTTGGGCCCCAGGCTAAA
  1021 GACATGTAGAGACCAATAGAAAAGGAGGACAGGTCTCTGTTCTTGGAGAAAGGGCAGG
  1081 ATGGAGAGCCGAGCAGGTGGGATGCGAGTGTCTAATGCACACTGTTCATTTTCCAGC
  1141 CCTCTTTCTTTTCTGCTGTGGGTTTGGAAACCCAGTCCATGCTACTAGGTGAGCACT
  1201 TTGCTACGGAGCCCTCTGTTCTCCCAACCCCTCTTCTGTTGGTTACACTGTTACAGAA
  1261 GGCTTTGAGGACCCAAAGATCTCTTGCCTTCCCACTGCAATCTGACTTTGT AATAA
  1321 ATGGCTTAGTGTCTCTGCAAAAAAARAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

(B) タンパク構造



推定分子量: 27.9 kDa

図2 AQP8の構造

AQP family の特徴²⁾

AQPの特徴は、分子量はおおよそ28～32kDaの蛋白質である。アミノ酸一次構造の特徴として前述したとおりNPA配列（あるいは類似した配列）を2カ所有しており、疎水性配列と親水性配列を交互に持ち、立体構造としては6回膜貫通型の膜蛋白質である。例として、我々がクローニングしたAQP8のcDNA/蛋白質配列を図2に示す¹⁴⁾。

生体膜では4つのチャンネル分子が結合した4量体として存在していると考えられている。基本的には水分子のみをエネルギー非依存性に通過させるチャンネルであるが、グリセロール/尿素なども通過させるfamily (AQP3, AQP7, AQP9, AQP10)も存在している。尚、AQP6はイオンを通す特殊性を有する¹⁶⁾。水透過性については、AQP蛋白質発現を行わせたGenopus oocyteを低張液に移した際のoocyteの膨張速度を測定することにより

水透過係数を算出する。図3にAQP8蛋白質発現を行わせたoocyteの低張液内での変化を示すが、急速にoocyteが膨張しやがて破裂していく様子が観察される。

AQPの水透過性はHg⁺により抑制されるが、さらにメルカプトエタノールなどの還元剤で回復することも特徴の1つである。図4にAQP8の水透過性を例示する¹⁴⁾。尚、例外としてAQP4はHg⁺の影響を受けない⁸⁾。

AQPの機能—疾患との関係

AQP1はほ乳類の生体で最も広範かつ豊富に存在・分布しているが、先天的にAQP1が欠損している家系の報告では正常人と比較し明らかな表現型の変化は認められなかった¹⁷⁾。しかし生理食塩水負荷などの条件下では先天性AQP1欠損では正常人に比し肺の血管透過性の低下があることが

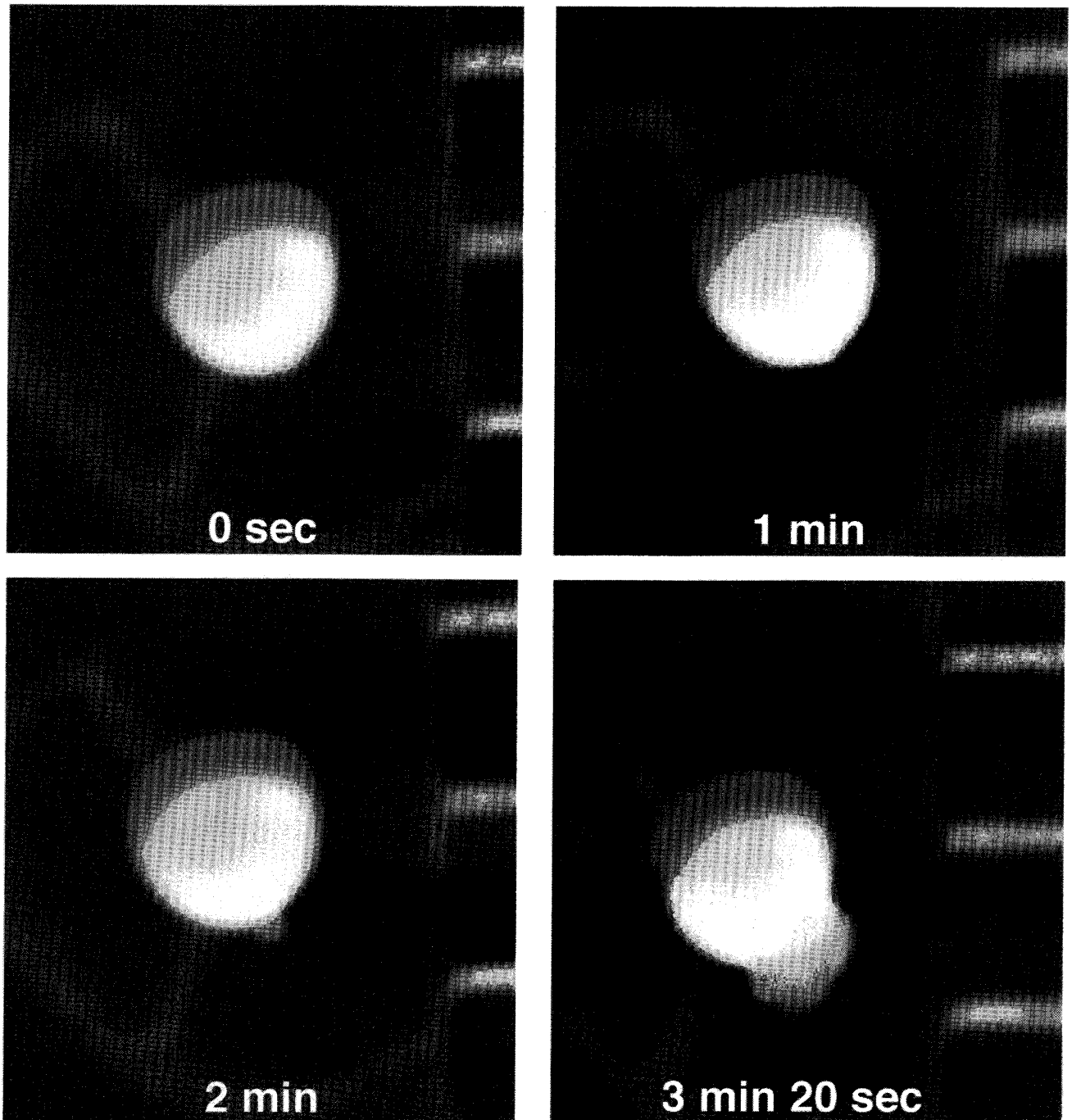


図3 AQP8発現卵の変化

示され¹⁸⁾, ラットの AQP1 ノックアウトモデルでは脱水などのストレス下では腎の尿濃縮力が低下することが示されている¹⁹⁾. AQP は様々な臓器に数種類が存在するため, 1 種類の AQP 欠損では他の AQP が欠損を補い得るために表現型に明らかな異常をきたすことは少ないものと考えられ

る. しかし, 腎集合管上皮細胞内腔側膜には AQP2 のみ存在するため, AQP2 欠損や変異は先天性尿崩症の原因となりうる²⁰⁾ し, AQP0 欠損は白内障の原因となることも示されている²¹⁾. 表1に現在までに示されている, あるいは想定されている AQP 異常と疾患との関連を示す.

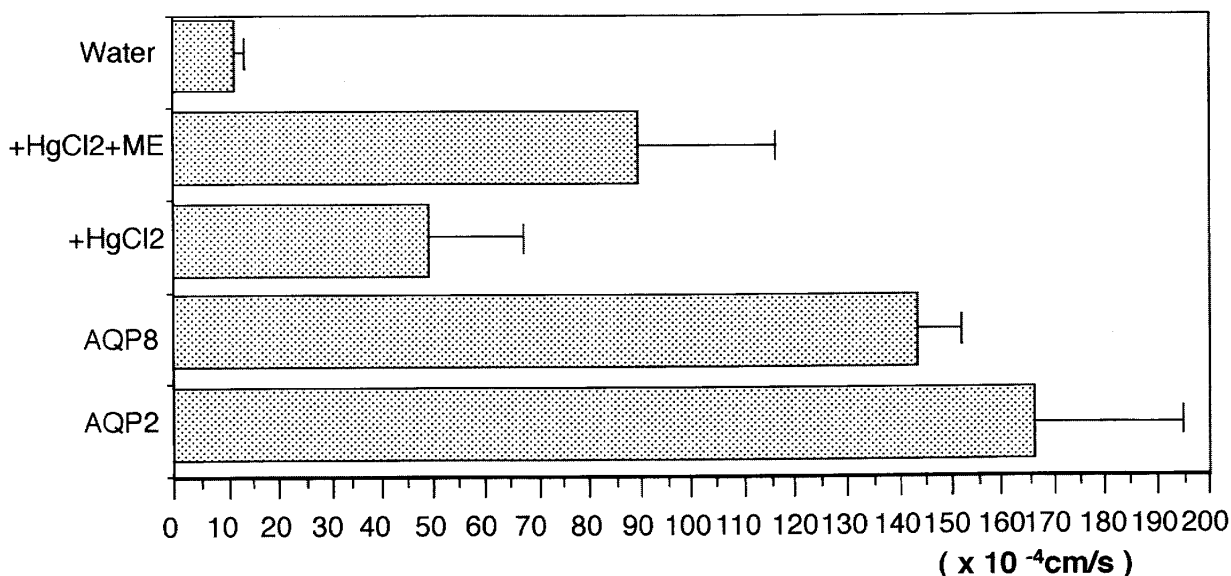


図4 AQPにおける水透過係数 (Pf)

表1 AQP異常と疾患

AQP欠損	疾患, 病態
AQP0	先天性白内障
AQP1	尿濃縮障害, 脂肪吸収障害
AQP2	腎性尿崩症
AQP3	皮膚異常乾燥
AQP5	シェーグレン症候群, 唾液腺分泌障害

消化器における AQP の発現・分布・局在

我々はこれまでにラット消化管・肝・膵などでの AQP の分布・局在を示してきた²²⁾。RNase protection assay の結果では, AQP1, AQP3 mRNA はラット消化管全般にわたり幅広く分布しているのに対し, AQP4 mRNA は胃と小腸に比較的限局して存在する。また, AQP8 はラット空腸と大腸, に限局して存在していた (図5)。

ラットの免疫組織化学による検討では, AQP1 は消化管全般にわたりリンパ管および毛細血管内皮細胞に存在していたが, 小腸および結腸では腸液腺の最下部の上皮細胞膜にも認められた (図6)。小腸では内腔側に存在するのに対し, 結腸では基底側膜に存在していた。食道上皮に存在する

のは AQP3 のみであり, 食道扁平上皮の基底部の細胞膜に全周性に認められ, さらに AQP3 は胃および小腸には認めないものの結腸では吸収上皮細胞の基底側膜に存在していた (図7)。AQP4 は食道および結腸には認めないものの胃および小腸に存在していた。胃では基底腺部の壁細胞の基底側膜に認めたが, 表層の上皮では認めなかった。また小腸では AQP1 と同様に腸液腺最下部の上皮細胞に存在したが, AQP1 と異なり, 基底側膜に存在した (図8)。AQP8 は食道, 胃には存在せず空腸および結腸の吸収上皮細胞の基底側膜に存在した。さらに AQP8 は膵腺房細胞の内腔側, および肝細胞表面にも発現していた (図9)。

消化器における AQP の機能

これまでに消化器における AQP の役割は明らかにされていない。我々は消化管における AQP の役割を推察するために, ラット小腸大量切除モデルを作成して検討を行った。体重 280g 前後の SD 雌性ラットを, 90%小腸切除を行った小腸大量切除群 (SB 群, n = 11), 空腸起始部より約 5cm の所で離断した後吻合した対照群 (C 群, n = 12) 及び正常群 (N 群, n = 4) の 3 群に分

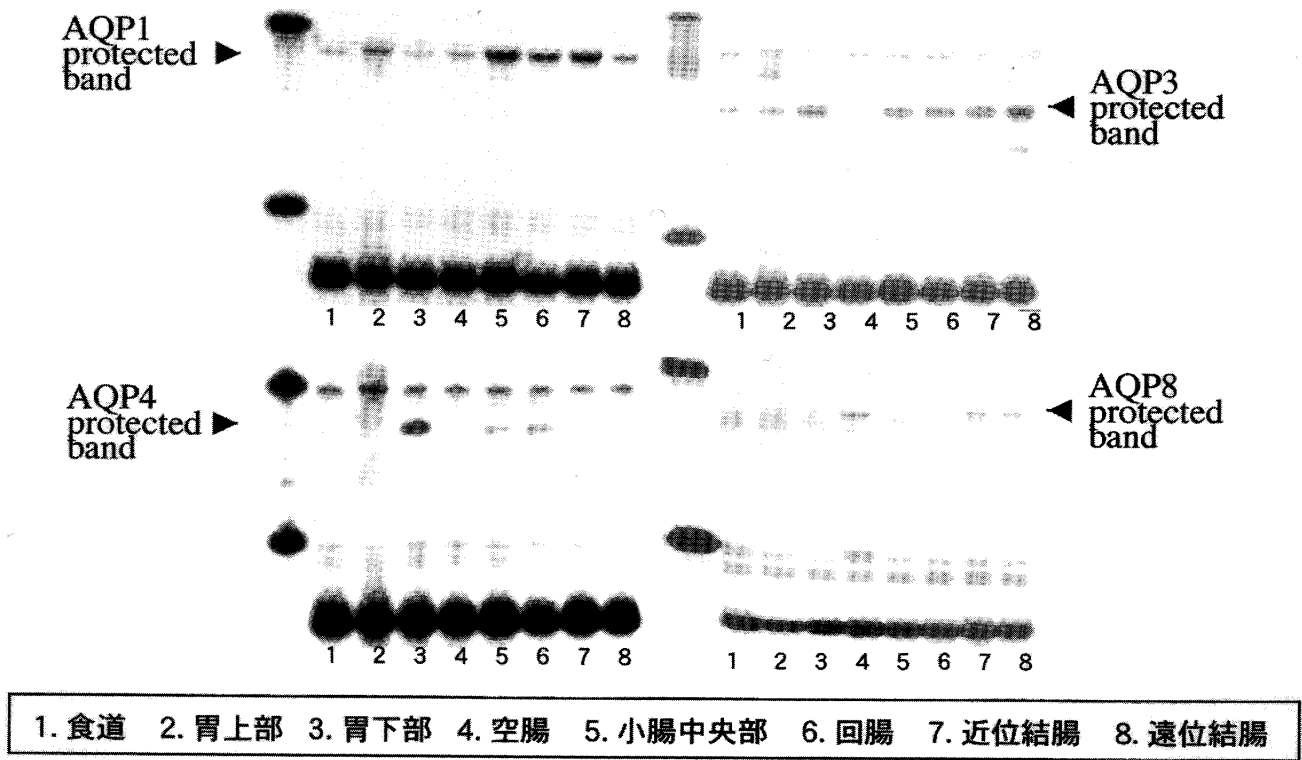


図5 ラット小腸における AQP mRNA の分布

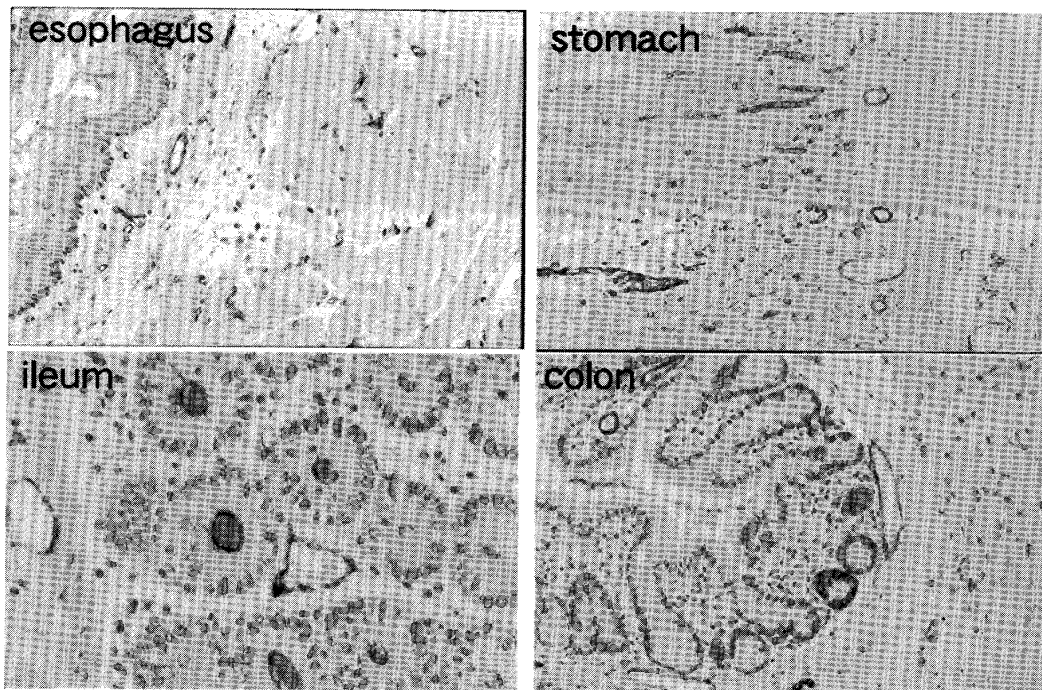


図6 ラット消化管における AQP1 の局在

け, AQP8 mRNA 発現の推移を Taqman 法を用いた定量的 RT-PCR で検討した. AQP8 mRNA は

空腸, 近位結腸, 遠位結腸において術後7日目に増加し, その後漸減しており (図10), AQP8 が術

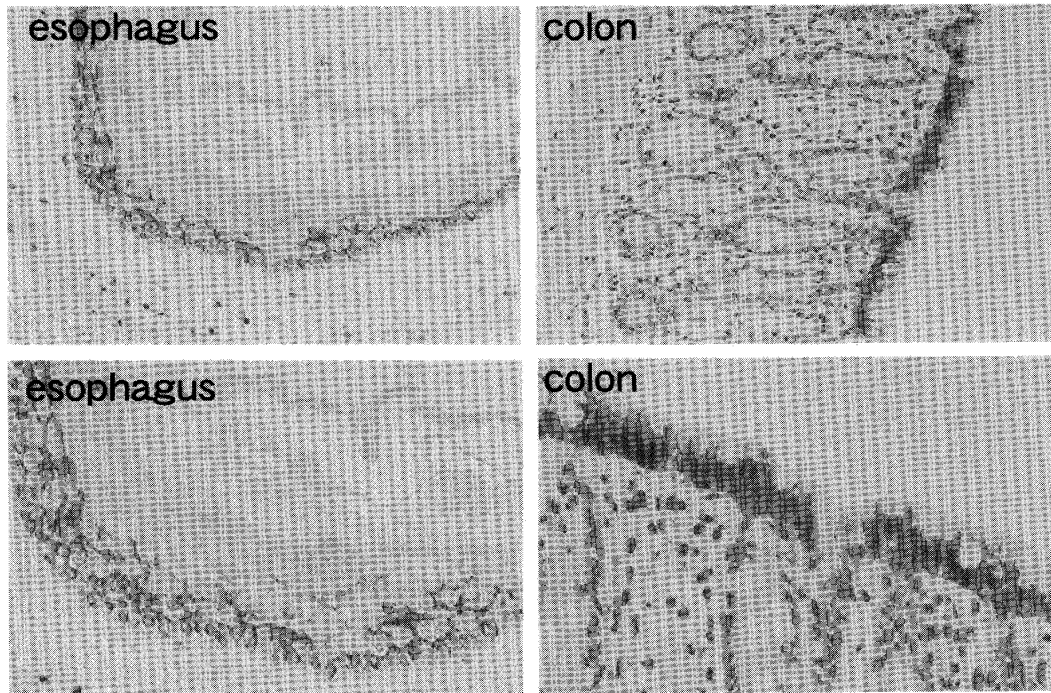


図7 ラット消化管における AQP3 の局在

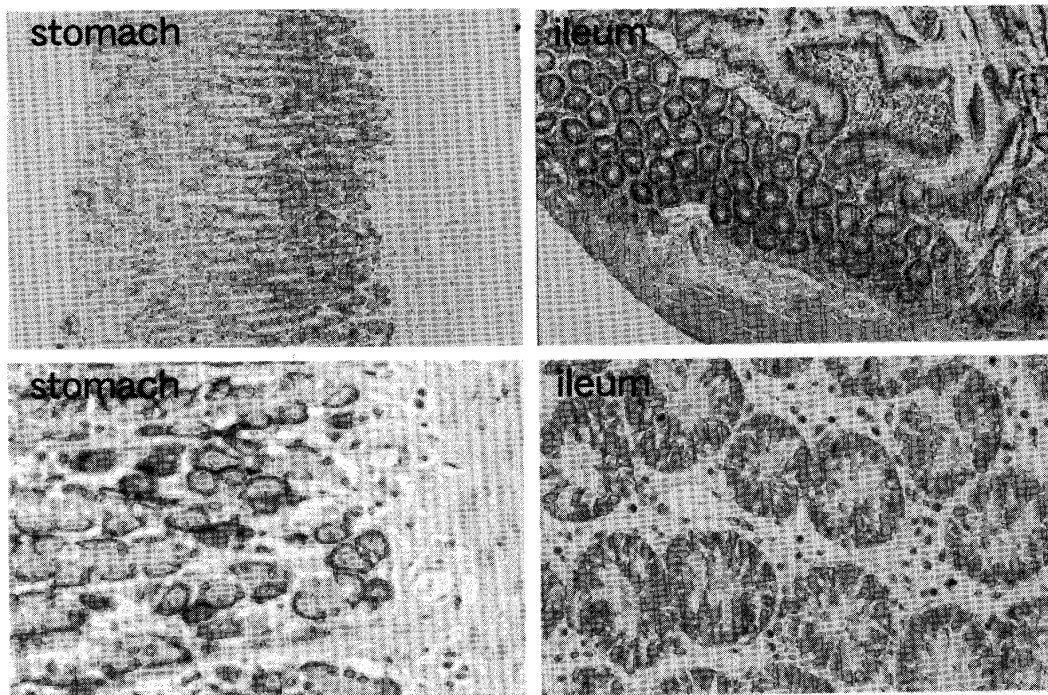


図8 ラット消化管における AQP4 の局在

後の水分吸収における順応に役立っている可能性が示唆された。

考 察

消化器における AQP 研究は現在までにあまり

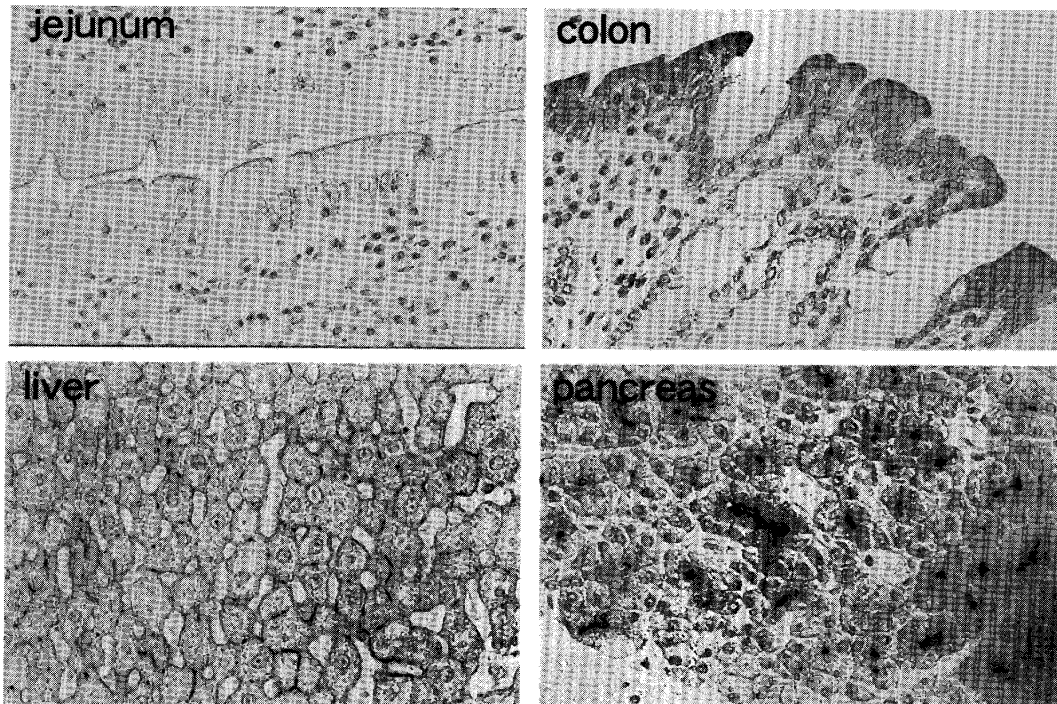


図9 ラット消化管におけるAQP8の局在

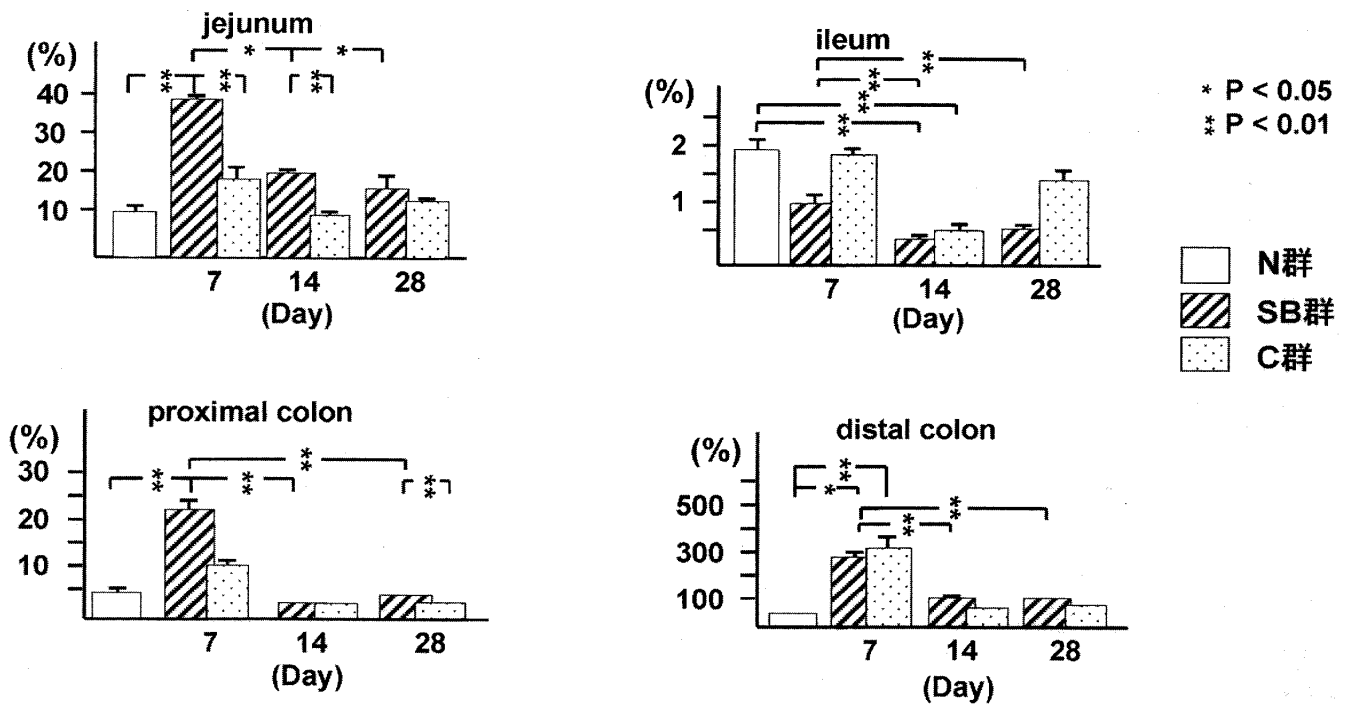
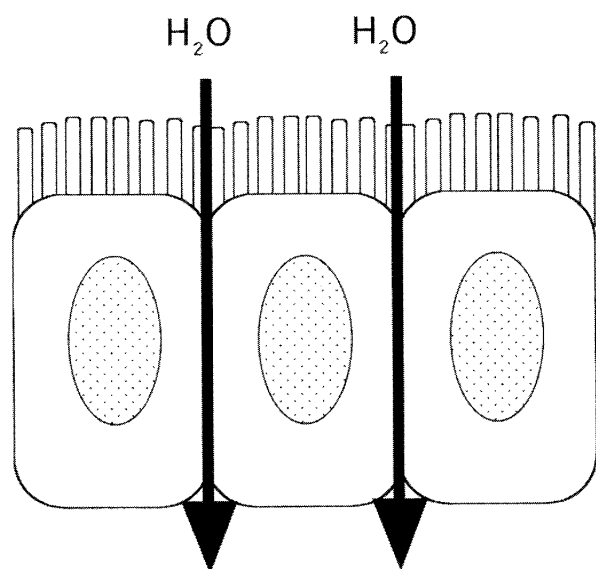


図10 小腸大量切除ラットにおける腸管AQP8 mRNA発現の変化

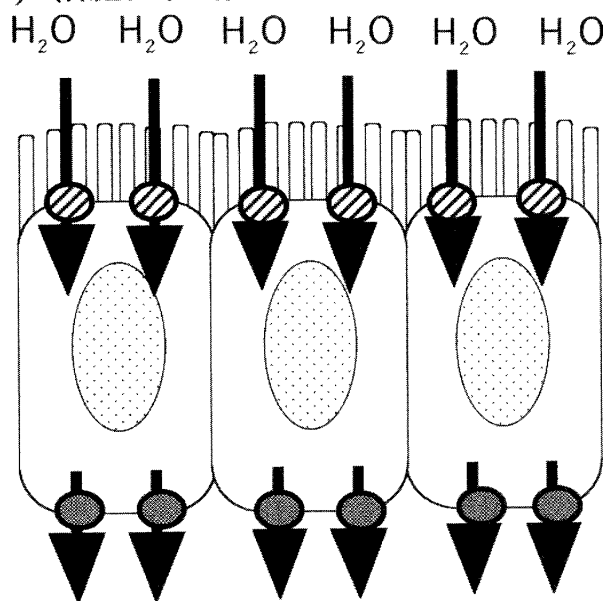
進んでいない。しかし、消化管・肝・膵などの消化器にも Aquaporin は確かに存在する。消化管に

おいてはこれまで図11Aに示すように、水は細胞と細胞の間隙を浸透圧勾配に従って移動する

(A) 細胞間経路



(B) 細胞内経路



 Aquaporins; AQPs

図 11 水分子の細胞通過経路

(細胞間経路) と考えられてきたが、細胞内経路 (図 11B) も存在し、消化・吸収などの生理機能に密接に関わっている可能性もあるものと考えられる。

謝 辞

Aquaporin 研究に際して多大な御協力を頂きました山本教授 (新潟大学医学部附属腎研究施設構造病理学分野) に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Preston GM, Carrol TP, Guggino WB and Agre P: Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256: 385 - 387, 1992.
- 2) King LS and Agre P: Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Physiol* 58: 619 - 648, 1996.
- 3) Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F and Sasaki S: Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361: 549 - 552, 1993.
- 4) Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T and Marumo F: Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6269 - 6273, 1994.
- 5) Ma T, Frigeri A, Hasegawa H and Verkman AS: Cloning of a water channel homolog expressed in brain meningeal cells and kidney collecting duct that functions as a stilben - sensitive glycerol transporter. *J Biol Chem* 269: 21845 - 21849, 1994.
- 6) Echevarria M, Windhager EE, Tate SS and Frindt G: Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10997 - 11001, 1994.

- 7) Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM and Agre P: Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 13052 - 13056, 1994.
 - 8) Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay M and Verkman AS: Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water transporting tissues. *J Biol Chem* 269: 5497 - 5500, 1994.
 - 9) Ma T, Yang Y, Kuo WL and Verkman AS: cDNA cloning and gene structure of a novel water channel expressed exclusively in human kidney: evidence for a gene cluster of aquaporins at chromosome locus 12q13. *Genomics* 35: 543 - 550, 1996.
 - 10) Gorin MB, Yancey SB, Cline J, Revel J - P and Horwitz J: The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* 39: 49 - 59, 1984.
 - 11) Raina S, Preston GM, Guggino WB and Agre P: Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 270: 1908 - 1912, 1995.
 - 12) Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F and Sasaki S: Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem* 272: 20782 - 20786, 1997.
 - 13) Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F and Sasaki S: Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 268 - 274, 1998.
 - 14) Koyama Y, Yamamoto T, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K and Kihara I: Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver. *J Biol Chem* 272: 30329 - 30333, 1997.
 - 15) Hatakeyama S, Yoshida Y, Tani T, Koyama Y, Nihei K, Ohshiro K, Kamiie JI, Yaoita E, Suda T, Hatakeyama K and Yamamoto T: Cloning of a new aquaporin (aqp10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 814 - 819, 2001.
 - 16) Yasui M, Kwon T - H, Knepper MA, Nielsen S and Agre P: Aquaporin - 6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5808 - 5813, 1999.
 - 17) Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ and Agre P: Mutations in aquaporin - 1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science* 265: 1585 - 1587, 1994.
 - 18) King LS, Nielsen S, Agre P and Brown RH: Decreased pulmonary vascular permeability in aquaporin - 1 - null humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1059 - 1063, 2002.
 - 19) Chou CL, Knepper MA, Hoek AN, Brown D, Yang B, Ma T and Verkman AS: Reduced water permeability and altered ultrastructure in thin descending limb of Henle in aquaporin - 1 null mice. *J Clin Invest* 103: 491 - 496, 1999.
 - 20) Knoers NV and Monnens LL: Nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 19: 344 - 352, 1999.
 - 21) Francis P, Chung JJ, Yasui M, Berry V, Moore A, Wyatt MK, Wistow G, Bhattacharya SS and Agre P: Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts. *Hum Mol Genet* 22: 2329 - 2334, 2000.
 - 22) Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K and Kihara I: Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 276 (cell physiol 45): C621 - C627, 1999.
-