

氏 名	キョク シン ウン 曲 振 運
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第52号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Expression and Localization of the Water Channel, Aquaporin, in the Rat Urinary Tract (水チャンネル、アクアポリンのラット尿路における発 現と局在)
論文審査委員	主査 教授 清 水 不二雄 副査 教授 山 本 格 副査 教授 追 手 巍

博士論文の要旨

アクアポリンはさまざまな細胞の膜表面に存在して選択的に水を通す水チャンネル(Aquaporin, AQP)である。これまで、哺乳類動物には 11 種類の水チャンネルがあることが分かっている。現在、ラットの腎臓には 6 種類の水チャンネル(AQP1, 2, 3, 4, 6, 7)があることがわかっている。腎臓は中胚葉由来のネフロンと外胚葉由来の集合管が連結し、糸球体で濾過された原尿はネフロンから集合管を通り、その過程で近位尿細管と集合管の AQP チャンネルファミリーによって水は再吸収され、尿として尿管、膀胱、尿道へと導かれ、体外に排泄される。AQP1 は近位尿細管上皮細胞に存在し、AQP2, 3, 4 は集合管主細胞に存在し、水の再吸収を担っているが、集合管と発生を同じくする尿管、膀胱、尿道の移行上皮細胞では水の移動は行われなかったと考えられていた。本研究では腎臓と比較して、ラット尿路における AQP の局在と発現、それらに対する脱水の影響を検討した。

正常ラット及び給水を 48 時間制限させたラットの腎臓皮質と髄質、尿管、膀胱、尿道を取り、またタンパク質、total RNA を抽出した。ラットの AQP1, 2, 3, 4, グリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の cDNA から In vitro transcription 法で ³²P ラベル AQP1, 2, 3, 4, GAPDH アチセンス cRNA プローブを作成し、抽出した RNA サンプルと混ぜ、45°Cで一晩ハイブリダイゼーションさせた。その後、リボヌクレアーゼ A とリボヌクレアーゼ T1 でハイブリダイゼーションしていない cRNA プローブを消化し、6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、消化されなかった cRNA プローブ を X 線フィルムで検出した(リボヌクレアーゼ・プロテクション・アッセイ法)。その結果、尿管、膀胱、尿道には AQP1 と AQP3 の mRNA の発現を認めたが、AQP2 と AQP4 の mRNA の発現は認められなかった。

ラットの腎臓髄質、尿管、膀胱、尿道から抽出したタンパク質 40 μg を 12.5 %ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写し、5 %スキムミルク PBS-Tween20 溶液で 1 時間洗浄した。ウサギ抗ラット AQP1, 2, 3, 4 抗体を 4 °Cで一晩反応させ、その後、PBS-Tween20 溶液でニトロセルロース膜を 30 分洗い、ペルオキシダーゼ標識二次抗体をかけ、室温で 1 時間反応させ、PBS-Tween20 溶液で洗浄後、ECL plus 化学発光剤をかけ、ペルオキシダーゼ反応を X 線フィルムで検出した。ウェスタンブロットの結果、腎臓、尿管、膀胱、尿

道に 28kDa AQP1 の発現をタンパク質レベルで確認し、腎臓、尿道にグリコシル化した 35kDa AQP1 の発現も確認した。腎臓、尿管、膀胱、尿道に 31kDa AQP3 の発現を認め、膀胱にグリコシル化した 34kDa AQP3 の発現も認めた。

ラットの腎臓、尿管、膀胱、尿道をメチルカルノワ液で固定し、パラフィン包埋し、パラフィン切片を作った。パラフィンを除いた後、切片にウサギ抗ラットの AQP1,2,3,4 抗体をかけ、室温で 1 時間反応させた。PBS 溶液で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体をかけ、室温に 40 分反応させ、PBS 溶液で洗浄し、DAB でペルオキシダーゼ反応を検出後、ヘマトキシリンで核を染色し、光学顕微鏡で観察した。免疫組織化学法により、AQP1 は尿管、膀胱、尿道の毛細血管内皮細胞に、AQP3 は尿管、膀胱、尿道の移行上皮の中間層と基底層の細胞膜に発現していることが分かった。

脱水の影響の検討では腎臓の AQP2 と AQP3 は脱水によって、その発現は増加したが、下部尿路の AQP1 や AQP3 の発現は脱水によって調節されなかった。

この研究により、尿管、膀胱、尿道の移行上皮では AQP3 を介して水の経細胞的輸送が行われる可能性が示された。

審査結果の要旨 アクアポリンは種々の細胞膜表面に存在して選択的に水を通す水チャンネル(Aquaporin, AQP)である。本研究ではラット尿路における AQP の局在と発現、それらに対する脱水の影響を検討した。正常及び給水を 48 時間制限させたラットの腎臓皮質と髄質、尿管、膀胱、尿道を検索対象とした。リボヌクレアーゼ・プロテクション・アッセイ法により、尿管、膀胱、尿道には AQP1、AQP3 の mRNA の発現を認めたが、AQP2、AQP4 の mRNA の発現は認められなかった。ウエスタンブロットの結果、腎臓、尿管、膀胱、尿道に 28kDa AQP1 の発現をタンパク質レベルで確認し、腎臓、尿道にグリコシル化した 35kDa AQP1 の発現も確認した。腎臓、尿管、膀胱、尿道に 31kDa AQP3 の発現を認め、膀胱にグリコシル化した 34kDa AQP3 の発現も認めた。免疫組織化学法により、AQP1 は尿管、膀胱、尿道の毛細血管内皮細胞に、AQP3 は尿管、膀胱、尿道の移行上皮の中間層と基底層の細胞膜に発現していることが判明した。脱水によって、腎臓の AQP2、AQP3 の発現は増加したが、下部尿路の AQP1 や AQP3 の発現は影響を受けなかった。以上、本研究により、尿管、膀胱、尿道の移行上皮では AQP3 を介して水の経細胞的輸送が行われる可能性が示され、その点に学位論文としての価値を認める。