

## 《まえがき》

### 細胞容積調節における水チャネルの役割の解明

#### Study on the Role of Aquaporin Water Channel in Cell Volume Regulation

(日本生理学会推薦)

|       |                                                              |                    |
|-------|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| 代表研究者 | 生理学研究所 岡田泰伸<br>National Institute for Physiological Sciences | Yasunobu Okada     |
| 協同研究者 | 生理学研究所 眞鍋健一<br>National Institute for Physiological Sciences | Kenichi Manabe     |
|       | 生理学研究所 木田 肇<br>National Institute for Physiological Sciences | Hajime Kida        |
|       | 生理学研究所 高橋信之<br>National Institute for Physiological Sciences | Nobuyuki Takahashi |
|       | 福井大学 森島 繁<br>Fukui University                                | Shigeru Morishima  |
|       | 福井大学 今野 卓<br>Fukui University                                | Takashi Konno      |

## 《英文サマリー》

Membrane water transport is an essential final event not only in the osmotic cell volume change but also in the following cell volume regulation. First, we investigated the route of water transport involved in a regulatory volume decrease (RVD) after osmotic swelling in human epithelial Intestine 407 cells. Functional expression of water channel in the cell membrane was supported by the facts of  $P_f/P_d \gg 1$  as well as prominent temperature dependence and mercury sensitivity of  $P_f$ . Molecular expression of AQP3 water channel was confirmed by RT-PCR and immunostaining. The RVD response was significantly suppressed by mercury or antisense-induced downregulation of AQP3. Second, an involvement of water channel in a regulatory volume increase (RVI) after a secretory volume decrease (SVD) induced by a secretagogue, carbachol, in human colonic T84 epithelial cells. AQP3 expression was demonstrated by RT-PCR and

immunostaining. Antisense-mediated knockdown of AQP3 expression abolished SVD and RVI. When mercury was applied upon the SVD peak, the following RVI was blocked. Taken together, it is concluded that AQP3 water channels serve as a prerequisite pathway for volume-regulatory water transport in human intestinal epithelial cells.

## 《本文》

### 研究目的

すべての動物細胞の容積は固有の正常値に調節されており、たとえ異常浸透圧環境下において膨張・縮小が強いられたとしても、その後速やかに正常容積へ復帰する能力を持っている。例えば、低浸透圧刺激時における浸透圧性水流入によって、あるいは糖・アミノ酸などの有機溶質の吸収時にそれらの細胞内蓄積によって、小腸吸収上皮細胞は膨張を強いられるが、その後速やかに Regulatory Volume Decrease (RVD) を示す。また高浸透圧刺激時における水流出がおこるときや、各種ホルモンや神経伝達物質による刺激によって等張 NaCl 液を分泌するときに、大腸や小腸の腺分泌細胞は縮小化を強いられるが、その後 Regulatory Volume Increase (RVI) とよばれる容積調節を示す。私達はこれまでの研究で、これらの細胞では、 $K^+$ チャネルと  $Cl^-$ チャネルの並列的開口による KCl 流出と、 $Na^+-K^+-2Cl^-$ シンポータ活性化による NaCl 流入による水移動の駆動によって、それぞれ RVD と RVI が達成されることを明らかにした。このように RVD と RVI のイオン機序の解明はほぼ終了を見たが、容積調節の最終的達成のための水輸送がどこを通過していかに行われているかについては未だ不明であった。

細胞膜を通る水のルートは、基本的には脂質二重層を介する単純拡散路と、膜貫通蛋白を介する促進拡散路に分けられる。後者は、イオンや溶質を運ぶイオンチャネルやトランスポータを水が slippage することによるもののみと永らく考えられてきたが、最近水を選択的に通す水チャネル aquaporin (AQP) の存在が証明され、現在まで 10 種以上の AQP メンバーが同定されている。しかしながら、容積調節メカニズムにこれらの AQP が関与するかどうかについては未だに不明であった。

本研究は、腸管上皮細胞の RVD と RVI という両種の容積調節において、水チャネルが関与するのかどうか、するとすればいずれの AQP メンバーが関与するのか、という二点について検討し、容積調節メカニズムの最終的解明に到達することを目的とする。

### 研究結果

#### A. ヒト小腸 Intestine 407 細胞 RVD における水チャネルの役割

本細胞における低浸透圧刺激後の RVD は、容積感受性  $Cl^-$ チャネル (VSOR) の開口 (Kubo & Okada, 1992 J. Physiol.) と中間型コンダクタンス  $Ca^{2+}$ 依存性  $K^+$ チャネル (IK1) の開口 (Wang et al. 2003 Am. J. Physiol.) による KCl 流出に基づき、これを種々のレセプターがオートクリン的に調節することを私達は明らかに

してきた (Okada et al. 2001 J. Physiol.)。本研究では KCl 流出に駆動される水輸送のルートを次の手順で解明した。

#### 1) 水チャネルの機能的発現

浸透性水透過係数 ( $P_f$ ) と拡散性水透過係数 ( $P_d$ ) の比 ( $P_f/P_d$ ) が 1 よりはるかに大きいことが水チャネルの機能的発現の第 1 クライテリアであるので、重水を用いての NMR 法によって  $P_d$  値を測定し、浸透圧性細胞容積変化の立上りの観察から  $P_f$  値を測定した。その結果、 $P_d$  値は  $0.47 \mu\text{m/s}$ 、 $P_f$  値は  $17.5 \mu\text{m/s}$  であること、したがって  $P_f/P_d$  値は 37.2 と 1 よりはるかに大きいことを明らかにした。

水チャネルの機能的発現の第 2 のクライテリアは、水輸送の活性化エネルギー ( $E_a$ ) が  $5 \text{ kcal/mol}$  より小さいことであるので、 $P_f$  値の温度依存性の変化を測定し、これらのデータを Arrhenius プロットして、そのスロープから  $E_a$  値を求めたところ  $1.6 \text{ kcal/mol}$  と計算された。

多種の水チャネルの機能的発現の第 3 のクライテリアは  $P_f$  値の水銀などの SH 修飾剤に対する感受性であるので、これをテストしたところ、 $P_f$  値は水銀によって有意に減少することが明らかになった。

以上の 3 つのクライテリアから、Intestine 407 細胞膜には水チャネルが機能的に発現していることが確認された。

#### 2. AQP3 水チャネルの分子的发現

RT-PCR 法によって AQP1~9 の遺伝子発現を調べたところ、AQP3 が最も強く発現し、AQP1 は僅かに発現しているのに対し、他の AQP の発現は確認されなかった。蛍光抗体法によって AQP3 タンパク質の発現も確認された。

#### 3. AQP3 水チャネルの RVD への関与

AQP3 の分子発現をアンチセンスオリゴヌクレオチドによってノックダウン (蛍光抗体法で確認) し、低浸透圧液を与えて膨張させた後に見られる RVD への影響を調べたところ、RVD の顕著な緩和化と抑制が見られた。このような効果は対照としてのセンスオリゴヌクレオチドでは見られなかった。

次に水チャネル阻害剤である水銀の投与下では、浸透圧性 (水流入による) 細胞膨張の立上げスピードが鈍化すると共に、RVD の完全抑制が観察された。

以上の結果より、ヒト小腸上皮 Intestine 407 細胞の浸透圧性膨張後の容積調節 (RVD) の達成の最終プロセスである容積調節性水流出には、AQP3 水チャネルの役割が不可欠であることが明らかになった。

#### B. ヒト大腸 T84 細胞 RVI における水チャネルの役割

腸管の腺上皮細胞においては、各種ホルモンや神経伝達物質などの分泌刺激を受けて、能動的に  $\text{Cl}^-$  を分泌し、結果としては等張 NaCl 液を分泌している。このときに本上皮細胞の容積はもちろん縮小 (分泌性細胞縮小 Secretory Volume Decrease: SVD と呼ぶ) することが知られている。しかし私達は T84 細胞と単離モルモット大腸腺においてカルバコール (CCh) 刺激時のそれは一過性であって、たとえ分泌刺激中においてもその後に  $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} \text{Cl}^-$  シンポータの活性化によって RVI を示すことを明らかにした (Manabe et al. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 2004)。本研究では本シンポータによる NaCl 流入によって駆動された容積調節性水輸送のルートの解明を T84 細胞を用いて 次の手順で行った。

#### 1) AQP3 水チャネルの分子的发現

RT-PCR 法によって AQP3 の mRNA の発現を、蛍光抗体法によって AQP3 タンパク質の発現を T84 細胞において確認した。

## 2) AQP3 水チャネルの RVI への関与

アンチセンスオリゴヌクレオチドによって AQP3 の発現をノックダウン（蛍光抗体法で確認）し、CCh 刺激後に発生する SVD とこれに続く RVI への影響をコーラターカウンター法によって観察したところ、SVD が著しく抑制され、その結果 SVD に続く RVI も当然見られなくなった。

水チャネルの阻害剤である水銀の存在下において CCh 刺激した場合も、同様に SVD の抑制が見られた。CCh によって SVD 発生させた直後に水銀を加えた場合は、SVD 後にみられるはずの RVI の発生が完全に阻止されることが明らかとなった。

以上の結果より、ヒト大腸上皮 T84 細胞の CCh 誘導性細胞縮小（SVD）の後の容積調節（RVI）の達成の最終プロセスである容積調節性水流入には、AQP3 水チャネルの役割が不可欠であることが明らかになった。

## 考察

今回の研究で明らかになったことは、①細胞外液の浸透圧を減少させて浸透圧的に水流入を起こさせる場合の水の通路には、AQP3 水チャネルの関与は部分的にみとめられるが、AQP3 のノックダウンによっても（その膨張スピードの純化、即ち  $P_f$  値の低下は見られるが）浸透圧性細胞膨張自体の程度は抑制されない。即ち、浸透圧性水流入は AQP3 水チャネルがなくとも他の通路（脂質二重層など）を通して起こりうるということである。これに対し、②浸透圧性膨張後の容積調節（RVD）時の水流出は、KCl 流出に駆動されて発生することが知られているが、この場合には AQP3 の機能阻害や分子発現ノックダウンによって完全に抑制されることが判明した。同様に、③分泌性容積縮小後の容積調節（RVI）時の水流入は、NaCl 流入に駆動されて発生することが知られているが、この場合にも AQP3 なしには実現しえないことが明らかとなった。更に驚いたことには、④Cl<sup>-</sup>分泌に駆動された水分分泌によってもたらされる分泌性容積縮小（SVD）においても AQP3 は不可欠の役割を果たしていることが明らかとなった。これら②～④の事実から、イオン移動に駆動された水移動の通路としては脂質二重層は働きえず、アクアポリン水チャネルがこの通路を与えるものと考察される。

## 研究発表

### 口頭発表

1. Y. Okada (2004) Cell volume regulation mechanisms: Roles of channels and transporters. Kyoto University International Symposium on "Leading Project for Biosimulation", February 27-28, 2004, Kyoto
2. Y. Okada & K. Manabe (2004) Mechanisms of cell volume regulation after shrinkage induced by muscarinic stimulation in colonic epithelial cells. The 3rd Symposium on Exocrine Glands Korea-Japan on "Frontiers of Epithelial Transport 2004", July 7-10, 2004, Seoul, Korea