

胃に発現する水チャネルの生理機能の解析

岡田 晋 治

東京大学大学院農学生命科学研究科 助教

緒 言

食物摂取は生体維持や生活活動のために必要な栄養素やエネルギーを補給する重要な生理行動である。ヒトを含む哺乳類では、口腔から摂取された食物は消化管において消化、吸収される。消化管の中で小腸は三大栄養素の消化・吸収を中心にその生理活動の分子機構について詳しく調べられてきた。一方、小腸に比べ、食物摂取時の胃の生理機能に関しては不明な点が多く残っている。胃の食物摂取時の活動の全容の解明、特に分子レベルでの解明についてはまだ不明な点が多い。

胃の消化活動においてアクアポリン (AQP) が重要な働きを担っていることが想定される。アクアポリンは生体の水輸送の中心的役割を担う水チャネル分子であり、細胞の形質膜や小胞体膜に局在し、水や小分子の膜透過を制御する¹⁾。消化・吸収活動においても、水輸送は必須である。消化管においては、摂取した食物を分解するために、消化管内腔に面した上皮細胞から消化液が分泌される。さらには、上皮細胞からは粘液も分泌される。また一方、体内の水分量を一定に保つために、また、栄養素の吸収を速やかに行うために、水は上皮細胞を介して生体内へと吸収される。このように消化管では上皮細胞を介して内腔 (外界) と体内との間で活発な水輸送が行われているが、この水輸送におけるアクアポリンの役割については不明な点が多い。

胃においても、胃液の分泌や、消化物の浸透圧調整のための水分分泌・吸収という消化活動に上皮細胞を介した水輸送が行われている。そして、胃にはいくつかのアクアポリン遺伝子が発現していることが報告されている²⁾。以上のことから、胃の水輸送をアクアポリンが担っていることが予想されるが、アクアポリンの関与は未だ明らかではない。そこで、本研究では、まず、消化管の水輸送におけるアクアポリンの生理的役割の解明の一端として、胃に発現するアクアポリンが消化活動で果たす役割を解明することを目的として、摂餌後の胃における

アクアポリンの発現量変化について解析を行った。

また、消化・吸収活動時の胃における遺伝子発現変化に関する研究はごくわずかで、消化管ホルモンをコードする遺伝子の発現変化についていくつかの報告がなされているのみである。そこで、摂餌後のマウス胃における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、食物摂取・消化時の胃の活動を分子レベルで明らかにすることも目的とした。

結 果

1. 摂餌後のマウス胃における

アクアポリン遺伝子発現量変化の解析

アクアポリンのチャネル活性の制御は主に、①発現量の変化 (発現誘導と分解)、②細胞膜表面から細胞内への移行の2つによって行われることが知られている³⁾。胃においてアクアポリンが消化活動に関わるならば、食物摂取の刺激によってその発現様式が変化すると考えられる。前者の制御について、胃に関しては、摂食刺激によって誘導される遺伝子発現変動についての報告は非常に少ないが、消化管ホルモンの1つであるソマトスタチンについて、摂食時に胃の内分泌細胞において発現量が増加するという報告がなされている。また、我々が行った予備的な実験ではアクアポリンについても摂食時に遺伝子発現量が増加する可能性が見出された。

そこでまず、摂餌後のマウス胃におけるアクアポリン遺伝子の発現量変化をリアルタイム PCR 法で解析することを試みた。しかしながら、実験試行毎のバラツキが大きく、アクアポリン遺伝子の発現量変化について明確な結果は得られなかった。

次に、解析手法を変更し、DNA マイクロアレイ法を用いて解析することにした。1週間の予備飼育期間中、朝夕各2時間ずつの制限給餌を行いマウスの摂食行動の周期を揃えた後、給餌の1、2、4時間後に胃を摘出し、total RNAを抽出してマイクロアレイ解析 (Affymetrix 社 Mouse Genome 430 2.0) に供した (n=5)。対象サンプル

表1 摂餌後のマウス胃におけるアクアポリン遺伝子の発現量変化

遺伝子名	変化率 (摂餌群 / 対象群)	RankProducts FDR 値
<i>Aqp1</i>	0.82	0.131
<i>Aqp3</i>	1.05	1.002
<i>Aqp4</i>	1.06	0.938
<i>Aqp5</i>	0.89	0.634
<i>Aqp6</i>	0.94	0.945
<i>Aqp7</i>	1.03	1.064
<i>Aqp8</i>	0.96	0.931
<i>Aqp9</i>	0.91	0.580
<i>Aqp11</i>	1.04	1.017

摂餌 2 時間後のマウスから摘出した胃をマイクロアレイ解析に供し、対照群と比較した。摂餌によってアクアポリン遺伝子の有意な発現量増加は観察されなかった。RankProducts FDR 値 0.025 未満を有意とした。

表2 摂食後に発現変化した遺伝子数

	摂餌群>対象群	摂餌群<対象群	合計
摂食後 1 h	153	189	342
摂食後 2 h	212	201	413
摂食後 4 h	501	497	998

摂食後経過時間別に有意に発現変化した遺伝子数を示した。RankProducts FDR 値 0.025 未満を有意とした。

としては概日リズムによる遺伝子発現変化の影響を除くため、給餌を行わず、給餌群と同時刻に摘出した胃 (n=5) を用いた。得られたマイクロアレイデータについて、同時刻の給餌群と対照群の間で発現量の比較を行った。その結果、いずれのアクアポリン遺伝子も発現量の変化はごくわずかで、有意な変化はみられなかった (表 1)。

in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法によって細胞レベルでアクアポリン遺伝子の発現量変化をしらべた。マウス胃では *Aqp3*, *Aqp4*, *Aqp5* の 3 種の発現が検出可能であった (図 1)。この 3 種のアクアポリン遺伝子について ISH で摂食による発現量変化の観察を行ったところ、得られたシグナルの強度および頻度は給餌群と対照群とで明確な差は観察されなかった (データは示さない)。

以上の結果から、マウス胃におけるアクアポリン遺伝子の発現量は、摂食刺激によって変化しないことが強く示唆された。

2. 摂餌後のマウス胃における遺伝子発現量変化の網羅的解析

上記 1 のマイクロアレイ解析で得た摂餌後のマウス胃の遺伝子発現データについてアクアポリン遺伝子

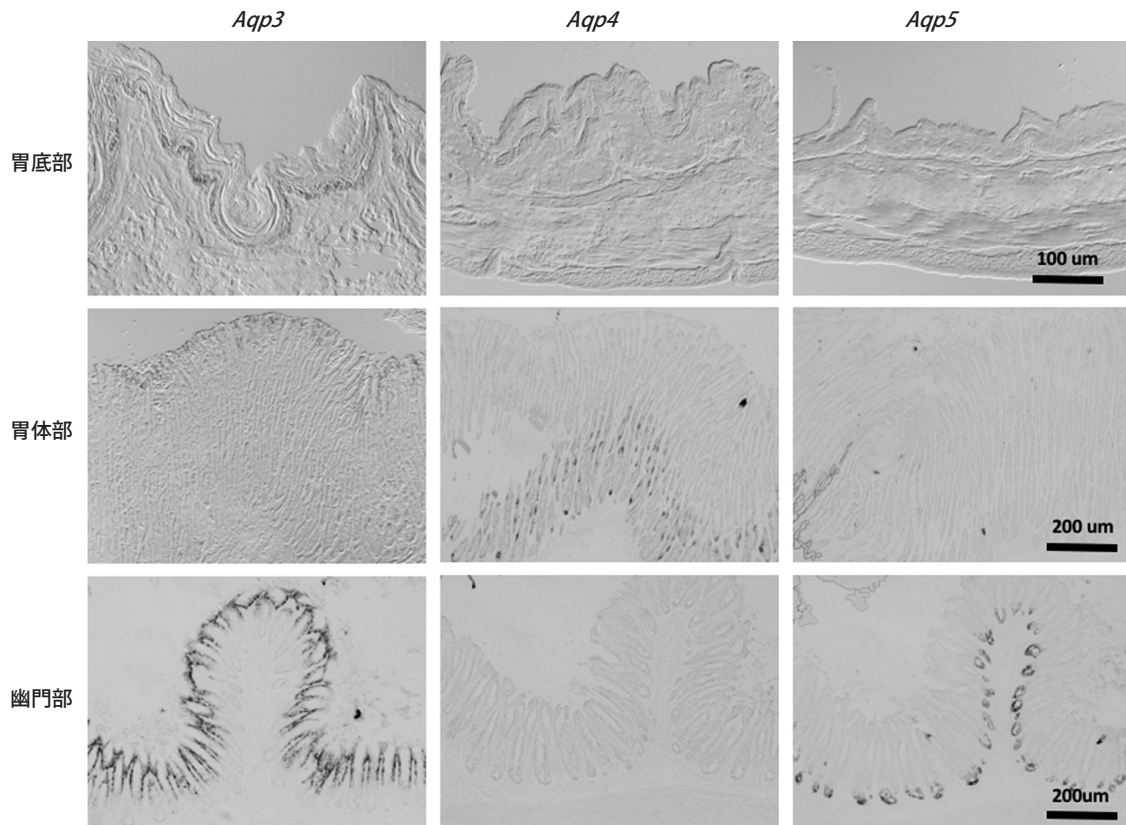


図1 マウス胃におけるアクアポリン遺伝子の局在

マウス胃の切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。*Aqp3*, *Aqp4*, *Aqp5* の 3 種のアクアポリン遺伝子の発現が観察された。

以外についても解析を行った。マイクロアレイ上の約45,000個の遺伝子中でマウス胃に発現していた遺伝子は約27,000個であった。各時間の給餌群と対照群との間でそれぞれ比較を行い、食物摂取の影響による遺伝子発現変化をしらべた。その結果、発現変化する遺伝子数は摂食開始1時間後で342、2時間後で413、4時間後で998であり、給餌後の経過時間に伴い増加していく傾向がみられた(表2)。1、2、4時間後いずれかの時間で発現変化がみられた遺伝子群をまとめ、GeneOntology termを用いて機能分類した結果、(1)脂質、リポタンパク質、有機酸、芳香族化合物、アミノ酸および高分子の代謝；(2)高温、タンパク質、金属イオン刺激および低酸素刺激に対する刺激応答；(3)脂質、有機酸、アミン、炭水化物および神経伝達物質の輸送；(4)形態、器官、システムの形成および細胞分化；(5)恒常性、消化系、筋肉系調節およびアポトーシスの5つの類型に関わる遺伝子が発現変化することが明らかになった。一方、胃の消化・吸収、分泌作用に関わる遺伝子はほとんど発現変化していなかった。経時的視点から解析を行うと、一部重複もみられたが、1、2、4時間後のそれぞれの時間においては、異なる機能に関連する遺伝子が発現変化していた。例えば、刺激応答に関わる遺伝子群〔主に(2)〕は早期に発現増加し、後期に減少する傾向がみられるのに対し、分化・形成、機能調節に関わる遺伝子群〔主に(4)、(5)〕は早期に発現減少し、後期に増加する傾向がみられた。一方、物質代謝、物質輸送の機能〔主に(1)、(3)〕では、対象物質によって、それぞれの関連遺伝子が異なる発現変動パターンを示した。リポタンパク質、有機酸代謝；神経伝達物質、有機酸、アミンの輸送に関わる遺伝子は、早期に発現増加し、後期に減少するが、脂質、アミノ酸、高分子代謝；炭水化物の輸送に関わる遺伝子は早期に減少し、後期に増加する傾向がみられた。脂質輸送に関わる遺伝子は全ての時間で発現増加がみられた。

考 察

1. 摂餌後のマウス胃におけるアクアポリン遺伝子発現量変化について

マウス胃におけるアクアポリン遺伝子の発現量は摂食刺激によって変化せず、今回行った発現量変化の解析からは胃に発現するアクアポリンの消化活動への関与の手がかりを得ることは出来なかった。アクアポリンの機能制御については、転写レベルでの発現量制御の他に形質

膜と細胞内膜との間の移行が知られている³⁾。胃での消化活動時においてもこの形質膜への移行によって機能制御が行われている可能性がある。今後、摂餌後のマウス胃切片を用いて免疫組織染色法などによって解析を行うことで、これについて検討する必要がある。

2. 摂餌後のマウス胃における遺伝子発現変化の網羅的解析について

摂食刺激による胃での遺伝子発現変化についてはいくつかのホルモンを除き、ほとんど報告がなされていなかったが⁴⁾、本研究により新たに多くの遺伝子を同定することができた。また、機能分類により、摂食後発現変動した遺伝子に関わる生理的機能を解明した。

予想に反し、胃液の分泌、ホルモンの生成・分泌などに関わることが報告されている遺伝子群は摂食刺激により発現量の変化は見られなかった。これらの活動に関わる分子は定常的に発現しており、遺伝子発現変化を伴わない可能性がある。また、胃酸の分泌について、壁細胞は独自の概日リズムを有し、それによって胃酸の分泌を調節していることが報告されていることから⁵⁾、胃はあらかじめ概日リズムに従って、消化活動に関連する遺伝子の発現を調節し、摂食時の消化に備えている可能性もある。

摂食によって発現変化した遺伝子の中では、多数のHeat Shock Protein (Hsp)を含む刺激応答に関連した遺伝子群の発現量が増加していることは興味深い。これらの遺伝子群は摂食開始後、短時間で発現量が変化していた。生体維持のため体外から摂取する食餌は、一方では生体を損傷させる異物となる可能性がある。また、消化活動時に分泌される胃液も生体に損傷を与えうる。そのため、胃では摂食時に速やかにHspによる防御機構を働かせ、食餌や胃液による損傷を防ぎながら消化を行っていることが示唆される。

要 約

食物摂取は生体維持や生活活動のために必要な栄養素やエネルギーを補給する重要な生理作用である。消化管の中で胃の食物摂取時の活動の全容の解明、特に分子レベルでの解明についてはまだ不明な点が多い。

胃に発現する水チャネル、アクアポリンの消化活動への関与をしらべるため、摂餌後のアクアポリン遺伝子の発現量変化をDNAマイクロアレイおよび*in situ*ハイブリダイゼーションによって解析した。その結果、いずれのアクアポリン遺伝子についても発現量に変化は観察さ

れなかった。

給餌 1、2、4 時間後の遺伝子発現変化についてマイクロアレイ解析によって網羅的に解析したところ、代謝、刺激応答、物質輸送、形態形成および細胞分化などに関わる遺伝子が発現変化することが明らかになった。一方、胃での消化・吸収、分泌に関わることが知られている遺伝子はほとんど発現変化していなかった。摂食刺激による胃での遺伝子発現変化についてはほとんど報告がなされていなかったが、本研究により新たに多くの遺伝子を同定することができた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りました財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) E. Kruse, et al.: *Genome Biol.*, **7**, 206, 2006.
- 2) T. Ma and A. S. Verkman: *J. Physiol.*, **517**, 317-326, 1999.
- 3) Y. Noda and S. Sasaki: *Biol. Cell*, **97**, 885-892, 2005.
- 4) S. G. Moesgaard, et al.: *Regul. Pept.*, **120**, 261-267, 2004.
- 5) M. Zaviacic, et al.: *Exp. Pathol.*, **18**, 85-95, 1980.