

小腸上皮細胞におけるAQP3-shortの機能解析

—細胞間接着の制御における役割—

Function of an AQP3 splice variant "AQP3-short" in intestinal epithelial cells

—Regulatory function in cell-cell adhesion—

永井 つばさ

Tsubasa Nagai

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 修士課程

キーワード：小腸，アクアポリン3，細胞間接着

Key words : intestinal epithelial cells, aquaporin-3, cell-cell adhesion

1. 研究目的

小腸上皮細胞に発現する水チャネルであるアクアポリン3 (AQP3) は、急激な増減によって便秘や下痢に繋がることが報告されており、腸管から水の吸収において重要な役割を担っていると考えられている。これまで本研究室では、第5エクソンを欠失したAQP3のスプライシングバリエント (AQP3-short) の存在を見出し、小腸上皮細胞では、低浸透圧刺激によって野生型AQP3-longの発現量が減少する一方、AQP3-shortは急激に増加することから、小腸における水吸収にAQP3-shortが重要な役割を果たしている可能性があると考えてきた。

これまでの本研究室での研究から、(1) AQP3-shortを過剰発現させた細胞では接着性が極端に低下すること、この時、細胞間接着タンパク質のmRNA発現量も低下していること、(2) 小腸上皮細胞様の性質を示すCaco-2細胞に低浸透圧刺激を与えると、AQP3-shortの発現量が増加するとともに細胞間接着タンパク質、特に接着下部に存在するタンパク質群のmRNA発現量が低下すること、また(3) AQP3-shortは低浸透圧刺激時に発現量が増えるだけでなく細胞間接着部位で会合しているように見えること、などがわかっている。このことからAQP3-shortは、低浸透圧下で細胞内に流入した水を速やか

に細胞間隙に排出する役目を担っている可能性があるかと推測される (図1)。AQP3-shortの発現量変化は、細胞間隙への水の流れを変化させ、細胞間接着にも影響を与えている可能性が考えられる。

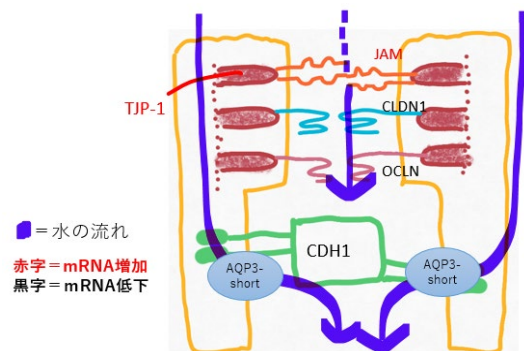


図1. 小腸上皮細胞の細胞間接着と水の流れの模式図

以上を踏まえ、本研究は、小腸上皮細胞に発現する水チャネルAQP3のスプライスバリエントであるAQP3-shortの発現量変化が、細胞間接着タンパク質のmRNA発現および細胞内に流入した水の排出に与える影響を調べることを目的とし、siRNAを用いたAQP3の発現抑制が、小腸上皮細胞の細胞間接着および水吸収の流れにどのような影響を与えるかを調べた。

2. 研究実施内容

小腸上皮様の性質を示すCaco-2細胞をsiRNA

で処理して AQP3-short の発現量が増加しないようにした細胞 (siAQP3) に低浸透圧刺激 (100mOsm) をかけ、細胞間接着タンパク質の mRNA 発現量の変化、および細胞の体積変化 (細胞への水の出入り) を調べて、AQP3 の発現抑制を行わない Control 細胞と比較した。

細胞間接着タンパク質の mRNA 発現量変化：

低浸透圧培地に交換 24 時間後に RNA を抽出し、細胞間接着タンパク質 JAM, TJPI, CLDN1 (クローディン 1), OCLN (オクルーディン), CDH1 (カドヘリン 1), および AQP3-short の mRNA 発現量を調べた。

低浸透圧刺激によって、Control 細胞では AQP3-short の mRNA 発現量は約 26 倍に増加し、接着タンパク質の発現量は CLDN1, OCLN, CDH1 の発現量は 30% 以下に減少していた。一方、siAQP3 細胞では AQP3-short 発現量は 7 倍程度の増加に抑えられていたが、接着タンパク質の発現量は Control 細胞と同程度まで減少していた。しかしながら、CLDN1 と CDH1 の発現量が有意にしかしわずかに高かったことから、AQP3-short の発現量の違いが影響を与えた可能性も考えられた。

低浸透圧刺激後の細胞の体積変化： Control 細胞および siAQP3 細胞の細胞膜を蛍光色素 PKH26 で染色し、低浸透圧培地に交換直後からの細胞の体積変化を共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Zeiss 社) で 2 分ごとに 40 分間観察した。

Control 細胞では、低浸透圧刺激後は 4~6 分ぐらいに刺激前の 1.4 倍程度まで増加したが、その後徐々に減少し、刺激を 36 分後にはほぼ刺激前の体積に戻った。低浸透圧環境下で細胞内に流入した水細胞外に排出するしくみが早いう

ちからはたらいていることが示唆された。一方、siAQP3 細胞では、Control 細胞より数分遅れて刺激前の 1.5 倍程度の体積になった後は、40 分後まで減少せずにそのままの体積を維持していた。細胞内へ流入する水を排出するしくみはたらいているものの、その速度が遅いため細胞の体積を元に戻すに至っていないと推測された。

AQP3 の発現抑制は細胞内への水の流入よりも、流入した水の細胞からの排出に強く影響を与えていることが示唆された。

3. まとめと今後の課題

今回の研究結果から、AQP3-short が細胞内に流入した水の血管側への排出に重要な役割を果たしていることが示された。AQP3 発現抑制が低浸透圧刺激下での接着タンパク質の発現量変化に与える影響では、接着下部に存在するタンパク質にわずかではあるが有意な差が観察されたことから、水の流れを介して間接的に接着タンパク質の発現に影響を与えた可能性が考えられた。

今回もちいた siRNA は AQP3-short だけでなく野生型の AQP3-long も同時に抑制してしまうことから、AQP3-short の機能だけを見るのが難しかった。今後は、AQP3-short の発現量に影響を与える消化管内のさまざまな変化に着目し、細胞間隙における役割にとらわれず AQP3-short の作用全般を解明していきたい。

4. この助成による発表論文等

②学会発表

[1] 永井つばさ他「水チャネル AQP3 スプライスバリエーションの過剰発現が細胞間接着に与える影響」, 日本薬学会 第 142 年会, 2022 年 3 月 26 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)(オンライン開催, 発表確定)