

味覚および食物消化に関与するチャンネルの
分子生物学的解析

三 坂 巧

博士論文

味覚および食物消化に関与するチャンネルの
分子生物学的解析

東京大学大学院
農学生命科学研究科
応用生命化学専攻
生物機能開発化学研究室

三坂 巧

指導教官
東京大学大学院教授
阿部 啓子



本論文で使用する略語

AQP	aquaporin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BSA	bovine serum albumin
CHIP28	channel-forming integral protein of 28 kDa
CHO	chinese hamster ovary
CNG	cyclic nucleotide-gated
cRNA	complementary RNA
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EGTA	ethylene glycol bis(β -aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GFP	green fluorescent protein
hAQP4	human aquaporin 4
HEK	human embryonic kidney
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
IP ₃	inositol triphosphate
MBS	modified Barth's saline
MOPS	3-[<i>N</i> -morpholino] propanesulfonic acid
NBT	nitro blue tetrazolium chloride
NO	nitric oxide
PBS	phosphate-buffered saline
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase

目次

第1章	はじめに	1
第2章	舌上皮に発現する環状ヌクレオチド活性化チャンネル	4
第1節	序論	5
第2節	舌上皮に発現するCNGチャンネルのクローニング	11
第3節	CNGgustのチャンネル機能の解析	33
第4節	舌上皮有郭乳頭におけるCNGgustの局在	50
第5節	まとめ	54
第3章	ヒト胃に発現する水チャンネル	59
第1節	序論	60
第2節	ヒト胃に発現する水チャンネルのクローニング	66
第3節	hAQP4の水透過性機能の解析	81
第4節	hAQP4のヒト胃における局在	95
第5節	ラット胃における水チャンネルの発現	103
第6節	まとめ	111
第4章	おわりに	112
	論文要旨	114
	引用文献	118
	謝辞	129

第1章

はじめに

動物は生命維持のために食物を摂取し、それを自分の血や肉にするために消化吸収を行っている。食物を摂取する際には、それが食べるべきものであるかどうかの判断を下す必要がある、それには食物が持っている味が大きな材料となる。一般に栄養があり食べるべきもの、あるいは食べてもよいものは甘味に代表されるような快い味を呈し、食べるべきでないものは苦味に代表されるような不快な味を呈する。つまり味覚は摂食行動そのものをコントロールしうる非常に高度な機能であると言えるであろう。

さらに人間においては、食品を単にエネルギー補給や生存のためにのみ摂取するのではない。おいしいものを食べることを快楽と感じ、「おいしさ」への飽くなき追求を行っている。そのままでは食べられない食材を調理することにより食べられるようにし、さらに調味することにより「食材」から「料理」へと変化させる。この過程を技術として認め、その技術を評価していることから、食に対するこだわりが感じられる。

また人間は舌上皮で感じる味だけでなく、口腔全体で食品を味わい飲み込んだ後に得られる満足感も含めて、感覚として認識している。これら全体をいわゆる「おいしさ」と言っても過言ではない。

一方食品を摂取すると、舌において味を認識した後に、胃へと運ばれ消化が始まる。この摂食行動に伴って起きる味覚受容と、胃での初期消化の機能との間に何らかの関連づけが可能ではないかというところから今回の研究は開始された。未知の分子に注目することにより、何らかの関連づけができるようになるなら、両者のいわば橋渡しの解析が可能になると期待された。

このような背景のもと、味覚受容から消化までの過程に関わる2つの新規分子について、分子生物学的手法を用いて解析を行った。個々の細かい背景については各章の序論に述べてあり、ここでは簡単に紹介するに留める。

まず第2章において味覚の情報伝達経路で機能していることが示唆される環状ヌクレオチド活性化チャンネルについての解析を行った。味を感じる舌上皮にて機能しており、古くよりその存在は予想されていたものの、長い間実体が掴めなかった分子である。他の感覚受容を行う組織からの推測により、伝達経路中で重要な役割を果たしていることが予想される。

また第3章においてヒト胃に発現し消化機能にかかわると考えられる水チャンネルについての解析を行った。水を透過させる機能を持つチャンネルは水透過性の高い組織における水透過を担っている分子であり、胃における胃液分泌

に関わっていることも推測される。

これら新規分子に注目した解析を通して、これまで知られていない知見を見出すことができることが強く期待される。

第2章

舌上皮に発現する環状ヌクレオチド 活性化チャンネル

第1節 序論

1、 感覚の受容

脊椎動物は視覚、聴覚、平衡、嗅覚、味覚などの感覚によって外界からの情報を感知し、行動へと結びつけている。これらの感覚受容はそれぞれ特有の組織、細胞で行われ、受容された後に神経伝達を介した系により脳のそれぞれの感覚野へと情報が送られ認識される。これらの感覚受容の際に行われる細胞内および細胞間のシグナルの伝達および増幅といった過程に関しては、組織や細胞が違いながらも多くの共通な特徴を有している。

そのうち視覚は脊椎動物において最も詳しく調べられている感覚である。瞳孔から入った光は眼球の奥へと進み、網膜を通過してその深層に達する。そこにおいて光のエネルギーは杆状体細胞（杆体と略される）および錐状体細胞（錐体と略される）によって電気的な信号に変換される。ヒトの網膜には約1億2000万個の杆体および約700万個の錐体が存在しており、それぞれ明暗や色彩を感じているとされる。以下杆体における光受容について概説する。

杆体においては光の情報を受容、伝達するために用いられる分子が同定されている。光を受容する7回膜貫通型のレセプターであるロドプシン、GTP結合タンパク質（Gタンパク質）の α サブユニットであるトランスデューシン、効果器であるホスホジエステラーゼ、環状ヌクレオチド活性化チャンネル（CNGチャンネル）がそれにあたる。これらの分子が以下のように協調して光のシグナル伝達を行っている（Yau, K.-W. and Baylor, D. A., 1989）。

光を受容しないとき、すなわち暗時においては、グアニル酸シクラーゼの働きにより細胞内に存在するcGMPによってCNGチャンネルが活性化されており、このチャンネルを介した内向きの膜電流が流れている。この内向きの膜電流により杆体は約-40 mVの脱分極状態に保たれており、その結果、軸索終末部より定常的に神経伝達物質が放出されている。光照射が起こりレセプターであるロドプシンで光が受容されると、Gタンパク質であるトランスデューシンが活性化され、さらに活性化型トランスデューシンはホスホジエステラーゼの調節サブユニットと結合することによりホスホジエステラーゼを活性化する。その結果大量のcGMP分子が加水分解され、CNGチャンネルが閉じることにより内向き電流が減少する。これによって過分極性の電位変化が起こり、軸索終末部から

の神経伝達物質の放出が抑制される。このようにして変換された光の情報は杆体から双極細胞や水平細胞へと伝達され、脳の視覚野へと伝わっていく。

これらの光の情報伝達に関わる分子は視細胞で特異的に機能しているように考えられているが、嗅覚においても視覚と相同なシグナル伝達経路が存在すると現在では強く推察されている (Buck, L. B., 1996)。嗅物質は鼻腔の上壁に存在する嗅上皮で受容され認識される。嗅上皮に多数存在する嗅神経細胞 (嗅細胞) の末梢突起はいわば嗅覚の受容器としての機能を果たしている。嗅細胞においては1000以上の遺伝子にコードされている嗅覚レセプター (Ressler, K. J., 1994)、嗅上皮に特異的なGタンパク質 (Jones, D. T. and Reed, R. R., 1989)、CNGチャンネル (Dhallan, R. S. et al., 1990) などが発現しており、これらの分子は嗅覚の情報伝達に関与していると考えられている。その中でも注目すべき事実は、それぞれの嗅細胞は非常に大きな遺伝子ファミリーの中から1つもしくは高々数個のレセプターしか発現していないことである。この事実はそれぞれの嗅細胞に発現しているレセプター分子が各細胞のリガンドに対する特異性を決定しているということを強く推察するものである (Ressler, K. J., 1994)。

2. 味覚 — 味の認識

一方視覚や嗅覚と並ぶ重要な感覚として味覚がある。味覚は舌上皮に存在する味蕾と呼ばれる味覚器官で受容される。これはヒトをはじめ、哺乳類を含むほとんどすべての動物に共通している。味蕾は主として舌表面に存在する乳頭に存在する。舌前部には茸状乳頭が、後部に有郭乳頭が、後側面に葉状乳頭がそれぞれ存在する。茸状乳頭は最も数が多く、舌前部の全面に存在する。有郭乳頭は比較的大きな乳頭でラットの場合は1個、ヒトの場合は8~12個存在する。葉状乳頭はひだ状の形状をしており、多くの哺乳動物がこれを有している。これらの乳頭部に存在するの味蕾の数は、茸状乳頭にはラットで1個、ヒトで複数個であり、有郭、葉状乳頭には非常に多数が認められる。味蕾の総数は動物により異なるがヒトで約9000個程度であるとされる。

味蕾は乳頭部上皮中に存在する味覚器で、その大きさは長さ約60 μm 、幅約50 μm でありタマネギ様の形状をしている。味蕾は上皮細胞に囲まれ、味蕾上方に存在する味孔と呼ばれる孔で外界と接している。味蕾を構成する細胞の個数は40~120個程度であり、味の受容を行う味細胞以外に支持細胞、基底細胞

等から構成されている。これらの細胞は紡錘形の細長い形状をしているものが多く、味孔部に位置する先端部分には微絨毛を持っているものもある。味細胞底部には中枢に投射している味神経がシナプス連絡しており、味細胞上部からもたらされている味情報を脳に伝えている。

口より摂取された食品中の呈味物質は、その種類により様々な経路を経て受容、認識されている。古くより味の基本概念として甘味、酸味、苦味、塩味、旨味といったクラシックな5基本味の類型がある。これらの基本味はそれぞれ異なった機構を用いて認識されているだけでなく、一つの基本味の中でも様々な機構を利用しているとされている (Kinnamon, S. C. and Margolskee, R. F., 1996)。つまり基本味の概念と呈味物質の受容の際におこる受容機構との間には大きな隔たりがあり、味の受容について論じるのにこれら基本味の分類を用いることはある種の誤解を招く原因にもなるであろう。しかし生理学的な研究にはこれらの分類で区別することが多いため、以下の記述には基本味の名称を用いる。

味覚の受容における機構は、大まかに味物質がイオンチャンネルに直接作用するものと、何らかのレセプターを介して受容されるものとに分けられる。イオンチャンネルに直接作用する経路の例としては塩味がある。ナトリウムイオンは塩味の代表的な呈味物質である。この受容にも複数の経路の存在が示されているが、そのうちの一つに味細胞膜に存在する Na^+ チャンネルを介してナトリウムイオンが細胞内に流入するという経路がある。鼓索神経における神経電流を測定した生理学的な解析により、塩化ナトリウムに対する反応性がアミロライドにより阻害されることが示されていることより (Heck, G. L. et al., 1984)、アミロライド感受性の Na^+ チャンネルがこれに関わる主要な経路とされる。また水素イオンに起因する酸味も、 K^+ チャンネルを直接阻害する経路などにより感知されている (Kinnamon, S. C. et al., 1988)。

一方、レセプターを介した系により伝達が行われているとされる主な味に甘味や苦味がある。ある種の甘味や苦味の呈味物質で味細胞に刺激を与えることによりcAMPや IP_3 といった細胞内二次メッセンジャーの量が増加することが示されている (Striemi, B. J. et al., 1991; Spielman, A. I. et al., 1994)。しかし甘味や苦味によって統一的な現象は起こらず、甘味物質、苦味物質の中での細かい分類分けが必要であると考えられる。

さてここ数年の間に、レセプターを介した味覚の情報伝達に関わるものが強

く期待される複数の分子が舌上皮よりクローニングされた。そのうちの代表的なものとして、複数のグループからGタンパク質に共役する7回膜貫通型のレセプター分子が同定されたことが挙げられる(Abe, K. et al., 1993a; Abe, K. et al., 1993b; Matsuoka, I. et al., 1993; Tal, M. et al., 1995; Thomas, M. B. et al., 1996)。それらレセプター分子のうちの一つであるGUST27は嗅上皮に発現する嗅覚レセプターと約60%の相同性を持ち、*in situ*ハイブリダイゼーションや抗体染色によって味蕾およびその周辺に発現していることが明らかにされた(Abe, K. et al., 1993b; Kusakabe, Y. et al., 1996)。また味細胞に存在するGタンパク質として、味細胞に特異的に発現していると考えられるガストデュエシンと、視細胞で発現しているトランスデュエシンが明らかにされている(McLaughlin, S. K. et al., 1992; Ruiz-Avila, L. et al., 1995)。

これらクローニングされた分子が何らかの味の情報伝達に直接関与しているという証拠は提出されていないが、最近ガストデュエシンのノックアウトマウスが作製され(Wrong, G. T. et al., 1996)、甘味物質や苦味物質に対する反応が非常に減少したことより、このGタンパク質が味の受容経路に直接もしくは間接的に関与していることが強く推察されている。

3. 環状ヌクレオチド活性化チャンネル(CNGチャンネル)の一般的性質

視覚や嗅覚といった感覚の受容経路において重要な役割を果たすCNGチャンネルについて概説する前に、まずイオンチャンネル一般について簡単に述べる。

イオンチャンネルはイオンの通り道となる細孔構造を有している膜貫通型のタンパク質である。イオンチャンネルの機能は主に電気生理学的な手法、すなわちイオンが膜の電気化学ポテンシャル勾配を下る向きにチャンネルを透過するときその流束を電流として測定するという方法により解析がなされてきた。

イオンチャンネルの分類については、第一にその電気生理学的性質(ゲーティング機構、コンダクタンス、イオン選択性など)により行われる。イオンチャンネル分子は何らかの構造変化により、イオンの透過を行う開状態と、透過を行わない閉状態とを行き来することによりイオンの透過の制御を行っている。開状態と閉状態との状態の変化をゲーティングと一般に呼ぶが、ゲーティングにより大まかな分類がなされる。膜電位の変化に依存する電位依存性チャンネル、細胞内または細胞外にある種のリガンドが結合することにより活性化され

るリガンド感受性チャンネル、膜の伸張により開閉が制御される機械刺激受容チャンネルなどに分けられる。

さらに開状態にあるイオンチャンネルを特徴づける性質として、透過するイオンの種類（選択性）とその透過速度（コンダクタンス）がある。両者はイオンの通り道となる細孔構造の大きさや形状により決定される。生理的なイオンのうち一種類のみに対する選択性が特に高いイオンチャンネルは、そのイオンの名前により、 Na^+ チャンネル、 K^+ チャンネル、 Ca^{2+} チャンネル、 Cl^- チャンネルなどと呼ばれることが多い。それぞれのイオンを透過するチャンネルの中にはイオン透過を阻害するような毒物や薬物といった薬理学的な性質から分類がなされている。

さて環状ヌクレオチド活性化チャンネル（CNGチャンネル）はゲーティング機構に関してはリガンド感受性チャンネルに分類されるもので、細胞内の環状ヌクレオチド濃度の増加により閉状態から開状態へと変化する。

CNGチャンネルが最初に発見されたのは視細胞においてである。1985年に杆体の外節形質膜から作製したパッチ膜を用いて、cGMPによって直接かつ可逆的に増大するコンダクタンスが見つけた（Fesenko, E. E. et al., 1985）。これが環状ヌクレオチドによって直接開閉されるコンダクタンス機構としての最初の報告であった。次いで1987年に嗅細胞にも同様のコンダクタンスが報告され（Nakamura, T. and Gold, G. H., 1987）、情報伝達における新しい機構として注目され出した。ウシの網膜より精製されたタンパク質（Cook, N. J. et al., 1987）のアミノ酸配列をもとに1989年にcDNAクローニングがなされ、新規のチャンネルであることが判明した（Kaupp, U. B. et al., 1989）。推定アミノ酸配列から予想される構造として6回の膜貫通領域を持ち、C末端の細胞質に位置する領域に環状ヌクレオチドの結合領域を有していた。

その後、この杆体に発現するCNGチャンネルと相同性を持ち、同様の構造をとるCNGチャンネルの発現が嗅上皮、脳などの組織で認められた（Dhallan, R. S. et al., 1990; Kingston, P. A. et al., 1996）。当初感覚受容を行う組織に特異的に発現すると考えられていたが、大動脈や精巣といったそれ以外の組織における存在も明らかにされている（Biel, M. et al., 1993; Weyand, I. et al., 1994）。また哺乳類だけでなく、ハエやナマズにもCNGチャンネルが存在することが確認されている（Goulding, E. H. et al., 1992; Baumann, A. et al., 1994）。さらに線虫の温度受容の変異体の解析から同定された原因遺伝子がCNGチャンネルであるこ

とが最近明らかにされた (Coburn, C. M. and Bargmann, C. I., 1996; Komatsu, H., et al., 1996)。

4. 本研究の目的

これまで述べてきたように、舌上皮の味蕾中に存在し味物質の受容を行う味細胞には、視覚・嗅覚レセプターと相同性を有する七回膜貫通型レセプターや味細胞特異的に発現するGタンパク質の存在が確認されている。また味細胞において、ある種の味物質で刺激を行うと細胞内の環状ヌクレオチド濃度が上昇することが生化学的に示されている。これらの事実は、味細胞においてもレセプターを介した、環状ヌクレオチドを細胞内二次メッセンジャーとして利用する味覚の情報伝達系が存在し、その下流にある種のCNGチャンネルが機能している可能性を示唆するものである。にもかかわらず、味覚受容器官におけるCNGチャンネルの存在については全く報告されていなかった。

そこで本研究においては舌上皮において発現しているCNGチャンネルの検索を行うことにした。まず第2節にて、RT-PCRによるCNGチャンネルをコードするcDNA断片の獲得を手がかりにして舌上皮に発現するCNGチャンネルの構造を明らかにすることを試みた。このチャンネルのチャンネル活性について培養細胞を用いた発現系で詳細に解析した結果を第3節で述べた。また舌上皮有郭乳頭におけるこのCNGチャンネルの局在について調べた結果を第4節で述べた。

なお、この章における結果については、Journal of Biological Chemistry、272巻22623～22629頁に「Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust」という題にて公表を行った。

第2節 舌上皮に発現するCNGチャンネルのクローニング

1. 序

CNGチャンネルは6回膜貫通型のイオンチャンネルで、C末端側の細胞質領域にヌクレオチド結合領域を持つという構造的特徴を有している。既知のCNGチャンネルにおいては膜貫通領域やヌクレオチド結合領域において高い相同性が見られる。そこでこれらの保存性の高い領域をもとに縮重プライマーを作製してRT-PCRを行い、その後ゲノムDNAのスクリーニング、5'-RACEによりラット舌上皮に発現するCNGチャンネルをコードするcDNAの配列を明らかにした。以下に詳細を述べる。

2. 材料および方法

2.1 材料

ラット (Wistar) は日本生物材料センターおよび埼玉実験動物社より購入した。RNA抽出に用いたISOGENはニッポンジーン社より、cDNA合成のためのFirst-Strand cDNA Synthesis KitはPharmacia社より、ラット、マウス、ヒトのゲノムDNAはClontech社より、それぞれ購入した。オリゴdTカラムはオリゴdTセルロース (Pharmacia社) をガラスバスツールピペットに詰めて作製した。

2.2 試薬

・リンガー液

- 150 mM 塩化ナトリウム
- 4.7 mM 塩化カリウム
- 3.3 mM 塩化カルシウム
- 2 mM HEPES
- 7.8 mM グルコース
- 0.1 mM 塩化マグネシウム

・カラム洗浄緩衝液

- 0.1 M 水酸化ナトリウム
- 5 mM EDTA

・ローディング緩衝液

- 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)

- 0.5 M 塩化ナトリウム
- 0.5 mM EDTA
- 0.1% SDS
- ・ 2×ローディング緩衝液
 - 40 mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 7.6)
 - 1 M 塩化ナトリウム
 - 1 mM EDTA
 - 0.2% SDS
- ・ 洗浄緩衝液
 - 20 mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 7.6)
 - 0.1 M 塩化ナトリウム
 - 1 mM EDTA
 - 0.1% SDS
- ・ 溶出緩衝液
 - 10 mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 7.6)
 - 1 mM EDTA
 - 0.05% SDS
- ・ ライブラリースクリーニング用ハイブリダイゼーション緩衝液
 - 6×SSPE
 - 5×Denhardt's solution
 - 0.5% SDS

1/100量のサケ精子DNA (10 mg/ml) および適当量 (約100万cpm/ml) のプローブを熱変性させてから加えて使用した。
- ・ サザン分析用ハイブリダイゼーション緩衝液
 - 5×SSPE
 - 10×Denhardt's solution
 - 2% SDS

1/100量のサケ精子DNA (10 mg/ml) および適当量 (約100万cpm/ml) のプローブを熱変性させてから加えて使用した。
- ・ TdT反応緩衝液
 - 100 mM カコジル酸ナトリウム (pH 7.2)
 - 1 mM 塩化コバルト

0.1 mM DTT

0.66 mM dATP

2.3 方法

2.3.1 縮重プライマーの作製

既知のCNGチャンネルに高く保存されている配列をもとにして、各種縮重プライマーをBeckman社のOligo 1000を用いて合成した。

合成後のプライマーはフェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿により回収した。Milli Q水に溶解後、260 nmの吸光度を測定することによりプライマーの濃度を算出した。プライマーは50 pmol/μlの濃度にして使用した。

2.3.2 ラット舌上皮からのRNAの抽出

ラットにネンブタール注射液（大日本製薬社）を腹腔注射して麻酔し、舌をハサミで切り取った。リンガー液で洗浄後、2 mg/mlの濃度でリンガー液に溶解したコラゲナーゼ（Sigma社、Type I）を有郭乳頭および葉状乳頭の皮下に注入した。室温でリンガー液中に約30分間放置した後、実体顕微鏡下で両乳頭を含む上皮部分をピンセットを用いて剥離した。剥離した上皮から乳頭以外の部分を眼科ハサミを用いてできるだけ除去し、ISOGEN（ニッポンジーン社）の溶液中に浸した。溶液中でホモジナイズを行い、プロトコールに従いRNAを抽出した。エタノール沈殿することにより得た沈殿をDEPC水に溶解後、再度リチウム沈殿、エタノール沈殿を行った。得られたRNAは260 nmの吸光度を測定し濃度を算出した。

2.3.3 mRNAの精製

オリゴdTカラムを用いてmRNAの精製を行った。オリゴdTカラムに1 mlのカラム洗浄緩衝液と5 mlのローディング緩衝液を流し平衡化した。RNA溶液を65℃で5分処理した後、2×ローディング緩衝液を等量加え室温まで冷やしカラムに供した。素通り画分をもう一度カラムに供した後、3 mlのローディング緩衝液、3 mlの洗浄緩衝液でカラムを順次洗浄し、3 mlの溶出緩衝液で溶出した。260 nmの吸光度を測定することによりmRNAの画分を決定し、エタノール沈殿を2回行いmRNAを回収した。

2.3.4 一本鎖cDNAの合成

舌上皮由来のmRNAよりFirst-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia社) を用いて一本鎖cDNAを合成した。

2.3.5 RT-PCR

舌上皮由来の一本鎖cDNAを鋳型として、作製した縮重プライマーを用いてPCRを行った。条件は96°C45秒、45°C2分、72°C3分で50サイクル行った。PCR産物はアガロースゲルで電気泳動を行い、ナイロンフィルターに転写した。

2.3.6 サザン分析

増幅される領域中に含まれる、CNGチャンネル間で保存性の高い配列をもとに作製したオリゴヌクレオチドに $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'ラベルを行った。これをプローブとしてPCR産物のサザン分析を行った。ハイブリダイゼーションは42°Cで行い、洗浄は42°Cで、 $6\times\text{SSC}/0.1\%$ SDSを用いて行った。

2.3.7 サブクローニング

サザン分析で陽性と判断されたPCR産物を平滑化処理、リン酸化処理を行った後、プラスミドベクターにサブクローニングした。サザン分析に用いたものと同じプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い陽性クローンの単離を行った。プラスミドを精製後、塩基配列の解析を373A DNAシーケンサー (Perkin Elmer社) を用いて行った。

2.3.8 ラットゲノムライブラリーのスクリーニング

約100万ブラックよりなるラットゲノムライブラリーを得られたRT-PCR断片をプローブとして用いてスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは65°Cで行い、洗浄は65°Cで、最終的に $0.1\times\text{SSC}/0.1\%$ SDSを用いて行った。その後セカンドスクリーニングを行うことにより陽性クローンを単離した。

2.3.9 陽性クローンの解析

陽性クローンからファージDNAの精製を行い、各種制限酵素で消化後、プラ

スミドベクターにサブクローニングした。クローン全体の制限酵素地図を作製し、塩基配列の解析を行った。

2.3.10 5'-RACE (Frohman, M. A. et al., 1988)

ゲノムDNA断片中に存在する配列をもとに14 merのオリゴヌクレオチド (Ch-P, 5'-TGAAGTGCAAGGTC-3') を作製し、これを用いてラット舌上皮由来の mRNA から一本鎖cDNAを合成した。合成したcDNAをエタノール沈殿した後、TdT反応緩衝液に溶解し、TdTを作用させることによりcDNAの3'末端にポリdAの配列を付加した。dA配列が付加したcDNAを鋳型として、オリゴdTプライマーとゲノムDNA断片中の配列から作製したプライマー (Ch-Q, 5'-GTTTCCACAGCCTCTTGG-3') を用いてPCRを行うことによりcDNAの5'上流を含む断片を増幅した。さらにPCR産物を新たに鋳型として、オリゴdTプライマーとCh-Qプライマーの上流に相当するプライマー (Ch-R, 5'-ATCCCTGACCATTAGGCC-3') を用いてPCRを行い、増幅された断片の塩基配列の解析を行った。

2.3.11 CNGgust cDNA全長のRT-PCRによる増幅

得られた5'-RACEクローンおよびゲノムクローンの配列をもとに、5'非翻訳領域を含むプライマー (5'-TTCAGGATGCATCAGATG-3', 図2-8の-6~+12に相当する) と3'非翻訳領域に相当するプライマー (5'-GCATCCAACAACACTCTC-3', 図2-8の+2183~+2200に相当する) を作製した。ラット舌上皮由来のcDNAを鋳型に2つのプライマーを用いてRT-PCRを行った。

2.3.12 ゲノムサザン分析

1レーンあたり25 µgのラット、ヒト、マウスのゲノムDNA (Clontech社) を制限酵素EcoR I, BamH I, Pst Iで消化後、1%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、ナイロンフィルターに転写した。RT-PCRによって得られた断片をプローブとして60℃でハイブリダイゼーションを行った。洗浄は60℃で、1×SSC/0.1% SDSを用いて行った後、さらに65℃で、0.1×SSC/0.1% SDSを用いて行った。

2.3.13 マウスゲノムライブラリーのスクリーニング

ラットCNGgustのcDNA断片をプローブとして用い、マウスゲノムDNAライ

ブラリー（東京大学分子細胞生物学研究所分子系統研究分野・加藤茂明助教授から供与して頂いた。）のスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは60℃で行い、洗浄は60℃で、1×SSC/0.1% SDSを用いて行った。

3. 結果

3.1 舌上皮に発現するCNGチャンネルのRT-PCR断片の獲得

CNGチャンネルは6回膜貫通型のイオンチャンネルで、C末端の細胞質側にヌクレオチド結合領域を持つという構造的特徴を有しており（図2-1）、細胞内の環状ヌクレオチド濃度の上昇によってチャンネルが開きイオンが透過する。視細胞や嗅細胞に発現している既知のCNGチャンネルは膜貫通領域やヌクレオチド結合領域において高い相同性を有している。そこで保存性の高い領域をもとに縮重プライマーを作製し、ラット舌上皮由来のcDNAを鋳型としてRT-PCRを行い、舌上皮に発現するCNGチャンネルの検索を試みた。

杆体や嗅細胞に発現する既知のCNGチャンネルのアミノ酸配列を並べると、N末端を除いた全体にわたって保存性の高い領域が存在している（図2-2）。N末端領域は杆体に発現するもの、嗅細胞に発現するものそれぞれにおいては相同性を有している。そこで図2-2に示したように、全体に保存されている領域およびN末端のそれぞれに保存されている領域を選び、これらに相当する縮重プライマーを図2-3に示したように作製した。各種プライマーの組み合わせで舌上皮のcDNAを鋳型にPCRを行った。その後増幅される領域中に含まれる保存配列に相当するオリゴヌクレオチドプローブでPCR産物のサザン分析を行い、陽性断片の獲得を試みた。

この方法を用いたところ、ほとんどのプライマーの組み合わせではサザン分析における陽性バンドが確認できず、舌上皮におけるCNGチャンネルの発現量の少なさが予想された。さらに多種の組み合わせでPCRを繰り返し試みたところ、Ch-4とCh-7のプライマーの組み合わせでPCRを行い、その産物をCh-6をプローブとしてサザン分析を行ったときに陽性のバンドが確認された。この長さを持つPCR断片をサブクローニングし、サザン分析に用いたのと同じオリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングを行うことにより約400 bpのインサートを持ったクローン（pch12）を獲得することができた。塩基配列の解析の結果、pch12断片にコードされているアミノ酸配列は用いたプライマーの内側、すなわちCNGチャンネルの6回目の膜貫通領域の直後からヌクレオチド結合領域の

前半部までに相当することが判明した(図2-4A、B)。増幅された領域は全てのCNGチャンネル間では非常に相同性の高い領域であるが、既知のものの相当する部分と比較するとアミノ酸レベルで80~84%程度の相同性しか有していなかった(図2-4C)。この結果今回採用した方法により、舌上皮に発現する新規のCNGチャンネルをコードするcDNAの断片が得られたものと推定した。

3.2 舌上皮に発現するCNGチャンネルのcDNAの同定

次にこのPCR断片に相当するcDNAの全長を得ることを試みた。まず一本鎖cDNAの作製に用いたmRNAと同様にして抽出したラット舌上皮由来のmRNA約10 μ gを用いて、RT-PCR断片をプローブとして用いたノーザン分析を行った。その結果、このクローンに対応するmRNAの発現は全く確認できなかった(データ未掲載)。このことより通常のcDNAライブラリーをスクリーニングする方法ではPCR断片に相当するcDNAクローンを得ることが非常に困難であることが予想された。従って以下のような方法でcDNAの配列を決定することにした(図2-5)。まず得られたPCR断片をプローブに用いてゲノムDNAのクローンを得ることにより、PCR断片周辺のエキソンの配列を決定した。その塩基配列の情報をもとに5'-RACEを行いcDNAの5'上流の配列を決定し、最後にcDNA全長を舌上皮由来の一本鎖cDNAからPCRにより増幅することを試みることにした。

まず約100万ブランクよりなるラットゲノムライブラリーをRT-PCR断片をプローブに用いてスクリーニングしたところ、1つの陽性クローン(λ 2)を得ることができた。このクローンのインサートをサブクローニングし、制限酵素地図を作製した(図2-6)。プローブがハイブリダイズする周辺の塩基配列を解析したところ、PCR断片に相当する塩基配列が確認された。さらにその周辺を含む部分に1つの長いエキソンの存在が推察された(図2-7)。

推定エキソン中の上流部に位置する塩基配列をもとにプライマーを作製し(図2-7)5'-RACE用の鋳型の作製およびPCRを行ったところ、複数種の5'-RACEクローンが得られた。そのうち最も多く得られたクローンの配列をもとに5'非翻訳領域を含むプライマーを作製し、さらにゲノムクローンにおける3'非翻訳領域に相当するプライマーを作製した。これらの組み合わせでラット舌上皮由来のcDNAを鋳型にRT-PCRを行ったところ、図2-8に示した配列のほぼ全長に相当するバンドが増幅されたことより、このクローンが確かに舌上皮に発

現していることが確認された。

3.3 舌上皮に発現するCNGチャンネル (CNGgust) の構造

このようにして得られたcDNAにコードされているCNGチャンネルを、舌上皮に発現していることからCNGgustと命名した。CNGgustをコードするcDNAの塩基配列および推定されるアミノ酸配列を図2-8に示した。CNGgustは611アミノ酸残基よりなっており、既知のCNGチャンネルと同様に6回の推定膜貫通領域、イオン透過性を決定するボア領域およびC末端に位置するヌクレオチド結合領域を有していた(図2-9)。既知のCNGチャンネルとの相同性はアミノ酸レベルで50~80%であり、最も高い相同性を有するものとしてウシの精巣に発現するCNGチャンネル (Weyand, I. et al., 1994; Biel, M. et al., 1994) およびヒト錐体に発現しているとされるCNGチャンネル (Yu, W.-P. et al., 1996) が挙げられる。

3.4 CNGgustのcDNAのエキソン・イントロン構造

スクリーニングによって得られたゲノムDNAクローン λ 2を解析したところ、最初のRT-PCR断片周辺に存在する長いエクソン(図2-8の+437~+2200に相当する)以外にも、その上流に2つのエクソン、すなわち図2-8の+222~+329に相当する108 bpおよび+330~+436に相当する107 bpの存在が確認された(図2-6)。cDNAの-13~+221の部分については対応するエクソンがクローン λ 2中には見つからなかった。そこで λ 2の上流に相当するゲノムDNAクローンを得る目的で、クローン λ 2の上流部をプローブとして用い、再度ラットゲノムライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、最初のゲノムDNAクローンの上流に位置しておりcDNAの上流部に対応するエクソンを含むようなゲノムDNAクローンを得ることができた。塩基配列の解析の結果、2カ所のエクソン(図2-8の-13~+41と+42~+221の部分)が確認され、今回明らかにしたCNGgustをコードするcDNAは5つのエクソンから構成されていることが判明した(図2-8)。

3.5 ゲノムサザン分析

CNGgustに相当する遺伝子を同定するため、ゲノムサザン分析を行った。ラットのゲノムDNAを制限酵素で消化後ナイロンフィルターに転写し、最初に得られたRT-PCR断片(図2-8の+961~+1343に相当する)をプローブとしてハイ

ブリダイゼーションを行った。60℃でハイブリダイゼーションを行い、洗浄を60℃で、 $1\times\text{SSC}/0.1\%$ SDSを用いて行うというややゆるい条件でサザン分析を行っても、陽性バンドは各レーンに一本しか確認できなかった(図2-10)。このことからCNGgustをコードする遺伝子はラットゲノム上にシングルコピーで存在すること、および非常に相同な遺伝子が他に存在しないことが強く示唆された。またラットゲノムで観察されたバンドの長さは、ゲノムDNAクローン $\lambda 2$ の制限酵素地図に一致した(図2-6)。

またラット以外にもマウス、ヒトのゲノムDNAを制限酵素で消化後、同様の条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、それぞれ各レーンに一本のバンドが確認できた(図2-10)。ハイブリダイゼーションの条件を考慮すると、マウスおよびヒトにもCNGgustをコードする遺伝子に相同なものが存在することが強く示唆される。特にマウスにおいては、65℃で $0.1\times\text{SSC}/0.1\%$ SDSを用いて洗浄を行ってもバンドは消失しなかった。

3.6 マウスゲノムDNAのスクリーニング

ゲノムサザン分析によりマウスにおいても非常に相同な遺伝子の存在が推察されたことより、ラットCNGgustのcDNA断片(図2-8の+450~+1811に相当する)をプローブとして用いマウスゲノムライブラリーのスクリーニングを行った。その結果1つの陽性クローン(λA)が得られた。制限酵素地図を作製し塩基配列の解析を行ったところ、ラットの場合と同じようにコード領域のC末端に相当する部分に長いエキソンの存在が示唆された(図2-11)。このエキソンのコード領域に相当する部分(1400 bp)については、ラットとの相同性が塩基レベルで93%、アミノ酸レベルで95%であることが判明した(図2-11)。また図2-10で見られたゲノムサザン分析の結果は、このクローンの制限酵素地図と一致した。

4. 考察

味覚の情報伝達に関わるものが強く期待される分子として、環状ヌクレオチド活性化チャンネル(CNGチャンネル)に注目し、ラット舌上皮において発現するCNGチャンネルの検索を行うことにした。

視覚、嗅覚といった他の感覚受容を行う組織においてはCNGチャンネルの存在がすでに明らかにされているが、味覚受容を行う舌上皮においてはCNGチャ

ンネルの存在についての報告は生理学的にも、分子生物学的にもなされていなかった。今回舌上皮に発現していることを見出したCNGgustが舌におけるCNGチャンネルに関しての初めての報告である。

最初に既知のCNGチャンネルに保存性の高い領域をもとに多種類の縮重プライマーを作製し、舌上皮由来のcDNAを鋳型にRT-PCRを行った。しかしCNGチャンネルをコードする断片を獲得することは非常に困難であった。陽性断片の獲得後にラット舌上皮由来のmRNAを10 µg用いたノーザン分析を行ったところその発現が確認できなかったことから、舌上皮におけるCNGチャンネルの発現量の少なさがうかがえる。これには舌上皮中に存在する味細胞の割合も影響しているものと考えられる。RNA抽出の際にはコラゲナーゼを用いて舌上皮を剥離した後、味蕾が集まっている有郭乳頭および葉状乳頭の上皮以外の部分をできるだけ除去するようにしたが、元来、乳頭中に含まれる味細胞の数はそれほど多くないため、乳頭部の上皮には味細胞以外の上皮細胞がかなり混入している。一方、光の受容を行う網膜は多種の細胞が層状の構造をとっているが、杆体と錐体が一層を占めているため網膜中の視細胞の割合は多い。また匂物質の受容を行う嗅上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞よりなっており、ここでも嗅細胞の割合は非常に多い。事実、杆体や嗅細胞に発現するCNGチャンネルはノーザン分析を行うとはっきりとしたバンドが確認されている (Dhallan, R. S. et al., 1990; Ludwig, J. et al., 1990; Dhallan, R. S. et al., 1992; Pittler, S. J. et al., 1992)。今回のCNGチャンネルのクローニングが困難だったことの原因の一つには、舌上皮において味覚の受容を行う細胞、すなわち味細胞の割合の少なさがあると考えられる。

舌上皮に発現しているCNGgustはウシの精巣からクローニングされたCNGチャンネルに最も相同性が高かった (図2-9)。このCNGチャンネルは抗体染色により網膜での発現も確認されている (Weyand, I. et al., 1994)。しかも網膜においては杆体には存在せず、錐体に発現が特異的であった。今回ラット舌上皮からクローニングされたCNGgustの網膜錐体における発現については調べていないが、もし錐体と舌上皮に同じ分子が発現しているとすれば、情報伝達経路の解析などにおいて得られる知見は大きいであろう。

今回明らかにしたCNGgustのアミノ酸配列のN末端は他のCNGチャンネルに比べて50アミノ酸残基程度短かった (図2-9)。5'上流の塩基配列は5'-RACEクローンより決定したが、5'-RACEを行った際にはこの長さをもつクローニングが

多数得られた。そのことから開始メチオニンの位置を推定したが、もしかするとN末端が長いようなCNGgust分子も同時に発現しているかもしれない。しかし第3節で述べるように、この長さをもつCNGgustも環状ヌクレオチドにより活性化されるチャンネルを形成しうることから、N末端のアミノ酸配列が仮に存在していたとしてもチャンネルの基本的な機能には影響しないことが推測される。

このように本節にて舌上皮における発現が確認されたCNGチャンネルであるCNGgustのチャンネル機能について、第3節にて培養細胞を用いた発現系で解析を行った。

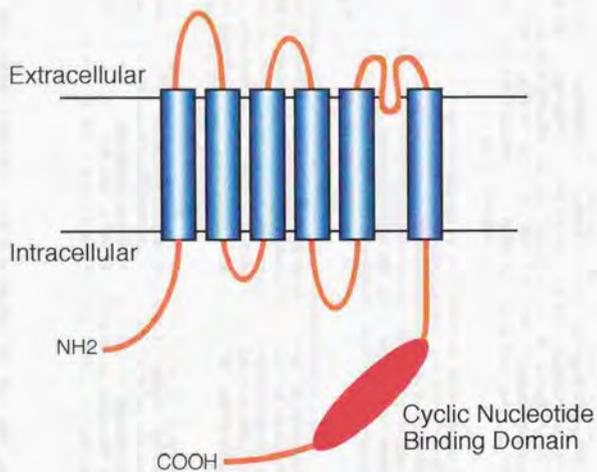


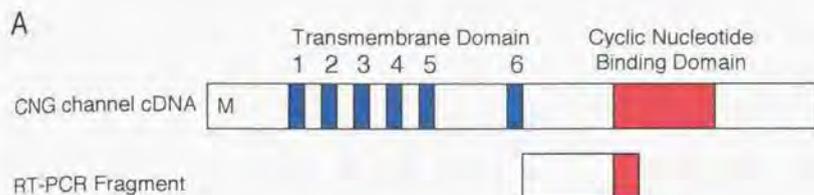
図2-1 CNGチャンネルの予想されるトポロジー

CNGチャンネルは6回膜貫通領域を持つイオンチャンネルである。C末端の細胞質側に環状ヌクレオチド結合領域を有している。

- Ch-1 F(VC)I(AT)(ML)PV(LM)YNW
5'-TT(TC)(TG)(TG)IAT(ATC)(AG)CI(ACT)TICCI GTI(CTA)TITA(TC)AA(TC)TGG-3'
- Ch-2 MFEFF(DQ)RTET
5'-ATGTT(TC)GA(GA)TT(TC)TT(TC)(GC)AI(AC)GIACIGA(GA)AC-3'
- Ch-3 YI(LI)(VI)IHWNAC
5'-TA(TC)AT(ATC)(ATC)TI(GA)TIAT(ATC)AT(ATC)CA(TC)TGGAA(TC)GCITG-3'
- Ch-4 GSMISNWN
5'-GGITCIATGAT(ATC)TCIAA(TC)ATGAA(TC)GC-3'
- Ch-5 YM(QH)FR(KN)VSKDM
5'-TA(TC)ATGCAIT(TC)(AC)GIAAIGTTTCIAA(GA)GA(TC)ATG-3'
- Ch-6 VIKWFDYLWの相補鎖
5'-GTCCAIA(GA)(GA)TA(GA)TC(GA)AACCA(TC)TT(GAT)ATIAC-3'
- Ch-7 KEMYIIEGKLの相補鎖
5'-AG(TC)TTICC(TC)TC(CT)TT(GAT)AT(GAT)AT(GA)TACAT(TC)TC(CT)TT-3'
- Ch-8 EISILNIKGSK
5'-GA(GA)AT(ATC)IAT(ATC)(TC)TIAA(CT)AT(ATC)AA(GA)GGITCIAA-3'
- Ch-9 KDDLMEA(VL)TEYの相補鎖
5'-TA(CT)TCIGTIA(GAC)IGC(TC)TCCATIA(GA)(GA)TC(GA)TC(CT)TT-3'
- Ch-10 MK(ED)GLLD(EI)N
5'-ATGAA(GA)GAIGGI(TC)TI(TC)TIGA(TC)(GA)(AT)(ATC)AA-3'
- Ch-11 QQKLR(IL)Tの相補鎖
5'-GTIA(GAT)IC(GT)(TC)TG(TC)TTIA(GA)(TC)TT(TC)TG(TC)TG-3'
- Ch-B IGFG(VN)DTWVY
5'-AT(ATC)GGITT(CT)GGI(GA)(AT)IGA(TC)ACITGGGTITA-3'
- Ch-G GNRRTANIの相補鎖
5'-AT(GA)TTIGCIGTIC(GT)IC(GT)(GA)TTICC-3'
- Ch-H DFLIGVLIF
5'-GA(CT)TT(TC)(TC)TIAT(ATC)GGIGTICTIAT(ATC)TT-3'
- Ch-1A MTEK(AS)NGVK
5'-ATGACIGA(GA)AA(GA)(GT)CIAA(TC)GGIGTIAA-3'
- Ch-2A ANNHNNH
5'-GCIAA(TC)AA(TC)CA(TC)AA(TC)CA(TC)CA-3'
- Ch-3A IKA(SN)GKDDH
5'-ATIAA(GA)GCIA(GA)(TC)GGIAA(GA)GA(TC)GA(TC)CA-3'
- Ch-5A I(TR)RMENGAC
5'-AT(ATC)A(GC)ICGIATGGA(GA)AA(TC)GGIGCITG-3'

図2-3 作製した縮重プライマー

図2-2に示した領域に相当するプライマーを上記のような配列で作製した。作製したプライマーの名前、相当するアミノ酸配列、合成した塩基の順で記した。



B

```

TTCCCGGGGGAGTTCCAGGCTAAGATAGATTCCATCAAGCAGTACATGCAGTTCCGGAA 60
S R A E F Q A K I D S I K Q Y M Q F R K

GGTAACCAAGGACTTGGAGACTCGGGTTATCCGGTGGTTTGACTATCTGTGGGCTAACAG 120
V T K D L E T R V I R W F D Y L W A N R

GAAGACGGTGGATGAAAAGGAAGTGCTCAAAAACCTCCCAGACAGCTGAAGGCCGAGAT 180
K T V D E K E V L K N L P D K L K A E I

CGCCATCAACGTGCACCTGGACACACTGAAGAAAGTCCGAATCTTCCAGGACTGCGAGGC 240
A I N V H L D T L K K V R I F Q D C E A

AGGGCTTCTGGTGGAGCTGGTCTGAAGCTTCGCTCCTGCTGTGTTTCAGCCCTGGGGACTA 300
G L L V E L V L K L R P A V F S P G D Y

CATTGCAAAAAGGGGGACATTGGA 325
I C K K G D I G
  
```

C

```

Rat gust :SRAEFQARIKIDSIKQYMQFRVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDEKEVLKNLPDKLKA EI
Bovine rod :A.....R..A.....H..N.S..M.K...K.....T.K.....R...Y....R...
Human rod :A.....R..A.....H..N.S..M.K...K.....T.K.....Y....R...
Mouse rod :A.....SRV.A.....N..N.S..M.K...K.....T.K.....R...RY....R...
Rat olf :T.....AV.H.....S..M.AK..K.....T.K.....R.....A..R...
Bovine olf :T.....AV.H.....S..EM.AK.....T.K.S...R.....A..R...

Rat gust :AINVHLDTLKKVRIFQDCEAGLLVELVLKLRPAVFS PGDYICKKGDIG
Bovine rod :.....A.....Q.Q.Y.....
Human rod :.....A.....Q.Q.Y.....
Mouse rod :.....A.....Q.Q.Y.....
Rat olf :.....S.....Q.....R.....
Bovine olf :.....S.....Q.....R.....
  
```

図2-4 舌上皮より得られたRT-PCR断片

A: 得られたRT-PCR断片のcDNAに対する位置を模式的に示した。膜貫通領域を青で、ヌクレオチド結合領域を赤で示した。

B: RT-PCR断片の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を示した。用いたプライマーの内側に相当する配列を示した。

C: RT-PCR断片の推定アミノ酸配列を他のCNGチャンネルの相当する部分と比較した。RT-PCR断片のもの (Rat gustと表記) と相同な残基は点で示した。

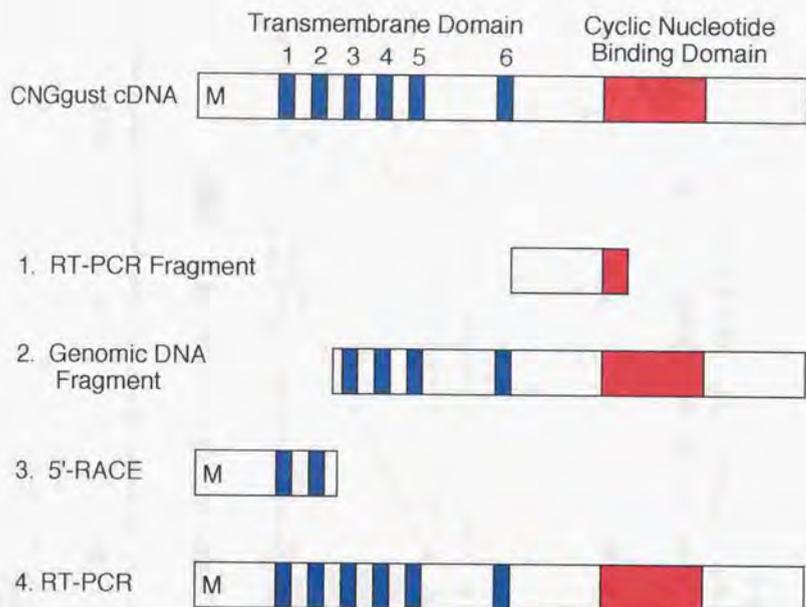


図2-5 舌上皮に発現するCNGチャンネルのクローニング方法

得られたRT-PCR断片を含むcDNAの全長を決定するために、以下のような方法を選択した。得られたPCR断片をプローブとしてゲノムDNAのスクリーニングを行い、周辺のエキソンの配列を決定した。得られた塩基配列をもとに5'-RACEを行った後、cDNAの全長を増幅するようなRT-PCRを行った。

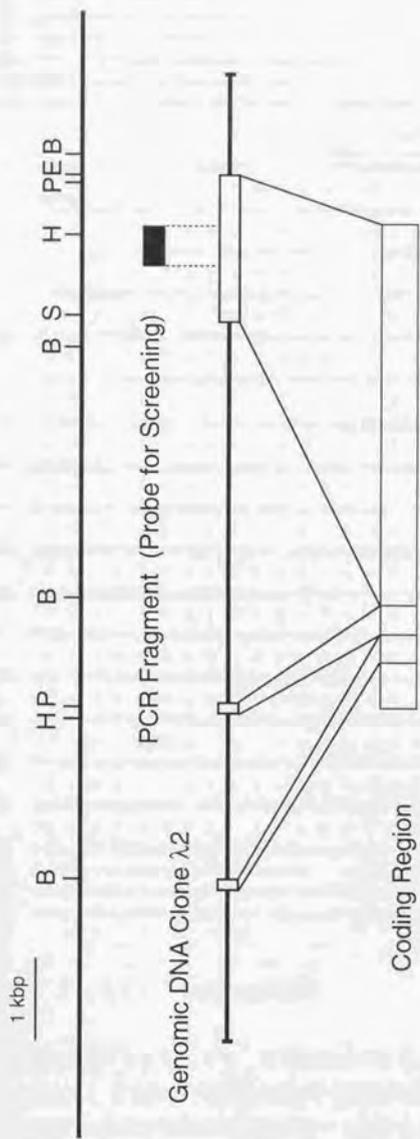


図2-6 得られたゲノムDNAクローンの制限酵素地図

RT-PCR断片をプローブとして得られたゲノムDNAクローン $\lambda 2$ の制限酵素地図を示した。用いたプローブに相当する位置およびゲノム上でcDNAのコード領域に相当する部分をそれぞれ示した。

B, *Bam*H I; E, *Eco*R I; H, *Hind* III; S, *Stu*I; P, *Pst*I.

1 ATGCATCAGATGGAACATCGACCATGGTCCAGACCAAGGGTGTCAAGCTTCATCATCTCCGATTCGTGGCTGGGCGCCGAGCACTTA
 KH Q D M E T S T M V Q D N R V S R F I I S I R A W A A R H L 30
 31 GACCATGAAGACCCGACGCTGACTCCCTTTTGGATCTTTTCATGGAGCTGAGCCCTAAGGAAGTCCAGCCAGGAAAGGAATGCCGAG
 H H E D P T P D E F L D R F H G A E P K E V S S Q E R N A Q 60
 32 CCTAACCCAGGGAGCAGGAACCCAGCAAGGGAGGGAGAGGCGAGGAAGAAGATCCCATTTGGTGGACCCCTCCAGCAACATCTACTAC
 P N F G G Q E P P E G G R G R K K D F I V V D P S S N I Y Y 90
 33 CCGTGGTGACTCCATGCGCCCTCCCGCTCTCTATAACTGGTGTACTGTGTGCGAGGGCCCTCTTTGATGAGGTACAGTCAGAACAC
 R W L T A T A L P V F Y N W C L L V C R A C C F D E L Q S E H 120
 34 CTGCACTCTGGCTGTCTGACTACTCTGCAGATGCCCTGTATGTGTGGACATCTGCTGTGCGCCCGGACAGGTTCTCTGAACAA
 D T L W L V L E D Y S A D A L Y V V D M L V R A R T G E F L E Q 150
 35 GGCCTAATGCTCAGGGAATCCAAAGGCTGGGAAACATTACACAAAGACCTTCGACTTCAGCTGGACATCTGCTCTGATCCCCACA
 G L M V R D T K R L W R H Y T E T L H F R L D I L S L I F T 180
 36 GACCTGGCTATTGGAAGTGGGCGATGAACTCCCGGAACCTGAGGTCAATCGCCCTCTGAGGTTCTCTCGGCTCTTTGAGTCTTTGAC
 D L A V L E L G M N Y P E L R F N R L L R F S R L F E F F D 210
 37 CGCACGGAGACAGGACCAACTACCCAAATGCTCAGGATAGGGAACCTGGTCTGTACACCTCAITATATCCACCTGAAAGCCCTGC
 R T E T R T N Y P N V F R I G N L V D Y T L I I I H W N A C 240
 38 ATCTACTTTGGCACTTCCAAAGTTCATCGGTTTGGAAACAGATTCCTGGCTCTATCCAAACCTCCAAAGCCGAGTATGGAGCCCTCTCC
 I S F A I S F I G F G T D S W V Y P N T S K P E S R L S 270
 39 AGGAAGTACATTACAGCCTCTACTGCTCCACCTTGACCTGACCCACCATTTGGGAGACCCCGCCCGCTGGAAGGATGAGGAGTATCTC
 R E Y I T Y S L Y W S T L T L D T T I G E T P P P V K D E E Y L 300
 40 TTTGTGCTATAGACTTCTGTGGGGGCTCTGATCTTGGCCACTATAGTAGGCAATGGGGCTCCATGATTTCCAAAGATGAAGCCCTCC
 F V V I D F L V G V L I F A T I V G N V G S M T S N M N C S 330
 41 CGCCCGGAGTTCAGGCTAAGATAGATTCATCAAGCAGTACATGCGACTGCGGAAGGTAAACCAAGGACTTGGAGACTCCGGTTATCCGG
 R A E F D A K I D S I K Q V M Q F R K V T K D L E T R V I R 360
 42 TGGTTTACTATCTTGTGGCTAAGCAAGACGGTGGATGAAAAGGAGCTCCCAAAAACCTCCAGACAGGTGAAGCCGAGATCGCC
 W P D Y L W A N B K E T V D E E V L K N L P D K L K A E I A 390
 43 ATCAAGCTGACCTGACACACTGAAGAAAGTCCGAATCTTCAGGACTGCGAGGAGGGCTTCTGGTGGAGCTGTGACTGAAGCTTCCT
 I N V H L D T L K K V B I F Q D C E A G S L L V E L V L K L R 420
 44 CCTCTGTGTTGAGCCCTGAGGACTACATTTGCAAAAAGGGACATTGGAGGGAGATGTACATCATCAAGAGGGCAAGCTGCTGCTC
 P A V F S F G D Y I C K K G D I G R E M Y I I K E G K L A V 450
 45 GTRGCTGAGATGGGCTCAGCCAGTTGTGCTCTCAGTATGGCAGTTACTTTGGGAGATCAGCATCTTAAACATTAAAGGGAGCAG
 V A D D G V T G V V L S D G S Y F G E I S I L N I K G S R 480
 46 TGGGGAACCCGAGGACAGCCAACTCAAGGACATCGGCTACTCGGACTGTGTGCTCTCCAAGGATGACTGATGGAGACCTCAAG
 S G N R R T A N I R S I G Y S D L P C L S K D D L M E T L T 510
 47 GAGTACCCGGATCTAAGAGGGCTCTGGAGAAAAGGGTCGSCAGATTTGATGAAGGACAACTAATCGATGACACCTGGTGACGCC
 E Y F D A K R R A L E E K G R O I L M K D N L I D D D L V T A 540
 48 AGCCAGATGCCAGGAACATGAGGAGAAGTGGAGTACTGGAGTATCCTTTGGAGGGCTGACAGACAGGTTCCGCCGACTCTCGCT
 R A D A R N I E E K V E Y L E S S L D G L Q T R F A R L L A 570
 49 GATGAGTGGCTCCCGAGTAAAGCTGAAACAGCGCTCAGCCAGCTGGAGAGCCAGATGACAGGAGGGGCTATGGCTTCTCACCTGAC
 E Y S A S Q M K L K Q R L S Q L E S Q M T R R G G F S P D 600
 50 AGGAGATTCAGGATGCTTCAAAGCTGACTGAAAATGCGAGTGGCTCTGCTCTGCTTCCAGGGCCAGCTGCCAGTGGAGACT
 R E N S E D A S K A D * 611
 51 TTACAGCTCTGTGGAGAGATTGACTGTGCTTGTGCTCTGCTCTGCTCTGCTTGGTGTGAGGACAGCAGGAGAGCCCTCATTT
 1981 CTTCACTAGAAAATGGAGACTATGCTCCCAACCCCATGATTTCCAGATATCATGAGGCTTACTTGTATACAGGACAGGGGTTGAG
 3071 CTTTGAAGAGTGAAGGTTCCAAACCACTGTATGATGCACATGCGCGATCTAATGTCGTAAATGATGTTGTGATGTGGAATGTT
 3161 GGGTACCTGTGGAGTCCAGAGAGAGTGTGTGTGATCC

図2-8 舌上皮に発現するCNGチャンネル(CNG_{gust})をコードするcDNAの塩基配列ならびに推定されるアミノ酸配列

5'-RACEクローンおよびゲノムDNAクローンから明らかにされた塩基配列を示した。ゲノム上イントロンが挿入されている位置を▼で示した。

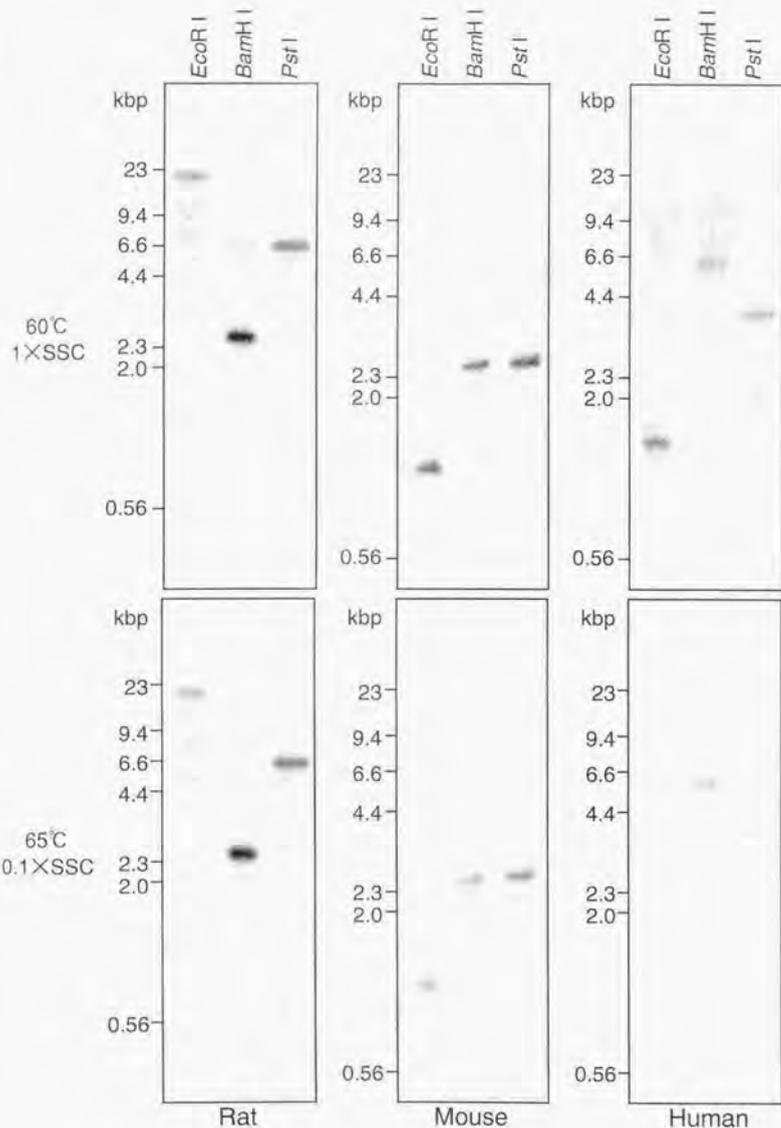


図2-10 ゲノムサザン分析

ラット、マウス、ヒトのゲノムDNAを制限酵素で消化し、電気泳動後フィルターに転写した。フィルターはラットCNG_{gust}のcDNA断片を用いてハイブリダイゼーションを行った。洗浄は左に示した条件で行った。

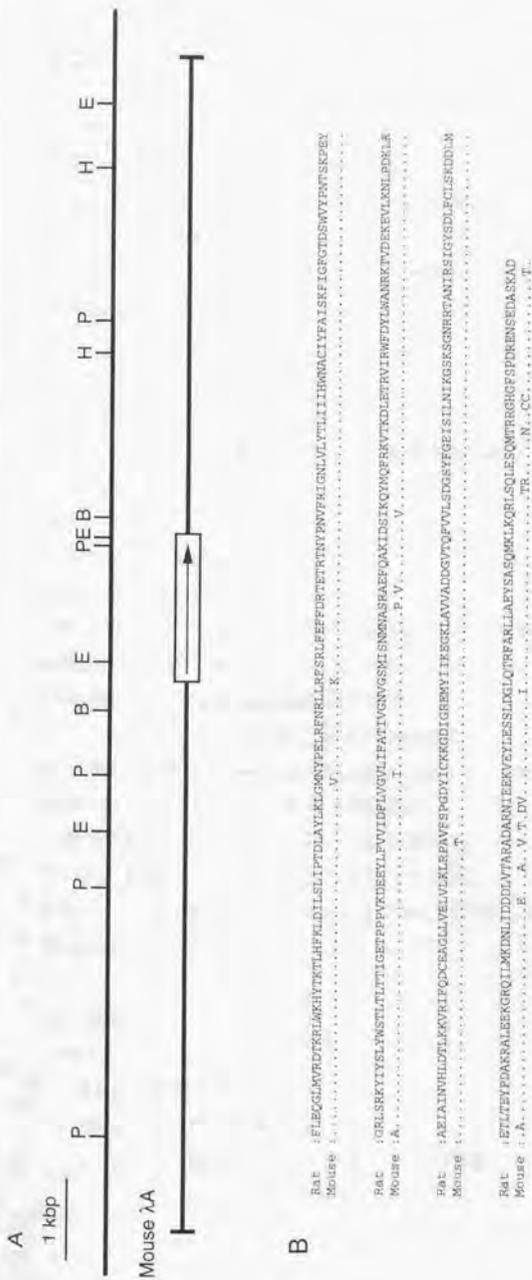


図2-11 CNGustに相同なマウス遺伝子のクローニング

A: ラットCNGustcDNA断片をプローブとして得られたマウスのゲノムDNAクローン λ Aの制限酵素地図を示した。マウスゲノム上で推定されるエキソンの位置を四角で、コードされている向きを矢印で示した。 B: BamH I; E: EcoR I; H: Hind III; P: Pst I。
 B: コード領域C端に位置するエキソンにコードされているラット、マウスそれぞれのアミノ酸配列を並べ、両者で相同な残基を点で表した。

第3節 CNGgustのチャンネル機能の解析

1. 序

舌上皮に発現が確認された新規CNGチャンネルであるCNGgustのチャンネル機能の解析を行うため、CNGgustを培養細胞に発現させて、電気生理学的な性質についての検討を行った。

なおこの章における電気生理学的な解析は、千葉大学医学部高次機能制御・発達生理分野研究室にて行ったものである。

2. 材料および方法

2.1 材料

CNGgustタンパク質発現のための培養細胞はヒト胎児腎臓由来の細胞であるHEK293株を使用した。

アミノ末端にシステインを持ちそれにCNGgustのC末端の15アミノ酸残基に相当する配列を続けた計16残基のペプチド (CFSPDRENSEDASKAD) の合成は宝酒造社に委託した。

細胞培養用の培地として用いたDMEMおよびOPTI-MEM、培地添加用のFBS、細胞をはがす際に用いたトリプシン液、およびトランスフェクションに用いたLipofectAMINEはLife technologies社より、コラーゲン (Type IA) は新田ゼラチン社より、ウェスタン分析に用いたHRP結合抗ウサギIgG抗体、検出のためのECL KitおよびHyperfilm-ECLはAmersham社より、チャンバースライドは岩城硝子社より、FITC結合抗ウサギIgG抗体はフナコシ社より、それぞれ購入した。

微小電極作製の芯入りガラス管およびマイクロプレーはナリシゲ科学社のものを、電極のコートには室町化学社のダウコーニングシルボット184を、灌流用チャンバーはWaner Instrument社のRC-26Gを、電流測定用のアンプはList Electronic社のEPC-7を、それぞれ使用した。

2.2 試薬

・PBS

- 0.2 g 塩化カリウム
- 0.2 g リン酸二水素カリウム
- 2.9 g リン酸水素二ナトリウム・12水和物

8 g 塩化ナトリウム

Milli Q水を用いて溶解し、1 リットルにした。

・3×SDS-PAGEサンプル緩衝液

150 mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 6.8)

30% グリセロール

0.3% BPB

300 mM DTT

6% SDS

終濃度が1×の濃度になるようにして使用した。

・カップリング緩衝液

50 mM 炭酸ナトリウム-重炭酸ナトリウム (pH 9.5)

・ブロッキング緩衝液

1 M エタノールアミン

塩酸を用いてpH 8.0に調製した。

・グリシン緩衝液

0.1 M グリシン

塩酸を用いてpH 2.5に調製した。

・洗浄緩衝液

20 mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.0)

1 M 塩化ナトリウム

1% トリトン X-100

・TBS

20 mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.0)

150 mM 塩化ナトリウム

・電気生理用緩衝液

140 mM 塩化ナトリウム

5 mM 塩化カリウム

0.5 mM EDTA

0.5 mM EGTA

10 mM HEPES (pH 7.4)

2.3 方法

2.3.1 CNGgust発現プラスミドの構築

発現プラスミド構築のためのベクターはpSRDおよびpcDNA3.1(-) (Invitrogen社)を用いた。CNGgustのコード領域全長を含むようなcDNA断片(図2-8の-6~+1836に相当する)をPCRにより増幅し、両ベクターのクローニングサイトに挿入したものをCNGgust発現プラスミドとして使用した。発現プラスミドは超遠心により精製して用いた。

2.3.2 コラーゲンコート

細胞培養に用いたカバーガラスはコラーゲンコートを行ってから使用した。滅菌水を用いて10倍に希釈したコラーゲン(Type IA、新田化学社)をガラスシャーレ中で乾熱したカバーガラス(9 mm四方)に加え、冷蔵庫で一晩放置した。コラーゲンを吸引して室温で一晩乾燥させた後、使用するまで冷蔵庫で保存した。使用直前にDMEMで2回洗浄してから使用した。

またチャンバースライドも同様の処理を行ってから使用した。

2.3.3 トランスフェクション

HEK293細胞はFBSを終濃度10%となるように加えたDMEMを用いて、CO₂インキュベーター(CO₂濃度5%)中、37℃で100 mmシャーレを用いて培養した。コンフルエント近くまで培養した細胞をPBSで2回洗浄後、トリプシン液を用いて細胞をはがし、1200 rpmで5分遠心することにより細胞を集めた。上清を除去した後DMEMに懸濁し、35 mmシャーレ(必要なときにはシャーレ内にコラーゲンコートしたカバーガラスを敷いた)に 2×10^5 個(電気生理用)もしくは 4×10^5 個(ウェスタン分析用)の細胞をまき、翌日に以下の操作を行った。

マイクロチューブに2 μgの発現プラスミド、0.25 μgのpAdVantage (Promega社)、100 μlのOPTI-MEM (Life technologies社)、さらに必要なときは0.25 μgのGFP発現用のプラスミド(pS64T-C1もしくはEGFP-N1、Clontech社)を加えた。ファルコン2051チューブに10 μlのLipofectAMINE (Life technologies社)と100 μlのOPTI-MEMを加えた後、マイクロチューブの中身を全量加え、攪拌後室温で30分間静置した。細胞を生やしたシャーレをFBSを加えていないDMEMで2回洗浄し、800 μlのOPTI-MEMを追加したファルコン2051チューブの中身を全量シャーレに加えた。さらに6時間後に20%FBSを含むDMEMを1 ml加えた。翌日以降毎日培地交換を行い、トランスフェクションから2日後もしくは3日後

に、トランジェントに外来タンパク質を発現した細胞として使用した。

2.3.4 培養細胞からのタンパク質の抽出

細胞を培養したシャーレをPBSで2回洗浄後、ピペッティングにより細胞をはがし、マイクロチューブに細胞を移した。10000 rpmで1分遠心後上清を除去し、得られた沈殿にSDS-PAGEサンプル緩衝液を加えて超音波破碎後、熱処理を行いSDS-PAGEに供した。

2.3.5 抗原液の作製

ヘモシアニンに架橋試薬である *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester を反応させた後、合成したペプチドに作用させることによりペプチドをヘモシアニンに結合させた。1 mgのペプチドより作製したヘモシアニン結合物を最終的にMilli Q水で5 mlにした。

2.3.6 抗血清の作成

体重約2 kgのオスのウサギ（ニュージーランドホワイト）を用いて抗血清を作成した。1 mlの抗原液と1 mlのコンプリートアジュバンド（Freund）を用いてエマルジョンを作製し、ウサギの両脚の指の間に注射して初回免疫を行った。初回免疫から3週間以上経過した後に、1 mlの抗原液と1 mlのインコンプリートアジュバンド（Freund）を用いて作製したエマルジョンを背中皮下に注射し追加免疫を行った。その後抗体価が上昇するまで、約3週間おきに追加免疫を行った。最終の追加免疫より約3週間後に頸動脈から採血を行った。採血後の血液は37℃で1時間保温し、その後冷蔵庫で一晩静置した。3000 rpmで10分遠心して得られた上清を0.45 μmのフィルターを用いて濾過したものを抗血清として使用した。抗血清は使用するまで凍結保存した。

2.3.7 CNGgust抗体のアフィニティ精製

抗血清よりアフィニティー精製用のカラムを用いてCNGgust抗体を精製した。1 gのエポキシ活性化セファロース6B樹脂（Pharmacia社）をMilli Q水で膨潤させ、洗浄を行った。その後20 mlのカップリング緩衝液に懸濁し、1 mgの合成ペプチドを加え、45℃で一晩振とうした。カップリング緩衝液で数回洗浄した後、20 mlのブロッキング緩衝液に懸濁し、45℃で一晩静置した。樹脂をカラム容器に

移した後、10 mlのMilli Q水、10 mlのグリシン緩衝液、10 mlのMilli Q水、10 mlの洗浄緩衝液、10 mlのMilli Q水を順次用いて洗浄した。

作製したカラムを10 mlのTBSで洗浄後、液を完全に流しきった後に適当量の血清を加え、数回転倒混和してから冷蔵庫中で一晩放置した。血清を流した後、10 mlのTBS、30 mlの洗浄緩衝液、30 mlのTBS、10 mlの0.15 M塩化ナトリウムを用いて順次洗浄した。液を完全に流した後に、カラム樹脂にグリシン緩衝液を重層した。溶出液のpHをpH試験紙を用いて測定し、溶出液が酸性になったら、あらかじめ50 μ lの1 Mトリスを加え氷冷しておいたマイクロチューブに1 mlずつ分注した。5 ml採取したら、さらに10 mlのグリシン緩衝液で洗浄し、20 mlのMilli Q水で洗浄した。カラムは最終的に5 mMのアザイドに置換し、冷蔵庫で保存した。

ペプチドカラムで精製した抗体画分は、原液の280 nmの吸光度を計ることにより濃度を測定した。ウサギIgG 1 mg/mlの280 nmにおける吸光度は約1.35である。

2.3.8 ウェスタン分析

10%アクリルアミドゲルを用いて培養細胞由来のタンパク質のSDS-PAGEを行い、フィルターに転写した。一次抗体としてCNGgust抗体を、二次抗体としてHRP結合抗ウサギIgG抗体を用いてウェスタン分析を行った。検出はECL Kit (Amersham社)を用いて行った。

2.3.9 培養細胞の抗体染色

チャンバースライドに培養した細胞に前述した方法でトランスフェクションを行い、2日後に抗体染色に供した。スライド部からチャンバー部分はずしてPBSで洗浄した後、アセトンに5分間浸し固定を行い、0.1%トリトンX-100/PBSに5分間浸した。PBSで3回洗浄した後、2%BSA/PBSで100倍に希釈したCNGgust抗体で1時間反応した。PBSで3回洗浄した後、2%BSA/PBSで400倍に希釈したFITC結合抗ウサギIgG抗体を1時間反応させた。PBSで3回洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察した。

2.3.10 CNGgustのチャンネル活性の測定

芯入りガラス管をマイクロブラーを用いて引くことにより、先端直径が1~5

μm のガラス針を作製した。針先端のガラス管が細くなった部分の外側にダウコーニングシルボット184を塗り、ニクロム線で熱することにより針のコートを行った。さらに針先端部を顕微鏡下で白金線を用いて熱し、heat polishすることにより電流測定用のガラス微小電極を作製した。微小電極の末端から $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過した電気生理用緩衝液を充填し、電流測定用のプローブに取り付けた。

コラーゲンコートしたカバーガラス上にHEK293細胞を培養し、CNGgust発現プラスミドおよびGFP発現プラスミドをトランスフェクションしたものを、カバーガラスごと顕微鏡下に設置した灌流用のチャンバーに入れ電気生理用緩衝液でゆるやかに灌流した。微小電極を陽圧を与えながら灌流液中に浸し、電圧をかけない状態での電流値が $0\ \text{A}$ になるようにアンプの調整を行った。紫外線照射によりGFPの発現が認められた細胞の細胞膜にガラス微小電極を接した後、電極に与えていた陽圧を解除した。微小電極の電気抵抗を常時モニターし、電気抵抗が十分上昇するまで軽く陰圧を与えた。電気抵抗が上昇したことを確認した後、電極先端を細胞表面から灌流液中に引き上げることににより電極先端部の微小膜領域を切り取り、インサイドアウトのパッチを作製した。

作製したパッチ膜の膜電位を $0\ \text{mV}$ に固定しておき、膜電位を $30\ \text{ms}$ 間変化させた際に流れる電流を記録した。膜電位の変化は1秒に1回行い、 $+90\ \text{mV}$ 、 $+75\ \text{mV}$ 、 $+60\ \text{mV}$ のように $-75\ \text{mV}$ まで $15\ \text{mV}$ 間隔で計12回変化させた。パッチ膜に対するこの一連の操作を、灌流液中の環状ヌクレオチド(cGMPもしくはcAMP)濃度を変えながら繰り返し行った。30 ms間の膜電位を与えたうち、与えはじめてから25 ms後における電流の値を数値化し、環状ヌクレオチドの濃度依存性等の解析に用いた。

3. 結果

3.1 培養細胞におけるCNGgustタンパク質の発現

培養細胞発現用のベクターにCNGgustをコードするcDNAのコード領域全体を挿入した発現プラスミドを構築した。この発現プラスミドをHEK293細胞にトランスフェクションし、2日後におけるCNGgustタンパク質の発現をCNGgust抗体を用いたウェスタン分析により検討した。トランスフェクションの際には、外来タンパク質の発現量を増加させるためのpAdVantage (Promega社)や、蛍光タンパク質であるGFPを発現するようなプラスミド(pS64T-C1もしくはは

EGFP-N1、Clontech社)をCNGgust発現プラスミドとともに用いた。

ウェスタン分析の結果、CNGgust発現プラスミドをトランスフェクションした細胞から抽出したタンパク質を泳動したレーン(図2-12、レーン3)には、コントロールとしてベクターのみをトランスフェクションしたもの(図2-12、レーン1)には見られない約66 kDaのバンドが確認できた。これより構築したCNGgust発現プラスミドをHEK293細胞にトランスフェクションすることによりCNGgustタンパク質が発現することが確認された。またpAdVantageとGFPを発現するようなプラスミドをベクターとともにトランスフェクションした細胞由来のタンパク質にはバンドが見られず(図2-12、レーン2)、また両プラスミドはCNGgustタンパク質の発現を阻害しなかった(図2-12、レーン4)。従って今後トランスフェクションを行う際には常にpAdVantageを用い、トランスフェクションされた細胞を確認する必要があるときにはGFP発現プラスミドも用いることにした。

3.2 培養細胞に発現させたCNGgustタンパク質の細胞内の局在

発現させたCNGgustタンパク質が細胞膜に局在しているかどうかについて、CNGgust抗体を用いた抗体染色により検討した。その結果、採用したトランスフェクションの条件では全体で約20~30%の細胞にCNGgustタンパク質が発現している様子が観察された。またそれぞれの細胞においては、細胞膜にも存在している様子が確認された(図2-13)。

3.3 CNGgustのチャンネル活性

CNGgustのチャンネル活性について検討するため、CNGgustを発現している細胞の細胞膜からインサイドアウトのパッチを作製し、パッチ膜に膜電位を与えたときに流れる電流を環状スクレオチド添加の有無の場合について測定した。

トランスフェクションにはCNGgustの発現プラスミドとともにGFP発現用のプラスミドを用いた。紫外線照射した際の蛍光を観察することによりGFPの発現が確認された細胞の細胞膜から2.3.10に述べたようにしてインサイドアウトのパッチを作製した(図2-14)。電極の電気抵抗を常時モニターすると、灌流液に浸した段階での抵抗は数M Ω の値を示すが、電極を細胞膜に接触させた瞬間にその抵抗は増加する。その後電極に与えていた陽圧を解除してやや陰圧を与えると、細胞膜がガラス電極に密着することにより抵抗は飛躍的に増加する。

電極先端の微妙な形状や細胞膜との密着度により得られる抵抗値はその都度変わるが、この段階での抵抗が高いほどノイズの少ない測定結果が得られる。3回もしくは4回に1回程度の割合で数G Ω 程度の抵抗にまで増加した。この状態になった膜を細胞から切り出し、インサイドアウトのパッチ膜の作製を行った。

まず作製したパッチ膜の膜電位を0 mVに固定すると、電流は全く流れなかった。その状態から図2-15Aに示したように膜電位を変化させた際に流れる電流を記録した。まず灌流液に電気生理用緩衝液を用いたときには、膜電位を変化させてもパッチ膜を流れる電流はほとんど観察されなかった(図2-15B)。一方同一のパッチ膜に対して、灌流液に100 μ MのcGMPを加えた電気生理用緩衝液を用いたときには、膜電位を変化させると電位依存的にパッチ膜を電流が流れる様子が確認できた(図2-15C)。パッチ膜を流れる電流は膜電位を与えた30 msの間ほぼ一定であった。

1つのパッチ膜において、与えた膜電位と流れる電流との関係を灌流液中に様々な濃度のcGMPを加えたときについて記録すると図2-16のようになり、cGMPの濃度依存的に電流の増加が見られることが判明した。また膜電位を+90 mVから-75 mVまで変化させた場合においては極端な整流性は見られなかった。膜電位が-60 mVのときに、灌流液中に種々の濃度の環状ヌクレオチドを加えた際に流れる電流を、100 μ MのcGMPを加えたときに観察される電流に対する相対値で示すと図2-17のようになった。最大電流の半分を流すような各環状ヌクレオチドの濃度はcGMPが約3 μ Mなのに対してcAMPは約300 μ Mであり、CNG_{gust}の環状ヌクレオチドに対する感受性はcGMPの方が約2桁高いことが判明した。またcAMPを十分量灌流液に加えた際に見られる電流値はcGMPを十分量添加した場合の約85%であった(図2-17)。

4. 考察

パッチクランプ法は細胞膜において単一(あるいは複数個)のイオンチャンネル分子の活動をそれを通るイオン電流として記録する方法で、1976年にNeherとSakmannによって開発された(Neher, E. and Sakmann, B., 1976)。具体的には細胞膜にガラス微小電極をギガオーム(G Ω , $10^9\Omega$)以上の高抵抗で密着させ、その先端開口部の微小膜領域を電氣的に他の領域と隔絶した状態で電位固定し、そこに含まれるイオンチャンネルを通る電流(pA (10^{-12} A)) オーダ

一) を計測する方法である。

この方法には種々のバリエーションがあり、測定したいチャンネルの種類や状態により採用する方法は異なってくる (Hamil, O. P. et al., 1981)。微小電極に細胞膜を密着させた状態で電極を引き上げると、細胞からバッチした膜が切り取られてインサイドアウトのバッチが形成される (図2-14)。この方法では細胞内に相当する側が灌流液に接しているため、細胞内液条件を灌流液を介して自由に制御しつつ、細胞活動とは独立した形でチャンネルの活性を観察できる。ただし細胞質画分は灌流液により洗浄されるため、細胞質にチャンネルの制御因子が存在している場合にはそれが欠落してしまうことに注意が必要である。

CNGチャンネルは細胞質側に存在するヌクレオチド結合領域に環状ヌクレオチドが結合することによりチャンネルが開くが、この際に他の細胞質因子は必要ではない。また外部から与える環状ヌクレオチドの濃度を制御するためにも、細胞内領域が灌流液側に露出されていることが望ましい。これらのことはインサイドアウト法の理論に合致しているといえよう。

CNG gust とともに培養細胞に発現させたGFPというタンパク質はクラゲから発見されたタンパク質で、他の因子を必要とせずに紫外線の照射により単独で緑色の蛍光を発する。生きた細胞中でのモニターが可能なることから、現在では大腸菌、酵母、線虫、ハエ、哺乳類培養細胞、植物など多種の分野で使用されている。今回はバッチ膜の作製の際の効率を上昇させるために、トランスフェクションが行われた細胞のマーカーとして使用した。実際にはCNG gust の発現を可視化することが最も良い方法ではあるが、細胞を生きたままの状態を確認することは困難である。そこでCNG gust 発現プラスミドに比べ少量のGFP発現プラスミドをトランスフェクションに用いることにより、GFPが発現している細胞にはCNG gust も発現していることが強く期待される状況をつくった。実際今回の条件で電気生理の実験を行ったときには、GFPが発現している細胞からバッチ膜を作製するとその大部分から環状ヌクレオチド依存性の電流が観察された。

これまでにクローニングがなされたCNGチャンネルにおける電気生理学的な解析は多数行われている。発現系としては培養細胞もしくはアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いたものが多い。用いる培養細胞としては環状ヌクレオチドによって直接影響を受けるようなチャンネルを発現していないことから

HEK293株がよく用いられている。それぞれのCNGチャンネルの環状ヌクレオチド濃度依存性を求める際には、今回CNGgustで行ったのと同じようにインサイドアウトのパッチを作製して測定を行っている。これまでに出版されたデータとして、目の杆体に発現するCNGチャンネルは1 mMという高濃度のcAMPを与えても電流が流れず、cAMPによっては活性化されないことが知られている (Kaupp, U. B. et al., 1989; Barnstable, C. J. and Wei, J.-Y., 1995)。一方、嗅上皮に発現するCNGチャンネルはcAMPによっても活性化されるが、その感受性はcGMPに比較して約30倍低い (Dhallan, R. S. et al., 1990)。CNGgustは杆体に発現するCNGチャンネルの場合とは異なり、cGMPによってもcAMPによっても活性化されるが、cGMPに対する反応性の方が約100倍高かった (図2-17)。

イオンチャンネル一般の構造として、電位依存性のNa⁺チャンネルおよびCa²⁺チャンネルは6回膜貫通の領域が分子内で4回繰り返される24回膜貫通の構造をとっている。一方、電位依存性のK⁺チャンネルやCNGチャンネルは6回膜貫通型の構造をしていることから、これらは4量体を形成することによりチャンネル分子として機能していることが推測されている。電位依存性のK⁺チャンネルにおいてはサソリ毒素および毒素不感受性変異体を用いた解析により、4つのサブユニットから構成されていることが確認された (MacKinnon, R., 1991)。またCNGチャンネルにおいてはコンダクタンスの異なる2種のCNGチャンネルを用いた解析により、やはり4量体の形成が示されている (Liu, D. T. et al., 1996)。

多量体で機能するCNGチャンネルは、最近 α サブユニットと β サブユニットからなるヘテロオリゴマーを形成していることが強く推定されている。 α サブユニットは一般にCNGチャンネルタンパク質と呼ばれてきたものであり、単独で発現させたときでも環状ヌクレオチドによって活性化されるチャンネル、すなわちCNGチャンネルとして機能する。 β サブユニットは杆体、嗅細胞、精巣からクローニングされ、 α サブユニットとアミノ酸配列の相同性を有しており構造的に相同であるのにも関わらず、単独では環状ヌクレオチドによって活性化されるチャンネルを形成しない (Chen, T.-Y. et al., 1993; Biel, M. et al., 1994; Bradley, J. et al., 1994; Liman, E. R. and Buck, L. B., 1994; Körschen, H. G. et al., 1995)。しかし、 β サブユニットを α サブユニットと共発現させることによってチャンネルを形成させたときには、 α サブユニット単独のチャンネルの場合と比較して電気生理学的諸性質が変化することが知られている。例えば嗅

細胞のCNGチャンネルの場合には β サブユニットと共発現することによりcAMPへの感受性が上昇し、実際の嗅細胞で機能しているチャンネルと電気生理学的な性質が非常に似てくる (Bradley, J. et al., 1994; Liman, E. R. and Buck, L. B., 1994)。これらのことより、現在では β サブユニットはCNGチャンネルの調節サブユニットとして機能していることが示唆されている。舌上皮にも何らかの β サブユニットが発現しているなら、 α サブユニットであるCNGgustとヘテロオリゴマーを形成する可能性は強く、その場合には今回CNGgust単独を発現させた際に観察された環状スクレオチドに対する感受性等が変化することも十分予想される。実際の味細胞から電気生理学的にCNGチャンネルに相当する電流が観察されていればCNGgustの解析で得られた結果と比較することが可能であるが、現段階ではまだ報告はされていない。味細胞で機能している分子構造を推測するためにも、実際の味細胞におけるCNGチャンネルの電気生理学的性質の解明が待たれるところである。

舌上皮における発現ならびにCNGチャンネルとしての機能を有していることが確認されたCNGgustのラット舌上皮における局在について、抗体染色により第4節で検討を行った。

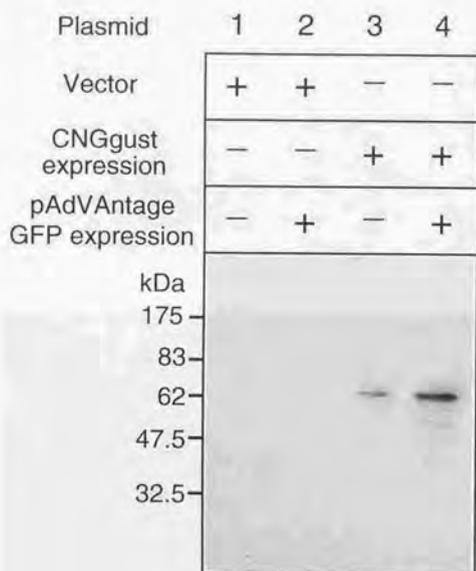


図2-12 HEK293細胞に発現させたCNGgustのウェスタン分析

CNGgustの発現プラスミドもしくはコントロールとしてベクターのみをトランスフェクションした細胞からタンパク質を抽出し、CNGgust抗体を用いたウェスタン分析を行った。また示した場合にはトランスフェクションの際にpAdVantageとGFP発現用のプラスミドも用いた。



図2-13 CNGgustを発現させた培養細胞の抗体染色

HEK293細胞にCNGgust発現プラスミドをトランスフェクションし、2日後に抗体染色を行った。一次抗体にCNGgust抗体を、二次抗体にFITC結合抗ウサギIgG抗体を用いた。透過光および蛍光の写真は同一視野のものである。

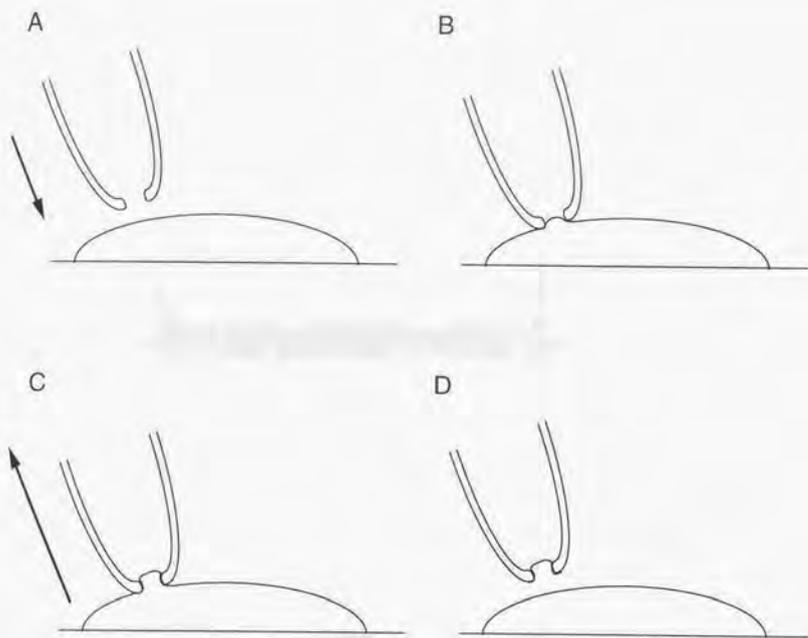


図2-14 CNGgustの電気生理学的な測定方法

CNGgustが発現している細胞の細胞膜にガラス微小電極を着け (A)、電極に与えていた陽圧を解除した (B)。電極にやや陰圧をかけて細胞膜を十分密着させ (C)、電極を引き上げるによりインサイドアウトのパッチ膜を作製した (D)。その後作製したパッチ膜に膜電位を与えたときに流れる電流を測定した。

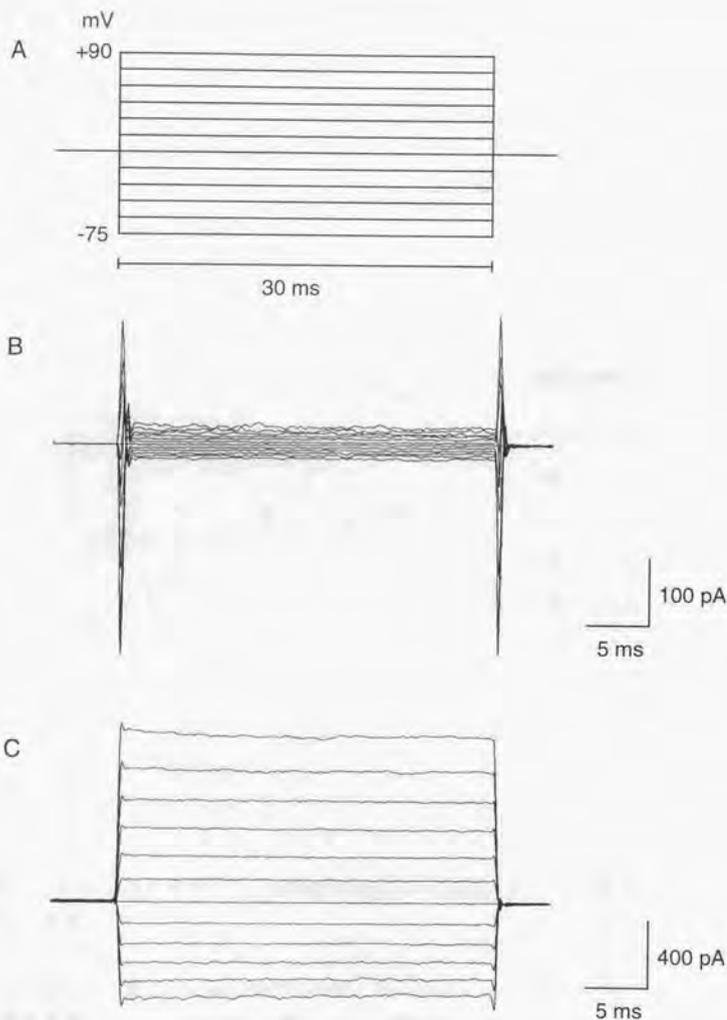


図2-15 CNG_{gust}の電気生理学的性質

CNG_{gust}が発現している細胞からインサイドアウトのパッチ膜を作製し、作製したパッチ膜に膜電位を与えたときに流れる電流を測定した。同一のパッチ膜に対してAのように30 msの膜電位を与えたとき、灌流液中に環状ヌクレオチドがないとき (B)、灌流液中に100 μMのcGMPを添加したとき (C) にそれぞれ流れる電流を示した。膜電位を+90 mVから-75 mVまで、15 mV間隔で12回与えた結果を一つにまとめて示した。Bの電流のスケールはCに比べて4倍拡大してある。

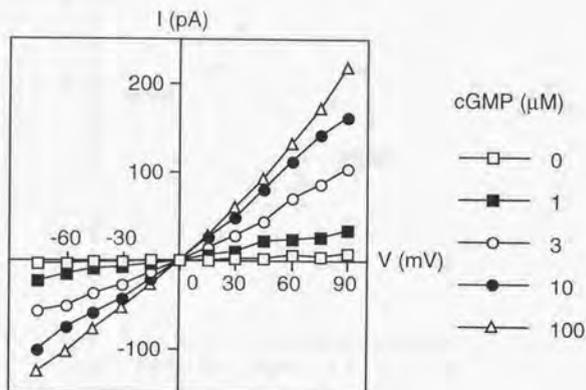


図2-16 CNGgustを発現させた細胞の細胞膜より作製したパッチ膜を流れる電流

CNGgustを発現しているHEK293細胞よりインサイドアウトのパッチ膜を作製した。一つのパッチ膜に対して膜電位を与えたときにパッチ膜を流れる電流の値を、灌流液中に種々の濃度のcGMPが存在する場合について測定した。膜電位と流れた電流との関係についてグラフで示した。

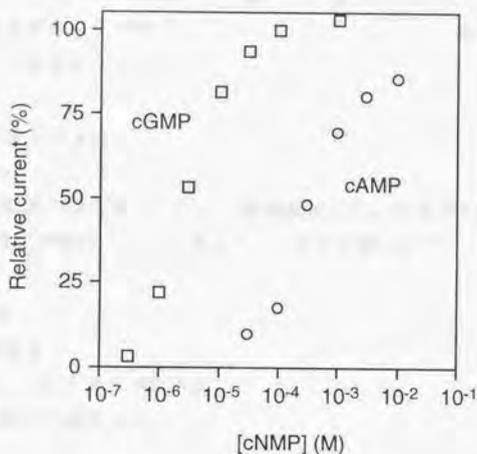


図2-17 CNGgustの環状ヌクレオチドに対する濃度依存性

CNGgustを発現している細胞の細胞膜よりインサイドアウトのバッチ膜を作製し、膜電位を-60 mVにしたときにバッチ膜を流れる電流を測定した。灌流液中に種々の濃度のcGMPまたはcAMPを添加した際に流れる電流を、100 μ MのcGMPを添加した際に観察される電流に対する相対値で示した。数値は複数個のバッチ膜より得られた値の平均値を示した。

第4節 舌上皮有郭乳頭におけるCNGgustの局在

1. 序

舌上皮での発現が確認されたCNGgustタンパク質の局在について検討するため、ラット有郭乳頭から切片を作製しCNGgust抗体を用いた抗体染色を行った。また味蕾特異的な発現様式を示すかどうかについて、舌咽神経を切断したラットを用いた解析も行った。

2. 材料および方法

2.1 材料

包埋用樹脂のOCTコンパウンドはMiles社より、正常ヤギ血清およびFITC結合抗ウサギIgG抗体はフナコシ社より、それぞれ購入した。

2.2 試薬

・組織固定液

10% ホルムアルデヒド液

PBSを用いて希釈した。

2.3 方法

2.3.1 ラット舌有郭乳頭の切片の作製

ラットを麻酔後速やかに舌を切除してOCTコンパウンドに包埋した後、液体窒素を用いて凍結固定させた。固定させた樹脂から有郭乳頭を含む部分をクライオスタットを用いて約5 μ mの厚さに切り、スライドグラス上にのせた。顕微鏡で観察して乳頭部であることが確認できた切片を以下の染色の操作に用いた。

2.3.2 抗体染色

有郭乳頭を含む切片を組織固定液で10分間処理した後、PBSで希釈した正常ヤギ血清を用いてブロッキングを行った。次いでPBSで100倍に希釈したCNGgust抗体で一晩反応し、PBSで洗浄を行った。その後PBSで400倍に希釈したFITC結合抗ウサギIgG抗体を反応させた。PBSで洗浄後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

2.3.3 ラット舌咽神経の切断

ラット舌咽神経の切断は朝日大学歯学部二ノ宮裕三教授に行っていただいた。生後約5週間のラットに手術を施すことにより舌咽神経を切断し(Ninomiya, Y. et al., 1994)、約6週間通常飼育を行った後に有郭乳頭の切片の作製を行った。切片は上記したのと同様にCNGgust抗体を用いた抗体染色に供した。

3. 結果

3.1 舌上皮有郭乳頭におけるCNGgustの局在

舌上皮に発現が確認されたCNGgustの局在について検討するため、CNGgust抗体を用いた抗体染色を行った。切片は味蕾が多く含まれる有郭乳頭から作製した。

その結果、有郭乳頭切片に存在するほぼ全ての味蕾においてシグナルが観察され、それ以外の上皮部分には有意なシグナルは認められなかった(図2-18B)。これと同じ様子が多数の切片で確認されたことから、CNGgustは有郭乳頭においては味蕾に発現していることが確かめられた。それぞれの味蕾における染色は味孔部分に強く認められ(図2-18C)、味細胞の先端部にCNGgustが局在していることが強く示唆された。

3.2 舌咽神経を切断したラットにおける抗体染色

舌咽神経を切断することにより有郭乳頭の味蕾は退化し、味細胞が消失することが知られている(Guth, L., 1957)。今回は舌咽神経切断の6週後に有郭乳頭の切片を作製したが、顕微鏡観察によつては味蕾は認められなかった。この切片を用いてCNGgust抗体を用いた抗体染色を同様に行ったところ、味蕾が存在していた部分に相当する乳頭溝部分の上皮における有意な染色は観察されなかった(図2-18D)。このことより有郭乳頭におけるCNGgustの発現は味蕾に特異的、すなわち味蕾を構成する味細胞に特異的であることが示唆された。

4. 考察

舌上皮に発現が確認されたCNGgustの局在について検討するため、CNGgust抗体を用いた抗体染色を行った。材料としては味蕾が多数集まっている有郭乳頭を選択し、乳頭溝の上皮における局在を検討した。

抗体染色の結果、CNGgustは有郭乳頭のほぼ全ての味蕾に発現が認められた。

また味蕾の中でも味孔付近に局在している様子が確認された。味細胞は味孔部にて外界と接しており、この部分には多数の微絨毛が存在する。味細胞は味孔部分で味物質の受容を行っていると推定されている。CNGgustが味孔に局在しているということは、この分子が何らかの味物質の受容における情報伝達経路に関わる分子であることを強く推察するものであろう。

ラットにおいては、舌咽神経の切断後約1週間で有郭乳頭に存在する味蕾は完全に消失することが知られている (Guth, L., 1957)。また再び舌咽神経を連絡しない限り、味蕾が再生することはない。舌上皮に発現するGタンパク質であるガストデューシンにおける解析でも、舌咽神経切断により味蕾を退化させたときにその有郭乳頭における発現が観察されなかったことより、味細胞に特異的であることを確認している (McLaughlin, S. K. et al., 1992)。ガストデューシンと同様に、今回解析を行ったCNGgustにおいても味蕾を退化させたときにその発現が認められなくなったことより (図2-18D)、CNGgustの有郭乳頭における発現が味細胞特異的であることが強く示唆された。味細胞特異的な発現様式を示すことが味覚情報伝達にかかわる分子であることの証明にはならないが、現時点ではCNGgustが味覚の情報伝達に関与する分子であることを十分に期待することができると言えよう。

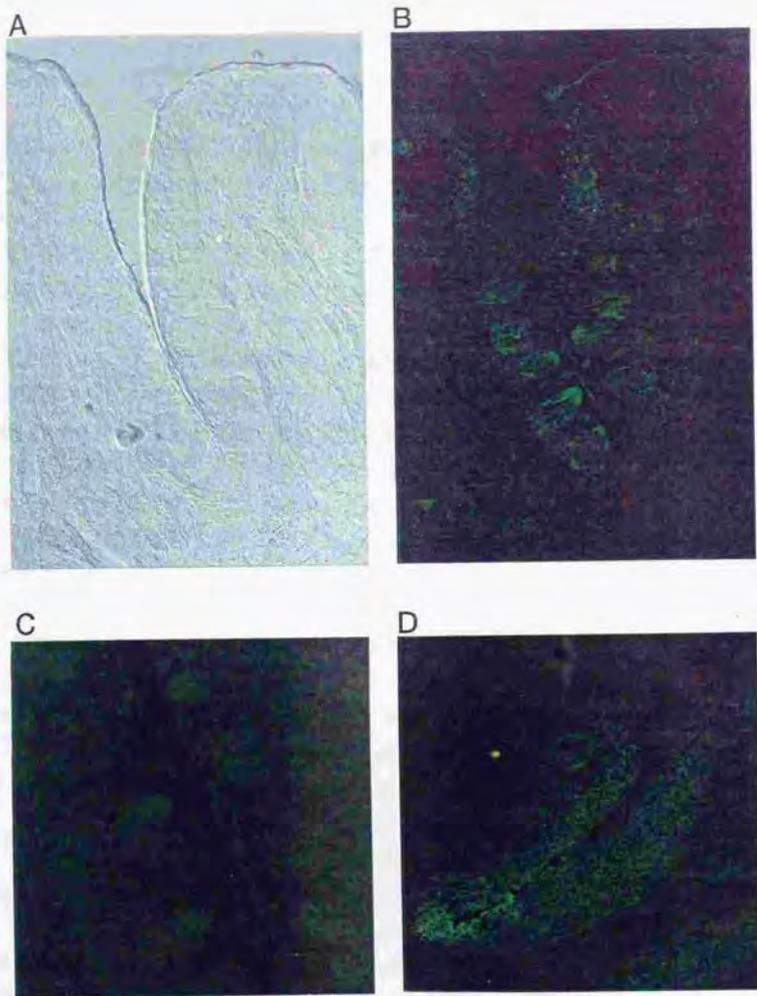


図2-18 ラット有郭乳頭におけるCNGgustの局在

ラット有郭乳頭より切片を作製し、CNGgust抗体を用いて抗体染色を行った。有郭乳頭上皮においては味蕾に局在している様子が観察できる (A、B)。違う切片の味蕾部分を拡大すると特に味孔部分に局在が認められる (C)。舌咽神経を切断することにより味蕾を退化させたラットにおいては有郭乳頭におけるCNGgustの発現が認められなかった (D)。

第2節から第4節にかけて舌上皮に発現しているCNGチャンネルとしてCNGgustを明らかにした。これは舌上皮におけるCNGチャンネルの存在に関する初めての報告である。CNGgustのクローニングは先に第2節で述べたように非常に困難を伴った。舌上皮では味を受容を行っているときされる味細胞の割合が低く、味細胞に特異的な発現様式を示すCNGgustの発現量が舌上皮全体からすると非常に少ないこともその原因の一つであったであろう。他の感覚受容を行う組織と同じように、味細胞においてもかなり古くより何らかのCNGチャンネルが存在していることが推察されていた。事実、複数のグループにおいて、味細胞を用いた電気生理学的手法によりCNGチャンネルに相当するコンダクタンスの獲得のための努力がなされていた。今回それに先駆けて分子生物学的手法により舌上皮におけるCNGチャンネルの存在を明らかにしたことから、今後はCNGチャンネルの味細胞で果たしている機能を推測するための解析へと研究が向かうことが期待される。

現在までに得られている情報から考えると、以下に述べる多数の理由によってCNGgustが味覚の細胞内情報伝達に関与している分子であることが強く推定される。味覚の情報伝達経路を担うであろう複数の分子の味細胞における存在、環状ヌクレオチドを細胞内二次メッセンジャーとする味覚情報伝達経路の示唆、CNGgustの味細胞に特異的な局在様式、味覚以外の感覚受容を行う組織でのCNGチャンネルの役割などがそれらの理由である。

呈味物質はその種類により様々な経路を経て受容、認識される (Lindemann, B., 1996; Kinnamon, S. C. and Margolskee, R. F., 1996)。ある種の味物質においてはGタンパク質に共役する7回膜貫通型レセプターが受容を行うことが示唆されている。実際、舌上皮味細胞にはレセプターならびにその下流に位置する細胞内情報伝達に関わる分子の存在が確認されている。これまでに味細胞に発現が認められた分子として、嗅上皮に発現する嗅覚レセプターと相同性を有する多数のGタンパク質共役型の7回膜貫通レセプター (Abe, K. et al., 1993a; Abe, K. et al., 1993b; Matsuoka, I. et al., 1993; Tal, M. et al., 1995; Thomas, M. B. et al., 1996)、Gタンパク質であるガストデューシンやトランスデューシン (McLaughlin, S. K. et al., 1992; Ruiz-Avila, L. et al., 1995)、環状ヌクレオチドの加水分解を行う酵素であるホスホジエステラーゼ (McLaughkin, S. K. et al.,

1994; Ruiz-Avila, L. et al., 1995)、cAMPやcGMPの合成を行うアデニル酸シクラーゼやグアニル酸シクラーゼ (Kurihara, K. and Koyama, N., 1972; Asanuma, N. and Nomura, H., 1995)、レセプターの脱感作を行うロドプシンキナーゼ (Premont, R. T. et al., 1994) などが挙げられる。これらの分子は味細胞に共存していることから、同一の細胞内情報伝達経路に関わることも期待される。

環状ヌクレオチドを細胞内二次メッセンジャーとする情報伝達経路の存在は以下のような知見から示唆されている。前述したように環状ヌクレオチド濃度の制御に直接的に関与するホスホジエステラーゼ、アデニル酸シクラーゼ、グアニル酸シクラーゼといった分子が味細胞には存在している。また味細胞に発現するGタンパク質であるガストデューシン、トランスデューシンは環状ヌクレオチド濃度を下げるような経路で働くGiのファミリーに属していることから、その下流には環状ヌクレオチド濃度の減少が起きることが予想される。さらに生化学的な実験により、ラット味細胞においては砂糖の刺激により細胞内cAMPの濃度の増大が観察されている (Striem, B. J. et al., 1991)。味細胞から脳へと味の情報が伝達されるためには、味神経を介したシグナル伝達が必要であり、それには味細胞中で最終的に何らかの電位変化が起こることが必要であると考えられる。その過程にチャンネル分子が関与することが推定され、CNGチャンネルも候補分子の一つであると思われる。

またCNG_{gust}は味蕾に特異的な発現様式を示し、その他の上皮細胞における存在は確認されなかった (図2-18)。しかも有郭乳頭においては切片に含まれるほぼ全ての味蕾において存在していた。しかし味蕾中の全ての細胞が染色されたわけではない。CNG_{gust}の発現している細胞に存在する他の情報伝達因子が明らかにされれば、その経路も推測できるであろう。特にGタンパク質はレセプターの下流の情報伝達経路を決定することより、ある種のGタンパク質と共存していることが観察されれば、CNG_{gust}の機能の推測が可能となるであろう。

視覚・嗅覚の情報伝達においてはCNGチャンネルが視細胞および嗅細胞の細胞内情報伝達に重要な役割を果たしていることはこれまで何度も繰り返して述べてきた。視覚の情報伝達経路では、レセプター、Gタンパク質、ホスホジエステラーゼ、CNGチャンネルに至る経路が証明されている (Yau, K.-W. and Baylor, D. A., 1989)。しかし伝達の経路がはっきりと証明されているのは視覚のみであり、嗅覚においても非常に強く示唆されているものの、完全な経路の

証明はなされていない。その理由として各嗅覚レセプターに対するリガンドの決定がなされていないことが挙げられる。視細胞に発現するロドプシンはレチナールを結合しており光が照射されるとレチナールの異性化が起こる。それがシグナルとなり下流へと情報が伝わる。受容するものが光であることが分かっていたことから、視細胞においては情報伝達経路の検証が可能であった。一般にレセプターが受容する物質（リガンド）が明らかでないと、レセプター下流に存在する経路の同定は非常に困難である。匂物質を受容する嗅覚レセプターは哺乳類においては1000種類以上も存在しているとされるが(Buck, L. and Axel, R., 1991; Buck, L. B., 1996)、それらが受け取るであろう匂いの種類は無数といってもいいほど存在する。候補となるリガンドの数があまりにも多いため、リガンドとレセプターとの対応関係はほとんど明らかにされていない。

唯一嗅覚レセプターにおいてリガンドとの対応が付けられているものとして線虫由来のレセプターがある。線虫においては302個の神経細胞間で形成される全てのシナプス結合が電子顕微鏡のレベルで解析されている。神経細胞のうち、32個が匂いや味を認識する化学受容を行う神経細胞であると考えられている。匂いや味の受容を行う候補分子として、化学受容を行う神経細胞で発現している多数の7回膜貫通型のレセプターファミリーが同定されている(Troemel, E. R. et al., 1995)。それらのうちの一種類であるOdr-10というレセプターが2,3-ブタンジオン（ジアセチル）を受容することが明らかにされている

(Sengupta, P. et al., 1996)。しかしこの知見はジアセチルに不感受性の変異体および遺伝学的手法を用いての解析により見いだされたものであり、生化学的手法からのアプローチではない。線虫では遺伝学的解析が可能なこと、および各神経細胞の機能が明らかにされているからこそリガンドの同定ができたのであろう。最近の報告で、魚類のゼブラフィッシュの嗅覚レセプターの一つを哺乳類培養細胞で発現させたところ、このレセプターが魚の餌の抽出物に反応することが見いだされた(Wellerdieck, C. et al., 1997)。まだこのレセプターのリガンドは同定にまで至っていないが、今後このような解析が多数行われれば、近い将来複数の嗅覚レセプターにおいてリガンドの決定が行われると予想される。受容するリガンドが分かりさえすればレセプターのアッセイを行うことが可能となり、嗅覚受容においてもいくつかの情報伝達経路の決定がなされるであろう。

味覚受容を行う舌上皮にも嗅覚レセプターと相同性を持つ多数の7回膜貫通

型のレセプターが存在するが、これらに関しても現在においてはリガンドを決定するには至っていない。味を呈する物質も匂い物質と同じように無数の種類のものが存在し、嗅覚の場合と同じようにその同定は困難であろう。リガンドからレセプター、Gタンパク質という経路までが確定されないことには、そのさらに下流に位置するであろうCNGチャンネルの関与は検討することができない。味覚レセプターのリガンド決定が望まれるところである。

嗅覚のほとんどの情報伝達経路にCNGチャンネルが関与することを強く示唆するデータが最近提出された。嗅細胞に存在するCNGチャンネルを発現しないようなノックアウトマウスを作製したところ、このマウスはほとんどの嗅物質に対する反応性を消失した (Burnet, L. J. et al., 1996)。古くより行われている嗅上皮に作用させた際の生化学的な解析から、匂い物質は嗅細胞内のcAMP濃度を上昇させるようなもの (Pace, U. et al., 1985; Sklar, P. B. et al., 1986; Breer, H., 1990) と、嗅細胞内のIP₃の濃度を上昇させるようなもの (Huque, T. and Bruch, R. C., 1986; Boekhoff, I. et al., 1990; Breer, H. and Boekhoff, I., 1991) とに分類されている。cAMP濃度が上昇することはその下流にCNGチャンネルの活性化が起こることが推定されるため、嗅細胞CNGチャンネルのノックアウトマウスにおいてはcAMP濃度を上昇させるような匂いに対する反応のみが押さえられると予想されたが、実際にはIP₃濃度を上昇させるような匂い物質に対する反応をも阻害した。この事実はcAMPとIP₃がそれぞれの嗅物質に対する二次メッセンジャーとして機能することにより、異なる経路によって伝達されているのではないかという予想を覆すものであった。

味覚とは直接関連はないが、鼻腔の前下部に存在しており多くの動物でよく発達している鋤鼻器と呼ばれる器官に存在する粘膜構造は、嗅上皮粘膜の構造に類似している。しかしこの組織では匂物質ではなくフェロモンを認識しているとされる。事実、鋤鼻器では嗅上皮において発現している嗅覚レセプターは発現していない。最近この組織からフェロモン受容を行うことが期待される7回膜貫通型レセプターのクローニングがなされた (Dulac, C. and Axel, R., 1995; Herrada, G. and Dulac, C., 1997; Matsunami, H. and Buck, L. B., 1997)。鋤鼻器の細胞においてはGタンパク質としては主にG_oとG_{i2}の2種類しか発現しておらず、しかもこれらは発現する部位が明確に異なり、細胞はどちらか一方のGタンパク質しか発現していない (Haipern, M. et al., 1995)。レセプターとGタンパク質との局在に注目すると、1つのレセプターはG_oを発現している細胞に特異的

に発現しているか、Gi₂を発現している細胞に特異的に発現しているかのどちらかであった。つまりレセプターとGタンパク質の組み合わせが明確なことから、レセプター下流の伝達経路が推定しやすいといえよう。しかもリガンドの候補物質も基本的にフェロモンだけに絞られるため、その種類は嗅物質や味物質に比べて非常に少ない。さらに鋤鼻器にはCNGチャンネルも発現している。この器官では嗅細胞に発現するCNGチャンネルのβサブユニットのみが発現し、αサブユニットは発現していない (Berghard, A. et al., 1996)。βサブユニットは環状ヌクレオチドにより活性化されるチャンネルは形成しないことが知られていたが、最近、NO供与基によって活性化されるチャンネルを形成しうることが発見された (Broillet, M.-C. and Firestein, S., 1997)。これらの知見を考えると、フェロモン受容を行う鋤鼻器という特殊な器官ではあるが、レセプターとリガンドの同定、その下流の伝達経路、CNGチャンネルの役割などについて、関わる分子の種類が少ないという利点を生かした解析が今後進むことが期待される。この器官で得られる知見には、味覚受容においても共通に行われている事柄が多数存在することが期待される。

多種多様な味物質の認識を行っている舌上皮において、今まで存在が知られていなかったCNGgustが味覚の情報伝達経路の一端に関わっているとすれば、この分子に注目した解析を行うことにより、味覚情報伝達の解明への道が少しでも開けるかもしれないし、開けることを強く期待する。

第3章

ヒト胃に発現する水チャンネル

第1節 序論

1. 細胞膜の水透過

細胞膜を通しての水の移動は、消化、吸収、呼吸、循環、体温調節といった多くの重要な生理作用に関与している。細胞における水の出入りは細胞膜の脂質二重膜層の間隙を通して浸透圧差に応じて行われている。一般に動物細胞の細胞膜はある程度の水を透過し、周辺環境との浸透圧バランスを保っている

(Haines, T. H., 1994)。しかし腎臓や肺といった大量の水を出入りさせる組織や器官もあり、そこで観察される細胞の水透過性の大きさは脂質二重膜を通過する水の量だけからはとうてい説明できない (van Os, C. H. et al., 1994)。このことから、実体は明らかとされてはいなかったが、水を選択的に透過するような細胞膜上の穴のようなもの、おそらくは水選択的なチャンネルの存在が古くより示唆されてきた。

2. 水を選択的に透過する水チャンネルの発見

水を選択的に透過する水チャンネルの同定は変わったところから行われた。赤血球の膜から主要膜タンパク質を検索している過程で見つけられた約28 kDaのタンパク質が、最初に発見された水チャンネルであった。

1988年にこのタンパク質がヒト赤血球の膜より精製され、精製タンパク質に対する抗体を用いた実験により、(1)このタンパク質が赤血球膜に非常に多量に存在すること、(2)糖鎖が付加されることにより高分子量になったものも存在すること、(3)他の組織における分布を調べたところ、腎臓を構成する細胞の細胞膜にも多量に存在すること、といった事実が明らかにされた

(Denker, B. M. et al, 1988)。さらにこのタンパク質が一般的なチャンネルタンパク質のように多量体を形成しうることも判明した (Smith, B. L. et al., 1991)。精製タンパク質のN末端アミノ酸配列 (Smith, B. L. et al., 1991) をもとにcDNAのクローニングが行われ、アミノ酸配列の疎水性プロットから推定される全体的な構造が6回膜を貫通するチャンネル様タンパク質であったことから、新たにこのタンパク質はCHIP28 (channel-forming integral protein of 28 kDa) と命名された (Preston, G. M. et al., 1991)。この段階においてもCHIP28タンパク質の機

能については未知のままであったが、赤血球および腎臓という水透過性の高い細胞や組織の細胞膜に局在してチャンネル様の構造をとることから、水を透過させるチャンネルであることも推定される機能のひとつではあった。

このcDNAにコードされるタンパク質をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させたところ、卵母細胞の外液を希釈液にしたときに著しい体積増加が見られ、浸透圧に依存した水透過性が増加したことが判明した (Preston, G. M. et al, 1992)。また同時に、赤血球膜の水透過を可逆的に阻害する水銀によってCHIP28タンパク質を発現させた卵母細胞の水透過が阻害されること、およびCHIP28が水以外のイオンの透過性を上昇させないことも確かめられた。以上の結果より、このタンパク質が卵母細胞に内在する未知の水チャンネル分子を活性化させるような調節因子ではないかという危惧はあったものの、実際に細胞膜で機能している水チャンネルそのものであることが強く推定された。

その後CHIP28の精製タンパク質とリボソームを用いた再構成実験によってもこのタンパク質が水透過活性を有すること (Zeidel, M. L. et al, 1992; van Hoek, A. N. et al, 1992)、およびアフリカツメガエル卵母細胞だけでなくCHO細胞に発現させたときにも細胞の水透過性の上昇が確認された (Ma, T. et al, 1993b) ことから、CHIP28が水チャンネルタンパク質そのものであることが明らかにされた。

3. CHIP28の水チャンネルとしての諸性質

水チャンネルとして初めて同定されたこのCHIP28はヒト以外の生物種からも相当する分子のクローニングがなされ、CHIP28に相同なタンパク質を生物が共通に有していることが示唆された (Deen, P. M. T. et al., 1992; Patil, R. V. et al., 1994; Abrami, L. et al., 1994)。さらにCHIP28を材料として、(1) アミノ酸配列中にエピトープを挿入した変異体を用いた解析により、疎水性プロットから推定される通り、N末端とC末端が細胞質側に存在する6回膜貫通の構造をしていること (Preston, G. M. et al., 1994)、(2) CHIP28の水透過を阻害する水銀は還元剤添加により阻害効果を失うことから (Preston, G. M. et al, 1992) 阻害作用は細胞外に位置するシステイン残基によりもたらされると推測されたが、部位指定変異体を用いた解析により189残基目のシステインがその原因であること (Preston, G. M. et al., 1993)、といった性質が検証された。

CHIP28タンパク質が持つ機能の重要性は以下の実験からも示唆される。腎臓から抽出したmRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入すると卵母細胞の水透過性は上昇する (Zhang, R. et al., 1990) が、mRNAを注入する際にCHIP28のアンチセンスのオリゴヌクレオチドも同時に注入するとその上昇の大部分が抑さえられることが判明した (Echevarria, M. et al., 1993)。これより腎臓に存在する細胞の高い水透過性にCHIP28タンパク質が主要な役割を果たしていることが強く推察された。

生体中のCHIP28タンパク質の組織分布については様々なグループが抗体を用いた組織染色や*in situ*ハイブリダイゼーションによる報告を行っている (Sabolic, I. et al., 1992; Bondy, C. et al., 1993; Hasegawa, H. et al., 1993; Nielsen, S. et al., 1993a; Nielsen, S. et al., 1993b; Zhang, R. et al., 1993; Folkesson, H. G. et al., 1994; Hasegawa, H. et al., 1994a)。CHIP28タンパク質は腎臓だけでなく、目、脾臓、肺といった水の透過性の高い組織に幅広く分布しており、細胞機能の基本的役割を果たしていると推定されている。

また多量体の形成や立体構造に関する解析も精力的に行われている。精製されたCHIP28タンパク質とリポソームを用いた再構成膜の2次元結晶解析の実験により、CHIP28タンパク質が4量体を形成することが判明した (Jap, B. K. and Li, H., 1995)。さらに最近の研究として3次元結晶解析により α ヘリックス構造が膜を6回貫通していることが確認された (Walz, T. et al., 1997; Cheng, A. et al., 1997)。

4. 他の水チャンネル — アクアポリン (AQP) ファミリー

このようにしてCHIP28タンパク質の水チャンネルとしての諸性質が徐々に明らかにされてきたが、組織分布の詳細な解析などにより水チャンネルを形成するタンパク質が1種類ではないことが予想されてはいた。事実この数年間の間に、PCRならびにcDNAクローニングの手法によりCHIP28と高い相同性を持つ水チャンネルタンパク質が次々と明らかにされた。これらのタンパク質は「水の穴」という意味からアクアポリン (aquaporin, AQPと略される) と命名されたファミリーに分類されるに至った (Agre, P. et al., 1993)。

最初にクローニングされ、これまでCHIP28と呼んでいたものはaquaporin 1 (AQP1) と呼ばれるようになった。その後はクローニングがなされた順序に

従って番号付けがなされ、現在までに哺乳類においてはAQP1からAQP5の5種類の水チャンネルが明らかとなっている (Agre, P. et al., 1995)。これらはいずれも6回の推定膜貫通領域と、水の選択的な透過に必要とされている2つのNPA (Asn-Pro-Ala) モチーフを共通に保存しており、立体構造的にも相同であることが推測されている。

他のアクアポリンについてその特徴を簡単にまとめると、AQP2 (Fushimi, K. et al., 1993) はAQP1が発現していない腎臓の集合管に特異的に発現している。AQP3は主に腎臓、大腸、小腸に発現している (Ishibashi, K. et al, 1994)。このチャンネルは他のアクアポリンが水のみを透過するのに対し、尿素やグリセロールといった水以外の低分子物質も透過させる機能を有する (Ishibashi, K. et al, 1994)。またラット脳からは水銀に感受性を持たない水チャンネルであるAQP4が見つげられた (Jung, J. S. et al., 1994)。AQP5は唾液腺に発現しており、唾液の分泌に関与しているとされている (Raina, S. et al., 1995)。

水を透過するという共通の性質を持つ各アクアポリンタンパク質の機能相関についてはそれほど明らかとされていないが、尿の生成および排泄を行っている腎臓においては複数のアクアポリンの組織分布と機能との関連について詳しく調べられている。腎臓に存在するAQP1、AQP2、AQP3、AQP4はそれぞれ特異的な局在を示しており、しかもその役割も異なっていることが推測されている。AQP1は近位尿細管およびヘンレ下行脚の尿細管の管腔膜と基底膜の両方に発現している (Sabolic, I. et al., 1992; Nielsen, S. et al., 1993a)。AQP2は集合管の管腔膜および細胞内小胞にあり、抗利尿ホルモン (バソプレッシン) による制御を受けている (Nielsen, S. et al., 1993c; Fushimi, K. et al., 1994; DiGiovanni, S. R. et al., 1994; Nielsen, S. et al., 1995)。バソプレッシンはAQP2を細胞内小胞から管腔膜上に移動させることにより集合管の水透過性を充進させる。腎原性尿崩症という尿の濃縮が不能になる遺伝病がAQP2の変異によって生ずることも知られている (Deen, P. M. T. et al., 1994)。AQP3およびAQP4は集合管の基底膜に特異的に発現している (Ishibashi, K. et al, 1994; Terris, J. et al., 1995)。このような一つの組織内での局在の相違は、水を透過するという同一の性質を持つアクアポリンタンパク質がそれぞれ特異的な機能を果たしていることを示唆するものであろう。

5. 消化管におけるアクアポリンの存在

摂取した食物の消化、吸収を専業とする胃や腸においても水の透過は盛んに行われている。例えばヒト胃においては1日に平均2リットルもの胃液が分泌されている。そこに何らかの水チャンネルが関与している可能性は大きいことが考えられる。それにもかかわらず消化管に注目したアクアポリンの解析についてはこの研究を開始した段階ではほとんどなされていなかった。

AQP1は広い組織分布を示していることが知られているが、胃における発現は確認されていない。これまでクローニングされた水チャンネルの中ではAQP3のみがノーザン分析によってラット胃において発現していることが確認されている (Ishibashi, K. et al, 1994)。しかしこのタンパク質の胃における局在や機能については調べられておらず、さらに他のアクアポリンの存在の可能性についても知られていない。

6. 本研究の目的

以上のような背景をもとに、本章においては消化管の中で食品の初期消化を担っている胃に注目し、そこに発現している水チャンネルの検索を行うことにした。胃を選択した理由としては、消化に関係する酸やペプシノーゲンの分泌機構について詳しく調べられていること、および消化に関与している細胞の役割分担がはっきりしていることなどが挙げられる。さらに食品を摂取した後、最も早く食品が到達して消化が行われる臓器であることから、摂食行動と消化との関係についての検討がしやすいと考えられたためである。

まず第2節にてヒト胃において発現する水チャンネルのRT-PCRによる検索ならびにそのcDNAクローニングを行った。この水チャンネルの水透過性の活性についてアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いた解析を第3節で行った。ヒト胃における機能の推定を行うため、抗体染色によりその局在を第4節にて検討した。さらに胃における水チャンネルの発現が広く保存された形質であることを確認するため、ラットを材料として解析を行った結果を第5節にまとめた。

なお、この章におけるヒト胃からのcDNAクローニング、水透過活性、抗体染色についての結果は、*FEBS Letters*, 381巻 208~212頁に「A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secretory

cells of human stomach」 という題にて公表を行った。

第2節 ヒト胃に発現する水チャンネルのクローニング

1. 序

ヒト胃に発現する水チャンネルを検索するため、RT-PCRの手法を用いて実験を開始し、その後cDNAクローンの単離を行った。以下に詳細を述べる。

2. 材料および方法

2.1 材料

ヒト胃由来のmRNAおよびヒトゲノムDNAはClontech社より購入した。cDNA合成キット (First-Strand cDNA Synthesis KitおよびTimeSaver cDNA Synthesis Kit) はPharmacia社のものを、ヒト組織のノーザン分析用のフィルターはClontech社のHuman Multiple Tissue Northern Blotを使用した。

2.2 試薬

・10×MOPS緩衝液

0.4 M MOPS

0.1 M 酢酸ナトリウム

10 mM EDTA

水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 7.0に調整した。

・ノーザン分析泳動用緩衝液

1×MOPS緩衝液

18% ホルムアルデヒド液

Mili Q水を用いて作製した。

・ノーザン分析用ハイブリダイゼーション緩衝液

5×SSPE

10×Denhardt's solution

50% ホルムアミド

2% SDS

1/100量のサケ精子DNA (10 mg/ml) および適当量 (約100万cpm/ml) のプローブを熱変性させてから加えて使用した。

2.3 方法

2.3.1 プライマーのデザイン

既知のアクアポリンタンパク質に高く保存されている領域をもとにして、センス2種類(W1とW2)、アンチセンス2種類(WAとWB)の計4種類のプライマー(各20 mer)を合成した。

W1 5'-CA(TC)IT(AC)AA(TC)CCIGCIGTIAC-3'

W2 5'-AGIGGGIG(GC)ICACI(TC)CAA(TC)CC-3'

WA 5'-GCIA(GA)(GA)I(AT)IC(GT)IGC(AT)GG(GA)TT-3'

WB 5'-CCIA(TC)CCA(GA)(AT)AIA(TC)CCA(GA)TG-3'

それぞれH(IL)NPAVT、SG(AG)H(SIA)NP、NPARS(FL)(GA)、HW(IV)(FY)-W(IV)Gというアミノ酸配列に相当する。

2.3.2 RT-PCR

ヒト胃由来のmRNA(Clontech社)1 µgより、オリゴdTプライマーおよびFirst-Strand cDNA Synthesis Kit(Pharmacia社)を用いて一本鎖cDNAを作製した。作製したセンスプライマー2種、アンチセンスプライマー2種を用いた全ての組み合わせ(計4種類)でPCRを行った。PCRは96°C 1分、50°C 1分、72°C 3分の条件で30サイクル行った。アガロースゲルで電気泳動を行い、約400 bpのバンドを切り出した。切り出したPCR産物をプラスミドベクターにサブクローニングし、塩基配列の解析を行った。

2.3.3 cDNAライブラリーの構築およびcDNAクローニング

ヒト胃由来のmRNA 2 µgよりランダムプライマーを用いて二本鎖cDNAを合成し、*Not*I-*Eco*R Iアダプターを付加した。 λ gt10フェージベクターの*Eco*R Iのサイトに挿入してパッケージングを行い、ヒト胃のcDNAライブラリーを作製した。約100万プラークよりなるライブラリーのスクリーニングを上記のRT-PCR断片をプローブとして用いて行った。ハイブリダイゼーションは60°Cで行い、洗浄は60°Cで、最終的に1×SSC/0.1% SDSで行った。陽性クローンは*Not*Iでインサートを切断後プラスミドベクターにサブクローニングし、塩基配列の解析を行った。

2.3.4 5'-RACE

RT-PCRによって得られた断片中に存在する塩基配列をもとに14 merのオリゴ

ヌクレオチド (WC, 5'-TTTCCCATGATAAC-3') を作製し、これを用いてヒト胃の mRNA から一本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA の 3' 末端に TdT を用いて poly dA の配列を付加した。オリゴ dT プライマーと RT-PCR 断片中の塩基配列から作製したプライマー (WD, 5'-GCAGGTCCAAAGGATCGG-3') を用いて PCR を行うことにより cDNA の 5' 上流を含む断片を増幅し、得られた断片の配列を解析した。

2.3.5 ゲノムサザン分析

1 レーンあたり 20 μg のヒトゲノム DNA (Clontech 社) を各種制限酵素で消化後、1% のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、ナイロンフィルターに転写した。他のアクアポリンの遺伝子構造 (Moon, C. et al., 1993; Uchida, S. et al., 1994) より一つのエキソンよりなると推定される部分 (図 3-4 の -3 ~ +407 に相当する) を hAQP4cDNA より PCR で増幅し、得られた断片をプローブとして用いて 65°C でハイブリダイゼーションを行った。洗浄は最終的に 65°C、 $0.1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS で行った。

2.3.6 ノーザン分析

5 μg のヒト胃由来の mRNA に 5 μl の $10 \times \text{MOPS}$ 緩衝液、8.75 μl のホルムアルデヒド液、25 μl のホルムアミドを加え、水で全量を 50 μl にし 65°C で熱変成したものを 1% アガロースゲルで泳動し、ナイロンフィルターに転写した。他の組織由来のものについては Human Multiple Tissue Northern Blot (Clontech 社) を使用した。フィルターは hAQP4 の cDNA 断片 (図 3-4 の -3 ~ +1102 に相当する) をプローブとして 42°C でハイブリダイゼーションを行った。洗浄は最終的に $0.1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS を用い、60°C で行った。

2.3.7 ヒト AQP1cDNA 断片の獲得およびノーザン分析

ヒト AQP1cDNA (Preston, G. M., and Agre, P., 1991) のコード領域を増幅するようなプライマーを合成し、ヒト胃由来の cDNA を鋳型として PCR を行うことにより AQP1cDNA 断片を獲得した。この断片をプローブとして用い、hAQP4 のノーザン分析に用いたフィルターのハイブリダイゼーションを行った。条件は hAQP4 の場合と同様に行った。

3. 結果

3.1 RT-PCR

まずヒト胃に発現する水チャンネルの検索ならびにコードするcDNA断片を得る目的で、既知のアクアポリンに高く保存されている配列に相当するプライマーを作製してヒト胃のcDNAを鋳型としてRT-PCRを行うことを試みた。図3-1Aに示したように、既知の水チャンネルのアミノ酸配列は膜貫通領域を中心とする中央部付近に高い相同性を有している。そこで図3-1A、Bに示した位置に、センス2種、アンチセンス2種のプライマーを作製した。これらを組み合わせた全ての組み合わせ(4種類)で、ヒト胃のcDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、W1とWB、W2とWBという2つの組み合わせで約400 bpの断片が増幅された。増幅された断片の長さが既知のアクアポリンの塩基配列から予想される長さとはほぼ同じであったことより、増幅された断片をサブクローニングし、塩基配列の解析を試みた。サブクローニングによって得られた複数の断片の塩基配列を解析した結果、プライマーの組み合わせにかかわらずだ1種類の断片のみが得られたことが判明した。図3-2AにはW1とWBのプライマーの組み合わせで得られた断片の塩基配列およびそこから推定されるアミノ酸配列を示した。RT-PCR断片にコードされているタンパク質はラット脳に発現しているAQP4のものと非常に相同性が高く、さらにその他のアクアポリンにも相同性を有していた(図3-2B)。このことより、今回試みたRT-PCRによってヒト胃において発現する水チャンネルをコードするcDNA断片が得られたものと判断した。

3.2 ヒト胃に発現する水チャンネルのcDNAクローニング

得られたRT-PCRクローンに相当するcDNA断片を獲得するため、RT-PCR断片をプローブとして用い、約100万ブランクからなるヒト胃のcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。得られた5個の陽性クローンのインサートをサブクローニングし塩基配列を解析したところ、長さの違いはあるものの全てが1種類のmRNA由来であることが推定された。得られた陽性クローンのうちコード領域全てを含んだものをW4と命名した。このクローンは約1.7 kbpのインサートを有しており(図3-3)、推定されるコード領域は969 bp(323アミノ酸残基)であった。図3-4にクローンW4の塩基配列およびそこから推定されるアミノ酸配列を示した。推定開始メチオニン周辺の配列はコザックの法則に合致

していた (Kozak, M., 1987)。

3.3 5'-RACE

得られたRT-PCRの断片の配列をもとにしてアンチセンスのオリゴヌクレオチドを合成した。これをプライマーに用いてヒト胃のmRNAよりcDNAを合成し、TdTを用いて3'末端にポリdA配列を付加した。これを鋳型とすることにより5'-RACEの反応を行った。得られた多数の5'-RACEクローンの塩基配列を解析した結果、そのうちの最長のものは推定開始メチオニンの上流に20 bpの5'非翻訳領域の塩基配列を有していた。この長さを持つクローンが多数獲得できたことから、このタンパク質をコードするmRNAの5'末端は-20の位置付近であることが強く推定された。

3.4 アミノ酸配列の相同性および全体の構造

得られたcDNAクローンにコードされているタンパク質のアミノ酸配列を主なアクアポリンファミリーのものと比較した (図3-5)。ヒト胃に発現している水チャンネルはラット脳に発現しているAQP4 (Jung, J. S. et al., 1994) にアミノ酸レベルで94%の相同性を有していた。今回得られたものがヒト由来のものであることから、コードされているタンパク質をhuman aquaporin 4 (hAQP4と略す) と命名した。

またhAQP4はAQP4以外の既知のアクアポリンにも相同性を有していた。AQP5 (Raina, S. et al., 1995) と54%、AQP2 (Fushimi, K. et al., 1993) と49%、AQP1 (Preston, G. M. et al., 1991) と47%、AQP3 (Ishibashi, K. et al., 1994) と30%の相同性をそれぞれ有していた。hAQP4も他のアクアポリンタンパク質と同じようにアミノ酸配列中に2つのNPA (Asn-Pro-Ala) モチーフを有していた。このモチーフはチャンネルとしての水の選択的透過に機能しているとされている配列である。また疎水性プロットからhAQP4は6回の推定膜貫通部位を有し、N末端とC末端が細胞質側に位置していることが推定された (図3-6)。

3.5 hAQP4をコードする遺伝子の同定

hAQP4に相当する遺伝子を同定する目的で、ヒトのゲノムDNAを各種制限酵素で消化し、hAQP4cDNAの一部をプローブとして用いたゲノムサザン分析を行った。その結果、EcoR I、BamH I、Hind III、Bgl IIで消化したそれぞれのレ

ーンに一本のバンドしか確認されず、hAQP4をコードする遺伝子がゲノム上シングルコピーであることおよびプローブとして用いた配列に非常に似かよった遺伝子がゲノム上存在しないことが推定された(図3-7)。

3.6 hAQP4mRNAの組織分布

ヒト胃におけるhAQP4mRNAの発現の確認を行うため、ヒト胃のmRNA5 µgを電気泳動しナイロンフィルターに転写後、hAQP4cDNAのコード領域をプローブとして用いてノーザン分析を行った(図3-8A)。その結果濃いバンドが約5.5 kbの位置に見られ、二本の薄いバンドが約3.7 kb、1.4 kbの位置に見られた。胃以外の組織における発現については、脳、肺、骨格筋において強い発現が、心臓、腎臓、卵巣において弱い発現が見られた。消化管である小腸、大腸を含むその他の組織においては今回のノーザン分析でhAQP4mRNAの発現は認められなかった。

一方同じフィルターを用いてヒトのAQP1cDNAのコード領域をプローブとして用いることによりAQP1のmRNAの発現についても検討したところ、胃を含むほぼ全ての組織において発現が確認された(図3-8B)。

4. 考察

ヒト胃において発現する水チャンネルを同定するためRT-PCRにより水チャンネルをコードするcDNA断片の検索を行い、その後cDNAクローンの単離を行うという方法を採用した。現在では水チャンネルをコードするcDNAは動物、植物を初めとする幅広い生物由来のものが明らかになっており、その数も40を超えている。またひとつの生物においても、例えばラットでは10種ものcDNAクローンが得られており、そのレパートリーは今後ますます広がるであろう事が予想される。しかしこの研究を始めた当初はクローニングされた水チャンネルがそれほど多くなかった。従って少ない情報を最大限に生かすため、保存性の高い配列に相当する縮重プライマーをデザインしRT-PCRを行うことにした。

最初にヒト胃のcDNAからRT-PCRを行った際には1種類の断片しか得られなかった。デザインした縮重プライマーの塩基配列によるPCRの増幅のかかり具合に違いがあることを考慮に入れなければならないが、得られた断片にコードされる水チャンネル、すなわちhAQP4がヒト胃の中で他の水チャンネルに比べて多量に発現していることを示唆する結果といえるであろう。

hAQP4はラット脳において発現しているAQP4と94%の相同性を、また他のアクアポリンタンパク質とはそれよりも低い30~50%の相同性を有していた(図3-5)。相同性の高さが今回得られた水チャンネルをhAQP4と命名した所以である。ラットAQP4における解析では、ノーザン分析により脳、肺、腎臓においての発現が確認されている(Jung, J. S. et al., 1994; Hasegawa, H. et al., 1994b)。一方、ヒトにおいてhAQP4は胃、脳、肺、および骨格筋において強い発現が認められた(図3-8)。相同性の高さおよび発現組織から判断すると、今回ヒト胃よりクローニングされたhAQP4はラットAQP4のカウンターパートであるとも考えられる。しかしラットにおいてAQP4が胃に存在していることは知られていなかったため本研究によりヒト胃におけるhAQP4の発現を示したことは、胃における水の分泌、吸収といった機能を考える上での新たな知見となったであろう。

ノーザン分析によりhAQP4 mRNAの発現が認められた組織においては3本のバンドが観察された(図3-8)。ゲノムサザン分析の結果、hAQP4をコードする遺伝子はヒトのゲノムにシングルコピーで存在することが示唆されたことより(図3-7)、複数のバンドはオールタネティブなスプライシングに起因するものであることが推定される。hAQP4のmRNAの長さの違いの意味については未知のままであるが、mRNAの安定性などに関わっている可能性は考えられる。また図3-8で同時にノーザン分析を行ったAQP1がほぼ全ての組織に普遍的に発現しているのに対して、hAQP4は組織特異的な発現様式を示している。しかも消化管においては胃のみに発現が限られていることが強く示唆された。

ヒト胃においてはhAQP4とAQP1の両方のmRNAが発現していることがノーザン分析により示された(図3-8)。しかし当初のRT-PCRではヒトAQP1のアミノ酸配列も十分考慮に入れてプライマーを設計したのにも関わらず、AQP1をコードするcDNA断片は得られなかった。以上を考え合わせると、胃においてhAQP4タンパク質が他のアクアポリンタンパク質に比べて多量に存在していることが推定され、胃におけるhAQP4の機能の重要性が推察できる。

A

Human CHIP28	1:MASEFKKKLFWRAVVAEFLATLTFVFIISGALGFYYPV-GN-PQT-A-VQDNVKSLSLAFGLSTATLAQSVGHIE	71
Frog CHIP28	1:MASEFKKKAFWRAVIAEFLAMILEVPIISGALGFYPIEEKANQIVGRSDIVKVSJAKGISIATMAQSVGHVE	75
WCH-CD	1:M-WEL-RE-----I-----AFSEAVLAEPLATLLPVFVGLGSLQWASSPPSVLQIIVARGLGIGILLVQALHVS	63
WCH3	1:MEPGLCNRAYL-LVGGIWTIISKALFAEFLATGLVFFVGGVSLPWPVALPSVLQVAITENLATATAVQISKWTI	74

W2 → W1

Human CHIP28	72:GARLNPAVTLGILLSCQISIPRALMYIIAQCVGAIVATAILSGITSSLTGNSLSPNDLADGVNSGQGLGIEHITQ	146
Frog CHIP28	76:GARLNPAVTLGILLSCQISILKAVMYIIAQCLGAVVATAILSGITSGLENNSLGLNLSLPGVSAGQGLGVEILLV	150
WCH-CD	64:GARLNPAVTVACLVGCHVSPFLRAAFYVAAQLLGAVAGAAIILHEITPVEIRGLAVNALHNNATAGQAVTVELFLT	138
WCH3	75:GABANPAVTLAYLVGSHISLPRAVAYIAAQLAGATVGAALLIGVTGGVRETLGVNVVHNSTSTGQAVAVELVLT	149

Human CHIP28	147:LQLVLCVLAITDRRRRLDGGSAFLAIGLSVALGHELLAIDYTGCGINPARSFGSAVITHNFSNMIWVGFPIGGA	221
Frog CHIP28	151:PLVLCVVAIVDRRRHVDVSGSVPLAIGLSVALGHELLAIDYTGCGMNPAREFGSAVLTKNFTYHWLPWVGMIGGA	225
WCH-CD	139:MLVLCIFASTDERRGMNLSFALSIGFVTLGHLGLIYFTGCSMNPARESLAPAVTVKGFDDHWVWIGPLVGLAI	213
WCH3	150:LQLVLCVFAEMD-SR-QTLGSPAMIGTISVALGHLIGIYFTGCSMNPAREFGSAVIVKGFVAHWIIPWVGLTGA	222

← WA ← WB

Human CHIP28	222:LAVLIYDFILAPRSSDLTRVKKVWTSQVVEYDLDDADDINSRVEMKPK-----	269
Frog CHIP28	226:AAALIYDFILAPRTSDLTRMKVWVWNGQVEEYELDGGD-NTRVEMKPK-----	272
WCH-CD	214:IGSLLYNYLIFPSAKSLQERLAVLKGLEPDTMRESEVVRPQSVLEHSPQSLPRGSKA	271
WCH3	223:LASLIYNYLIFPDTKTVACLAILLVGTTKVKRVVDLEPQKKESTNSSELTQVSV---	276

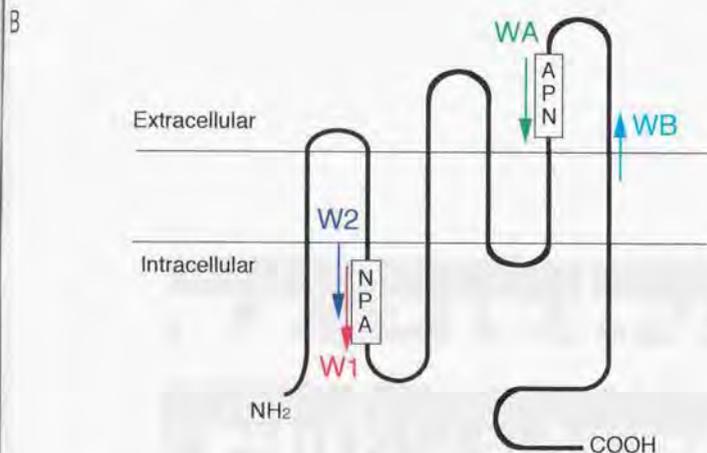


図3-1 縮重プライマーのデザイン

A: 研究を開始した段階でクローニングされていた水チャンネルであるヒトのCHIP28 (Preston, G. M. and Agre, P., 1991)、カエルのCHIP28 (Abrami, L. et al., 1994)、ラットのWCH-CD (Fushimi, K. et al., 1993)、ラットのWCH3 (Ma, T. et al., 1993a) のアミノ酸配列を並べた。全てに共通なアミノ酸残基を網掛けで示した。デザインしたプライマーに相当するアミノ酸配列を矢印で示した。

B: アクアポリンの予想されるトポロジーを表し、全てのアクアポリンに共通に保存されているNPA (Asn-Pro-Ala) モチーフを示した。デザインしたプライマーに相当する位置を矢印で示した。

A

```

      10      20      30      40      50      60
TGTGGCCATGGTGTGCACCAGGAAGATCAGCATCGCCAAGTCTGCTTCTACATCGGAGC
V A M V C T R K I S I A K S V F Y I A A
      70      80      90     100     110     120
CCAATGCCTGGGGCCATCATTTGGAGCAGGAATCCTCTATCTGGTCACACCTCCCAGTGT
Q C L G A I I G A G I L Y L V T P P S V
      130     140     150     160     170     180
GGTGGGAGGCCTGGGAGTCACCATGGTTCATGGAATCTTACCGCTGGTCATGGTCTCCT
V G G L G V T M V H G N L T A G H G L L
      190     200     210     220     230     240
GGTGTAGTTAATAATCACATTTCAATTTGGTGTTTACTATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAA
V E L I I T P Q L V P T I F A S C D S K
      250     260     270     280     290     300
ACGGACTGATGTCACCTGCTCAATAGCTTTAGCAATTTGATTTTCTGTTGCAATTTGGACA
R T D V T G S I A L A I G F S V A I G H
      310     320     330     340     350     360
TTTATTTGCAATCAATTAATACTGGTCCAGCATGAATCCCGCCGATCCTTTGGACCTGC
L F A I N Y T G A S M N P A R S F G P A
      370     380
AGTTATCATGGGAAATGGGAAAAC
V I M G N W E N

```

B

```

RT-PCR      :VAMVCTRKISIAKSVFYIAAQLGAIIGAGILYLVTPPSVGGGLVTVHGNLTAGHGLLVELII
Rat AQP4    :VAMVCTRKISIAKSVFYIAAQLGAIIGAGILYLVTPPSVGGGLVTVHGNLTAGHGLLVELII
AQP1       :LGLLLSCQTSIFRALMTIQAQCGAIVATAHLGGITSELTGNSUGRNDLADGVNSGGLSIEHHS
AQP2       :VA CLVGCCHVSELRAAFYVAACLGGAWACATLHEITTEVEIREDLAANALENNATAGQAVIVELFL

RT-PCR      :TFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSHALAIGFSVAIGHLFAINVTGASMNPARSFGPAVIMGNWEN
Rat AQP4    :TFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSHALAIGFSVAIGHLFAINVTGASMNPARSFGPAVIMGNWEN
AQP1       :HLEQLVLCVLSITDRRRRDIGSSAPLAIGLSVALGHLFAIDYTGGINPARSFGSAVITNHSN
AQP2       :TFQLVLAIFASDERRSDNLSSPALSIGFSVTLGHLGHTVFGSSMNPARSLAPAVITKDFD

```

図3-2 ヒト胃より得られたRT-PCR断片の塩基配列および推定されるアミノ酸配列

A: RT-PCR断片の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を示した。塩基配列はプライマーとして用いた配列の内側に相当する配列から示した。

B: RT-PCR断片にコードされているアミノ酸配列と既知のアクアポリンの相当部分との相同性を示した。今回得られたものと相同なアミノ酸残基を反転で示した。

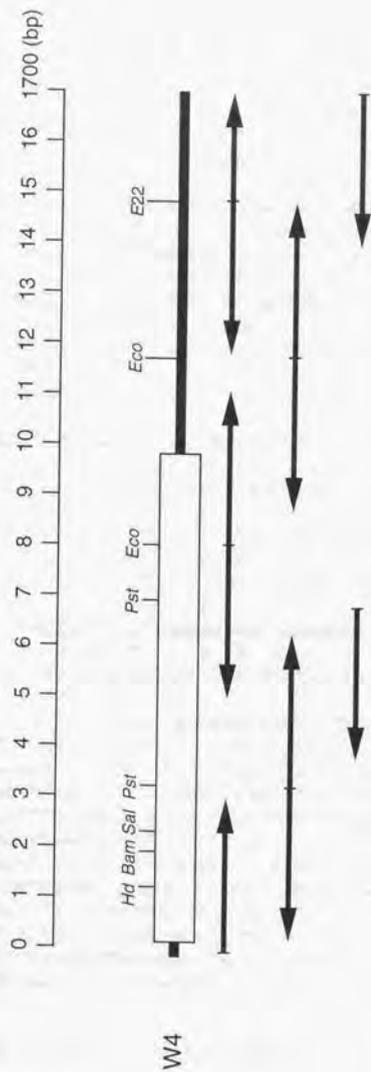


図3-3 得られたcDNAクローンの制限酵素地図

スクリーニングによって得られたcDNAクローンW4の制限酵素地図を示した。推定されるコード領域を四角で、非コード領域を太線で、塩基配列の解析を行った方向、位置を矢印でそれぞれ示した。

Bam, BamH I; Eco, EcoR I; E22, EcoT22 I, Hd, Hind III; Pst, Pst I; Sal, Sal I.

1 ATGAGTGACAGACCCACAGCAAGGCGGTGGGGTAAGTGTGGACCTTTGTGTACCAGAGAG
 M S D R P T A R R W G K C G P L C T R E 20
 61 AACATCATGGTGGCTTTCAAAGGGGTCTGGACTCAAGCTTTCTGGAAAAGCAGTCCACAGCG
 N I M V A F K G V W T Q A F W K A V T A 40
 121 GAAITTCCTGGCCATGCTTATTTTTGTCTCCTCAGCCTGGGATCCACCATCAACTGGGGT
 E F L A M L I F V L L S L G S T I N W G 60
 181 GGAACGAAAAGCCCTTACCTGTGCACATGGTTCATCTCCCTTTGCTTTGGACTCAGC
 G T E K P L P V D M V L I S L C F G L S 80
 241 ATTGCAACCATGGTGCAGTGGTTTGGCCATATCAGCGGTGGCCACATCAACCCGTGCAGTG
 I A T M V Q C C F G H I S G G H I N P A V 100
 301 ACTGTTGGCCATGGTGTGCACCAGGAAGATCAGCATCGCCAAGTCTGTCTTCTACATCGCA
T V A M V C T R K I S I A K S V F Y I A 120
 361 GCCCAGTGCCTGGGGGCCATCAITGGAGCAGGAATCCTCTATCTGGTGCACACCTCCCAGT
A Q C L G A I I G A G I L Y L V T P P S 140
 421 CTGGTGGGAGGCCCTGGAGTCCACCATGGTTCATGGAAATCTTACCCTGGTGCATGGTCTC
V V G G L G V T M V H G N L T A G H G L 160
 481 CTGGTTGAGTTGATTAATCACATTTCAATTGGTGTACTACTCTTTGCCAGCTGTGATTCC
L V E L I I T F Q L V F T I F A S C D S 180
 541 AAACCTGCATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCA
K R T D V T G S I A L A I G F S V A I G 200
 601 CATTTTATTTGCAATCAATTATACTGGTGCACAGATGAATCCCGCCCGATCCTTTGGACCT
H L F A I N Y T G A S M N P A R S F G P 220
 661 GCAGTTATCTGGGAAATTTGGGAAAACCATTTGGATATATTGGGTGGGCCCATCATAGGA
A V I M G N W E N H W I Y W V G P I I G 240
 721 GCTGTCTCCTCGCTGGTGGCTTTATGAGTATGCTTCTGTCCAGATGTTGAATTCAAAAGT
A V L A G G L Y E Y V F C P D V E F K R 260
 781 CGTTTAAAGAAGCCCTTCAGCAAAGCTGCCAGCAAACAAAAGGAAGCTACATGGAGGTG
R F K E A F S K A A Q Q T K G S Y M E V 280
 841 GAGGACAACAGGAGTCAAGTAGAGACGGATGACCTGATCTAAAACCTGGAGTGGTGCAT
E D N R S Q V E T D D L I L K P G V V H 300
 901 GTGATTGACGTTGACCGGGGAGGAGAAGAAGGGGAAAGACCAATCTGGAGAGGTATTG
V I D V D R G E E K K G K D Q S G E V L 320
 961 TCTTCAGTATGACTAGAAGATCGCACTGAAAGCAGACAAGACTCCTTAGAACGTCTCTCA
S S V * 323
 1021 GATTTCCCTTCCACCCATTAAGGAAAACAGATTTGTTATAAAATAGAAATGTGCAGGTTTGT
 1081 TGTTTCATGTCATATTACTCAGTCTAAACAATAAATATTTTCATAATTTACAAAAGGAGGAA
 1141 CGGAAGAAACCTATTTGGAATCCAAATCTAAAAAAGAAATATTTTAAAGATGTTCTTA
 1201 AGCAAATATATACCTAATTTTATCTAGTACCTTTTCATTAACAACCAATTTTAAACCGTGTG
 1261 TCAAGATTTGGTTAAGTCTTGCCCTGACAGAACTCAAAGACACGTCTATCAGCTTATTCCT
 1321 TCTCTACTGGAATATTGGTATAGTCAATCTTATTTGAATATTTATTCTATTAAACTGAG
 1381 TTTAACAATGGCAAAATACAGTATGTCACAGTTCATGCACATTCAGAGAGAAAATATAAC
 1441 AAGTTCTTTTATGAGCAATCCCTTATGCAATGACTACCTTGGCAAAAGAGCATTTAGCAAG
 1501 TGTCACCTGCTCATCAGTTACTTCCCTTCCATTTATATCACAAATACCCAAGTTTCAATTCT
 1561 AACTTCATTTCAATGGTATTTCTTCCCTCCCAATGCCCAAGGTAATGTGGACTAAAGCCC
 1621 AGAAATTTGAAAAGAAATATTCAGAAATCCTTCCCAAATCATAAGGGCACCTATTGAGATT
 1681 CAAGACAAGCAGACTCGTAAATCTTGTAGAGGCAGAGGCAAG

図34 ヒト胃よりクローニングされたcDNAクローンW4の塩基配列およびそこから推定されるアミノ酸配列

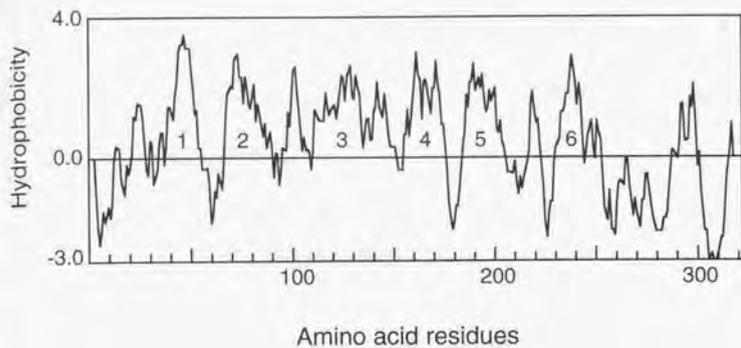
最初に得られたRT-PCR断片に相当する塩基配列を下線で示した。

		=====1=====	
hAQP4	MSDRPTARRWGKCGELCTRENIMVAFKGVVWTOAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGSTI		
AQP4	MSDGAAARRWGKCGEPFSRESIMVAFKGVVWTOAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGSTI		
AQP5		MKREVCSLAFKAVFAEFLATLIFVFFGLGSAL	
AQP2		MWELRSIAFSAVLAEFLATLIFVFFGLGSAL	
AQP1		MASEFKKILFWRVVAEFLATTLVFVTSIGSAL	
		=====2=====	***
hAQP4	--NWGGTBRPLPV--DMVLISLCFGLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKIS		
AQP4	--NWGGSENPLPV--DMVLISLCFGLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKIS		
AQP5	--KWPSA---LP--TILQISIAFGLATCTLAQALGPVSGGHINPAITLALLIGNOIS		
AQP2	--QWASS----PP--SVLQIAVAFGLCTIGILVQALGHVSGAHINPAVTVACLVGCHVS		
AQP1	GFKYPVGNQTAWQDNVRVSLAFGLSIATLAQSVGHISGAHINPAVTLGLLLSCQTS		
		=====3=====	+++ =====4
hAQP4	IAKSVFYIAAQCIGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAGHLLVELIITF		
AQP4	IAKSVFYIAAQCIGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAGHLLVELIITF		
AQP5	LLRAVFFVAAQLGVAIGAGILYWLAFLNARCNLAVNALNNNTTECKAMVVELIITF		
AQP2	FLRAAFYVAAQLLGAVAGAILHEITVEIRCDLAVNALHNNATAQOAVTVELFITM		
AQP1	IFRALMYTIAOQVGAIVATAILSGITSSLTGNSLGRNDLADGVNSOGLGTEIITCTL		
		=====5=====	+++ ***
hAQP4	QLVFTIFASCDKRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMG		
AQP4	QLVFTIFASCDKRTDVTGSAVAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMG		
AQP5	QLALCIFSSDTSRRTSPVGSFALSIGLSVTLGHLVGIYFTGCCSMNPARSFGPAVMN		
AQP2	QLVLCIFASTDERRGDNLGSPALSIGFSVTLGHLGDIYFTGCCSMNPARSLAPAVVTG		
AQP1	QLVLCVLAITDRRRRLDGGSAFLAIGLSVALGHLDAIDYTCGGINPARSFGSAVITH		
		=====6=====	
hAQP4	NWE--NHWIYVWGPPIIGAVLAGSLYEVVFCP--DVEFKRRRKEAFSKAAQQTKGSYMEV		
AQP4	NWE--NHWIYVWGPPIIGAVLAGALYEVVFCP--DVELKRRRKEAFSKAAQQTKGSYMEV		
AQP5	RFSPSHVFWVWGPVIGAMLAAILYFYLLFPSSLSLHDRVAVVVKGYEPEDEWDHRE		
AQP2	KFD--DHVWFVIGELVGAIGSLLYNYLLFPKAKSLQERLAVLKGLEPDTDWEEREVR		
AQP1	NFS--NHWIFWVGFPIIGALAVLIYDFILAPRSSDLTDRVWVTSQVEEYDLDDADDI		
		+++	
hAQP4	EDNRSQVETDLDLILKPGVVHVIDVDRGEKKGKDSGSEVLSSV		
AQP4	EDNRSQVETDLDLILKPGVVHVIDIDRGEKKGKDSGSEVLSSV		
AQP5	DRKKTIELTAH		
AQP2	RRQSVELHSPQSLPRGSKA		
AQP1	NSRVEMKPK		

図3-5 hAQP4の推定アミノ酸配列と他のアクアポリンの相同性

hAQP4およびAQP4 (Jung, J. S. et al., 1994)、AQP5 (Raina, S. et al., 1995)、AQP2 (Fushimi, K. et al., 1993)、AQP1 (Preston, G. M. et al., 1991)の推定アミノ酸配列を並べ、hAQP4と相同なアミノ酸を反転で示した。推定膜貫通領域を二重線で上に示し、NPA (Asn-Pro-Ala) モチーフを●で、糖鎖付加可能配列を+で示した。

A



B

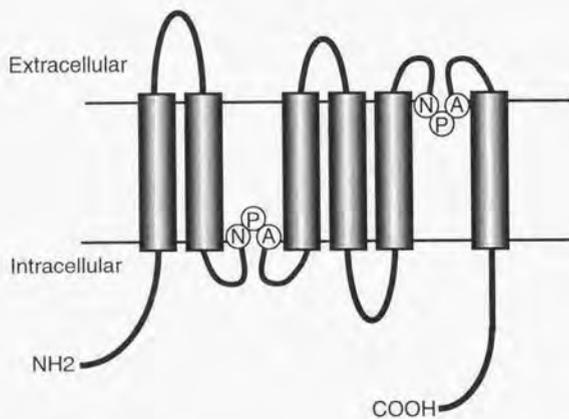


図3-6 hAQP4の疎水性プロットと推定されるトポロジー

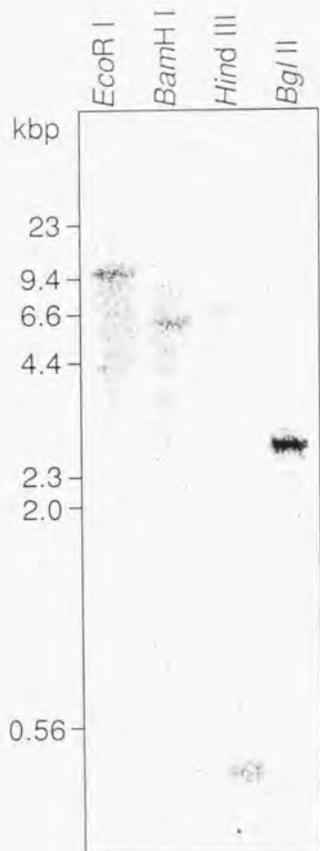


図3-7 hAQP4のゲノムサザン分析

ヒトゲノムDNAを各種制限酵素で処理し、電気泳動後ナイロンフィルターに転写した。フィルターはhAQP4cDNA断片を用いてハイブリダイゼーションを行った。サイズマーカーの位置を左に示した。

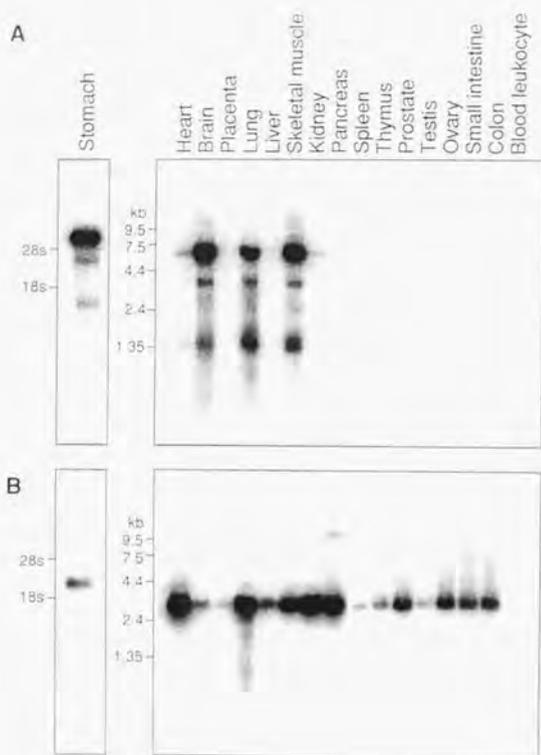


図3-8 ノーザン分析

ヒトの各組織由来のmRNAに対して、hAQP4 (A)、AQP1 (B) それぞれのcDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。サイズマーカーの位置を左に示した。

第3節 hAQP4の水透過性機能の解析

1. 序

今回クローニングされ、ヒト胃における発現が確認されたhAQP4は他の水チャンネルと高い相同性を有していた。アミノ酸配列中には6回の推定膜貫通領域ならびに水の選択的透過に必要であることが強く示唆されるNPA (Asn-Pro-Ala) モチーフが存在している。これらのことより、hAQP4も他の水チャンネルと同様に水透過活性を有していることが強く期待される。そこでアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いて、その活性についての検討を行った。

2. 材料および方法

2.1 材料

アフリカツメガエル（雌、体長10 cmぐらいのもの）は日本生物材料センターおよびアルプス科学社から購入した。十分な大きさを持ち、水の深さが10 cmほどの水槽にカエルを入れ、18℃から20℃一定に温度を保つ部屋で飼育を行った。餌として細かく切った牛もしくは豚レバーを週に2回与えた。

アミノ末端にシステイン残基を持ち、それにhAQP4のC末端に位置する10アミノ酸残基に相当する配列を続けた計11残基のペプチド (CDQSGEVLSSV) は宝酒造社に合成を委託した。ウェスタン分析の二次抗体として用いたアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体はSigma社より購入した。

*in vitro*でのcRNA合成に用いたmRNA capping kitはStratagene社より購入した。微小注入針作製のためのガラス管はDrummond社の20 cmガラスキャピラリーを、ガラス針作製のマイクロプラーはナリシゲ科学社のものを使用した。低分子物質の取り込み測定の際に用いた¹⁴Cラベルされた尿素とグリセロールはAmersham社より購入した。

2.2 試薬

・卵母細胞培養液 (Modified Barth's Saline, MBS)

88.0 mM NaCl

1.0 mM KCl

2.4 mM NaHCO₃

10 mM HEPES (pH7.6)

0.3 mM Ca(NO₃)₂

0.41 mM CaCl₂

0.82 mM MgSO₄

10 units/ml Penicillin

10 µg/ml Streptomycin

Milli Q水を用いて作製し、4℃で保存した。

・コラゲナーゼ溶液

0.1% コラゲナーゼ (Sigma社、Type IA)

MBSを用いて溶解した。

・MBS希釈液

MBSをMilli Q水を用いて3倍に希釈した。

・タンパク質抽出緩衝液

20 mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.0)

10 mM EDTA

20 µg/ml PMSF

1 µg/ml ペプスタチン

・アルカリフォスファターゼ反応緩衝液

0.1 M トリス/塩酸緩衝液 (pH 9.5)

5 mM 塩化マグネシウム

0.1 M 塩化ナトリウム

・アルカリフォスファターゼ発色液

10 ml アルカリフォスファターゼ反応緩衝液

33 µl 15 mg/ml BCIP/ジメチルホルムアミド

66 µl 30 mg/ml NBT/70%ジメチルホルムアミド

2.3 方法

2.3.1 発現ベクターの構築

hAQP4 cRNA合成に用いた発現プラスミド構築のためのベクターとしては pCS2'もしくはpSP64T (Krieg, P. A. and Melton, D. A., 1984) を使用した。これらのベクターはSP6RNAポリメラーゼのプロモーターの下流にアフリカツメガエルのβ-グロビンの5'上流配列を含んでいることにより導入したcRNAの翻訳効率が上昇することが知られており、アフリカツメガエルの発現系を用いるとき

に一般的に使用されている。

クローニングしたhAQP4の塩基配列をもとにして、コード領域全長を増幅するためのセンス (5'-GGCATGAGTGACAGACCC-3')、アンチセンス (5'-CCTCTAGACTGAGTAATATGACATG-3') 2種類のプライマーを合成した。このプライマーを用い、hAQP4cDNAを鋳型にしてPCRにより増幅した断片 (図3-4の3~+1102に相当する) を平滑化処理し、pCS2もしくはpSP64Tベクターのクローニングサイトに挿入した。正しい方向に挿入されたことが確認されたものについては、超遠心によりプラスミドを精製した。また水チャンネルの活性測定の際にポジティブコントロールとして使用するため、ヒトAQP1cDNA (Preston, G. M., and Agre, P., 1991) のコード領域に相当する断片をヒト胃のcDNAよりPCRにて増幅し、同様に発現プラスミドを作製した。

2.3.2 cRNAの作製

超遠心により精製を行った発現プラスミドをコード領域の3'下流に位置する制限酵素で処理して直線化し、mRNA capping kit (Stratagene社) およびSP6RNAポリメラーゼを用いて *in vitro* でcRNAを合成した。cRNAはエタノール沈殿を行った後、注射用蒸留水 (光製薬社) に0.1~1 µg/µlの濃度になるように溶解した。

2.3.3 アフリカツメガエル卵母細胞におけるタンパク質の発現

雌のアフリカツメガエルを氷水中に約15分つけることにより麻酔を行い、下腹部をハサミで約1 cm切り開いた。ピンセットを用いて卵塊を取り出し、適当量を切り出した。切り出した卵塊はMBSで洗浄し、ピンセットを用いて小さくちぎるようにして分け、コラゲナーゼ溶液中で約2時間、室温で緩やかに振とうした。MBSで数回洗浄後、成熟の進んだ卵母細胞の濾胞細胞を実体顕微鏡下でピンセットを用いて除去した。その後卵母細胞はMBSに浸し、使用するまで18℃のインキュベーター中で静置した。

ガラスキャピラリーをマイクロプレーを用いて引き延ばし、先端部をカッターで切断することにより直径20~40 µmの針先をもつガラス針を作製し、卵母細胞にcRNAを注入するための針として用いた。使用前には乾熱滅菌を行った。

ガラス針の末端に少量のミネラルオイルを注入し、マイクロディスペンサー (Drummond社) に取り付けた。cRNA溶液もしくは注射用蒸留水をパラフィルム上に置き、ガラス針の先端から溶液を吸い上げた。濾胞細胞を除去した卵母

細胞を実体顕微鏡下に置き、cRNA溶液またはコントロールとして同量の水を卵母細胞1個当たり50 nlずつ注入した。注入した卵母細胞はMBSに浸し、18°Cのインキュベーター中で培養を行った。

2.3.4 hAQP4抗体の作製

hAQP4のC末端のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドは第2章で述べたようにヘモシアニンと結合させ、ウサギに免疫することにより抗血清を得た。抗血清を抗原ペプチドによって作製したカラムを用いてアフィニティ精製を行ったものを、hAQP4抗体として使用した。

2.3.5 卵母細胞からのタンパク質の抽出

培養後の卵母細胞を氷冷したタンパク質抽出緩衝液中で超音波破碎した後、2500 rpmで5分間遠心することによって得られた上清を、さらに15000 rpmで30分間遠心した。得られた沈澱をSDS-PAGEサンプル緩衝液に懸濁し、熱処理後SDS-PAGEに供した。

2.3.6 ウェスタン分析

10%アクリルアミドゲルを用いて卵母細胞由来のタンパク質のSDS-PAGEを行った。フィルターに転写後、一次抗体としてhAQP4抗体を、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体を用いてウェスタン分析を行った。

2.3.7 水透過性の測定

培養後の卵母細胞をMBSからMBS希釈液に移した後、10秒から30秒ごとに共焦点顕微鏡 (Bio-Rad社) で取り込みを行った卵母細胞の画像をもとにして断面積を算出した。卵母細胞が球状の形をしていることより断面積から体積を算出し、さらに体積増加の初期においては直線的に体積増加が起こることより各卵母細胞の体積の初期値を算出した。その後以下の式により、浸透圧に応じた水透過性を示す値であるPf (cm/s)を算出した (Zhang, R. et al., 1990)。

$$Pf \text{ (cm/s)} = [V_0 \times d(V/V_0)/dt] / [S \times V_w \times (\text{osmin} - \text{osmout})]$$

ここで V_0 は卵母細胞の体積の初期値、 $d(V/V_0)/dt$ は相対体積の時間当たりの変化、 S は表面積の初期値、 V_w は水のモル当たりの体積 (=18 cm³/mol)、

(osmin-osmout)は卵母細胞内外の浸透圧の差を示す。

2.3.8 卵母細胞の水銀処理

培養後の卵母細胞を水透過測定の直前に1 mMのHgCl₂を含むMBSで5分間処理した後に、同様に水透過性の測定を行った。

2.3.9 低分子物質の取り込み

50 ngのhAQP4 cRNAもしくはコントロールとして同体積の水を注入した卵母細胞の注入2日後における尿素およびグリセロールの取り込みを測定した。1 mlのMBSに20 μlの¹⁴Cラベルされた尿素、グリセロールの原液をそれぞれ溶解した液に卵母細胞を加え、0、15、30分間室温で静置した後に卵母細胞を取り出し、直ちに氷冷したMBSで5回洗浄した。洗浄後の卵母細胞を1個ずつ10%SDS中で溶解し、その後放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより卵母細胞に取り込まれた低分子物質の量を求めた。

3. 結果

3.1 hAQP4抗体の作製

hAQP4のC末端10アミノ酸残基に相当するペプチドをシステイン残基を介してヘモシアニンに結合し、ウサギに免疫することにより抗血清を得た。抗血清を抗原ペプチドを用いて作製したカラムによりアフィニティ精製を行いhAQP4抗体を得た。精製抗体を280 nmの吸光度を測定することによりその濃度を推定したところ約0.2 mg/mlであり、十分量のhAQP4抗体が得られたことが判明した。

3.2 卵母細胞におけるhAQP4タンパク質の発現

hAQP4 cRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞におけるhAQP4タンパク質の発現を検討するため、作製したhAQP4抗体を用いてウェスタン分析を行った。その結果、cRNA溶液を注入しなかった卵母細胞から抽出したタンパク質のレーンには見られない約38 kDaと約56 kDaの2本のはっきりとしたバンドが観察され、hAQP4タンパク質の卵母細胞における発現が確認された(図3-9)。

3.3 hAQP4タンパク質によって生じる水透過性

次にhAQP4タンパク質を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の水透過性

について検討を行った。具体的には等張液であるMBS (200 mosM) で培養した卵母細胞をMilli Q水で3倍に希釈したMBSに浸した際に生ずる体積増加の速度をもとに浸透圧に依存した水透過性を示す値である P_f を求め、透過性の大きさについて検討した。

すでに水透過活性が確認できているヒトのAQP1タンパク質を発現させた卵母細胞を用いてこの条件で実験を行ったところ、水を注入した卵母細胞と比較して有意に大きな体積増加が確認された(データ未掲載)ことから、発現ならびに測定方法に問題はないことが確認できた。

まず卵母細胞を希釈したMBSに浸した後の断面積の大きさの変化の様子を、希釈液に浸してから30秒ごとに取り込みを行った卵母細胞の画像により示した。cRNA溶液の代わりに水を注入した卵母細胞は外液を3倍に希釈したMBSに変えても断面積の変化はほとんど見られないのに対し(図3-10)、cRNAを注入することによりhAQP4タンパク質を発現させた卵母細胞は同様の条件下で目で確認できるほどの断面積の増加が生じた(図3-11)。卵母細胞の相対体積の時間経過をみても、hAQP4 cRNAを注入した卵母細胞における体積増加の速さが確認できる(図3-12)。

多数の卵母細胞の体積増加の速度から P_f の値を算出したところ、hAQP4cRNAを注入したものにおいては水を注入した場合に比べて有意に大きな水透過性が確認できた(図3-13)。この水透過性は測定前に卵母細胞をHgCl₂で5分間処理しても阻害されなかった(図3-13)。

3.4 低分子物質の取り込み

hAQP4の水以外の低分子物質に対する透過性について検討するため、¹⁴Cラベルした尿素とグリセロールを用い、その卵母細胞への取り込みについて検討した。通常よりも多量に(卵母細胞1個当たり50 ng) hAQP4 cRNAを注入し、2日後に卵母細胞を尿素およびグリセロールを溶解したMBSに一定時間浸した際に取り込まれた放射活性の値を測定した。その結果、取り込まれた放射活性は水を注入した卵母細胞のものに比べてほとんど差がなく(図3-14)、hAQP4はこれらの物質を透過させる活性を持たないことが強く示唆された。

4. 考察

ヒト胃からクローニングしたhAQP4の水透過活性について検討するため、ア

フリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いて実験を行った。

卵母細胞の発現系を用いる利点としては、(1) 1個の細胞の大きさが大きく(直径約1mm)、比較的簡単に機械的な操作(RNAやDNAの注入など)ができること、(2) 細胞内にリボソームやtRNAなどを大量に貯蔵して受精直後に開始される急激なタンパク質合成に備えているためmRNAを注入することによりコードされるタンパク質を効率よく翻訳すること、(3) 発現させるタンパク質が膜タンパク質であっても機能を保持した構造をして細胞膜に局在することが多いこと、(4) GTP結合タンパク質や効果器などの細胞内情報伝達に必要な因子を有していることから情報伝達系の実験にも用いることが可能であること、等が挙げられる。反面不利な点として、(1) 卵母細胞の供給源である雌カエルそのものの個体差や、1つ1つの卵母細胞におけるばらつきが大きいこと、(2) 外来タンパク質を発現させるためには1つ1つの細胞にDNAやRNAの注入操作をしなければならず、試行回数(卵母細胞の個数)を増やすのが困難である、等が挙げられる。

1992年にアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いてAQP1の水透過活性の測定が行われて以来(Preston, G. M. et al, 1992)、多数の水チャンネルの発現にこの系が用いられてきた。水チャンネルの発現を行う際には球状の形態をしていることおよび細胞が大きいことが利点となる。取り込んだ画像(断面積)から体積を算出するため接着細胞のような形では算出がしづらく、また細胞の大きさは取り込みおよび解析の容易さへとつながる。さらに水チャンネルが膜タンパク質であることから、発現タンパク質が活性を保持するような構造をとって膜に輸送されることが必要であり、この面からも卵母細胞の発現系は優れていると言える。反面、個体差が大きいことから得られたデータの定量的な解析が難しく、定性的な傾向としてとらえた方が良いということも考慮に入れておく必要がある。

hAQP4 cRNAを注入した卵母細胞においては、体積増加を指標とした水透過性が有意に増大すること、および尿素、グリセロールといった水以外の低分子物質に対する透過性が上昇しないことから、アフリカツメガエル卵母細胞において水を選択的に透過するチャンネルを形成しうることが強く推定された。既知のアクアポリンファミリーに分類されているタンパク質はいずれも水の透過活性を有するが、このファミリーとアミノ酸配列の相同性を持ちながらも非常に弱い水透過活性しか持たないタンパク質も存在する。目の水晶体の繊維細胞

において膜タンパク質の約60%を占めているMIP (major intrinsic protein) というタンパク質がそれである。このタンパク質は6回膜貫通のタンパク質で、アミノ酸配列はアクアポリンファミリーのものと30~60%の相同性を有しており、さらにその中にはNPA (Asn-Pro-Ala) モチーフも存在している (Gorin, M. B. et al., 1984)。しかしアフリカツメガエル卵母細胞にこのタンパク質を発現させた際には水透過性がほとんど上昇しない (Mulders, S. M. et al., 1995)。水晶体の中でのMIPタンパク質の機能はいまだ明らかではないが、水透過以外の機能も果たしていることが推測されている。

水銀による水透過の阻害は古くから赤血球や腎臓の細胞を用いた研究により見出されている。還元剤添加によりこの阻害がかからなくなることから、システインを介した阻害であることが推定されている (Macey, R. I., 1984)。事実AQPIを用いた研究では部位指定変異体を用いた解析により189残基目のシステインがその原因であることが明らかにされている (Preston, G. M. et al., 1993)。今回クローニングされたhAQP4およびラットからクローニングされたAQP4

(Jung, J. S. et al., 1994) においては、AQPIの189残基目のシステインに相当する残基が210残基目のアラニンであり、アミノ残基の相違が水銀による阻害を受けない原因であるとされている。

hAQP4も一般的なアクアポリンと同様に水以外の低分子物質に対しての透過活性を持たなかった。既知のアクアポリンファミリーの中ではAQP3のみが低分子物質透過の機能を有しているとされている (Ishibashi, K. et al, 1994)。

AQP3においては今回行ったのと同様の条件下で、コントロールに比べて2~4倍の取り込みが確認されている。水の選択的透過に関わるとされるNPAモチーフ周辺のアミノ酸配列が他のアクアポリンよりも約15アミノ酸残基長いことが、AQP3において水よりも分子量のやや大きい低分子物質の透過を可能にしていると推測されている。

以上のようにして水透過活性を有することが確認されたhAQP4のヒト胃における機能を推測するため、胃の中でのhAQP4タンパク質の局在について次節にて検討を行った。

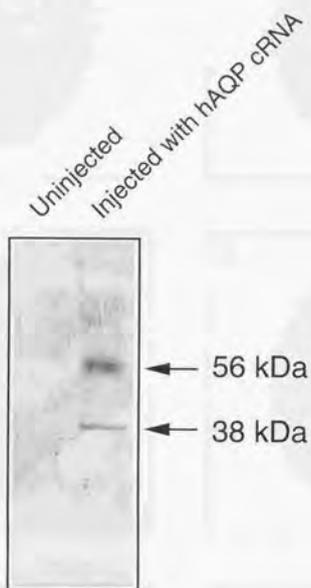


図3-9 アフリカツメガエル卵母細胞におけるhAQP4タンパク質の発現

hAQP4cRNAを注入した卵母細胞からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE後hAQP4抗体を用いてウェスタン分析を行った。コントロールとしてcRNAを注入しなかった卵母細胞由来のタンパク質を同時に泳動した。

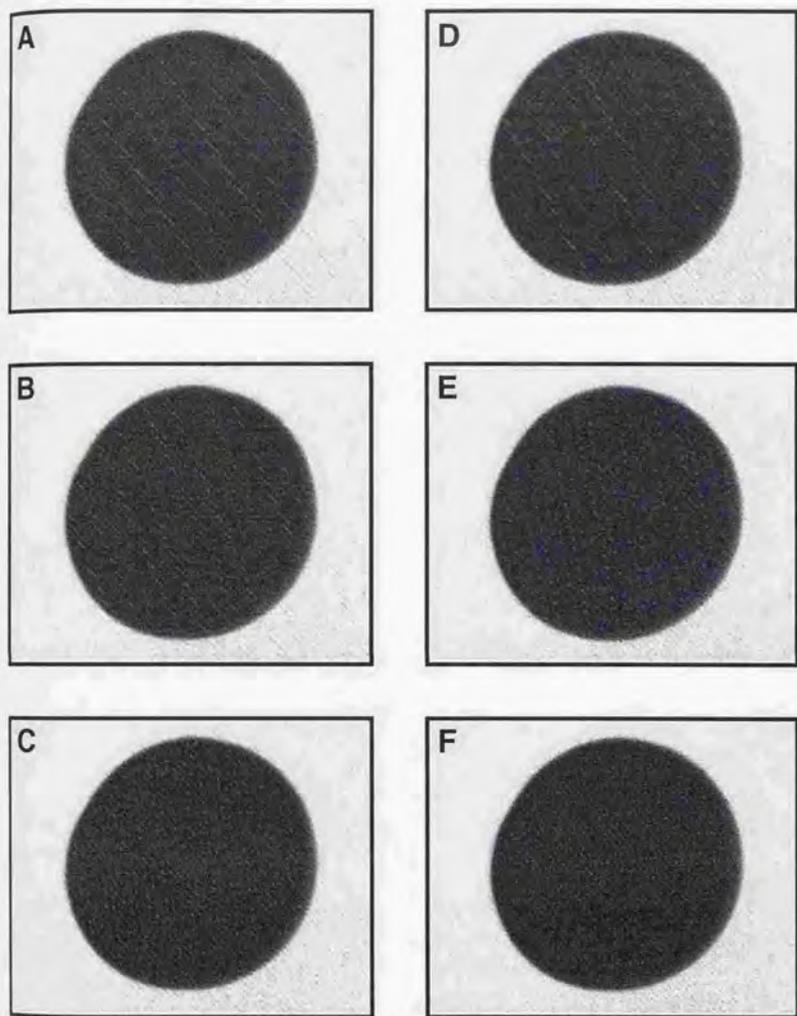


図3-10 水を注入した卵母細胞の希釈液に浸してからの変化

卵母細胞を3倍に希釈したMBSに浸してから30秒(A)、60秒(B)、90秒(C)、120秒(D)、150秒(E)、180秒(F)後に取り込んだ画像を示した。

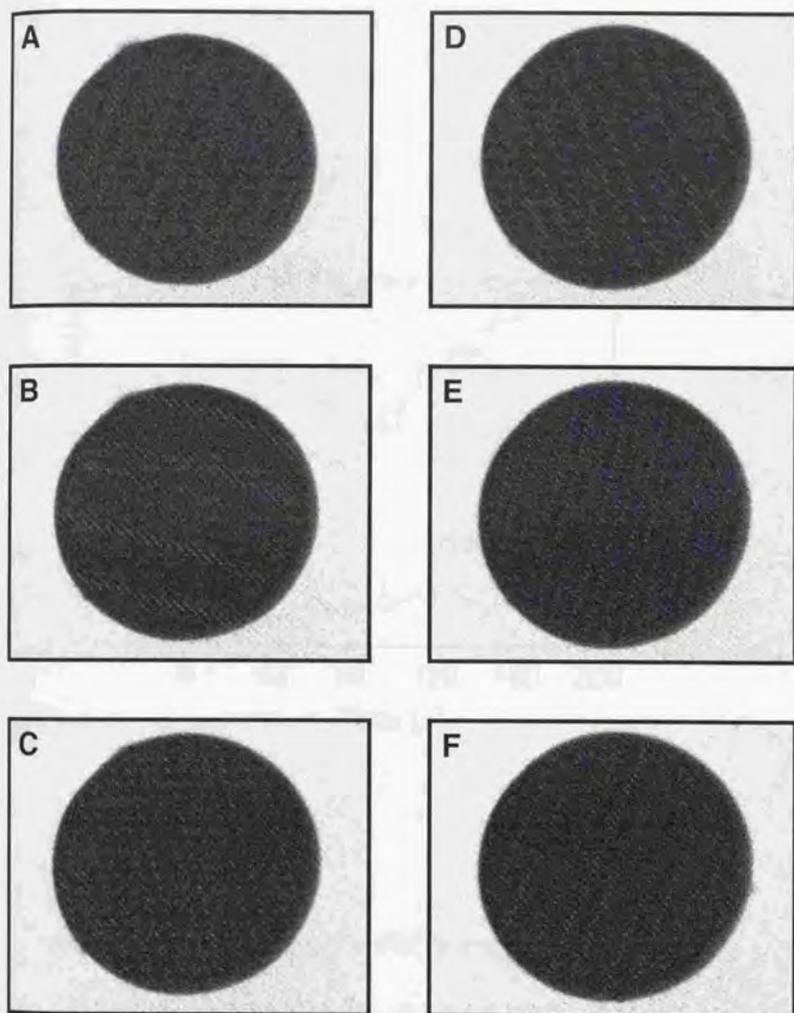


図3-11 hQP4cRNAを注入した卵母細胞の希釈液に浸してからの変化

卵母細胞を3倍に希釈したMBSに浸してから30秒(A)、60秒(B)、90秒(C)、120秒(D)、150秒(E)、180秒(F)後に取り込んだ画像を示した。

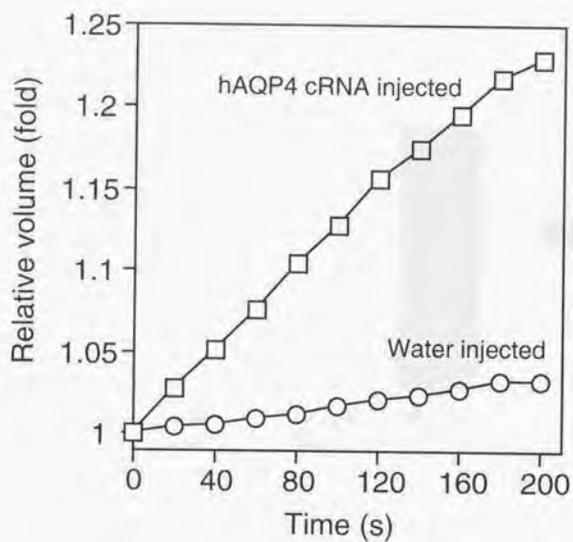


図3-12 希釈液に浸した際の卵母細胞の体積増加

卵母細胞を3倍に希釈したMBSに浸してからの相対体積の時間経過を示した。hAQP4cRNAを注入した卵母細胞の相対体積を□で、コントロールとして水を注入した卵母細胞の相対体積を○で示した。

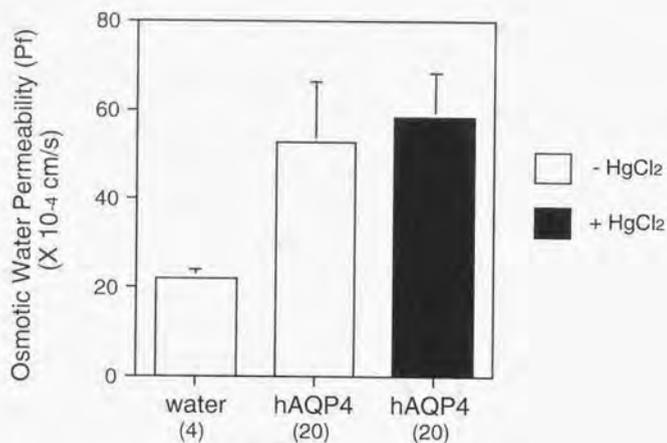
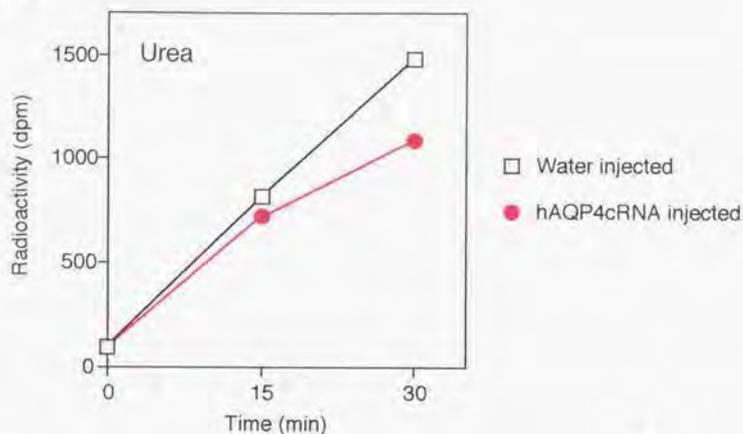


図3-13 hAQP4タンパク質を発現させた酵母細胞における水透過性

水もしくはhAQP4cRNAを注入した酵母細胞を3倍に希釈したMBSに浸した際に生ずる体積増加の速度から浸透圧に依存した水透過性を示す値であるPfの値を算出した。酵母細胞を測定前に1 mMのHgCl₂で5分間処理したときの結果を黒棒で示した。測定に用いた酵母細胞の数を下に示し、数値は平均値および標準偏差で表した。

A



B

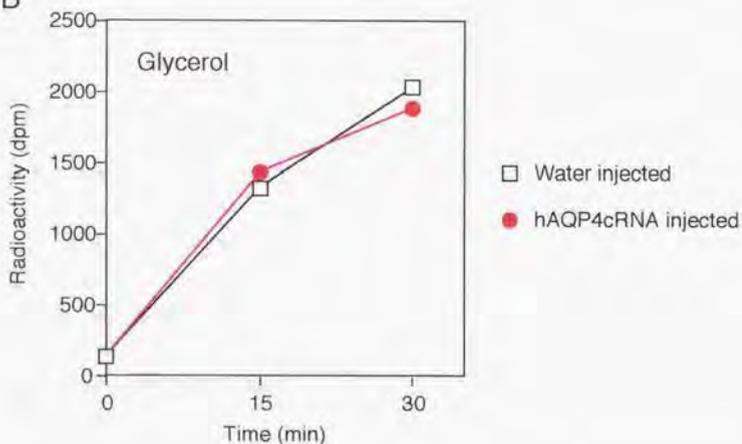


図3-14 卵母細胞への低分子物質の取り込み

1個あたり50 ngのhAQP4cRNA、もしくはコントロールとして同体積の水を注入した卵母細胞を ^{14}C ラベルした尿素 (A) もしくはグリセロール (B) を加えたMBS中で静置し、一定時間後に細胞内に取り込まれた放射活性を測定した。水を注入した卵母細胞を□で、hAQP4cRNAを注入した卵母細胞を●で示した。数値は複数個の卵母細胞における平均値を示した。

第4節 hAQP4のヒト胃における局在

1. 序

ヒト胃において発現し、水透過活性を有することが確認されたhAQP4タンパク質の胃における機能を推定するために、ヒト胃におけるhAQP4タンパク質の局在について抗体染色により検討を行った。

2. 材料および方法

2.1 材料

ヒト胃の肉片は胃ガン患者の摘出手術の検体の際に生じた一部（計2検体）を東京大学医学部第一内科・一瀬雅之先生より提供して頂いた。

組織固定のためのブアン液はSigma社より、正常ヤギ血清および組織染色の二次抗体として用いたビオチン化抗ウサギIgG抗体はフナコシ社から、ABCキットはVector Laboratories社よりそれぞれ購入した。

2.2 試薬

・タンパク質抽出用試薬

9 M 尿素

2% トリトンX-100

5% 2-メルカプトエタノール

・組織固定液

3 μl/ml 過酸化水素水/メタノール

・パーオキシダーゼ発色液

10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)

0.05% DAB

0.01% 過酸化水素

2.3 方法

2.3.1 ヒト胃からのタンパク質の抽出

胃ガン患者の摘出手術のさいに提供して頂いたヒト胃の胃体部の肉片を摘出直後に液体窒素で凍結した。この肉片を乳鉢を用いて粉末にし、10%トリクロロ酢酸を加え0℃で15分間静置した。遠心によって得られた沈殿にタンパク質

抽出用試薬を加え超音波破碎を行い、その後1/4量の10% SDSを加えた。1 M トリスを加えることにより中和を行い、SDS-PAGEに供した。

2.3.2 ウェスタン分析

10%アクリルアミドゲルを用いてヒト胃体部由来のタンパク質のSDS-PAGEを行い、フィルターに転写した。一次抗体としてhAQP4抗体を、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体を用いてウェスタン分析を行った。

2.3.3 ヒト胃切片の作製

ヒト胃の肉片を摘出直後にブアン液に浸し十分固定した後、70%、80%、90%、95%、99.5%のエタノール、キシレンに順次浸して脱水を行った。パラフィンに包埋後マイクロトームを用いて厚さ約4 μm に切り、ヒト胃の切片を作製した。

2.3.4 抗体染色

組織固定液で30分処理した切片をPBSで20倍に希釈した正常ヤギ血清を用いてブロッキングを行った。その後PBSで100倍に希釈したhAQP4抗体で一晩反応後洗浄し、PBSで100倍に希釈したビオチン化抗ウサギIgG抗体で30分間反応した。ABCキットを用いて反応を行った後、パーオキシダーゼ発色液を用いて発色した。

3. 結果

3.1 ヒト胃由来のタンパク質を用いたウェスタン分析

ヒト胃体部の肉片からタンパク質を抽出してSDS-PAGEを行った後、hAQP4抗体を用いてウェスタン分析を行った。その結果、約38 kDaの位置にはっきりとしたバンドが見られ、それよりも高い位置に数本のブロードなバンドが見られた(図3-15)。

3.2 hAQP4タンパク質の組織分布

ヒト胃におけるhAQP4タンパク質の局在についての詳細な情報を得るため、hAQP4抗体を用いた抗体染色を行った。

提供していただいたヒト胃の検体は、1検体が胃体部のみのものであり、もう1検体が胃体部と幽門部の両方であった。それぞれの肉片より切片を作製してhAQP4抗体を用いた抗体染色を行ったところ、胃体部の肉片より作製した切片からは強いシグナルが見られたのに対し、幽門部の肉片より作製したものについてはシグナルがほとんど見られなかった(図3-17)。

胃体部粘膜には胃底腺が垂直に並んでいるが、hAQP4の染色は上皮細胞が並ぶ胃底腺上部には観察されず、胃底腺下部に限定された(図3-17)。染色が認められた主要な細胞は、ペプシノーゲンの分泌を行う主細胞であり、細胞全体が染色されているように見られた(図3-18B)。また胃酸の分泌を行う壁細胞においても染色が見られる場合もあったが、この細胞においては基底膜側に凝集しているようにみられた(図3-18C)。

4. 考察

hAQP4タンパク質の胃における機能を推測するため、ヒト胃における局在について抗体染色により検討した。

胃は噴門、幽門により区分される消化器官であり、大まかに噴門部、幽門部、それらに挟まれた胃体部という構造に分けられる(図3-16)。胃における消化機能は胃体部粘膜に存在する胃底腺において行われている。胃底腺は単一管状腺であり、ヒトの場合直径約50 μm 、長さ約1mmという大きさをしており、成人一人平均約3500万個もの胃底腺を持っている。各腺はお互いに密着しており粘膜表面にはほぼ垂直に並んでいる。胃底腺を構成するのは上皮細胞、主細胞、壁細胞、粘液分泌細胞、内分泌細胞などといった複数種の機能をもつ細胞である。腺の上部には主に上皮細胞が一様に並んでおり、腺中部から下部にかけて、酸を分泌する壁細胞やペプシノーゲンを分泌する主細胞などが混在している

(図3-16)。この2種の細胞は形態的に大きく異なり容易に判別しうる。壁細胞は大きな円錐形の細胞で、腺腔に面する部は狭く基底膜に接する部は広い。ため、切片においては扇形の形状をしている。主細胞は底面がやや広い円柱状の細胞で、切片においては長方形に近い形で観察される。

抗体染色におけるhAQP4の主なシグナルはペプシノーゲンの分泌を行う主細胞で認められた(図3-18)。アスパラギン酸プロテイナーゼであるペプシノーゲンは主細胞から分泌された後、低pHの条件で自己触媒的に活性型のペプシンへと変わり消化酵素として働く。主細胞に存在するhAQP4はペプシノーゲンの

分泌に何らかの関与をしていることが期待される。一方壁細胞においては H^+ 、 K^+ -ATPaseの働きにより酸の分泌を行っている。抗体染色ではその基底膜においてhAQP4タンパク質が凝集している様子が観察された。酸の分泌によって生ずる浸透圧差を緩和するために何らかの機構が必要であり、hAQP4を介した水の移動がこれに関わっていることが推定される。

以上ヒト胃においてhAQP4タンパク質が胃底腺において局在強く局在していること、および胃底腺の中でも胃での消化に深く関わっている細胞において存在していることを明らかにした。この事実から推測されることとして、hAQP4が胃における消化に強く関係していることが挙げられる。具体的には胃液自体の分泌や、酸およびペプシノーゲンの分泌もしくはその調節に関わっていることが期待され、hAQP4を作用分子とした胃液分泌や消化機能の調節機構が存在するか否かについて興味を持たれるところである。

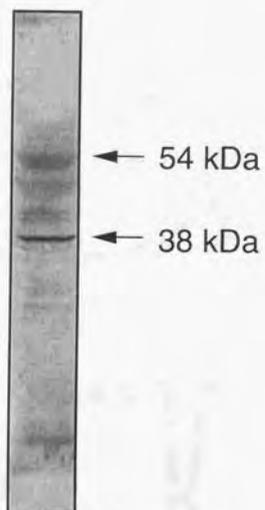


図3-15 ヒト胃におけるhAQP4タンパク質の存在

ヒト胃体部の肉片より抽出したタンパク質を泳動後、hAQP4抗体を用いたウェスタン分析を行った。

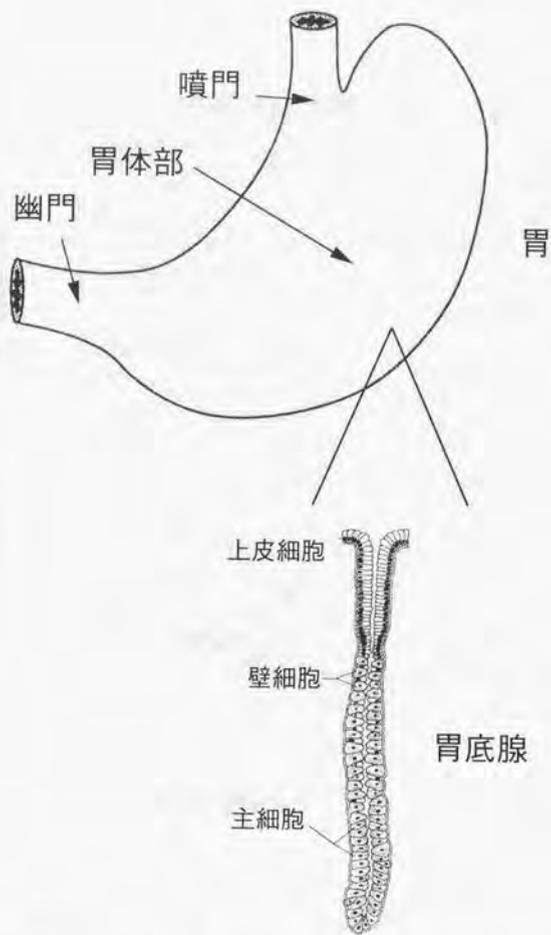


図3-16 胃および胃底腺の模式図

上：胃は噴門、幽門により区分される消化器官であり、大まかに噴門部、幽門部、それらに挟まれた胃体部という構造に分けられる。

下：胃体部粘膜に多数存在する胃底腺は複数種の機能をもつ細胞より構成されている。腺の上部には主に上皮細胞が一様に並び、腺中部から下部にかけて酸を分泌する壁細胞やペプシノーゲンを分泌する主細胞などが混在している。



Fundic glands



Pyloric glands

図3-17 ヒト胃におけるhAQP4タンパク質の局在

ヒト胃切片をhAQP4抗体を用いて抗体染色を行った。胃体部由来の切片を左に、幽門部由来の切片を右に示した。胃底腺の模式図を写真の左に示した。

A



B



C

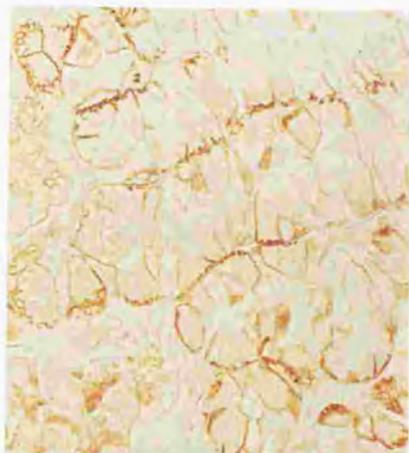


図3-18 ヒト胃体部におけるhAQP4タンパク質の局在

ヒト胃体部切片をhAQP4抗体を用いて抗体染色を行った。上皮細胞が並ぶ胃底腺上部には染色が認められない (A)。染色が確認された胃底腺の下部を拡大すると、主に主細胞が染色されている (B)。また染色がみられた壁細胞においては基底膜に凝集している様子が確認できる (C)。

第5節 ラット胃における水チャンネルの発現

1. 序

ヒト胃においてhAQP4が発現しており消化を担う細胞に局在していることを第2節から第4節において明らかにした。本節ではAQP4タンパク質が胃において発現している形質が広く保存されているかどうかについて検討するため、ラットを材料として用い、その胃におけるアクアポリンの発現について解析を行った。

2. 材料および方法

2.1 材料

ラット (Wistar) は日本生物材料センターおよび埼玉実験動物社より購入した。

2.2 方法

2.2.1 ラット各組織からのRNAの抽出

第2章に述べた方法により、ラットの胃、脳、肺、腎臓、小腸、大腸からISOGEN (ニッポンジーン社) を用いてRNAを抽出した。

2.2.2 一本鎖cDNAの合成

第2章と同様に、各組織由来のmRNA 1 µgよりランダムプライマーを用いて一本鎖cDNAを合成した。

2.2.3 オリゴヌクレオチドの合成

既知のラットのアクアポリンファミリー (AQP1~5) のcDNAのコード領域に相当する断片を増幅するために、各アクアポリンに対応するプライマーを合成した。センスプライマーは開始メチオニンのコドンを含む18 merのものを、アンチセンスプライマーは終止コドンの位置に対応するもので、制限酵素認識配列を加えて26 merにした。センス、アンチセンスプライマーの下線部はそれぞれ開始メチオニンおよび終止コドンの位置を示す。

ラットAQP1 (Deen, P. M. T. et al., 1992)

センス 5'-AACATGGCCAGCGAAATC-3'

- アンチセンス 5'-GCGAATTCCTATTTGGGCTTCATCTC-3'
ラットAQP2 (Fushimi, K. et al., 1993)
センス 5'-AGCATGTGGGAACTCAGA-3'
アンチセンス 5'-CCTCTAGATCAGGCCTTGCTGCCGCG-3'
ラットAQP3 (Ishibashi, K. et al., 1994)
センス 5'-GAGATGCTCCACATCCGC-3'
アンチセンス 5'-CCTCTAGATCAGATCTGCTCCTTGTG-3'
ラットAQP4 (Jung, J. S. et al., 1994)
センス 5'-GGCATGAGTGACGGAGCT-3'
アンチセンス 5'-CCTCTAGATCATACAGAAGATAATAC-3'
ラットAQP5 (Raina, S. et al., 1995)
センス 5'-ACCATGAAAAAGGAGGTG-3'
アンチセンス 5'-CCTCTAGATCAGTGTCCGTCAGCTC-3'

2.2.4 RT-PCR

各組織由来のcDNAを鋳型として、それぞれのアクアポリンのセンス、アンチセンスのプライマーの組み合わせでPCRを行った。条件は94℃45秒、50℃1分、72℃2分で40サイクル行った。

2.2.5 ラットAQP4cDNA断片の単離

脳由来のcDNAを鋳型とし、AQP4のプライマーの組み合わせを用いたPCR産物からAQP4 cDNAに相当する長さを持つバンドを切り出し、プラスミドベクターにサブクローニングした。塩基配列を解析し、既知のラットAQP4のものと同一であることを確かめた。

2.2.6 ノーザン分析

第3章第2節で述べたのと同様に、脳、胃、小腸、大腸の各組織由来のmRNA 5 µgずつをアガロースゲルで泳動し、ナイロンフィルターに転写した。上記のラットAQP4cDNA断片をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。洗浄は65℃で、最終的に0.1×SSC/0.1% SDSを用いて行った。

2.2.7 ラット胃の抗体染色

第3章第4節に述べたヒト胃の場合と同様にして、ラットの胃から切片を作製した。一次抗体にhAQP4抗体を用いて抗体染色を行った。

3. 結果

3.1 ラット各組織におけるアクアポリンの発現

胃においてAQP4が発現していることが、ヒトだけでなく広く保存された形質であるかどうかについて検討するため、ラットを材料として用い、AQP4および他のアクアポリンの発現について検討を行った。

まずRT-PCRにより各アクアポリンの発現の有無を検討した。既知のラットのアクアポリン (AQP1~5) のコード領域全長を増幅するようなプライマーを合成し、各組織由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行った (図3-19)。胃のcDNAを鋳型にしてPCRを行うとAQP1、3、4に相当するバンドが増幅され、ラット胃において3種類の水チャンネルが発現していることが明らかとなった。また他の消化管である小腸、大腸においても、胃と同様にAQP1、3、4に相当するバンドが増幅された。

3.2 ラット組織におけるAQP4の発現量の比較

すでにラットにおいては脳および肺から、2つのグループによりAQP4に相当するタンパク質のcDNAクローニングがなされており (Jung, J. S. et al., 1994; Hasegawa, H. et al., 1994b)、両組織においてAQP4が多量に発現していることが知られている。

そこで脳をポジティブコントロールとして用い、RT-PCRによりAQP4の発現が確認できた胃、小腸、大腸におけるAQP4mRNAの発現についてノーザン分析により検討した。各組織由来のmRNAを5 μ gずつ泳動し、AQP4 cDNA断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行ったところ3本のバンド (約4.5 kb, 2.3 kb, 1.7 kb) が観察された (図3-20)。これはヒトのhAQP4の場合と同様であった (図3-8)。ラットにおけるAQP4mRNAの発現量について比較を行うと、用いた組織の中では脳に最も多く発現していた。消化管の中では胃に最も大きな発現が認められたが、小腸、大腸においてもAQP4に相当するバンドが確認できた。

3.3 ラット胃におけるAQP4タンパク質の局在

ラット胃におけるAQP4タンパク質の局在について検討するため、ラット胃より切片を作製して抗体染色を行った。第3節でhAQP4抗体作製に用いたペプチド抗原はhAQP4のC末端に相当する10アミノ酸残基であるが、ラットAQP4の相当する部分と比較すると10アミノ酸中9アミノ酸が同一であり(図3-5)、作製したhAQP4抗体がラットAQP4タンパク質にも反応することが十分に期待された。そこでラット胃におけるAQP4の局在を検討する際にも、hAQP4抗体を用いて抗体染色を行うことにした。

その結果ラットにおいてもヒトと同様に胃底腺の下部がはっきりと染色された(図3-21)。主に染色された細胞は酸分泌を行う壁細胞であり、ヒトで見られた主細胞の染色はほとんど認められなかった。また壁細胞におけるシグナルは基底膜に限定されていた(図3-21)。

4. 考察

ヒト胃においてhAQP4が多量に発現しており、そのタンパク質の局在が消化機能に強く関わる細胞(主細胞、壁細胞)に限定されていることを第2節から第4節において明らかにしてきた。これらの事実よりhAQP4がヒト胃において消化機能に強く関わっていることを推測した。本節ではラットを材料として用い、ラット胃におけるAQP4の発現ならびに局在について検討することにより、ヒトで得られた知見が広く保存された形質であるかどうかを検討した。

まず既知のアクアポリンに対応するプライマーを合成し、RT-PCRを行うことにより各種組織におけるアクアポリンの発現について検討した。胃においては3種(AQP1、3、4)のアクアポリンの発現が確認され(図3-19)、ラット胃においてもAQP4が発現していることを見いだした。生体内で幅広い組織分布を示すAQP1はラットの胃においても発現しており、またすでに報告のあったようにAQP3の胃における発現も同時に確認された(Ishibashi, K. et al, 1994)。

ヒトにおけるノーザン分析において、hAQP4の消化管における発現は胃に限定されており、小腸、大腸における発現が認められなかったのに対し(図3-8)、ラットにおいては胃だけでなく小腸、大腸においても相当するバンドが確認できた(図3-20)。発現量は胃に比べて非常に少ないものの、ヒトの場合と違いが見られたことは興味深い。

ラットにおいてはRT-PCRを試みた全ての組織において複数のアクアポリンの発現が確認された(図3-19)。例えば腎臓においては4種類のアクアポリン

(AQP1~4)が発現している。腎臓では抗体染色によって各アクアポリンの局在が明確に異なることが明らかにされており、存在する部位の違いが機能の違いとなっていることが示唆されている (Sabolie, I. et al., 1992; Nielsen, S. et al., 1993a; Nielsen, S. et al., 1993b; Fushimi, K. et al., 1994; DiGiovanni, S. R. et al., 1994; Ishibashi, K. et al., 1994; Nielsen, S. et al., 1995; Terris, J. et al., 1995)。しかし他の組織においては、複数のアクアポリンの局在について明確な知見は得られておらず、各アクアポリンの機能を推測する上でも、組織内における局在の違いを明らかにすることが今後の課題となるであろう。

ラット胃におけるAQP4タンパク質はヒトの場合と同様に胃底腺の下部に局在していることが示された (図3-21)。ヒトにおいてはペプシノーゲンの分泌を行う主細胞が主に染色されたのに対して、ラットにおいては酸を分泌する壁細胞が主として染色された。消化を担う細胞に局在している点においては両者は共通であり、AQP4の胃における消化機能への関与がさらに強く推測できるといえるであろう。

RT-PCRで胃における発現が確認された他のアクアポリン (AQP1, 3) の胃における局在についての情報は得られていないが、腎臓で明らかにされたような明確な局在の相違が観察されれば、それぞれの機能についてさらなる理解が得られることが期待される。

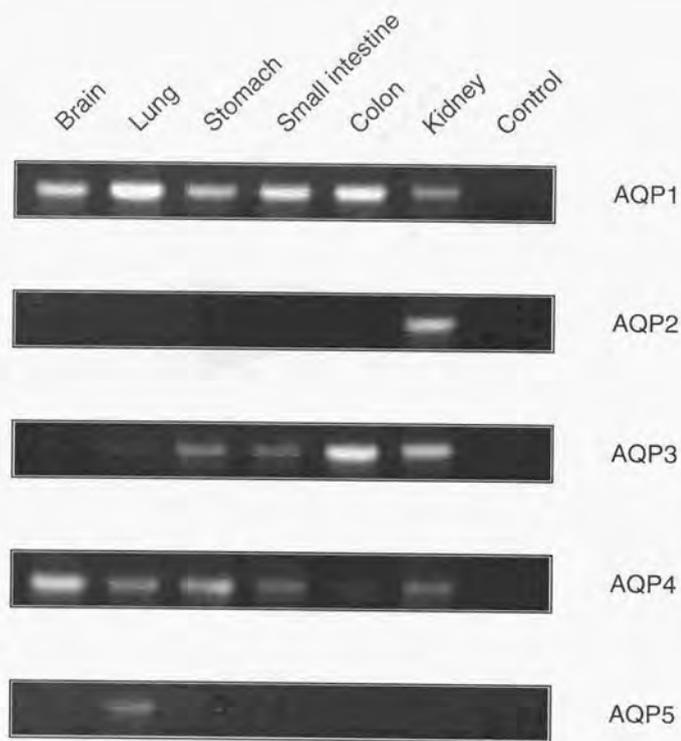


図3-19 ラット各組織におけるアクアポリンの発現

ラットの脳、肺、胃、小腸、大腸、腎臓由来のcDNAを鋳型とし、各アクアポリンを増幅するようなRT-PCRを行い、PCR産物の電気泳動を行った。PCRの際に鋳型を加えないものをコントロールとした。

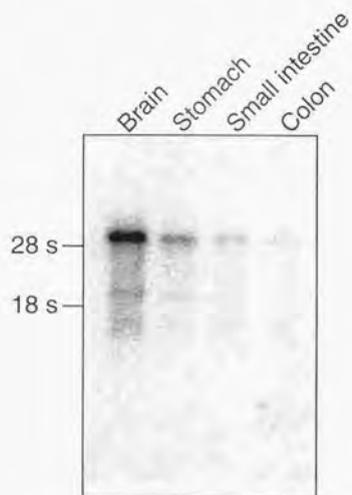


図3-20 ラットにおけるAQP4mRNAの発現

脳、胃、小腸、大腸より抽出したmRNAをそれぞれ5 μ gずつ泳動し、ラットAQP4cDNA断片をプローブとして用いてノーザン分析を行った。サイズマーカーの位置を左に示した。

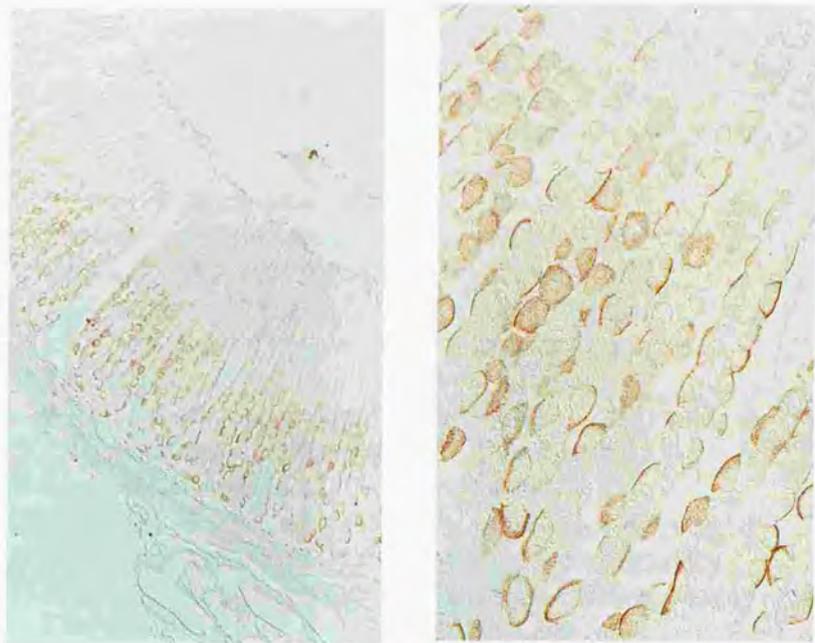


図3-21 ラット胃におけるAQP4タンパク質の局在

ラット胃切片を一次抗体にhAQP4抗体を用いて抗体染色を行った。低倍で観察したものを左に、胃底腺下部を拡大したものを右に示した。

第6節 まとめ

我々が食品を摂取した際はまず口腔にて味を受容し、認識する。それに引き続き胃における消化が行われる。食物の消化は多種多様な分子が協調することによって行われている。これまでその関与は知られていなかったが、水を透過する機能を持つ水チャンネルが消化液の分泌にも関わることが予想された。そこで胃に発現する水チャンネルについて、検索ならびに分子生物学的解析を行った。

第2節から第6節にかけてヒト胃およびラット胃を材料として用い、hAQP4もしくはAQP4といった分子種が胃に発現していること、および胃でのタンパク質の局在が消化機能を担う細胞に限定されていることを示してきた。胃という食品の初期消化を行う組織に注目した水チャンネルの解析は他に例がなく、今回明らかにしたAQP4分子種の発現は、胃での消化を考える上で新たな知見となるであろう。

ヒトでは一日に約2リットルの割合で胃液が分泌されている。この胃液の分泌に何らかの水の輸送を行う機構が関わっている可能性は非常に高いことが推定される。胃において発現するhAQP4が胃液の分泌に直接関わるといことは証明できていない。しかしヒトにおいてもラットにおいてもAQP4の発現が消化機能を担う細胞に限定されていることから、消化機能に何らかの関与はしていることは強く示唆される。例えば、摂食行動前後でのタンパク質の局在などに大きな変化が見られれば、さらに強く消化への関与が推定できるであろう。

胃酸は胃底腺に存在する壁細胞より分泌され、同じ胃底腺の主細胞から分泌されるペプシノーゲンをペプシンへと活性化することによって消化に重要な役割を果たしている。壁細胞における酸の分泌を促進するホルモンとしてヒスタミン、アセチルコリン、ガストリンがある。これらホルモンの受容を行うレセプターは壁細胞の基底膜に存在している。ラットにおけるAQP4タンパク質の局在も同様に壁細胞基底膜であり、これらの分子間で同じ局在を示すことは興味深い。何らかの機能相関が認められれば新しい知見となるであろう。また3種のホルモンのうち、アセチルコリンは脳での知覚により迷走神経末端を経て壁細胞から放出される。よって味覚の情報伝達を阻害するような薬剤などを投与して観察すると、味覚受容と胃の酸分泌との関係についてのより詳細な情報が得られることが期待される。

第4章

おわりに

以上のようにして、舌における味覚の受容と胃における消化の機能に直接もしくは間接に関与することが期待される2つの新規チャンネルタンパク質についての分子生物学的な解析を行ってきた。

食品には栄養面での機能、嗜好面での機能、病氣予防面での機能があるとされる。これらのうち栄養面での機能は食品の性質な中で最も基本的なものであり、これまでの食品研究においては主要な対象となってきた。またその研究の発展の過程で派生した病氣予防面での機能は最近世界的な関心を呼び、その研究は食品科学の新しい潮流となりつつある。その反面、嗜好面での食品の機能、すなわち呈味を担っている機能については、本来食品の特性を最も端的に表す属性であるにも関わらず、その研究は上記の2つの機能に遅れをとっている。少なくとも食品成分によって引き起される味の感覚の情報が脳へ伝達される機構を分子レベルで解析する研究はほとんど行われていなかった。

感覚は外来の情報を受容し認知するために使われている。感覚受容により得られた情報は単に誘因や忌避といった行動を誘導するばかりでなく、諸々の生理統御にも一定の効果を及ぼすことが示唆される。味物質が味覚を介して生理統御系に与える影響も少なくない。例えば唾液の分泌、消化液の分泌はそういったものの一例である。つまり食品の嗜好面での機能と病氣予防面での機能との間には互いにオーバーラップした領域が存在するといえよう。しかしこの新領域に踏み込む研究、とりわけ分子レベルでのアプローチは全くといっていいほどなされていなかった。

チャンネルを共通項とする2種の新規分子の解析を試みた本研究は、味覚と消化の連動の機構の新側面をとらえうるとの考えで開始されたものである。このアプローチが、今後、特定の味の食品成分の摂取と、その食品の消化とが分子論的に連動することを解明する研究につながることを期待される。またそれは将来、嗜好を経由した生体調節、さらには病氣予防の実践にも展開されるであろうと予想される。

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成7年度博士課程進学

氏名 三坂 巧

指導教官名 阿部 啓子

論文題目 味覚および食物消化に関与するチャンネルの分子生物学的解析

1. はじめに—研究の背景

イオンや低分子物質が細胞膜を透過する際には、膜貫通型のチャンネルタンパク質を利用する。生体の細胞膜には物質を選択的に透過させるチャンネルが多種存在している。しかもそれらは哺乳類に限らず、植物や微生物に至るまで広く分布し、生体内や細胞内の様々な生理機能に深く関わっていることが知られている。

我々人間が食品を摂取し、消化、吸収を行うといった一連の過程においても、何らかのチャンネルタンパク質が関与していることは想像に難くない。本研究においては、特に食物摂取時と摂取直後に機能することが強く推定される2種の新規チャンネルタンパク質の存在を見だし、その詳細な解析を行った。

2. 舌上皮に発現する環状ヌクレオチド活性化チャンネル

1) 緒論

食品摂取時に最初に起こる生体反応は、舌上皮における味の受容である。生体では舌上皮において味物質を受容するのと同じように、目の網膜において光、鼻の嗅上皮において匂物質を受容している。光や匂物質の受容を担うこれらの細胞においては、リガンドを認識する七回膜貫通型レセプター、共役するGTP結合タンパク質(Gタンパク質)、それらに続く効果器といった分子の存在、および細胞内二次メッセンジャーとしての環状ヌクレオチド(cGMPやcAMP)の濃度の増減に至る一連の経路が明らかとなっている。さらに環状ヌクレオチドの濃度の増減は、それぞれの組織特異的に発現している環状ヌクレオチド活性化チャンネル(cyclic nucleotide-gated channel, CNGチャンネル)の開閉を引き起こし、これが視覚や嗅覚の情報伝達に重要な役割を果たしていることが知られている。

一方、舌上皮の味蕾中に存在し、味物質の受容を行う味細胞には、視覚・嗅覚レセプターと同一性を有する七回膜貫通型レセプターや味細胞特異的に発現するGタンパク質の存

化が確認されている。また味細胞において、ある種の味物質で刺激を行うと細胞内の環状ヌクレオチド（主としてcAMP）濃度が上昇することが生化学的に示されている。これらの事実、味細胞においてもレセプターを介した、環状ヌクレオチドを細胞内二次メッセンジャーとして利用する味覚の情報伝達系が存在し、その下流にある種のCNGチャンネルが機能している可能性を強く示唆するものである。そこで本研究においては舌上皮味細胞において発現しているCNGチャンネルの検索を行うことにした。

(2) 舌上皮に発現するCNGチャンネルのクローニング

CNGチャンネルは6回膜貫通型のイオンチャンネルで、C末端側の細胞質領域にヌクレオチド結合領域を持つという構造的特徴を有しており、環状ヌクレオチドによってチャンネルが開きイオンが透過する。視細胞や嗅細胞に存在している既知のCNGチャンネルにおいては膜貫通領域やヌクレオチド結合領域において高い相同性が見られる。そこでこれらの保存性の高い領域をもとにプライマーを作製し、ラット舌上皮より抽出したRNAから作製したcDNAを鋳型としてRT-PCRを行った。さらに得られたPCR産物に対して、増幅される領域中に含まれる配列をもとに作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いてサザン分析を行うことにより、CNGチャンネルをコードするcDNA断片の検索を行った。合成した多種のプライマーの組み合わせでPCRを行った結果、6回目の膜貫通領域の直後からヌクレオチド結合領域の前半部までに相当する約400 bpの陽性断片を得ることができた。この断片にコードされるアミノ酸配列は、既知のCNGチャンネルのものとは80%程度の相同性しか有さず、新規のCNGチャンネルをコードするものであることが期待された。このチャンネルの発現量が非常に少ないことが予想されたため、cDNAの全構造を明らかにするために以下の方法を行った。まず得られたPCR断片をプローブにしてラットゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、PCR断片周辺のエキソンの配列を明らかにした。得られた情報をもとにして5'-RACEを行い、cDNAのコード領域の配列を決定した。またコード領域全長が増幅されるようにプライマーを作製し、再度舌上皮由来のcDNAよりPCRを行ったところ、相当するバンドが確認できたことより、このクローニングが確かに舌上皮に発現していることが明らかとなった。

このようにして得られたcDNAにコードされているCNGチャンネル（CNG_{gust}）は611アミノ酸残基よりなり、6回の膜貫通領域とヌクレオチド結合領域を有していた。既知のCNGチャンネルとはアミノ酸レベルで50～80%の相同性を示した。最も高い相同性をもつものとしては、ウシの精巣に発現しているCNGチャンネルおよびヒトの錐体に発現しているCNGチャンネルが挙げられる。

(3) CNG_{gust}のチャンネル機能の解析

舌上皮に発現しているCNG_{gust}のチャンネル機能の解析を行うために、CNG_{gust}を培養細胞（HEK293）に発現させた。培養細胞発現用のベクターにクローニングしたCNG_{gust} cDNAのコード領域に相当する断片を挿入した発現プラスミドを構築し、これをトランスフェクションに用いることによりトランジェントにCNG_{gust}タンパク質を発現させた。

まずCNG_{gust}に対する抗体を用いてウェスタン分析を行ったところ、予想される位置にバンドが確認でき、さらにトランジェントに発現させた細胞を抗体染色に供したところ、CNG_{gust}タンパク質の細胞膜への局在が観察された。

次に電気生理的な性質を解析するため、バッチクランプ法により検討を行った。この際

にはトランスフェクションされた細胞を確認するため、CNGgustの発現プラスミドと同時に蛍光タンパク質であるGFPを発現させるようなプラスミドをHEK293細胞にコトランスフェクションした。GFPの発現が認められた細胞の細胞膜にガラス微小電極を密着させ、電極を引き上げるにより電極先端部の微小膜領域を切り取り、インサイドアウトのパッチを作製した。インサイドアウトのパッチ膜においては、電極側が細胞外側に、灌流液側が細胞質側に相当する。パッチ膜に電位をかけ、灌流液にcGMPやcAMPを添加した際に流れる電流について検討した。その結果、灌流液にcGMPやcAMPがないときにはパッチ膜に電位をかけても電流は流れず、cGMPやcAMPを添加した際に濃度依存的、電位依存的に電流が流れるという、CNGチャンネル特有の性質を示した。電位と電流の関係について調べたところほぼ直線的であり、極端な整流性は示さなかった。また環状ヌクレオチドの濃度依存性に関しては、最大電流の半分を流すような濃度についてはcGMP (約3 μM) のほうがAMP (約300 μM) よりも約2桁感受性が高いことが判明した。

(4) 舌上皮有郭乳頭におけるCNGgustの局在

CNGgustの舌上皮における存在部位を調べるため、CNGgust抗体を用いてラット有郭乳頭切片の抗体染色を行った。その結果、有郭乳頭の味蕾にCNGgustの局在が認められ、さらに味蕾を構成する味細胞の味孔に近い部位に強いシグナルが観察された。また舌咽神経を切断することにより有郭乳頭に存在する味蕾を退化させたときにはCNGgust抗体による抗体染色のシグナルが見られず、CNGgustの発現が味蕾に特異的であることが判明した。

(5) 結論

以上のように新規CNGチャンネルであるCNGgustが味蕾に特異的な発現様式を示すこと、および味覚情報伝達経路の細胞内二次メッセンジャーの一つとして考えられる環状ヌクレオチドによりイオンを透過する機能を有することを明らかとした。今回得られたこれらの知見は、味細胞における味覚の情報伝達の一環にCNGチャンネルが関わっていることを強く示唆し、伝達経路上流に位置するレセプター分子の同定、延いてはそのリガンドの決定にまで期待を抱かせるものである。

3. ヒト胃に発現する水チャンネル

(1) 緒論

摂取された食品は消化の過程へと進む。この過程に関わることが強く期待されるチャンネルとして、水を透過する機能を持つ水チャンネルに着目した。食物の消化、吸収を専業とする胃や腸においては、水の透過が盛んに行われており、水チャンネルが何らかの関与をしている可能性は大きいと考えられた。そこでヒト胃において発現する水チャンネルの検索を行った。

(2) ヒト胃に発現する水チャンネルのクローニング

既知の水チャンネルタンパク質 (アクアポリン、AQP) ファミリーに保存されている配列をもとにしてプライマーを作製し、ヒト胃のcDNAを鋳型として用いてRT-PCRを行った。得られた断片をプローブとしてヒト胃のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、新規水チャンネルをコードするcDNAクローンを単離した。ここにコードされるタンパク質は323アミノ酸残基よりなっており、6回の推定膜貫通領域を有していた。このタンパク質はラットのAQP4とアミノ酸レベルで94%の相同性を有していたことから、

hAQP4 (human aquaporin 4) と名付けた。

(3) hAQP4の水透過性機能の解析

hAQP4の水透過性について検討するため、アフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いてhAQP4タンパク質を発現させた。hAQP4のコード領域を含むcRNAを合成して卵母細胞に注入し、1日もしくは2日後に卵母細胞の水透過性を検討した。細胞外液を培養液(等張液)から3倍に希釈した培養液(低張液)に変化させた際に起こる卵母細胞の体積増加を測定することにより、浸透圧に依存した水の透過性を算出した。hAQP4のcRNAを注入した卵母細胞はコントロールに比べ水透過性が著しく増加した。またこの水透過活性は一般に水チャンネルの阻害剤として知られる水銀によっては阻害されなかった。また水以外の低分子物質の透過性について検討したところ、尿素、グリセロールに関しては透過を促進しなかった。以上の結果より、hAQP4が水を選択的に透過するチャンネルとして機能していることが示された。

(4) hAQP4のヒト胃における局在

胃の組織におけるhAQP4の局在について調べるため、hAQP4抗体を用いてヒト胃切片の抗体染色を行った。その結果、hAQP4は胃体部の腺組織(胃底腺)に発現していたが、幽門付近の幽門腺には発現が見られなかった。胃底腺を構成する細胞のうちでも、上皮細胞が並ぶ腺の上部には発現が見られず、ペプシノーゲンを分泌する主細胞および酸を分泌する壁細胞が存在している腺の下部に強い局在が観察された。

(5) 結論

胃において水チャンネルが発現し、さらに胃での消化に直接関係する細胞に強く局在が観察されたというこれらの事実は、ヒト胃においてhAQP4がペプシノーゲンや酸の分泌の際の浸透圧調整において主要な役割を果たしている可能性を強く示唆するものである。

4. おわりに

食品を摂取すると生体はまず味という外来のシグナルに応答する。その直後に始まる食物消化の準備は、感覚と栄養の接点であるとも考えられる。本研究が明らかにした2種のチャンネルタンパク質は、それぞれ直接もしくは間接に、舌における味覚の受容と胃における消化の機能に深く関わるものであると考えられる。食品摂取時におけるこれらのチャンネルの局在や機能の変化についての詳細な解析が、味覚と消化の運動の新側面を把えるものであることが期待される。

発表論文

1. T. Misaka, Y. Kusakabe, Y. Emori, T. Gono, S. Arai, and K. Abe. Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22623-22629 (1997)
2. T. Misaka, Y. Kusakabe, Y. Emori, S. Arai, and K. Abe. Molecular cloning and taste bud-specific expression of a novel cyclic nucleotide-gated channel, in "Olfaction and Taste XII" (C. A. Greer and C. Murphy, eds.), New York Academy of Sciences, in press.
3. T. Misaka, K. Abe, K. Iwabuchi, Y. Kusakabe, M. Ichinose, K. Miki, Y. Emori, and S. Arai. A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secretory cells of human stomach. *FEBS Lett.*, **381**, 208-212 (1996)

引用文献

- Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y., and Arai, S. (1993a) Multiple genes for G protein-coupled receptors and their expression in lingual epithelia. *FEBS Lett.*, **316**, 253-256
- Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y., and Arai, S. (1993b) Primary structure and cell-type specific expression of a gustatory G protein-coupled receptor related to olfactory receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 12033-12039
- Abrami, L., Simon, M., Rousset, G., Berthod, V., Buhler, J.-M., and Rippe, P. (1994) Sequence and functional expression of an amphibian water channel, FA-CHIP: a new member of the MIP family. *Biochim. Biophys. Acta* **1192**, 147-151
- Agre, P., Sasaki, S., and Christensen, M. J. (1993) Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am. J. Physiol.* **265**, F461
- Agre, P., Brown, D., and Nielsen, S. (1995) Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 472-483
- Asanuma, N., and Nomura, H. (1995) Cytochemical localization of guanylyl cyclase activity in rabbit taste bud cells. *Chem. Senses* **20**, 231-237
- Barnstable, C. J., and Wei, J.-Y. (1995) Isolation and characterization of the α -subunit of the rat rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J. Mol. Neurosci.* **6**, 289-302
- Baumann, A., Frings, S., Godde, M., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (1994) Primary structure and functional expression of a *Drosophila* cyclic nucleotide-gated channel present in eyes and antennae. *EMBO J.* **13**, 5040-5050
- Berghard, A., Buck, L. B., and Liman, E. R. (1996) Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2365-2369
- Biel, M., Altenhofen, W., Hullin, R., Ludwig, J., Freichel, M., Flockerzi, V., Dascal, N., Kaupp, U. B., and Hofmann, F. (1993) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta. *FEBS Lett.* **329**, 134-138
- Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N., Murakami, M., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1994) Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**,

- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A., and Hofmann, F. (1996) Molecular cloning and expression of a modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel. *J. Biol. Chem.* **271**, 6349-6355
- Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J., and Breer, H. (1990) Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J.* **9**, 2453-2458
- Bondy, C., Chin, E., Smith, B. L., Preston, G. M., and Agre, P. (1993) Developmental gene expression and tissue distribution of the CHIP28 water-channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4500-4504
- Bradley, J., Li, J., Davidson, N., Lester, H. A., and Zinn, K. (1994) Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8890-8894
- Breer, H., Boekhoff, I., and Tareilus, E. (1990) Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* **345**, 65-68
- Breer, H., and Boekhoff, I. (1991) Odorants of the same odor class activate different second messenger pathways. *Chem. Senses* **16**, 19-29
- Broillet, M.-C., and Firestein, S. (1997) β -subunits of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel form a nitric oxide activated Ca^{2+} channel. *Neuron* **18**, 951-958
- Brunet, L. J., Gold, G. H., and Ngai, J. (1996) General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* **17**, 681-693
- Buck, L., and Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187
- Buck, L. B. (1996) Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 517-544
- Chen, T.-Y., Peng, Y.-W., Dhallan, R. S., Ahamed, B., Reed, R. R., and Yau, K.-W. (1993) A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* **362**, 764-767
- Cheng, A., van Hoek, A. N., Yeager, M., Verkman, A. S., and Mitra, A. K. (1997) Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature* **387**, 627-630
- Coburn, C. M., and Bargmann, C. I. (1996) A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in *C. elegans*. *Neuron* **17**, 695-706

- Cook, N. J., Hanke, W., and Kaupp, U. B. (1987) Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 585-589
- Deen, P. M. T., Dempster, J. A., Wieringa, B., van Os, C. H. (1992) Isolation of a cDNA for rat CHIP28 water channel: high mRNA expression in kidney cortex and inner medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 1267-1273
- Deen, P. M. T., Verdijk, M. A. J., Knoers, N. V. A. M., Wieringa, B., Monnens, L. A. H., van Os, C. H., and van Oost, B. A. (1994) Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* **264**, 92-95
- Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P., and Agre, P. (1988) Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.* **263**, 15634-15642
- Dhallan, R. S., Yau, K.-W., Schrader, K. A., and Reed, R. R. (1990) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* **347**, 184-187
- Dhallan, R. S., Macke, J. P., Eddy, R. L., Shows, T. B., Reed, R. R., Yau, K.-W., and Nathans, J. (1992) Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: amino acid sequence, gene structure, and functional expression. *J. Neurosci.* **12**, 3248-3256
- DiGiovanni, S. R., Nielsen, S., Christensen, E. I., and Knepper, M. A. (1994) Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8984-8988
- Dulac, C., and Axel, R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**, 195-206
- Echevarria, M., Frindt, G., Preston, G. M., Milovanovic, S., Agre, P., Fischbarg, J., and Windhager, E. E. (1993) Expression of multiple water channel activities in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat kidney. *J. Gen. Physiol.* **101**, 827-841
- Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S., and Lyubarsky, A. L. (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**, 310-313
- Folkesson, H. G., Matthay, M. A., Hasegawa, H., Kheradmand, F., and Verkman, A. S. (1994) Transcellular water transport in lung alveolar epithelium through mercury-

- sensitive water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4970-4974
- Frohman, M. A., Dushi, M. K., and Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002
- Fushimi, K., Uchida, S., Hara, Y., Hirata, Y., Marumo, F., and Sasaki, S. (1993) Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* **361**, 549-552
- Fushimi, K., Sasaki, S., Yamamoto, T., Hayashi, M., Furukawa, T., Uchida, S., Kuwahara, M., Ishibashi, K., Kawasaki, M., Kihara, I., and Marumo, F. (1994) Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct. *Am. J. Physiol.* **267**, F573-F582
- Gorin, M. B., Yancey, S. B., Cline, J., Revel, J.-P., and Horwitz, J. (1984) The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* **39**, 49-59
- Goulding, E. H., Ngai, J., Kramer, R. H., Colicos, S., Axel, R., Siegelbaum, S. A., and Chess, A. (1992) Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* **8**, 45-58
- Guth, L. (1957) The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. *Anat. Rec.* **128**, 715-731
- Haines, T. H. (1994) Water transport across biological membranes. *FEBS Lett.* **346**, 115-122
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85-100
- Halpern, M., Shapiro, L. S., and Jia, C. (1995) Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res.* **677**, 157-161
- Hasegawa, H., Zhang, R., Dohrman, A., and Verkman, A. S. (1993) Tissue-specific expression of mRNA encoding rat kidney water channel CHIP28k by in situ hybridization. *Am. J. Physiol.* **264**, C237-C245
- Hasegawa, H., Lian, S.-C., Finkbeiner, W. E., and Verkman, A. S. (1994a) Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by in situ hybridization and antibody staining. *Am. J. Physiol.* **266**, C893-C903
- Hasegawa, H., Ma, T., Skäch, W., Matthey, M. A., and Verkman, A. S. (1994b)

- Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J. Biol. Chem.* **269**, 5497-5500
- Heck, G. L., Mierson, S., and DeSimone, J. A. (1984) Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* **223**, 403-405
- Herrada, G., and Dulac, C. (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* **90**, 763-773
- van Hoek, A. N., and Verkman, A. S. (1992) Functional reconstitution of the isolated erythrocyte water channel CHIP28. *J. Biol. Chem.* **267**, 18267-18269
- Huque, T., and Bruch, R. C. (1986) Odorant- and guanine nucleotide-stimulated phosphoinositide turnover in olfactory cilia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 36-42
- Ishibashi, K., Sasaki, S., Fushimi, K., Uchida, S., Kuwahara, M., Saito, H., Furukawa, T., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Gojobori, T., and Marumo, F. (1994) 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
- Jap, B. K. and Li, H. (1995) Structure of the osmo-regulated H₂O-channel, AQP-CHIP, in projection at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **251**, 413-420
- Jones, D. T., and Reed, R. R. (1989) Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* **244**, 790-795
- Jung, J. S., Bhat, R. V., Preston, G. M., Guggino, W. B., Baraban, J. M., and Agre, P. (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 13052-13056
- Kaupp, U. B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N. J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T., and Numa, S. (1989) Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**, 762-766
- Kingston, P. A., Zufall, F., and Barnstable, C. J. (1996) Rat hippocampal neurons express genes for both rod retinal and olfactory cyclic nucleotide-gated channels: novel targets for cAMP/cGMP function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10440-

- Kinnamon, S. C., Dionne, V. E., and Beam, K. G. (1988) Apical localization of K⁺ channels in taste cells provides the basis for sour taste transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7023-7027
- Kinnamon, S. C., and Margolskee, R. F. (1996) Mechanisms of taste transduction. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 506-513
- Komatsu, H., Mori, I., Rhee, J.-S., Akaïke, N., and Ohshima, Y. (1996) Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* **17**, 707-718
- Körschen, H. G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Müller, F., Dosé, A., Godde, M., Molday, L., Kaupp, U. B., and Molday, R. S. (1995) A 240 kDa protein represents the complete β subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. *Neuron* **15**, 627-636
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125-8148
- Kurihara, K., and Koyama, N. (1972) High activity of adenylyl cyclase in olfactory and gustatory organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 30-34
- Kusakabe, Y., Abe, K., Tanemura, K., Emori, Y., and Arai, S. (1996) GUST27 and closely related G-protein-coupled receptors are localized in taste buds together with Gi-protein α -subunit. *Chem. Senses* **21**, 335-340
- Krieg, P. A. and Melton, D. A. (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7057-7070
- Lindemann, B. (1996) Taste reception. *Physiol. Rev.* **76**, 719-766
- Liman, E. R., and Buck, L. B. (1994) A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* **13**, 611-621
- Liu, D. T., Tibbs, G. R., and Siegelbaum, S. A. (1996) Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* **16**, 983-990
- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D., and Kaupp, U. B. (1990) Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* **270**, 24-29
- Ma, T., Frigeri, A., Skach, W., and Verkman, A. S. (1993a) Cloning of a novel rat kidney cDNA homologous to CHIP28 and WCH-CD water channels. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. **197**, 654-659

- Ma, T., Frigeri, A., Tsai, S.-T., Verbavatz, J.-M., and Verkman, A. S. (1993b) Localization and functional analysis of CHIP28k water channels in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 22756-22764
- Macey, R. I. (1984) Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol.* **246**, C195-C203
- MacKinnon, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235
- Matsunami, H., and Buck, L. B. (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **90**, 775-784
- Matsuoka, I., Mori, T., Aoki, J., Sato, T., and Kurihara, K. (1993) Identification of novel members of G-protein coupled receptor superfamily expressed in bovine taste tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 504-511
- McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J., and Margolskee, R. F. (1992) Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* **357**, 563-569
- McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J., Spickofsky, N., Danho, W., and Margolskee, R. F. (1994) Molecular cloning of G proteins and phosphodiesterases from rat taste cells. *Physiol. Behav.* **56**, 1157-1164
- Misaka, T., Abe, K., Iwabuchi, K., Kusakabe, Y., Ichinose, M., Miki, K., Emori, Y., and Arai, S. (1996) A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secretory cells of human stomach. *FEBS Lett.* **381**, 208-212
- Misaka, T., Kusakabe, Y., Emori, Y., Gonoi, T., Arai, S., and Abe, K. (1997) Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel (CNG_{gust}). *J. Biol. Chem.* **272**, 22623-22629
- Moon, C., Preston, G. M., Griffin, C. A., Jabs, E. W., and Agre, P. (1993) The human aquaporin-CHIP gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 15772-15778
- Mulders, S. M., Preston, G. M., Deen, P. M. T., Guggino, W. B., van Os, C. H., and Agre, P. (1995) Water channel properties of major intrinsic protein of lens. *J. Biol. Chem.* **270**, 9010-9016
- Nakamura, T. and Gold, G. H. (1987) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**, 442-444
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of

- denervated frog muscle fiber. *Nature* **260**, 799-802
- Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I., Knepper, M. A., and Agre, P. (1993a) CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell Biol.* **120**, 371-383
- Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I., and Agre, P. (1993b) Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7275-7279
- Nielsen, S., DiGiovanni, S. R., Christensen, E. I., Knepper, M. A., and Harris, H. W. (1993c) Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11663-11667
- Nielsen, S., Chou, C.-L., Marples, D., Christensen, E. I., Kishore, B. K., and Knepper, M. A. (1995) Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1013-1017
- Ninomiyama, Y., Kajjura, H., Naito, Y., Mochizuki, K., Katsukawa, H., and Torii, K. (1994) Glossopharyngeal denervation alters responses to nutrients and toxic substances. *Physiol. Behav.* **56**, 1179-1184
- van Os, C. H., Deen, P. M. T., and Dempster, J. A. (1994) Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 291-309
- Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y., and Laneet, D. (1985) Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* **316**, 255-258
- Patil, R. V., Yang, X., Saito, I., Coca-Prados, M., and Wax, M. B. (1994) Cloning of a novel cDNA homologous to CHIP28 water channel from ocular ciliary epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 861-866
- Pittler, S. J., Lee, A. K., Altherr, M. R., Howard, T. A., Seldin, M. F., Hurwitz, R. L., Wasmuth, J. J., and Baehr, W. (1992) Primary structure and chromosomal localization of human and mouse rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J. Biol. Chem.* **267**, 6257-6262.
- Premont, R. T., Koch, W. J., Inglese, J., and Lefkowitz, R. J. (1994) Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **269**, 6832-6841
- Preston, G. M., and Agre, P. (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral

- membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11110-11114
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B., and Agre, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**, 385-387
- Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B., and Agre, P. (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.* **268**, 17-20
- Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B., and Agre, P. (1994) Membrane topology of aquaporin CHIP. *J. Biol. Chem.* **269**, 1668-1673
- Raina, S., Preston, G. M., Guggino, W. B., and Agre, P. (1995) Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J. Biol. Chem.* **270**, 1908-1912
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., and Buck, L. B. (1994) A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 588-596
- Ruiz-Avila, L., McLaughlin, S. K., Wildman, D., McKinnon, P. J., Robichon, A., Spickofsky, N., and Margolskee, R. F. (1995) Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature* **376**, 80-85
- Sabolic, I., Valenti, G., Verbavatz, J.-M., van Hoek, A. N., Verkman, A. S., Ausiello, D. A., and Brown, D. (1992) Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **263**, C1225-C1233
- Sengupta, P., Chou, J. H., and Bargmann, C. I. (1996) *odr-10* encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell* **84**, 899-909
- Sklar, P. B., Anholt, R. R. H., and Snyder, S. H. (1986) The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 15538-15543
- Smith, B. L., and Agre, P. (1991) Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 6407-6415
- Spielman, A. I., Huque, T., Nagai, H., Whitney, G., and Brand, J. G. (1994) Generation of inositol phosphates in bitter taste transduction. *Physiol. Behav.* **56**, 1149-1155
- Striem, B. J., Naim, M., and Lindemann, B. (1991) Generation of cyclic AMP in taste

- buds of the rat circumvallate papilla in response to sucrose. *Cell. Physiol. Biochem.* **1**, 46-54
- Tal, M., Ammar, D. A., Karpuj, M., Krizhanovsky, V., Naim, M., and Thompson, D. A. (1995) A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 752-759
- Terris, J., Ecelbarger, C. A., Marples, D., Knepper, M. A., and Nielsen, S. (1995) Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am. J. Physiol.* **269**, F775-F785
- Thomas, M. B., Haines, S. L., and Akesson, R. A. (1996) Chemoreceptors expressed in taste, olfactory and male reproductive tissues. *Gene* **178**, 1-5
- Troemel, E. R., Chou, J. H., Dwyer, N. D., Colbert, H. A., and Bargmann, C. I. (1995) Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* **83**, 207-218
- Uchida, S., Sasaki, S., Fushimi, K., and Marumo, F. (1994) Isolation of human aquaporin-CD gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 23451-23455
- Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J. B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, B. L., Agre, P., and Engel, A. (1997) The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* **387**, 624-627
- Wellerdieck, C., Oles, M., Pott, L., Korsching, S., Gisselmann, G., and Hatt, H. (1997) Functional expression of odorant receptors of the zebrafish *Danio rerio* and of the nematode *C. elegans* in HEK293 cells. *Chem. Senses* **22**, 467-476
- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Müller, F., Altenhofen, W., Hatt, H., and Kaupp, U. B. (1994) Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**, 859-863
- Wong, G. T., Gannon, K. S., and Margolskee, R. F. (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* **381**, 796-800
- Yau, K.-W., and Baylor, D. A. (1989) Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 289-327
- Yu, W.-P., Grunwald, M. E., and Yau, K.-W. (1996) Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a human homolog of the cyclic nucleotide-gated ion channel of retinal cone photoreceptors. *FEBS Lett.* **393**, 211-215
- Zhang, R., Logee, K. A., and Verkman, A. S. (1990) Expression of mRNA coding for

kidney and red cell water channels in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **265**, 15375-15378

Zhang, R., Skach, W., Hasegawa, H., van Hoek, A. N., and Verkman, A. S. (1993) Cloning, functional analysis and cell localization of a kidney proximal tubule water transporter homologous to CHIP28. *J. Cell Biol.* **120**, 359-369

Zeidel, M. L., Ambudkar, S. V., Smith, B. L., and Agre, P. (1992) Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* **31**, 7436-7440

謝辞

学部4年生の頃から博士課程までの6年間、現在の研究室で実験を行って参りました。数多くの皆様方のご協力があったからこそ、このような形で博士論文の提出を行うことができました。紙面で言葉を述べるだけでは足りないとは思いますが、感謝の気持ちを表したいと思います。

この研究室に在籍した6年の間、研究だけでなくあらゆる面において御指導を賜り、日々励まし言葉をかけて下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科 阿部啓子教授に心より感謝申し上げます。

研究に対して、また投稿論文作製にあたり多数の御助言をいただきました東京大学大学院理学系研究科 榎森康文助教授には、研究の厳しさを教わった気がします。深く感謝いたします。

マウスのゲノムライブラリーを提供していただいた東京大学分子細胞生物学研究所の加藤茂明助教授、抗体作製にご協力いただきました東京大学医学部福田恵子先生、CNGチャンネルの電気生理学的解析の際に実験の場を提供して頂きました千葉大学医学部発達生理研究室の清野進教授、貴重な時間を割いてまで電気生理実験の技術を教えていただいた千葉大学真核微生物研究センターの五ノ井透博士、ラットの舌咽神経切断の手術をして下さった朝日大学歯学部二ノ宮裕三助教授、味覚の情報伝達に関しての有益な示唆をして下さった東京医科歯科大学歯学部の杉本久美子講師、ヒト胃の肉片を提供して頂きさらに胃の形態に関する指導をして下さった東京大学医学部第一内科の一瀬雅夫博士、これらの皆様方には実験を進めていく上での強力なサポートをしていただきました。深く御礼申し上げます。

かつての所属した研究室である、東京大学大学院農学生命科学研究科 清水誠教授、渡辺寛人博士をはじめとする食糧化学研究室の皆様には、場所、機械などの面で大変お世話になりました。深くお礼いたします。

現在の研究室であり、日々お互いに精進を積んで参りました松本一朗助手を

はじめとする生物機能開発化学研究室の皆様にも心よりお礼いたします。また AQP4の抗体染色にご協力いただいた岩渕京子博士に御礼申し上げます。

最後になりましたが、私が研究を始めたときに指導していただき、研究の世界へと導いて下さいました東京農業大学栄養学科 荒井綜一教授に心より感謝申し上げます。

平成10年1月9日
三坂 巧



