SURE 静岡大学学術リポジトリ Shizuoka University REpository

ニホンアマガエル(Hyla

japonica)の凍結耐性におけるグリセロールおよびア クアグリセロポリンの生理学的役割

メタデータ	言語: ja
	出版者:静岡大学
	公開日: 2015-06-24
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:廣田,敦司
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00008742

静岡大学 博士論文

ニホンアマガエル(Hyla japonica)の凍結耐性における グリセロールおよびアクアグリセロポリンの生理学的役割

2014年12月

大学院 自然科学系教育部

バイオサイエンス専攻

廣田 敦司

静岡大学 博士論文

ニホンアマガエル(Hyla japonica)の凍結耐性における グリセロールおよびアクアグリセロポリンの生理学的役割

2014年12月

大学院 自然科学系教育部

バイオサイエンス専攻

廣田 敦司

目次

- 和文要旨…… 2
- 英文要旨…… 6
- 第1章 序論 …… 7
- 第2章 ニホンアマガエルの凍結実験と生体中の候補耐凍物質の測 定 …… 22
- 第3章 ニホンアマガエル AQP9 (AQP-h9) をコードする cDNA の クローニングおよび AQP-h9 の分子機能解析 ……… 38
- 第4章 ニホンアマガエル凍結時の組織学的解析および AQP-h9 と

AQP-h3BL の発現解析 …… 59

- 第5章 本論文の要約と今後の展望 …… 76
- 谢辞 …… 88
- 参考文献 …… 89

和文要旨

寒冷地に生息する無尾両生類の中には、凍結に対する抵抗性を有する種 が知られているが、その生理的機構について十分には明らかにされていな い。本研究では、はじめに冬眠をしているニホンアマガエル(Hvla japonica) を−4°C で6時間凍結させた後、室温で1時間解凍した場合に80%以上の 個体が生き延びることを確かめ、ニホンアマガエルが凍結耐性を有する種 であることを明らかにした。続いて凍結時に利用される耐凍物質の種類お よび耐凍物質の輸送機構を明らかにするために、アマガエルを凍結または 凍結後解凍することによって、他種のカエルで耐凍物質として働くことが 知られているグルコース、グリセロールおよび尿素の血中および組織中の 濃度に変化が見られるかどうかを調べた。その結果、解凍群では冬眠群に 比べてグルコースおよびグリセロールの血中濃度が高まることがわかっ た。また、組織中のグルコース含量は凍結実験により変動するが、そのパ ターンは組織により異なること、組織中のグリセロール含量は肝臓以外の どの組織においても冬眠群に比較して解凍群で増加する傾向が見られる ことが明らかになった。一方、尿素については凍結実験によって血中濃度 および下腹部皮膚以外での組織中含量に差は見られなかった。これらのこ

とから、ニホンアマガエルではグルコースおよびグリセロール、またはそ のいずれかを耐凍物質として利用している可能性が考えられた。また、グ ルコースおよびグリセロールのいずれの血中レベルも、活動期のカエルと 冬眠群の間で同程度であったことから、グルコースやグリセロールの合成 および血中への放出は、温度低下や冬眠開始によるのではなく、凍結およ び/または凍結後の解凍に起因すると考えられた。

グリセロールの調節機構を明らかにするため、アマガエル肝臓より哺乳 類 AQP9 と相同であると予想された AQP-h9 をコードする cDNA をクロー ニングした。得られた cDNA は 885 塩基の翻訳領域、63 塩基の 5'-非翻訳 領域、および 780 塩基の 3'-非翻訳領域からなっていた。推定されるアミ ノ酸配列には 6 箇所の推定膜貫通領域および 2 箇所の NPA モチーフとい う AQP ファミリーで保存された構造が含まれていた。また、他の脊椎動 物の AQP9 と比較的高度に保存されていた。続いて、特異的プライマーを 用いた RT-PCR により、AQP-h9 mRNA が全身の組織で幅広く発現するこ とを明らかにした。さらにアフリカツメガエル卵母細胞に AQP-h9 cRNA を注入し、swelling assay により AQP-h9 の水およびグリセロール透過性を 調べた結果、AQP-h9 が水とグリセロールのいずれに対しても透過性をも つことが確かめられた。これらの結果から、得られた AQP-h9 は哺乳類 AQP9と相同であり、アクアグリセロポリンとして機能することが示唆された。

さらに凍結実験を行ったアマガエルの肝臓および骨格筋固定標本の HE 染色により、肝臓においては冬眠および凍結により類洞内で赤血球の凝集 が引き起こされること、また冬眠および凍結によりエオジンによる染色性 が低下することがわかった。骨格筋においても冬眠、凍結によってエオジ ンによる染色性が低下し、また筋細胞の萎縮が認められた。これら染色性 の低下は細胞内にグリコーゲンが蓄積されていたことによる可能性が考 えられた。肝臓切片を AOP-h9 抗体によって免疫染色した結果、冬眠群の 肝臓中の赤血球上に陽性シグナルが観察された。このシグナルは凍結群で はより強度を増し、解凍群ではほとんど消失した。骨格筋では冬眠群の筋 細胞の細胞質中にわずかなシグナルが検出された。このシグナルは凍結群 で著しく増大し、解凍群では低下した。また、肝臓と骨格筋のいずれにお いても、凍結実験による AOP-h9 mRNA の発現レベルの変動は見られなか った。一方、他のアクアグリセロポリンである AQP-h3BL については、凍 結実験の全ての群の肝臓および骨格筋において免疫陽性シグナルは検出 されなかった。
肝臓では AQP-h3BL mRNA が低レベルで発現していたが、 凍結による発現レベルの差は見られなかった。骨格筋では AQP-h3BL

mRNAの発現は検出されなかった。これらの結果から、AQP-h9はアマガ エルの赤血球に発現し、凍結および解凍に曝された際のグリセロールによ る赤血球の保護に寄与していることが示唆された。また骨格筋においては AQP-h9は細胞質内の細胞内小胞、小胞体、および/またはゴルジ装置に 局在し、凍結の際のグリセロール細胞内輸送に関わっている可能性が考え られた。

ABSTRACT

As the initial step to study freeze-tolerance mechanism in the Japanese tree frog, *Hyla japonica*, the serum and tissue levels of possible cryoprotectants in the hibernating, frozen and thawed frogs were measured. The serum concentrations of glycerol and glucose in the frogs thawed after freezing were significantly higher than those in the hibernating frogs. The glycerol content in the liver did not change in the freezing experiment, whereas that in the skeletal muscle was elevated in the thawed frogs as compared with the hibernating or frozen frogs. Subsequently, a cDNA encoding aquaporin (AQP)-h9 was cloned from the Hyla japonica liver, as a tool to study the involvement of glycerol and aquaglyceroporins in the freeze tolerance mechanisms in the tree frog. The predicted amino acid sequence of AQP-h9 contained six putative transmembrane domains and the two conserved Asn-Pro-Ala motifs, which are characteristic of AQPs. Swelling assay using Xenopus oocytes showed that AQP-h9 facilitates water and glycerol permeation, verifying the property of an aquaglyceroporin. Histological examination of the liver revealed that erythrocytes aggregate in the sinusoids during hibernation and freezing, and that immunoreactive AQP-h9 protein is detected over the erythrocytes. AQP-h9 labeling became more intense in the frozen frogs than in the hibernating frogs, but almost disappeared in the thawed frogs. For the skeletal muscle, weak labels for AQP-h9 were observed in the cytoplasm of the myocytes of the hibernating frogs. Its labeling was markedly enhanced by freezing, and declined by thawing. These results suggest that glycerol acts as a cryoprotectant in *H. japonica*, and that during hibernation, particularly in a state of freezing, AQP-h9 is involved in the glycerol uptake by the erythrocytes in the liver and in the intracellular glycerol transport in the skeletal muscle cells.

第1章 序論

凍結に対する生体防御

一般に、体液の凍結は細胞外液の浸透圧の上昇とそれに伴う細胞の脱 水、細胞の縮小、細胞膜の物理的損傷、虚血、酸素欠乏などの様々な現 象を引き起こし、生物の生存を脅かす(Storey and Storey 1984)。その一方 で、低温環境で生息可能な動植物の中には、自身で熱を産生する能力を 持たないにもかかわらず、凍結によるダメージから生体を守る機能を発 達させることで低温環境に適応進化している種がいることが明らかに なっている。また、それらの適応メカニズムに関して、以下のような例 が知られている(Storey 2004)。

(1)乾燥耐性 (anhydrobiosis):生体内から大部分の水分を排出することで、身体内で水分の凍結がおこることを防ぐ。多くの種では同時にトレハロースを合成して乾燥時の細胞保護を可能にしている。この機構を備えた種では幅広い温度環境での生存が可能であり、ネムリユスリカ (Polypedilum vanderplanki)の幼虫では乾燥時に速やかにトレハロース 蓄積が開始され、-270°C から 106°C までの温度範囲で生存が可能であ ることがわかっている(Watanabe et al. 2002)。また、クマムシの一種 (Adorybiotus coronifer)では、乾燥環境に置かれると 5–7 時間以内にト レハロース濃度が上昇し、乾燥のみならず高温および低温環境にも耐え うる状態となる(Westh and Ramløv 1991)。

(2) 不凍 (freeze avoidance): 生体内に高濃度の溶質を蓄積し、体液の 凝固点を降下させることで水分の過冷却状態を維持する機構であり、主 として低水温環境に生息する魚類および陸生昆虫類で古くから研究さ れている。1971年に南極海に生息する Trematomus 属の魚から、不凍糖 タンパク質が初めて発見された(DeVries 1971)。その後、多種の魚類に おいてさらに4タイプの不凍タンパク質が発見され、低温環境下でこれ らのタンパク質および糖タンパク質を合成・蓄積することで体液の凝固 点を下げていることが明らかになっている(Cheng 1998)。また、1957年 にカイコ (Bombyx mori) の休眠卵の越冬時には蓄積されたグリコーゲ ンからグリセロールおよびソルビトールが合成され、春になるとそれら の物質がグリコーゲンに再合成されて発生を開始することが報告され た(Chino 1957)。この研究は動物の生体内にこれらの糖アルコールが存 在することを初めて明らかにしたものであり、この分野での先駆的研究 となった。その後、様々な昆虫類で休眠、越冬中の生体内物質量の変動

8

が調べられ、北米に生息するヒメハマキの一種(Epiblema scudderiana) の幼虫は、秋季になると体内に蓄積したグリコーゲンをグリセロールに 変換し、それにより体液の凝固点を降下させることで−40℃付近でも生 命を維持し続けることができることが知られている(Muise and Storey 2001)。さらに、脊椎動物の中ではトカゲ類や孵化したてのカメ類など の小型爬虫類でも不凍機構がかなり発達していることがわかっている。 北米に生息するニシキガメ (Chrysemys picta) は、孵化後初めての冬季 には個体差はあるものの-20℃までの冷却にも耐えうる不凍能を備え ている(Costanzo and Lee 2013)。また、ヨーロッパからアジアに生息する コモチカナヘビ(Lacerta vivipara) は-3.5℃ で3週間生存可能である (Costanzo et al. 1995)。不凍は後述の耐凍(freeze tolerance)と比較して より低温で長期間の生存を可能にするが、体液の過冷却状態が熱力学的 に不安定な状態であることから、氷核生成が起こることにより急激な体 液の凍結が起こる危険性をはらんでいる。

(3) 耐凍(freeze tolerance): グルコース等の糖類、グリセロール、乳酸等を耐凍物質(cryoprotectant)として合成・蓄積することで、水分の凝固点降下を引き起こし、細胞内での水分の凍結とそれに付随する細胞構造の破壊を防ぐ。さらに、氷核形成タンパク質(ice nucleating protein;

INP) や不凍タンパク質(antifreeze protein; AFP)の合成により、氷結晶 の生成速度や大きさを制御する。さらに先に述べた不凍で見られる氷核 生成による急速な凍結という危険性を、耐凍では水分を細胞外で凍結さ せることにより回避している。これらの機構により生体内での水分の凍 結を制御することで、耐凍能を備えた種では体内の水分が65%程度まで 凍結した場合でも生存が可能である(Storey 2004)(図1-1)。耐凍機能は 脊椎動物のみならず無脊椎動物や高等植物においても知られており、広 範囲の生物種で保存された適応戦略であると考えられている(Knight and Knight 2012)。無脊椎動物においては、例えばタマバエの一種

(Eurosta solidaginis)の幼虫は、低温に曝されるとグリコーゲンからグ リセロールとソルビトールを合成することで耐凍能を獲得している (Storey and Storey 1986a)。グリセロールやソルビトールの体内濃度を高 めることで、凝固点以下の低温に曝されても細胞内の水分を液体状態に 維持することが可能となるとともに、細胞外の水分は緩やかに凍結する ことで、氷の結晶化が進行する過程で生じる細胞ダメージに順応する時 間的猶予を得ているとされている。脊椎動物の耐凍性については両生類 を例にとり次項目で詳述する。

無尾両生類における耐凍機構

本研究で研究対象とする無尾両生類の中にも、耐凍機構を備えている 種が知られている。例えば、Cope's gray tree frog (*Hyla chrysoscelis*)では、 生体の凍結時に細胞質内の水分を体腔やリンパ嚢へ排出することで細 胞質内での氷の結晶の生成を防ぎ、さらに凍結後にはそれらの水分を再 び細胞質内へ再分配することで、細胞のダメージを防いでいる(Costanzo et al. 1992)。さらに、耐凍能を有する無尾両生類はグルコース、グリセ ロールおよび尿素といった低分子溶質を耐凍物質として利用している ことが知られており、耐凍物質の合成と蓄積は凍結に対する抵抗性に関 わる重要な生理学的適応の一つであると考えられている(Costanzo and Lee 2013)。

耐凍性を有する無尾両生類の種の多くにおいて、広く耐凍物質として 利用される物質はグルコースである。北米に生息する wood frog (*Rana sylvatica*) では生体が凍結し始めると肝臓において速やかにグリコーゲ ンからグルコースが生成され、凍結開始から約5分後には血中グルコー ス濃度が上昇する(Storey and Storey 1985)。さらに肝臓で合成されたグル コースは2型グルコース輸送体 (GLUT2) を介して血液中に放出され る(Rosendale et al. 2014b)が、*R. sylvatica* の GLUT2 タンパク質の発現量 は凍結によって増大する(Rosendale et al. 2014a)。放出されたグルコース は心臓、脳、筋肉などの組織に蓄積され、心臓および脳では筋肉と比較 して高濃度のグルコースが蓄積される(Costanzo et al. 2013)。また *R. sylvatica*の解凍後には、グルコースは速やかに肝臓に戻り再びグリコー ゲンが合成されること(Costanzo and Lee 2013)、ならびに膀胱から余剰の グルコースが再吸収されること(Costanzo et al. 1997)も明らかになって いる。

また、その他のカエルにおいても、グルコースが耐凍物質として機能 することがわかっている。例えば、Hyla versicolor、H. chrysoscelis、Rana arvalis、Pseudacris triseriata および Pseudacris crucifer において、凝固点 以下の低温に曝されると血中グルコース濃度の上昇および組織でのグ ルコースの蓄積が起き、凍結からの細胞保護に役立っている(Schmid 1982; Layne and Lee 1989; Costanzo et al. 1992; Edwards et al. 2000; Voituron et al. 2009)。さらに血中および組織中グルコース濃度の上昇が 肝臓のグリコーゲンに由来するかどうかを調べるため P. crucifer、H. versicolor および P. triseriata において肝臓中のグリコーゲンホスホリラ ーゼ活性の測定が行われ、P. crucifer および H. versicolor では凍結後に その活性が上昇することが明らかになっている(Storey and Storey 1985; Churchill and Storey 1996; Edwards et al. 2000)。これまでに述べたように、 *Rana* 属、*Pseudacris* 属および *Hyla* 属では耐凍性を有する種の存在が明 らかになっている。一方、*Bufo* 属では耐凍性を持つ種は今日までに知 られていない(Voituron et al. 2009)。

Hyla 属の一部の種ではグルコースに加え、グリセロールも耐凍物質 として主要な役割を担っている。例えば、H. versicolor を低温に馴化さ せると、肝臓中に蓄積されるグリセロールの量が増大する(Layne and Jones 2001)。また、H. chrysoscelis では低温 (2°C) 環境では血中グリセ ロール濃度の上昇に加え、肝臓および筋肉へのグリセロール蓄積が見ら れる(Costanzo et al. 1992)。さらに他属の Litoria ewingii においても凍結 によって血中グリセロール濃度が上昇し、耐凍物質として機能している ことがわかっている(Rexer-Huber et al. 2011)。この種では凍結による血 中グルコース濃度の上昇は見られず、解凍後にグルコース濃度が高まる。 このことは耐凍物質の利用には種によって様々なパターンが存在する ことを示唆している(Rexer-Huber et al. 2011)。

さらに、耐凍物質として尿素を利用する種(R. sylvatica)も知られて いる(Costanzo and Lee 2005)が、尿素を利用する種は限定的であると言わ れている(Higgins and Swanson 2013)。また、グルコースおよびグリセロ ールが凍結に曝された際に速やかに合成されるのに対し、R. sylvaticaの 組織への尿素の蓄積は冬眠開始前から起こるという点においても、尿素 と上記2種の耐凍物質とはかなり異なった形で機能していると考えら れる(Costanzo and Lee 2013)。

アクアグリセロポリンによるグリセロールの輸送

グリセロールの経細胞輸送は水チャネルタンパク質であるアクアポ リン (AQP) ファミリーに属するアクアグリセロポリンが担っていると 考えられる。AQP は微生物や動植物の広範囲の細胞に存在する細胞膜 内在型タンパク質であり、選択的な水透過性を示す小孔構造を形成する (Ishibashi et al. 2011)。哺乳類における AQP の推定分子質量はおよそ 30 kDa 前後であり、細胞膜上では4量体を形成して存在するとされている。 AQP ファミリータンパク質では、その一次構造中に Asn-Pro-Ala(NPA) モチーフが高度に保存されている。NPA モチーフは小孔を形成する部 位に存在し、選択的な水透過能に重要な役割を担っている(Verkman and Mitra 2000)。現在までに哺乳類では AQP0-12 の 13 種類の AQP が同定 されている (表 1-1)。そのうちのいくつかはプロテインキナーゼ A ま たはプロテインキナーゼ C によるリン酸化部位を有しており、リン酸 化により AQP 分子の機能が制御されていることが知られている。哺乳類 AQP は、クラシカル AQP、アクアグリセロポリンの 2 種類のサブファミリーに分類される (Ishibashi et al. 2011) (表 1-1)。クラシカル AQP (AQP0、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5、AQP6、AQP8、AQP11、AQP12) は主に水を透過するのに対し、アクアグリセロポリン (AQP3、AQP7、AQP9、AQP10) は水だけでなくグリセロールや尿素などの低分子溶質も透過する(Rojek et al. 2008)。

哺乳類において、アクアグリセロポリン AQP3 は主として腎臓およ び皮膚、AQP7 は精巣や脂肪のほか全身の多くの組織、AQP9 は肝臓お よび精巣、AQP10 は十二指腸および空腸に発現していることがわかっ ている(Takata et al. 2004; Ishibashi et al. 2009)。AQP3 は腎臓において集 合管の基底側壁部細胞膜に局在し、主に水の再吸収に関与している一方 で、皮膚においてはグリセロール透過にも寄与している(Ishibashi et al. 1994)。皮膚は外界と接しているため水分の損失が大きいが、AQP3 が上 皮細胞に発現し皮膚に水分およびグリセロールを供給することでそれ を防いでいると考えられている。実際、AQP3 ノックアウトマウスの皮 膚においてはグリセロールおよび水分含量が低下する(Hara-Chikuma and Verkman 2005)。AQP7 および AQP9 はいずれも精巣での発現が見ら

れ、AQP7 は伸長精子細胞、残余小体および成熟精子(Suzuki-Toyota et al. 1999; Calamita et al. 2001)、また AQP9 は精母細胞やライディヒ細胞で発 現が確認されている(Tsukaguchi et al. 1998; Shima et al. 2004)が、その詳 しい役割は明らかにされていない。脂肪組織における AQP7 および肝臓 における AQP9の機能については、飢餓状態において脂肪組織での脂質 代謝および肝臓での糖新生にそれぞれ関与していることが知られてい る。飢餓により血中インスリン濃度が低下し、脂肪組織においてトリグ リセリドが遊離脂肪酸とグリセロールに分解されるとともに、AQP7 mRNAの発現および AQP7 タンパク質の脂肪細胞形質膜への局在が促 進される(Kishida et al. 2000)。一方で、血中に放出されたグリセロール は肝細胞の洞様血管側の細胞膜に発現する AQP9 により肝細胞に取り 込まれ、糖新生の材料として利用される(Elkjær et al. 2000; Portincasa et al. 2008).

無尾両生類においては、哺乳類の AQP に相同な AQP を含む 16 種類 以上の AQP の存在が示されている(Suzuki and Tanaka 2010; Finn et al. 2014)。その中には、無尾両生類特異的な AQP である AQPa1 および AQPa2 が含まれる(Suzuki and Tanaka 2010)。両生類の耐凍機構における AQP の関与については、*H. chrysoscelis* での報告がわずかにあるのみで ある。同種では AQP1、AQP2 および AQP3 のホモログとしてそれぞれ HC1、HC2 および HC3 をコードする cDNA がクローニングされている (Zimmerman et al. 2007)。23°C または 2°C で飼育した *H. chrysoscelis* を 用いて、これらの AQP の mRNA 発現を比較すると、肝臓での HC1 mRNA、 および肝臓、筋肉、膀胱での HC3 mRNA の発現が低温で飼育した群で 増大する。このことから、環境温度の変化により複数の AQP が生体内 の水および耐凍物質の輸送に関与している可能性が考えられている (Zimmerman et al. 2007)。

本研究の目的

先に述べたように、種々の物質が動物の耐凍物質として利用されてお り、凍結に対する抵抗性に重要な役割を果たしている。しかしながら、 無尾両生類に限っても耐凍物質として用いられる物質の種類は種によ って様々であり、またそれらの耐凍物質の輸送機構に関する知見はかな り乏しい。グリセロールが Hyla 属の数種のカエルにおいて凍結に対す る抵抗性に関与していることが明らかになっているが、グリセロールの 輸送に関与する可能性が高いアクアグリセロポリンに着目した研究成 果は非常に乏しく、無尾両生類の耐凍機構におけるアクアグリセロポリ ンの関与についてはほとんど未解明である。

ニホンアマガエル(Hyla japonica)は、北海道を含む日本列島のほぼ 全域に分布するほか、ユーラシア大陸の温帯や亜寒帯に属する地域でも 生息が認められる(図1-2)。多くの耐凍性を持たない両生類は冬眠中に 水中や、地中温度が氷点下まで達しない深さまで潜ることで体の凍結を 避ける(Pinder et al. 1992)。一方で、H. japonica は主に枯草の下や地中浅 くに潜って冬眠するという生態から、冬眠中に氷点下に曝される危険性 が高い。しかしながら、H. japonica が凍結耐性を有するか否かはこれま でに明らかになっておらず、耐凍性に関わる物質やその輸送体に関する 研究は全くなされていなかった。そこで本研究はニホンアマガエルを材 料として用い、ニホンアマガエルの凍結耐性に関わる物質とその輸送機 構を明らかにすることを目的として、(1) ニホンアマガエルの凍結実験 と生体中の候補耐凍物質濃度の測定、(2) ニホンアマガエルのアクアグ リセロポリンである AQP9 (AQP-h9) をコードする cDNA のクローニ ングおよび分子機能解析、(3) 凍結および凍結後に解凍したニホンアマ ガエルの組織学的解析、アクアグリセロポリンである AQP-h9と AQP-h3BL (AQP3)の組織内局在解析、および AQP-h9 と AQP-h3BL のmRNA 発現の解析を行った。



図1-1. 耐凍機構による細胞保護の仕組みの模式図

細胞外体液の凍結が始まると、細胞外スペースの浸透圧が上昇し細胞の脱水が起こる。耐凍性を持たない場合、凍結により細胞構造の破壊、細胞の過剰な縮小が生じ生命を維持できない。一方、耐凍性を有する場合、耐凍物質により細胞内の凍結を防止し、細胞の縮小を最小限に抑えることができる。さらにINP (ice nucleating protein) およびAFP (antifreeze Pprotein) により細胞外の 氷結晶の大きさとその成長速度が抑制される(Storey, 2004を改変)。



図1-2. ニホンアマガエルの分布域

緑色で示された温帯気候の地域および青色で示された亜 寒帯気候の地域で生息が確認されている(Amphibiaweb; http://amphibiaweb.org/, 2014)。

分類	哺乳類	哺乳類での 主な発現部位	無尾両生類
	AQP0	水晶体	AQP0
	AQP1	腎臓, 血管	AQP1
	AQP2	腎臓	AQP2
	AQP4	腎臓, 脳	AQP4
クラシカルAQP	AQP5	唾液腺,肺	AQP5
(水などを透過)	AQP6	腎臓	
	AQP8	肝臓, 腸	AQP8
	AQP11	脳,心臟	AQP11
	AQP12	膵臓, 腸管	
			AQPa2(*)
	AQP3	腎臓, 皮膚	AQP3
アクアグリセロポリン	AQP7	精巣	AQP7
(尿素、グリセロールなどの	AQP9	肝臓,精巣	AQP9
低分子溶質も透過)	AQP10	十二指腸,空腸	AQP10
-			AQPa1(*)

表1-1. アクアポリンファミリーに分類されるタンパク質と哺乳類における主な発現部位

(*) 無尾両生類特異的アクアポリン

第2章 ニホンアマガエルの凍結実験と生体中に含 まれる候補耐凍物質の測定

目的

第1章で述べたようにニホンアマガエル(Hyla japonica)は、比較的 寒冷な地域での生存が確認されている(図1-2)。このことから、ニホン アマガエルは凍結耐性を有する可能性が考えられていたが、この種が凍 結に対する抵抗性を示すか否かはこれまで明らかになっていなかった。 そこで本章では、ニホンアマガエルが凍結耐性を有するかどうかを調べ るため、まず冬眠中のカエルを用いて凍結実験を行い、凍結および解凍 後の生存率を評価した。次いでニホンアマガエルの耐凍物質として機能 している物質を明らかにするため、凍結実験を行ったカエルの血中およ び組織中に含まれる耐凍物質の候補物質(グルコース、グリセロール、 および尿素)の測定を行った。

材料と方法

動物

野生のニホンアマガエル(H. japonica)を大内水生動物供給社(埼玉)

より購入した。凍結実験には、11月に捕獲された冬眠に入る前の個体 を用いた。使用したアマガエルの体長は約3.0 cm、体重は約2.8 g であ った。湿らせた水苔を入れたプラスチック水槽にカエルを入れて静岡大 学内の野外に置き、自然な条件の気温および日照のもとで飼育した。餌 としてミルワームを与えた(自由摂餌)。12月から2月にかけてアマガ エルが冬眠状態となっていることが確認されたため、その期間に凍結実 験を行った。活動期のニホンアマガエルは4月に捕獲したものを大内水 生動物供給社(埼玉)より購入し、通常条件の実験室内で1週間飼育し た後、サンプリングした。その間、餌としてミルワームを自由摂餌によ り与えた。本論文で述べる全ての動物実験は、静岡大学動物実験規則に 従って行った。

凍結実験

2-10℃で冬眠状態となっているニホンアマガエルを、湿らせた水苔 を入れた 50 ml ポリプロピレンチューブに移し、冷却槽(CP-300R、 TAITEC、埼玉)中に沈めて-4℃で6時間置き凍結させた。一部の個体 を凍結群としてサンプリングした。残りの個体は、凍結後に室温(約 23℃)で1時間置き、心臓の拍動再開が確認された個体を解凍群として サンプリングした。4月に捕獲した活動期のアマガエルおよび冬眠中の アマガエルを比較対照のためのコントロールとして用いた。各群の個体 の心臓からヘマトクリット採血管(テルモ、東京)を用いて採血した後、 肝臓、後肢筋肉、腎臓および下腹部皮膚を採取した。そして、これらの 試料を速やかに液体窒素中で凍結した後、グルコース、グリセロールお よび尿素の組織含有量の測定を行うまで-80°C で保存した。

血中および組織中のグルコース、グリセロールおよび尿素濃度の 測定

各処理群のアマガエルから採取した血液は4°C で 450×g、10分間 遠心した後、上清を回収して血清サンプルとした。肝臓、腎臓、下腹部 皮膚および筋肉は氷冷した 0.7×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 0.01 M リ ン酸ナトリウム緩衝液、0.14 M NaCl、 pH 7.5) 400 µl 中でホモジェナ イズし、4°C で 20,000×g、10 分間遠心した後の上清を回収し、組織 抽出物サンプルとした。血清および組織抽出物は、測定を行うまで-20°C で保存した。血清および組織中のグリセロール、グルコースおよび尿素 濃度はそれぞれ Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、Glucose CII-Test Wako (和光純薬、大阪)、および QuantiChrom Urea

Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) を用いて、製品説明書 に従って測定した。グリセロール濃度は、スタンダードまたはサンプル 10 µl に対して反応試薬を 80 µl 加えて混和し、37℃ で5 分間インキ ュベートした後、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) により波長 562 nm での吸光度を測定した。グルコ ース濃度はスタンダードまたはサンプル1µl に反応試薬を150µl 加え て、37°C で5 分間インキュベートした後、波長 490 nm での吸光度を 測定した。尿素濃度は、スタンダードまたはサンプル 2.5 ul に対し、反 応液 100 µl を加えて混和し、室温で 20 分間インキュベートした後、波 長 450 nm での吸光度を測定した。いずれも検量線に基づきサンプル中 のグリセロール、グルコースまたは尿素の濃度を算出した。また、組織 抽出物のタンパク質濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)により製品説明書に従って測定した。ス タンダードまたはサンプル10 ul に対し、反応液 80 ul を加えて混和し、 37℃で 30 分間インキュベートした後、波長 562 nm での吸光度を測定 し、検量線よりタンパク質濃度を算出した。組織抽出物中のグリセロー ル、グルコースおよび尿素含量を、タンパク質1mg あたりの値として 表した。

統計処理

数値は平均値 ± 標準誤差で表し、F 検定後の Student の t 検定、また は Turkey 検定により P < 0.05 の場合を統計的に有意とみなした。

結果

凍結実験後のアマガエルの生存率

凍結後に解凍したニホンアマガエルのうち、心拍が回復し1週間後に 正常な運動が見られる個体数を数えた。第1回目の凍結実験では10匹 中7匹の生存が観察された。第2回目に行った実験では、凍結後解凍し た6匹全てが生存した。これらの結果から、凍結実験による生存率は 81.3%と算出された。

凍結実験を行ったアマガエルの血中に含まれるグルコース、グリ セロールおよび尿素の濃度変化

ニホンアマガエルを凍結、解凍することにより起こる生理的変化を明 らかにするため、血液中のグルコース、グリセロールおよび尿素濃度を 測定した(図 2-1, 2-2)。血中グルコース濃度は活動期および冬眠中の間 では変化が見られなかったが、解凍群では冬眠群と比較して約5倍に増 大していた(図2-1A)。血中グリセロール濃度は、グルコースと同様に 活動期と冬眠中の間には有意な差が認められなかったのに対し、解凍群 では冬眠群の約10倍の濃度上昇が見られた(図2-1B)。血中尿素濃度 については、冬眠群と解凍群の間で比較したところ、2群間で差はみら れなかった(図2-2)。なお、凍結群のカエルでは血液は凍結せず液状を 保っていたが、心臓の拍動が停止していて十分な量の血液を得ることが できなかったため測定を行わなかった。

凍結実験を行ったアマガエルの組織中に含まれるグルコース、グ リセロールおよび尿素の濃度変化

凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓、骨格筋、腎臓および下腹 部皮膚の抽出液中のグルコース、グリセロールおよび尿素の濃度を測定 し、抽出液に含まれるタンパク質重量で標準化した(図 2-3, 2-4, 2-5)。

グルコース濃度については、肝臓では冬眠群および解凍群と比較して 凍結群で有意に濃度が上昇していた。また、骨格筋および下腹部皮膚で は、冬眠群と凍結群の間で差は見られず、解凍群での濃度が高まってい ることがわかった。それぞれ冬眠群と比較すると、骨格筋の解凍群では 約3.5倍、下腹部皮膚の解凍群では約2倍の濃度上昇が見られた。また、 腎臓においては冬眠群、凍結群および解凍群でグルコース濃度の差は見 られなかった(図2-3)。

組織中グリセロール濃度は、肝臓においては全ての群の間で濃度変化 が見られなかった。骨格筋に含まれるグリセロール量は冬眠群と凍結群 では統計的に有意な差は認められなかったが、凍結群の平均値は冬眠群 と比較すると約3倍高かった。また、解凍群では冬眠群および凍結群に 比べ有意に濃度が上昇していることが明らかになった。解凍群の骨格筋 のグリセロール含量は、冬眠群と比較すると約10倍であった。腎臓で は冬眠群と比較して凍結群では約7倍、解凍群では約20倍のグリセロ ール濃度の有意な上昇が見られた。また、下腹部皮膚のグリセロール含 量に有意な差は認められなかったが、凍結さらにその後の解凍によって グリセロール量が増大する傾向が観察された(図2-4)。

肝臓、骨格筋および腎臓の尿素の含量に関しては、凍結実験のそれぞれの処理によって差は見られなかった。下腹部皮膚においては冬眠群では尿素含量が検出限界以下であったのに対し、凍結により濃度が上昇し、 解凍群では低下した(図 2-5)。

28

考察

自然条件で冬眠しているニホンアマガエルを、-4°C で 6 時間凍結さ せ、その後室温(約 23°C)に1 時間置いて解凍するという本凍結実験 の条件では、80%以上の個体が生き延びることが明らかになった。これ により、寒冷な地域にも分布するニホンアマガエルが、凍結に対する抵 抗性を備えていることが証明された。

続いて、ニホンアマガエルの凍結時に耐凍物質としてはたらく物質を 明らかにするため、他のカエルで耐凍物質として機能することがわかっ ているグルコース、グリセロールおよび尿素について、血中濃度および 組織中含量を測定した。その結果、解凍群の血中グルコースおよびグリ セロール濃度が冬眠群と比較して、それぞれ約5倍および10倍に上昇 していることがわかった。

これらのことから、ニホンアマガエルはグルコースおよびグリセロー ル、またはそのどちらかを耐凍物質として用いている可能性が考えられ る。グルコースは無尾両生類の多くの種で耐凍物質として働くのに対し、 グリセロールを耐凍物質として利用している無尾両生類はこれまでに 報告されている範囲では *H. versicolor、H. chrysoscelis* および *L. ewingii* の3種に限られていた(Costanzo et al. 1992; Rexer-Huber et al. 2011)。本研 究から、*H. japonica* もこれらの種と同様にグルコースに加えてグリセロ ールを用いた耐凍機構を備えている可能性が示された。また、活動期(春) のアマガエルから採取した血液中のグルコースおよびグリセロール濃 度はいずれも冬眠群のそれとほぼ同程度であった。このことから、凍結 による血中グルコースおよびグリセロール濃度の上昇は、秋から冬にか けての温度低下や冬眠の開始によってではなく、凍結もしくは凍結・解 凍の両方により引き起こされると考えられる。

グルコースの組織中の含量については、組織によりその変動パターン に違いが見られた。肝臓では凍結群でもっとも高い値となり解凍後は冬 眠群と同レベルまで低下していたのに対し、筋肉および下腹部皮膚にお いては解凍群でもっとも高濃度のグルコースが検出された。また、腎臓 のグルコース含量には変化が見られなかった。肝臓におけるグルコース 含量の変動パターンは、*H. versicolor* および *R. sylvatica* における結果と 一致した(Storey and Storey 1984; Costanzo et al. 2013)。一方、*R. sylvatica* では筋肉中のグルコース含量は凍結群で最も高く、解凍後には減少する (Costanzo et al. 2013)が、*H. japonica* においては異なる傾向が見られた。 これらは種による差および実験条件の違いに起因すると考えられる。ま た、本研究で測定したグルコースは遊離型グルコースであるので、細胞 に取り込まれリン酸化を受けたグルコース-6-リン酸についても測定し、 組織中に蓄えられたグルコースの全量を明らかした上で結論づける必 要があると考えられる。

一方、グリセロールの組織中含量はどの組織においても全体的に解凍 群で最も高い値を示す傾向が見られたが、肝臓および下腹部皮膚におい ては有意な差は認められなかった。両生類の肝臓において、グリコーゲ ンの分解に加え、グリセロールを主要基質とした糖新生によりグルコー スが生成されることが知られている(Hillman et al. 2008; Rodríguez et al. 2011)。肝臓に取り込まれたグリセロールが速やかに糖新生に利用され ているために、凍結群および解凍群のアマガエル肝臓中のグリセロール 含量が冬眠群と比較して変化が見られないのかもしれない。

また、グリセロールはトリアシルグリセロールとして脂肪体に貯蔵さ れていることが考えられたが、冬眠中のアマガエルの体内では脂肪体は 著しく萎縮し、組織を見分けることができないほどであった。このこと から、凍結やその後の解凍で高まるグリセロールは、脂肪体に由来する 可能性は低いと考えられるが、詳細は不明である。*H. japonica*の凍結お よび解凍時のグリセロール合成経路については、今後明らかにしていか なければならない。グリセロールは肝臓中に蓄えられたグリコーゲンか らも生成される(Goldstein et al. 2010)ことが知られており、このような経路も想定できる。

本実験で行った凍結実験の条件では、血中の尿素濃度に変化は見られ なかった。また組織中の尿素含量について大きな差が見られたのは下腹 部皮膚のみであり、他の組織の尿素濃度は変化しなかった。このことか ら、ニホンアマガエルにおいては尿素を耐凍物質として利用している可 能性は低いと考えられる。これは、尿素を耐凍物質として用いる無尾両 生類は限定されているという報告(Higgins and Swanson 2013)と一致す る。一方で、尿素を耐凍物質として利用する R. sylvatica において尿素 の蓄積は秋季から初冬にかけての長期間に渡って進行する(Costanzo and Lee 2005)ことから、H. japonica においても年単位での解析を行う必 要が考えられる。



図2-1. 凍結実験がニホンアマガエルの血中グルコース(A)および グリセロール(B)濃度に及ぼす影響

数値は平均値 ± SEMで表した(A, n = 5; B, n = 7)。異なる文字を付した群間には統計的に有意な差が認められた(Tukey's test, P < 0.05)。


図2-2. 凍結実験がニホンアマガエルの血中尿素濃度に及ぼす影響

数値は平均値 ± SEMで表した (n = 7)。2群間に統計的に有意な差は認められなかった (Student's *t*-test, P > 0.05)。



図2-3. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓、骨格筋、腎臓お よび下腹部皮膚中のグルコース含量

数値は平均値 ± SEMで表した (n = 7)。各組織で異なる文字を付した群間には統計的に有意な差がみられた (Tukey's test, P < 0.05)。



図2-4. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓、骨格筋、腎臓お よび下腹部皮膚中のグリセロール濃度の変化

数値は平均値 ± SEMで表した (n = 7)。各組織で異なる文字を付した群間には統計的に有意な差がみられた (Tukey's test, P < 0.05)。



図2-5. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓、骨格筋、腎臓お よび下腹部皮膚中の尿素含量

数値は平均値 ± SEMで表した(n = 7)。各組織で異なる文字を付した群間には統計的に有意な差がみられる (Tukey's test, P < 0.05)。N.D. は検出限界以下であったことを表す。

第3章 ニホンアマガエル AQP9(AQP-h9)をコ ードする cDNA のクローニングおよび AQP-h9 の分子機能解析

目的

ニホンアマガエルの凍結耐性の発現には、グルコースおよびグリセロ ール、またはそのどちらかが耐凍物質として関与している可能性が示唆 された。このことから、ニホンアマガエルの冬眠や凍結時にグリセロー ルの輸送を調節している分子の動態を調べる必要があると考えた。細胞 膜を介するグリセロールの輸送には、水に加えグリセロールや尿素など の小分子も通過させるアクアグリセロポリンが寄与していることが予 想された。

哺乳類で知られるアクアグリセロポリンは、AQP3、AQP7、AQP9 お よび AQP10 の4タイプであり、ネッタイツメガエルのゲノム中にはそ れらすべてのアクアグリセロポリンの遺伝子の存在が確認されている (Suzuki and Tanaka 2010)(Ensembl, http://ensemble.org/, 2014)。また、 両生類に特異的なアクアグリセロポリンとして、アフリカツメガエルの 卵母細胞に発現する AQPxlo が報告されており(Virkki et al. 2002)、ネッ タイツメガエルのゲノムにも相同の遺伝子 AQPxto が存在する(Suzuki and Tanaka 2010; Ensembl, http://ensemble.org/, 2014)。ニホンアマガエル においては哺乳類 AQP3 に相同な AQP-h3BL が同定されていた(Akabane et al. 2007)が、AQP7、AQP9、AQP10 および AQPxlo に相同なアクアグ リセロポリンが存在するかどうかは明らかにされていない。

ー方、ニホンアマガエルと同属の H. versicolor および H. chrysoscelis では、凍結によりグルコースおよびグリセロールの合成が促進されるこ と、および肝臓に蓄積されたグリコーゲンを材料としてこれらの物質が 合成されることがわかっている(Schmid 1982; Layne and Lee 1989; Costanzo et al. 1992)。このことから、ニホンアマガエルにおいても肝臓 のグリセロールの取り込みが凍結耐性と深く関連する可能性が考えら れた。

本章では、哺乳類の肝細胞に発現し肝臓へのグリセロール取り込みに 重要な役割を果たしている AQP9 と相同のアクセロポリンがニホンア マガエル肝細胞に発現し、凍結時の肝細胞でグリセロールの輸送に関与 している可能性を想定して、ニホンアマガエル AQP9 (AQP-h9) をコー ドする cDNA クローニングおよび AQP-h9 の構造と分子機能の解析を行 った。

材料と方法

動物

4月に捕獲された活動期の野生のニホンアマガエル(H. japonica)を 大内水生動物供給社(埼玉)より購入した。通常条件の実験室内でミル ワームを自由摂餌により与えて1週間飼育した後、サンプリングした。

部分的 AQP-h9 cDNA の増幅

ニホンアマガエル肝臓から抽出し、TRIzol 試薬(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)によって全 RNA を抽出した。抽出された RNA 濃 度は、分光光度計(Eppendorf Bio Photometer D30, Eppendorf, Hamburg, Germany)により波長 260 nm の吸光度を測定し、その値に基づいて算 出した。また波長 260 nm と 280 nm の吸光度比が 1.8 以上のサンプルを 使用した。3 µg の全 RNA、0.5 mM dNTP、 2.5 pmol オリゴ dT16 プラ イマー、10 mM dithiothreitol、 20 U Recombinant RNase Inhibitor(タカ ラバイオ、滋賀)、200 U M-MLV Reverse Transcriptase(Life Technologies) を含む全量 20 µl の反応液中で 37°C で 50 分間逆転写反応を行った。 逆転写反応後、反応液を 70°C で 15 分間加熱し酵素を失活させた。ニホ ンアマガエル AQP-h9 cDNA の部分的な配列を決定するため、ネッタイ ツメガエル(*Xenopus tropicalis*)AQP9 cDNA 配列(アクセッション番号:XM_002937673)に基づきプライマーを設計した (sense,

5'-GGATCTGCAGCAGTTTTTGG-3'; antisense,

5'-ATAGCTGCTCCAAGCATAGG-3')。PCR では、94℃、2 分間の変性 反応に続いて、94℃、30 秒間の変性、 60℃、30 秒間のアニーリング、 72℃、60 秒間の伸長反応を 30 サイクル行った。約 425 bp の PCR 産 物をアガロースゲル電気泳動により分離した後、塩基配列を解析した。

3'-および 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法による AQP-h9 cDNA 全長の配列の決定

AQP-h9 cDNA の部分的な塩基配列を決定後、3'-および 5'- RACE 法に より AQP-h9 cDNA の全長の配列を決定した。3'-RACE 法は、1 μg の全 RNA をオリゴ dT アダプタープライマー

[5'-(T)₁₉-GACTCGAGTCGACATCGA-3']を用いて M-MLV

reverse-transcriptase (Life Technologies) によって 20 μl の反応溶液中で 逆転写した 1 μl の逆転写産物を、3'-RACE プライマー

(5'-TACAGCTCTGTTGCTCATGC-3') およびアダプタープライマー (5'-GACTCGAGTCGACATCGA-3')を用いた PCR 反応によって増幅し た後、3'-RACE nested プライマー (5'-CCAAGAATCTTTACAGCTC-3') とアダプタープライマーを用いて nested PCR を行った。5'-RACE 法は、 500 ng の全 RNA を 5'-RACE primer

(5'-ATGTCAGAGCACAGTTCAGC-3') を用いて逆転写した後、得られ た1本鎖 cDNA を QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany) により精製し、terminal deoxynucleotidyl transferase (東洋紡、 大阪) により 3'末端に poly(A)を付加した。Poly(A)付加した cDNA の溶 液 5 µl を用いて 5'-RACE primer とアダプタープライマーにより PCR を 行い、その後、5'-RACE nested プライマー

(5'-AACAGCAACTGGCTCTAGTC-3') とアダプタープライマーにより
nested PCR を行った。3'-および 5'-RACE 法の PCR は、94℃、2分間
の変性に続いて 94℃、30 秒間の変性、50℃、30 秒間のアニーリング、
72℃、90 秒間の伸長反応を 35 サイクル行った。増幅産物は先に述べ
た方法で精製後、塩基配列を解析した。

分子系統解析

魚類からヒトまでのアクアグリセロポリンのアミノ酸配列を Clustal W (Thompson et al. 1994)により比較した。近隣結合法による系統樹の作

成は、MEGA program ver. 5.0 (Tamura et al. 2011)により行った。進化的 距離は p-distance method (Nei and Kumar 2000)に従って算出し、また分岐 の信頼性は 10,000 回の試行によるブートストラップ確率により評価し た (Felsenstein 1985)。

逆転写 PCR (RT-PCR) による AQP-h9 mRNA 発現解析

ニホンアマガエルの脳、心臓、肺、胃、腸、肝臓、膀胱、肝臓、脂 肪体、骨格筋、下腹部皮膚を材料とし、全 RNA の抽出およびオリゴ dT プライマーを用いた逆転写を前述の方法で行った。ニホンアマガエル AQP-h9 特異的なプライマーセット (sense,

5'-ATCCAGCAGTTTCGTTTGCG-3'; antisense,

5'-CAATGTTGACAGATACGGAGATGG-3')を合成した。また、比較対 照としてニホンアマガエルβ-actin(AB092519)特異的なプライマーセ ット(sense, 5'- TGGCATCACACCTTCTACAATGAG -3'; antisense, 5'-TCACCAGAGTCCATCACGATACC -3')を用いた。AQP-h9 および β-actin の PCR 反応産物はそれぞれ 227 bp および 215 bp と見積もられ た。PCR 反応は TaKaRa Ex Taq(タカラバイオ)を使用し、使用説明書 に従って行った。PCR では、94°C、1分間の変性反応に続いて、94°C、 20 秒間の変性、 65°C、30 秒間のアニーリング、 72°C 、30 秒間の伸 長反応を 30 サイクル行った。増幅産物は臭化エチジウムを含む 2%アガ ロースゲルで電気泳動することで可視化した。反応産物の特異性は塩基 配列解析により確認した。

AQP-h9の水およびグリセロール透過能の解析

全長 AQP-h9 cDNA のコード領域を、コザック配列および AQP-h9 特 異的配列を含むセンスプライマー(5'-

GCCACCATGAGGGAAAGGAGAAGCTG-3') およびアンチセンスプラ イマー [5'-(T)₂₅-ACAGTTCAGCAACGA-3'] を用いて RT-PCR により増 幅した。PCR 産物を pGEM-3Z ベクター (Promega, Madison, WI, USA) を用いてクローニングした。AQP-h9 の全翻訳領域を含む pGEM-3Z ベ クターを EcoR I (タカラバイオ)により線状化し、SP6 RNA ポリメラ ーゼ (mCAP mRNA capping kit; Stratagene, La Jolla, CA, USA) によりキ ャップ化 AQP-h9 cRNA を合成した。ステージ V-VI のアフリカツメガ エル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞を、1 mg/ml のコラゲナーゼ B (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を含む滅菌した OR2 溶液 (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH7.5) 中に入れ、濾胞を除去し

た。単離した卵母細胞に cRNA (50 ng) を含む DW 50 nl または cRNA を含まない DW 50 nl をマイクロインジェクションし、ペニシリン 10 µg/ml、ストレプトマイシン 10 µg/ml を含む Barth の緩衝液[88 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 1.7 mM MgSO₄, 0.48 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 7.6 mM Tris-HCl, pH 7.6, 200 mOsm) 中で 18°C で 3 時間イン キュベーションした。その後、卵母細胞を 200 mOsm から 70 mOsm の Barth の緩衝液 (Saitoh et al. 2014; Shibata et al. 2014a)、またはグリセロー ル等張液 [130 mM glycerol, 23 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 1.7 mM MgSO₄, 0.48 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 7.6 mM Tris-HCl, pH 7.6, 200 mOsm] (Hansen et al. 2002) 中に移した。細胞体積の変化を4 倍の対物レンズとコンピュータに接続された CCD カメラを備えた顕微 鏡(BX50:オリンパス、東京)により観察した。水透過係数(Pf) は 一般的に行われている方法 (Zhang et al. 1990; Fushimi et al. 1993)で計算 した。グリセロール透過率(Ps) は Carbrey et al. (2003)に従って算出し た。AQP-h9 cRNA を注入した卵母細胞の一部は 70 mOsm Barth の緩衝 液中に移す前に0.3 mM HgCl2を含む緩衝液中で10分間インキュベート した。cRNA を注入した卵母細胞における AQP-h9 タンパク質の発現は、 ウエスタンブロットおよび免疫組織化学によって確認した。

45

ウエスタンブロット解析

AQP-h9 cRNA またはDW を注入したアフリカツメガエル卵母細胞を、 細胞溶解液[50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 µg/mL aprotinin, pH 8.0]中 でホモジェナイズし、16,000 × g で 10 分間遠心した後、不溶物を除去 した。変性溶液[3% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 70 mM Tris-HCl, 11.2% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, and 0.01% (v/v) bromophenol blue, pH 6.8]中でタンパク質を 37°C で 60 分間変性させ、12% (w/v)ポリ アクリルアミドゲル中で電気泳動した後、Immobilon-P membrane

(Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。転写後の膜を 2% (w/v) ス キムミルク(和光純薬) でブロッキングした。膜に転写されたタンパク 質に対してウサギ抗 AQP-h9 抗体 (1:2,000) を反応させ、その後ペルオ キシダーゼ標識ロバ抗ウサギ IgG (Dako, Copenhagen, Denmark) を加え てインキュベートした。免疫陽性のバンドは ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) により可視化し た。また、あらかじめ十分量 (10 μg/ml) の抗原ペプチドによって吸収 した抗体を実験に用いることで抗体の特異性を確認した。

統計処理

数値は平均値 ± 標準誤差で表し、Turkey 検定により *P* < 0.05 の場合 を統計的に有意とみなした。

結果

ニホンアマガエル AQP-h9 cDNA の塩基配列およびその配列から推定 されるアミノ酸配列を図 3-1 に示した。AQP-h9 cDNA は 885 塩基の翻 訳領域、63 塩基の5'非翻訳領域および780 塩基の3'非翻訳領域と3'末 端に付加されたポリA鎖から構成されていた。翻訳領域は294アミノ 酸残基からなるタンパク質をコードしており、その分子質量は31.5 kDa と見積もられた。これまでに知られている他の AQP と同様に、AQP-h9 は6箇所の膜貫通領域と2箇所の Asn-Pro-Ala (NPA) モチーフ (79-81 および 211-213 残基)を有していた。さらに 137 残基目のアスパラ ギンが N型糖鎖結合部位、89および 287 残基目のトレオニンがプロテ インキナーゼCによるリン酸化部位と推定された(図 3-1)。AQP-h9の アミノ酸配列を他の脊椎動物の AQP9 と比較すると、ネッイツメガエル AQP9 (ENSXETG00000010861)と 59%、ニワトリ AQP9 (Sugiura et al. 2008)と 56%、ヒト AQP9 (Ishibashi et al. 1998)と 55%、およびメダカ

AQP9 (ENSORLG0000008259) と 52%の保存性が認められた。また、 分子系統学的な解析により、AQP-h9 は他の脊椎動物の AQP9 とクラス ターを形成することが明らかとなった(図 3-2)。一方、ニホンアマガエ ルで既に同定されている AQP である AQP-h1 (AQP1、BAC07470; Tanii et al. 2002)、 AQP-h2K (AQP2、BAF80993; Ogushi et al. 2007)、 AQP-h3BL (AQP3、BAF63030; Akabane et al. 2007)、 AQP-h2 (AQPa2U、BAC82379; Hasegawa et al. 2003)、 AQP-h3 (AQPa2s、BAC07471; Tanii et al. 2002) と 比較すると、それぞれの AQP との類似性は 20%、21%、44%、19%およ び 20%であった(図 3-3)。

RT-PCR による種々の組織における AQP-h9 mRNA の発現解析

ニホンアマガエルにおける AQP-h9 mRNA の発現部位を明らかにす るため、特異的プライマーを用いて RT-PCR 解析を行った。その結果、 AQP-h9 mRNA は解析に用いたすべての組織(脳、心臓、肺、胃、腸、 肝臓、膀胱、腎臓、脂肪体、骨格筋および下腹部皮膚)に発現すること が明らかとなった(図 3-4)。そのうち、肝臓、胃および下腹部皮膚にお いて特に強い発現が見られた。

AQP-h9の水およびグリセロール透過能

AQP-h9による細胞膜を介した水の透過能を、アフリカツメガエル卵 母細胞を用いた swelling assay により調べた。AQP-h9 cRNA をマイクロ インジェクションした卵母細胞を低張(70 mOsm)の Barth の緩衝液 (18°C)中に入れた場合の体積変化を3分間測定した結果、卵母細胞の 体積は顕著に増加した(図 3-5A)。DW を注入した卵母細胞と比較する と、AQP-h9 cRNA を注入した卵母細胞の Pf 値は約3倍高かった(図 3-5B)。また、AQP-h9による水の透過は0.3 mM HgCl₂存在下で阻害さ れた(図 3-5A, B)。

AQP-h9のグリセロール透過能は等張(200 mOsm)のグリセロール溶 液を用いた swelling assay により解析した (図 3-5C, D)。本解析ではグ リセロールの、濃度勾配によりグリセロールが卵母細胞内に取り込まれ、 それによって生じる浸透圧差により二次的に引き起こされる水の流入 を利用して細胞の体積変化を測定することにより、グリセロールの透過 能を推定した。AQP-h9 cRNA を注入した卵母細胞のグリセロール透過 能は、水を注入したコントロールと比較して、約4倍の高い値を示した (図 3-5D)。また AQP-h9 のグリセロール透過能は 0.3 mM HgCl₂存在下 で阻害された (図 3-5C, D)。 AQP-h9 cRNA を注入したツメガエル卵母細胞内で AQP-h9 タンパク 質が発現しているかどうかを調べるため、抗 AQP-h9 抗体を用いた免疫 染色を行ったところ、免疫陽性シグナルが卵母細胞の形質膜上に認めら れた(図 3-5E-a, b)。この結果は、swelling assay の結果と一致した。免 疫陽性シグナルはあらかじめ十分量の抗原ペプチドと反応させた吸収 抗体を用いると完全に消失し(図 3-5E-c)、DW を注入した卵母細胞で はシグナルは見られなかった(図 3-5E-d)。

AQP-h9 cRNA を注入した卵母細胞における AQP-h9 タンパク質の発 現は、ウエスタンブロット解析によっても確認された。AQP-h9 cRNA を注入した卵母細胞の抽出物で特異的な免疫陽性バンドが見られた(図 3-5F)。その分子質量は 31 kDa であり、AQP-h9 のアミノ酸配列から算 出した分子質量と一致した(図 3-5F レーン 1)。また、免疫陽性バンド は DW を注入した卵母細胞の抽出物では見られず(図 3-5F レーン 2)、 またあらかじめ十分量の抗原と反応させた吸収抗体を使用した場合に は消失した(図 3-5F レーン 3)。これらのことから本実験に用いた抗 AQP-h9 抗体の特異性が確認され、また 31 kDa の位置にあるバンドが ニホンアマガエルの肝臓より哺乳類の AQP9 と相同であると予想さ れる AQP-h9 をコードする cDNA をクローニングした。得られた cDNA の塩基配列より推定される AQP-h9 のアミノ酸配列には、これまでに知 られている他の AQP と同様、2 箇所の NPA モチーフおよび 6 箇所の膜 貫通領域が含まれていた。AQP-h9 の一次構造は、他の脊椎動物の AQP9 と比較的高い保存性を示したのに対し、ニホンアマガエルで報告されて いる他の AQP との類似性は低かった。このような傾向は、すでに知ら れているアマガエルのアクアグリセロポリンである AQP-h3BL の場合 と同様であった(Akabane et al. 2007)。また、分子系統解析により、AQP-h9 は他の脊椎動物の AQP9 とクラスターを形成することが確かめられた。

RT-PCRにより様々な組織における AQP-h9 mRNA の発現を調べた結 果、解析に用いた全ての組織で発現が認められた。特に高レベルの発現 が肝臓、胃および下腹部皮膚で観察された。哺乳類では AQP9 mRNA は肝臓、精巣、脳、白血球および筋繊維などの様々な組織において細胞 膜上に発現することが知られている(Inoue et al. 2009; Maeda 2012)が、本 研究の結果はこれとよく一致する。

AQP-h9の機能については、AQP-h9 cRNA を注入したアフリカツメガ

エル卵母細胞を用いた swelling assay により、AQP-h9 が水およびグリセ ロールの透過能を有することが証明された。これらの結果から、ニホン アマガエル AQP-h9 は哺乳類の AQP9 と相同のアクアグリセロポリンで あり、様々な組織において水やグリセロールの輸送に関与していること が示唆された。一方、*H.chrysoscelis* では赤血球に HC-3 (AQP3) が発現 することが報告されており (Mutyam et al. 2011)、今回 RT-PCR で検出 された AQP-h9 mRNA がそれぞれの組織で発現しているものなのか、血 球で発現しているものなのかを明らかにする必要がある。

GTGATGTTTGAAGTTGACACCACCAAGGGTGACAGGCGGAGCAGCAAGTATAGCACTTTA			
GACATGAGGGAAAGAAGAAGCTGTTTAGAAAAACTTGCTCTGAGGAACAGCCTGGCAAGG	120		
M R E R R S C L E K L A L R N S L A R	19		
GAAACCTTGTCTGAGTTTTTTGGGACATGCCTGTTGGTAACCTTCACATGTTGTAGTATC	180		
E T L S E F F G T C L L V T F T C C S I	39		
A T A V I. N Y C S S C C T I. C A T V C C	240		
TCATTGGCAGTCACTATGGCAATCTACGCAAGTGGAGGAGTGTCAGGAGGCCACGTCAAT	300		
<u>SLAVTMAIYASGGVSGG</u> HV <u>N</u>	79		
CCAGCAGTTTCGTTTGCGATGAGTATGACTGGAAAGCTGCCATGGGTCAAACTTCCTTTC	360		
<u>PA</u> VSFAMSM <u>T</u> GKLPWVK <u>LPF</u>	99		
TACATAACAGCACAGTTCCTTGGAGCTATCACCGGATCTGCCGCTGTTTTTGGTGTTTAT	420		
YITAQFLGAITGSAAVFGVY	119		
татсатссаттатсссатастсассассастсттасаста астосссса а атостаса	480		
Y D A L M A Y S G G V F R V T G P N A T	139		
GCTCAAATTTTTGCAACATATCCATCTCCGTATCTGTCAACATTGAATGGACTTGTTGAT	540		
AQIFATIPSPILSTLN <u>GLVD</u>	159		
CAAATGATGTCTACAGCTCTGTTGCTCATGCTGATCTTTGCCATATTTGACAAAAAGAAC	600		
<u>Q M M S T A L L L M L I F A I F </u> D K K N	179		
ATGCCAGCACCAAAGGGACTAGAGCCAGTTGCTGTTGGGCTCCTCATTCTAACATTAGCC	660		
M P A P K G L E <u>P V A V G L L I L T L A</u>	199		
CTCTCTCTACCATCCAACTCTCCACCCCCCCCCACCCAC	720		
L S L G S N C G A A M N P A R D L G P R	219		
ATCTTTACAGCTCTGGCTGGCTGGGGGCCCTGAAGTTTTCACTGCTGGTGGTAGCTTTTGG	780		
IFTALAGWGPEVFTAGG <u>SFW</u>	239		
TGGATCCCTGTGGTCGGACCAATGCTTGGAGCTGTAATCGGGTCCTACATATACATTCTT	840		
W I P V V G P M L G A V I G S Y I Y I L	259		
TGCATTGACATTCATCACAAGAAAGAGCCAGATCATGAAATGGATCCTGATCACTTTGAA 90			
C I D I H H K K E P D H E M D P D H F E	279		
AAACATGAACTTGCCAACATGACTGAAAAAGCCCTAAAAACTCGTTGCTGAACTGTGCTCTGA	960		
KHELANMTEKPKTRC*	294		
	1000		
	1020		
	1080		
	1200		
	1200		
	1200		
	1320		
	1440		
	1500		
	1560		
	1620		
	1690		
	1000		
<u>ΑΑCAAͲͲͲϹͲͲGCAͲͲGͲͲͲΤΑΑΑͲͲCACAΔͲΔΔΔͲGͲͲͲΔΔΔͲCΔC</u>	1728		

図3-1. ニホンアマガエルAQP-h9 cDNAの塩基配列および塩基配列から推定されるアミノ酸配列

下線は推定膜貫通領域(TMHMM Server v. 2.0; Krogh et al. 2001)、枠で囲んだ領域はNPAモチーフ、・はN型糖鎖結合部位、 \triangle はプロテインキナーゼCによるリン酸化部位、破線部はRT-PCRおよびqPCRに用いた特異的プライマー結合部位、網掛けは抗AQP-h9抗体の抗原ペプチドに相当する配列、*は終止コドン、二重下線部はポリA付加シグナルを示す。



図3-2. 魚類から哺乳類までのアクアグリセロポリンの近隣結合法による 分子系統樹

各枝の長さはアミノ酸残基あたりの差異の比率に相当する。枝に記載した 数字は、ブートストラップ確率を示す(10,000回の試行に対する%)。種 名およびアクセッション番号を図中に記した。

AQP-h9	MRERRSCLEKLALRNSLARETLSEFFGTCLLVTFTCCSIATAVLNYGSSGGTL	53
AQP-h3BL	MGRQKEVLNSISGMLRIRNKLIRQALAECLGTLILVMFGCGSVAQVVLSKGSHGLFL	57
AQP-h1	MASEFKKMAFWRAVIAEFLAMIMFVFISIGAALGFNFPIQEKTNETVGRTQDIV	54
AQP-h2K	MMIVRLWELRSVAFTRAVFVEFFATLLFVMFGIGSSLNWPGAPPSVL	47
AQP-h2	MKEMCTGPFTRAFAGELIGTSIFVFFGLGSAMSWPSALPTVL	42
AQP-h3	MLKELCAGFNFKAFLAELIATLVFVFVGLGSTLSWTGALPTVL	43
AQP-h9	GATVGCSLAVTMAIYASGGVSGGHVNPAVSFAMSMTGKLPWVKLPFYITAQFLGAITGSAAVFGV	118
AQP-h3BL	TVNLAFGFAVMLGILIAGQVSGGHINPAVTFALCIMAREPWIKFPVYTLAQTLGAFLGAGIVYGL	122
AQP-h1	KVSLAFGLSIATMAQSVGHISGAHLNPAVTLGCLLSCQISILKAVMYIIAQCLGAVVATAILSGI	119
AQP-h2K	QVALAFGLGIGTLVQAFGHISGAHLNPAVTLAFMVGSQISFMRAVFYVGAQLLGAVSGAAIIQGL	112
AQP-h2	QIAFTFGLGIGTLVQTFGHISGAHLNPAVTVAFLVSSQISLFRAVCYVCAQLLGAVIGAALLYQF	107
AQP-h3	QIAFTFGLGIGTMVQAVGHISGAHINPAVTIALLVGARISLIQTVFYVIAQMLGAVIGAALLYEF	108
	• <u>A</u>	
AQP-h9	YYDALMAY SGGVFRVTGENATAQIFATYPSPYLSTLNGLVDQMMSTALLLMLIFAIFDKKNMPAP	183
AQP-h3BL	YYDAIWYFANDQLYVMGFNGTAGIFATYPTEHLTLMNGFFDQFIGTAALVVCVLAIVDPYNNPIP	187
AQP-h1	TSNLAGNTLGLNGLSNGVTAGQGLGVEIMVTFQLVLCVVAVTDRRRRDV-	168
AQP-h2K	TPFEVRONLSVNGLENNTEAGKAFVVELFLTLQLILCIFASTDDRRTDI-	161
AQP-h2	TPEDVHGSFGVNMPSNNATEGQAVTVEIILTLQLVLCIYACTDDRRDDN-	156
AQP-h3	SPSDIRGGFGVNQPSNNTSPGQAVAVEIILTMQLVLCIFATTDSRTDN-	157
	• • • •	
AQP-h9	RGLEPVAVGLLILTLALPLRSNCGAAMNPARDLGPRIFTALAGWGPEVFTAGGSFWWIPVVGPML	248
AQP-h3BL	RGLEAFTVGFVVLVIGLSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTALAGWGTEVFSAGGQWWWVPIVSPLL	252
AQP-h1	SGSVPLAIGLSVALGHLIAIDYTGCGMNPARSFGSAVVAKNFQYHWIFWVGPMI	222
AQP-h2K	VGSPALSIGLSVTLGHLLGIYYTGCSMNPARSFAPAVVTGDFNAHWVFWLGPLF	215
AQP-h2	VGSPSLSIGLSVVLGHLVGIYFTGCSMNPARSFGPALVVGNFNTHWIFWIGPFV	210
AQP-h3	IGSPAISIGLSVVLGHLLGIYYTGCSMNPARSFGPALITGNFEYHWIFWVAPIT	211
	٥ •	
AQP-h9	GAVIGSYIYILCIDIHHKKEPDHEMDPDHFEKHELANMTEKPKTRC	294
AQP-h3BL	GAFAGVLVYQLMIGCHIEPAPESTEQENVKLSNVKHKERI	292
AQP-h1	GGAAAAIIYDFILAPRTSDITDRLKVWTNGQVEEYELDGEDARMEMKPK	271
AQP-h2K	GATVGSLMYNFIFIPNTKTFSERIAILRGELEPQEDWEERDMRRRQSMELHSTQTIPRSGMTEKV	280
AQP-h2	GAILASLIYNYVLCPQEQSFSEKLSVLLGRIPAMQEEEEDWEERQEQPRRKSMELQTL	268
AQP-h3	GAIFACLIYDYIFAPQFISPSERLEILRGNILQENEKEERRKQSVGLNSVYSQTNSKEKM	271
-		

図3-3. AQP-h9と他のニホンアマガエルAQPのアミノ酸配列の比較

上線はAQP-h9の推定膜貫通領域、◆はNPAモチーフ、●はN型糖鎖結合部 位、△はプロテインキナーゼCによるリン酸化部位、▲はプロテインキ ナーゼAによるリン酸化部位、◇は水銀感受性部位を示す。最適な類似性 を得るためアミノ酸残基間にギャップを挿入した(-)。それぞれのAQP のアクセッション番号および引用文献は次の通りである。AQP-h9 (LC008216)、AQP-h3BL (AQP3, BAF63030)、AQP-h1 (AQP1, BAC07470)、 AQP-h2K (AQP2, BAF80993)、AQP-h2 (AQPa2U, BAC82379; Shibata et al. 2014a)、AQP-h3 (AQPa2S, BAC07471; Shibata et al. 2014a)。



図3-4. ニホンアマガエルの種々の組織におけるAQP-h9 mRNA の発現

AQP-h9およびβ-actinに特異的なプライマーセットを用いてRT-PCRを行った後、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で分離し て可視化した。



図3-5. アフリカツメガエル卵母細胞を用いたAQP-h9の水およ びグリセロール透過能測定

- (A) 低張刺激による卵母細胞体積の継時的変化。AQP-h9 cRNAまたはDWを注入した卵母細胞、およびAQP-h9 cRNAを注入し、0.3 mM HgCl₂中でインキュベーションし たもの。
- (B) 浸透圧差による水透過係数(*Pf*)。数値は平均値±SEM で表した(n=6)。異なる文字を付した群間では統計的 に有意な差が見られた(Tukey's test, *P* < 0.05)。
- (C) 等張グリセロール溶液中の卵母細胞体積の継時的変化。
 数値は平均値 ±標準誤差で表した(n=6)。AQP-h9
 cRNAまたはDWを注入した卵母細胞、およびAQP-h9
 cRNAを注入し、0.3 mM HgCl₂中でインキュベーションしたもの。
- (D) グリセロール透過係数 (*Ps*) を卵母細胞の体積の膨張の 初速度から算出した。数値は平均値±標準誤差で表した (n=6)。異なる文字を付した群間では統計的に有意な 差が見られた (Tukey's test, *P* < 0.05)。
- (E) DWまたはAQP-h9 cRNAを注入した卵母細胞の免疫蛍光染 色像。(a) はAQP-h9 cRNAを注入した卵母細胞を抗AQPh9で染色したもの、(b) は(a) に対応する微分干渉像、 (c) はあらかじめ抗原と反応させた吸収抗体をAQP-h9 cRNA注入卵母細胞と反応させたもの、(d) はDW注入卵 母細胞を抗AQP-h9と反応させたもの。矢印は形質膜を示 す。Bar = 100 μm。
- (F) AQP-h9 cRNA (レーン1、3) またはDW (レーン2、4) を 注入した卵母細胞に対するウエスタンブロット解析。 レーン1、2は抗AQP-h9と、レーン3、4は吸収抗体と反応 させた。矢印はAQP-h9特異的なバンドを示し、アスタリ スクは非特異的シグナルを示す。

第4章 ニホンアマガエル凍結時の組織学的解析お よび AQP-h9 と AQP-h3BL の発現解析

目的

RT-PCR により、ニホンアマガエル AQP-h9 の mRNA が肝臓および他 の様々な組織で検出され、また AQP-h9 が水およびグリセロールの透過 能を有することが確かめられたことから、このアクアグリセロポリンが 凍結および解凍の際のグリセロールの輸送に関与している可能性が考 えられた。そこで、AQP-h9 タンパク質の組織における局在を調べ、凍 結や解凍により局在に変化が見られるかどうかを明らかにするために、 AQP-h9 特異的な抗体を作製し、本抗体を用いた免疫組織化学を行った。

グリセロールを主要な耐凍物質として利用している H. chrysoscelis で は、その供給源として肝臓、筋肉、および脂肪体が重要な役割を担って いる(Zimmerman et al. 2007)。また哺乳類では脂肪組織だけでなく骨格筋 においても中性脂肪(トリアシルグリセロール)を脂肪酸とグリセロー ルに加水分解するホルモン感受性リパーゼが発現し、トリアシルグリセ ロールの分解によるグリセロール放出が知られている(Bolinder et al. 2000; Skowronski et al. 2007)ことから、グリセロール輸送に特に重要であ ると考えられる肝臓および骨格筋に着目し、免疫組織化学により AQP-h9の局在を調べた。なお、脂肪体に関しては、前章の考察で述べ たように冬眠中のアマガエルでは著しく退縮していて、サンプリングが 不可能であった。

また、すでにアマガエルで同定されているアクアグリセロポリン AQP-h3BL(哺乳類 AQP3 と相同)についても検討した。さらに、凍結 実験による形態的な変化を調べるために、ヘマトキシリン-エオジン

(HE) 染色を行った。加えて、AQP-h9 および AQP-h3BL の mRNA 発
 現レベルが凍結や解凍により変動するか否かを、逆転写(RT)-PCR お
 よびリアルタイム RT-PCR による定量 PCR (gPCR) 法によって調べた。

材料と方法

ニホンアマガエル AQP-h9 抗体の作製

AQP-h9の一部に相当する配列(260-275: ST-225;

CIDIHDKKEPDHEMDP, 図 3-1 参照)をもつペプチドを合成し、本ペプ チドを抗原として抗 AQP-h9 の作製を行った。ST-225 ペプチドをスカシ ガイヘモシアニンと結合し、ウサギに免疫して抗体を作製した。方法は 定法(Tanaka et al. 1992)に従い、ペプチド合成および抗体作製は蛋白精製

組織学的解析

用いたニホンアマガエルおよび凍結実験の方法は第2章に準ずる。凍 結実験のコントロール(冬眠)、凍結および解凍のそれぞれの群のアマ ガエルから肝臓および筋肉を摘出し、PLP固定液(2% paraformaldehyde, 75 mM L-lysine hydrochloride, and 10 mM sodium periodate in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)に浸漬し、4°C で 16 時間固定した。組織をエ タノール系列により脱水した後、Paraplast plus (McCormick Scientific, St. Louis, MO, USA) により包埋した。その後、4 μm の厚さの薄切切片を 作製した。

一部の切片は Mayer の ヘマトキシリンおよびエオジンにより染色し
 (HE 染色)、エタノールにより脱水処理した後、Entellan (Merck,
 Darmstadt, Germany)により封入した。

また、他の切片を用いて免疫組織化学を行った。試料は1%ウシ血清 アルブミンを含む PBS で希釈したウサギ抗 AQP-h9 抗体(1:1,000)ま たはウサギ抗 AQP-h3BL 抗体(1:2,000, Akabane et al. 2007)を室温で 16 時間反応させた後、PBS で洗浄し、indocarbocyanine(Cy3)標識ロバ 抗ウサギ IgG (1:400; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) と 室温で2時間反応させた。二次抗体溶液には核染色のために4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を添加した。PBS で洗浄した後、切片 を PermaFluor (Thermo Scientific)により封入した。スライドは蛍光顕微 鏡 Olympus BX61 (オリンパス) により観察した。抗原抗体反応の特異 性はあらかじめ抗原ペプチド (ST-225) を終濃度 10 µg/ml となるよう に加えた一次抗体溶液によって確認した。

RT-PCR および qPCR 法による mRNA 発現レベルの解析

ニホンアマガエルの肝臓および骨格筋より全 RNA を抽出し、オリ ゴ dT プライマーを用いて逆転写した。全 RNA の抽出および逆転写の 方法は P.38 に、RT-PCR の方法は P. 41-42 に準じて行った。ニホンアマ ガエルの AQP-h9(sense, 5'-ATCCAGCAGTTTCGTTTGCG-3'; antisense, 5'-CAATGTTGACAGATACGGAGATGG-3')、AQP-h3BL (sense, 5'-TTTGTCGTCCTCGTCATTGGATTG-3'; antisense, 5'-CCGCCAGCACTAAAGACTTCTGTG-3') および β-actin (sense, 5'-TGGCATCACACCTTCTACAATGAG-3'; antisense,

5'-TCACCAGAGTCCATCACGATACC-3')に特異的なプライマーをそれ

ぞれ用いた。AQP-h9、AQP-h3BL および β-actin の PCR 反応産物はそ れぞれ 227 bp、131 bp および 215 bp と見積もられた。

qPCR 反応は希釈した cDNA 4 μl、それぞれのプライマー 0.5 μl(終 濃度 0.4 μM)、FastStart Essential DNA Green Master 5 μl (Roche

Diagnostics) および DW を含む 10 µl の反応液を白色の 384 穴プレート

(Roche Diagnostics)に分注し、LightCycler 480 (Roche Diagnostics)に より行った。サンプル1種類を10倍段階希釈したものをスタンダード として用いた。PCRによる増幅では、95℃、5分間の変性に続き、95℃、 10 秒間の変性、 65℃、10 秒間のアニーリング、72℃、12 秒間の伸長 反応を45 サイクル行い、伸張反応時に SYBR Green の蛍光を測定した。 PCR 反応の特異性を確認するため、サイクル反応後に 65℃ から 97℃ までの融解曲線分析を行った。また PCR 産物の特異性はアガロースゲ ル電気泳動と配列解析により確認した。 gPCR 解析は各サンプルにつき 2 ウェル行った。AQP-h9 および AQP-h3BL の mRNA 発現レベルは標準 曲線法により算出し、β-actin mRNA によって標準化した。これらの計 算は LightCycler 480 multiple plate analysis ソフトウェア (Roche Diagnostics) を用いて行った。AQP-h9、AQP-h3BL、および β-actin に ついて、PCR 増幅効率の平均はそれぞれ 1.928 ± 0.0195、1.931 ± 0.0276

63

および1.883±0.0158、スロープはそれぞれ-3.509、-3.499および-3.639、 Y intercept はそれぞれ 21.66、21.14 および 13.66 であった。逆転写反応 を行っていない全 RNA を鋳型として PCR を行い、サンプル中にゲノム DNA が混入していないことを確認した。同様に DW を鋳型とし、プラ イマーダイマーが形成されないこと、および反応液へのコンタミネーシ ョンがないことを確認した。

統計処理

数値は平均値 ± 標準誤差で表し、Turkey 検定により *P* < 0.05 の場合を 統計的に有意とみなした。

結果

凍結および解凍による形態学的変化

初めに凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓および骨格筋につ いて、形態学的な特徴を HE 染色により観察した。活動期のカエルの肝 臓において、肝実質部は毛細胆管を形づくる肝細胞の不規則な索状もし くは管状構造により構成されていた。また赤血球は類洞や血管内に確認 された(図 4-1A)。活動期のアマガエルではエオジン好性の物質が細胞 質内で染色されたのに対し、冬眠、凍結、および解凍群ではほぼ染色は 見られず、肝実質細胞の毛細胆管側の細胞質中にヘマトキシリン陽性染 色物質がわずかに観察されただけであった(図 4-1B, C, D)。さらに、 冬眠群では類洞および血管内に赤血球が凝集していた(図 4-1B)。凍結 群では、さらに赤血球が凝集して血管内の大部分を占めていたのに対し、 解凍群ではほとんど観察されなかった(図 4-1C, D)。骨格筋においても、 肝臓と同様に活動期のアマガエルでは筋細胞の細胞質にエオジン好性 の物質が見られるのに対し(図 4-1E)、冬眠、凍結および解凍群では染 色性が弱まった(図 4-1F, G, H)。冬眠中のカエルでは活動期に比べて筋 細胞の黍縮が見られ、凍結群ではさらにその度合いが強まった(図 4-1F, G)。

肝臓および骨格筋における AQP-h9 および AQP-h3BL の免疫組織 化学

次に肝臓および骨格筋における AQP-h9 の局在を調べるため、蛍光免 疫染色を行った。活動期のアマガエル肝臓では AQP-h9 免疫陽性シグナ ルがほとんど検出されなかったのに対し(図 4-2A)、冬眠群では免疫陽 性シグナルが赤血球に認められた(図 4-2C)。凍結群では AQP-h9 シグ

65

ナル強度が増強し、赤血球全体に広がって見られた(図 4-2E)が、解 凍群ではシグナルがほぼ消失した(図 4-2G)。

骨格筋では、活動期では AQP-h9 免疫陽性シグナルはほとんど検出さ れず(図 4-3A)、冬眠群のカエルで弱い陽性シグナルが筋細胞の細胞質 内に観察された(図 4-3C)。AQP-h9 免疫陽性シグナルの強度は凍結群 で著しく増加し(図 4-3E)、解凍群では減少した(図 4-3G)。

一方、抗 AQP-h3BL による蛍光免疫染色では、肝臓および筋肉のい ずれについても全ての群で特異的な免疫陽性シグナルは検出されなか った(データ掲載せず)。また、抗 AQP-h9 および抗 AQP-3BL の特異性 は、十分量の抗原とあらかじめ反応させた吸収抗体により、染色性が消 失することで確認した(データ掲載せず)。

AQP-h9 および AQP-h3BL の mRNA 発現解析

冬眠、凍結および解凍の各群のアマガエルの肝臓および骨格筋におけ るAQP-h9 およびAQP-h3BLのmRNA 発現を、RT-PCRおよびqPCR に より解析した。その結果、AQP-h9 mRNA はすべての群のカエルの肝臓 において高レベルに発現が認められた。一方、すべての群で骨格筋での 発現レベルは比較的低かった(図4-4A)。また、肝臓および骨格筋のい ずれにおいても、AQP-h9 mRNA の発現レベルは凍結および解凍により 変化しなかった(図 4-4B)。AQP-h3BL に関しては、すべての実験群の 肝臓において AQP-h9 と比較すると非常に低レベルの mRNA 発現が検 出されたが、筋肉では mRNA の発現は認められなかった。肝臓におけ る AQP-h3BL の発現レベルを qPCR により測定したところ、凍結群と解 凍群の間でのみ有意な差が見られた。

考察

哺乳類においては、AQP9 が類洞に面した肝細胞の形質膜に発現し、 肝細胞へのグリセロールの取り込みに関与していることが知られてい る(Maeda 2012)。このことから、AQP-h9 も同様にニホンアマガエル肝 細胞の形質膜上に局在していることが予想されたが、本研究で行った免 疫染色では AQP-h9 の肝細胞への局在は検出されなかった。一方で、 AQP-h9 はアマガエル肝臓中の赤血球に局在していることが明らかとな った。活動期のカエルの肝臓ではシグナルがほとんど検出されないのに 対し、冬眠群では赤血球での局在が認められた。免疫陽性シグナルの強 度は凍結により高まり、解凍群では消失した。これらの結果から、

が考えられる。マウスでは赤芽球と赤血球に AQP1 および AQP9 が発現 していることが知られている(Liu et al. 2007; Kingsley et al. 2013)。また AOP9 欠損マウスの赤血球では細胞膜を介したグリセロールの急速な 透過が起きなくなることから、マウスの赤血球では AOP9 が主要なグリ セロール透過経路となっていることが示唆されている(Liu et al. 2007)。 これらのことから、赤血球上に発現する AQP9 (AQP-h9) によるグリセ ロールの調節機構が、両生類においてすでに備わっていることが考えら れた。今後、血球標本に対する免疫組織化学により、赤血球における AQP-h9の局在を明らかにする必要がある。また、H. chrvsosceliの赤血 球に AQP3 が高レベルで発現しているという報告(Goldstein et al. 2010; Mutyam et al. 2011)とは異なり、ニホンアマガエルの赤血球中には AQP-h3BL は検出されなかったことから、無尾両生類の中でも赤血球の グリセロール輸送に関わるアクアグリセロポリンのタイプに関して、種 差があることが判明した。

アマガエル肝細胞にはAQP-h9およびAQP-h3BLが検出されなかった ことから、肝細胞には別のタイプのアクアグリセロポリンが発現してい る可能性が考えられる。ネッタイツメガエルのゲノム中には少なくとも AQP3、AQP7、AQP9、AQP10および無尾両生類特異的な AQPxto とい

う5タイプのアクアグリセロポリンの遺伝子が存在することが明らか となった (Suzuki and Tanaka 2010; Ensembl, http://ensemble.org/, 2015; Finn et al. 2014)。RT-PCR により、これらのアクアグリセロポリンのう ち、AQP3、AQP9 および AQPxto の mRNA がネッタイツメガエル肝臓 中に発現することがわかっている(未発表データ)。生理食塩水で灌流 した後の肝臓においてもこれら AQP の mRNA 発現が認められることか ら、ネッタイツメガエルでは肝実質細胞に AQP3、AQP9 および AQPxto のmRNA が発現している可能性がある。このことから、アマガエル肝 細胞には AQP-h3BL および AQP-h9の異なるサブタイプ、そして AQPxto に相同な AQP のうちのいずれか、またはそれらの全てが発現していて、 グリセロールの輸送を調節している可能性がある。AQP-h3BL および AQP-h9の異なるサブタイプの存在は現在のところ確認されていないが、 ネッタイツメガエルには2タイプの AQP5 (AQP-xt5a および AQP-xt5b, Shibata et al. 2014b) が存在し、トノサマガエル等には2タイプの AQPa2

(SAQP-rj3a および AQP-rj3b, Saitoh et al. 2014)が存在することから、 アマガエルにも未知のサブタイプの存在する可能性が仮定できる。また、 AQPxto に相同な AQP が存在するか否かもアマガエルにおいてはまだ
明らかになっていない。今後、どのタイプの AQP が肝細胞へのグリセ ロール取り込みに寄与しているかを明らかにしていく必要がある。

骨格筋に関しては、筋細胞中に AQP-h9 が発現していること、その発 現レベルは凍結により高まることが免疫組織化学により明らかにされ た。AQP-h9 免疫陽性シグナルは、筋細胞の細胞質中に観察されたこと から、AQP-h9 は筋細胞内の細胞内小胞、小胞体、および/またはゴル ジ装置に局在することが示唆された。このことから、凍結の際に AQP-h9 は筋細胞においてグリセロール細胞内輸送に関わっている可能性が推 察された。哺乳類では骨格筋細胞の形質膜に AQP9、AQP3 および AQP7 が局在している(Wakayama et al. 2002, 2004; Inoue et al. 2009)。したがっ て、筋細胞膜を介したグリセロールの輸送には、AQP-h9 とは異なるタ イプのアクアグリセロポリンが関与しているかもしれない。

肝臓および骨格筋のいずれにおいてもAQP-h9の局在およびシグナル 強度に変動が見られたが、AQP-h9 mRNAの発現レベルには差が見られ なかった。このことから、AQP-h9の発現の調節は転写レベルでなされ ている可能性は低く、別の機構で調節されている可能性が考えられる。 また、肝臓においてはAQP-h3BL mRNAの低レベルの発現が認められ、 冬眠群と比較すると凍結群で発現レベルが増大し、解凍群では低下する 傾向が見られたものの、免疫組織化学では AQP-h3BL タンパク質は検 出されなかったことから、AQP-h3BL が肝臓および骨格筋においてグリ セロール輸送へ寄与している可能性は低いと考えられる。



図4-1. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓および骨格筋のHE染色像

A-D: 肝臓の染色像。Bar = 50 μm。鏃は凝集した赤血球塊を示す。 E-H: 骨格筋の染色像。Bar = 20 μm。 A, Eは活動期(4月に捕獲)、B, Fは冬眠群、C, Gは凍結群、D, H は解凍群のアマガエルの標本。



図4-2. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓におけるAQP-h9の 免疫蛍光染色

A, C, E, Gは抗AQP-h9による免疫染色像。AQP-h9免疫陽性シグナルは 赤色で検出される。青色はDAPIによる核染色。 B, D, F, HはそれぞれA, C, E, Gに対応する微分干渉像。 A, Bは活動期(4月に捕獲)、C, Dは冬眠群、E, Fは凍結群、G, Hは解 凍群のアマガエル標本。 Bar = 50 μm。



図4-3. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの骨格筋におけるAQP-h9 の免疫蛍光染色

A, C, E, Gは抗AQP-h9による免疫染色像。AQP-h9免疫陽性シグナルは 赤色で検出される。青色はDAPIによる核染色。 B, D, F, HはそれぞれA, C, E, Gに対応する微分干渉像。 A, Bは活動期(4月に捕獲)、C, Dは冬眠群、E, Fは凍結群、G, Hは解 凍群のアマガエル標本。 Bar = 50 μm。



図4-4. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓および骨格筋におけるAQP-h3BLおよびAQP-h9のmRNAの発現

- (A) RT-PCR産物を電気泳動により分離しエチジウムブロマイドで染 色して可視化した。
- (B) AQP-h9 mRNA発現レベルをqPCRにより定量した。数値は平均値 ±SEMで表した(n=7)。
- (C) AQP-h3BL mRNA発現をqPCRにより定量した。数値は平均値± SEMで表した(n = 7)。

各組織で異なる文字を付した群間には統計的に有意な差がみられる (Tukey's test, P < 0.05)。

第5章 本論文の要約と今後の展望

生体内の水分の凍結は細胞に様々なダメージを与えることから、凍結 に対する抵抗性は、変温動物である無尾両生類にとってはとりわけ重要 な生理機能であるといえる。寒冷地に適応した無尾両生類の耐凍性はい くつかの種で報告されており、様々な物質を耐凍物質として利用してい ることがわかっていた。しかしながら、それらの物質、中でもグリセロ ールの輸送の調節に関しては、現在までにほとんど知見が得られていな い。本研究では、ニホンアマガエルを実験材料として用い、特にグリセ ロールとグリセロールの輸送体という観点から、無尾両生類の凍結耐性 の機構を明らかにすることを目指して研究を行った。

第1章では、凍結が生体に及ぼすダメージと、様々な生物がどのよう にして凍結に対する抵抗性を生み出しているかについてこれまでに得 られている知見に関して記した。特に無尾両生類に関して、耐凍物質と してグルコース、グリセロールおよび尿素を合成・蓄積することで凍結 による細胞の損傷を免れている機構について述べた。また、グリセロー ルの輸送体として考えられるアクアグリセロポリンが属する AQP ファ ミリーについて概説した。さらに、本研究の目的について述べた。すな わちニホンアマガエルに凍結耐性が備わっているかを明らかにし、本種 における耐凍物質を明らかにすること、グリセロールの輸送に関わるこ とが予想されるアクアグリセロポリン分子の構造や機能を明らかにす ること、および冬眠や凍結によるアクアグリセロポリンの発現や局在の 変化を明らかにすることなどを本研究の目的とした。

第2章では、凍結実験によりニホンアマガエルが凍結耐性を有するか 否か、および凍結実験によるアマガエル生体内での候補耐凍物質濃度の 変化について述べた。本研究では、自然条件で冬眠しているニホンアマ ガエルを、-4℃で6時間凍結させ、その後室温に1時間置いて解凍す るという条件で凍結実験を行った。この条件では、80%以上のアマガエ ルが生き延びることが確かめられ、ニホンアマガエルが凍結耐性を有す る種であることが明らかになった。続いて凍結実験を行ったカエルの血 中および組織中のグルコース、グリセロールおよび尿素の濃度を測定し た。その結果、解凍群では冬眠群に比べてグルコースおよびグリセロー ルの血中濃度が高まることがわかった。また、組織中のグルコース含量 が凍結実験により変動するが、そのパターンは組織により異なること、 組織中のグリセロール含量は肝臓以外の組織において冬眠群に比べ解 凍群で増加する傾向が見られることが明らかになった。一方、尿素に関

しては凍結実験による血中濃度の変化は認められず、下腹部皮膚以外で の組織中含量にも差は見られなかった。これらのことから、ニホンアマ ガエルではグリセロールを耐凍物質として利用していることが示唆さ れた。またグリセロールに加えグルコースについても耐凍物質として機 能している可能性が考えられた。また、グルコースおよびグリセロール のいずれの血中レベルも、活動期のカエルと冬眠群の間で同程度であっ たことから、グルコースやグリセロールの合成および血中への放出は、 温度低下や冬眠開始によるのではなく、凍結および/または凍結後の解 凍に起因すると考えられた。

第3章では、ニホンアマガエルのアクアグリセロポリン AQP-h9 をコ ードする cDNA のクローニングおよびその分子機能解析について述べ た。グリセロールの輸送機構を明らかにするため、まずアマガエル肝臓 より哺乳類 AQP9 と相同であると予想された AQP-h9 をコードする cDNA をクローニングした。得られた cDNA は 885 塩基の翻訳領域、63 塩基の 5'-非翻訳領域、および 780 塩基の 3'-非翻訳領域から構成されて いた。推定されるアミノ酸配列には 6 箇所の推定膜貫通領域および 2 箇所の NPA モチーフ (AQP ファミリーで保存された構造) が含まれて いた。また、AOP-h9 は他の脊椎動物の AOP9 と比較的高い類似性を示

した。次に、特異的プライマーを用いた RT-PCR により、AQP-h9 mRNA のバンドが全身で幅広く現れることを明らかにした。さらに、アフリカ ツメガエル卵母細胞に AQP-h9 cRNA を注入して swelling assay を行うこ とにより、AQP-h9 が水とグリセロールのいずれについても透過性をも っことが確かめられた。これらの結果から、得られた AQP-h9 は哺乳類 AQP9 と相同であり、アクアグリセロポリンとして機能することが示唆 された。

第4章では、凍結実験を行ったカエルの肝臓および骨格筋について、 形態学的解析、AQP-h9 と AQP-h3BL の免疫組織化学、および AQP-h9 と AQP-h3BL の mRNA の発現解析について述べた。まず、HE 染色に より、肝臓では冬眠および凍結により類洞内で赤血球が凝集すること、 ならびに冬眠および凍結によりエオジン好性の物質が失われることが わかった。骨格筋においても同様に、冬眠・凍結によりエオジンの染色 性が低下し、また細胞の萎縮が認められた。肝臓を AQP-h9 抗体により 免疫染色した結果、冬眠群の肝臓中の赤血球上に陽性シグナルが観察さ れた。このシグナルは凍結群でより強度を増し、解凍群ではほとんど消 失した。骨格筋では冬眠群の筋細胞の細胞質中にわずかなシグナルが検 出された。このシグナルは凍結群で著しく増大し、解凍群では低下した。

また、肝臓と骨格筋のいずれにおいても、凍結実験による AQP-h9 mRNA の発現レベルの変動は見られなかった。AQP-h3BL は凍結実験の 全ての群の肝臓および骨格筋で免疫染色によるシグナルは検出されな かった。肝臓では AQP-h3BL mRNA が低レベルで発現していたが、凍 結による発現レベルの差は見られなかった。骨格筋では AQP-h3BL mRNA の発現は検出されなかった。これらの結果から、AQP-h9 はアマ ガエルの赤血球に発現し、凍結および解凍に曝された際の赤血球の保護 に寄与していることが示唆された。また骨格筋においては AQP-h9 は細 胞質内の細胞内小胞、小胞体、および/またはゴルジ装置に局在し、凍 結の際のグリセロール細胞内輸送に関わっている可能性が考えられた。

本研究によりニホンアマガエルの凍結耐性が証明され、グリセロール が耐凍物質として機能していることが示唆された。日本国内に生息する 無尾両生類の固有種の中で、耐凍性を持つ種の報告は本研究が初めての ものである。亜寒帯気候に属する北海道には、ニホンアマガエルの他に エゾアカガエル (Rana pirica)、アズマヒキガエル (Bufo japonicus formosus)、トノサマガエル (Rana nigromaculata) などが生息している。 これらの種も耐凍能を持つ可能性が考えられるが、その詳細は不明であ る。また、北海道には北米からの外来種であるウシガエル(Rana catesbeiana)が移入していることが知られている。この種は−2℃で10 時間の生存が可能であり(Steiner et al. 2000)、ウシガエルが日本国内に広 く定着することができた要因の1つであると考えられる。今後、様々な 種での耐凍能の有無、耐凍能の程度およびその機構について明らかにし ていくことで、無尾両生類の適応戦略を気候的観点から考察する一助と なると考えられる。

無尾両生類の耐凍物質の合成器官については、R. sylvatica において凍 結により肝臓中でグリコーゲンが分解されグルコースが生成されるこ とが明らかとなっている(Storey and Storey 1986b)。一方、グリセロール を耐凍物質として利用する H. chrysoscelis では肝臓、筋肉および脂肪体 において中性脂肪からグリセロールが合成されると推定されているが、 その実態は明らかになっていない。また、無脊椎動物でグリセロールを 耐凍物質として用いるニカメイガ (Chilo suppressalis) では主として脂 肪体に蓄積されたグリコーゲンを材料としてグリセロールを合成して いることがわかっている(Atapour and Moharramipour 2009)。ニホンアマ ガエルにおいて凍結時のグリセロールの合成・放出に関わる器官を特定 するため、今後、凍結開始後および解凍後の様々な組織における中性脂 肪およびグリコーゲン含有量の継時的な測定、またグリセロール合成に 関与する酵素の活性や発現レベルの測定を行う必要があると考えられ る。

本研究から、ニホンアマガエルの凍結時に肝臓中に蓄積した赤血球 や骨格筋細胞においてグリセロールの輸送がAOP-h9を介して活発化し、 それがこれらの細胞の保護に寄与する可能性が考えられた。低温馴化し た H. chrvsoscelis では赤血球で、哺乳類 AQP3 と相同な AQP である HC3 のmRNA 発現およびタンパク質合成が促進されるが、それに付随する グリセロールの赤血球内への取り込みは観察されていない(Goldstein et al. 2010)。一方、H. chrysoscelis の培養赤血球において、グリセロールに よりグリコシル化された HC3 タンパク質の質量および細胞膜に局在す る HC3 量が増大する(Mutyam et al. 2011)。これは、①グリセロール自体 もしくは細胞外グリセロール濃度の上昇による浸透圧の変化が刺激と なり、AQPの転写・翻訳・修飾が調節される、②発現促進されたアク アグリセロポリンが必ずしもグリセロール透過に関与しない、という2 つの可能性を示している。今後、ニホンアマガエルを凍結した際の赤血 球における AQP-h9 の mRNA およびタンパク質発現を調べ、赤血球で の AOP-h9 の機能を明らかにしていく必要がある。また、実際に赤血球

が AQP-h9 を介して細胞内にグリセロールを取り込んでいるのかを、標 識グリセロールを用いた実験により調べる必要もある。また、筋肉組織 においても同様の解析が必要である。

さらに、凍結に曝された際にグリセロールがどのような経路により 生体内で輸送されるかを明らかにするためには、引き続き肝臓と筋肉以 外の組織も対象として AQP-h9 の発現や局在を調べていく必要がある。 また、AQP-h9の発現や局在を調節する因子に関する研究も重要である。 ラットでは卵管上皮細胞のアピカル側形質膜に AOP9 が局在し、その転 写および翻訳はエストラジオールやプロゲステロンといった性ホルモ ンにより調節される可能性が示されている(Brañes et al. 2005)。また、ヒ ト AOP 遺伝子の上流にはグルココルチコイド応答配列および浸透圧感 受性配列と推定される領域が存在する(Tsukaguchi et al. 1999)。これらの ことから、ニホンアマガエル AOP-h9 の発現がホルモンや浸透圧の変化 により調節されている可能性が考えられる。さらに H. chrvsoscelis の HC1およびHC2について、下腹部皮膚など一部の組織においては mRNA 発現がほとんど検出されないのに対し、免疫組織化学では強い シグナルが検出されることから、これらの AQP は転写および翻訳のそ れぞれの段階で調節されていると考えられている(Zimmerman et al.

2007; Pandey et al. 2010)。無尾両生類の耐凍機構においては、低温、細 胞外体液の凍結、浸透圧変化などが刺激になり、各種の生体反応が進行 すると考えられる。*In vivo* での実験に加え、培養細胞を用いた実験によ り上記のような各種刺激を与えた際の反応を *in vitro* で調べることで、 凍結時における AQP とその他の関連因子の調節機構を明らかにするこ とも重要である。

また、凍結および解凍中の耐凍物質の循環や再吸収にもアクアグリセ ロポリンが関わっている可能性が考えられる。実際、腎臓においてグリ セロールの蓄積量が凍結および解凍によって増大することが明らかと なった。これは毛細血管から腎臓の細胞保護のためにグリセロールが分 配されている可能性と、糸球体で濾過されたグリセロールが尿細管で再 吸収された可能性の双方が想定される。ニホンアマガエルの腎臓では遠 位尿細管と集合管の主細胞にアクアグリセロポリンである AQP-h3BL が存在することが知られており(Akabane et al. 2007)、AQP-h3BL はこれ らの細胞と毛細血管の間のグリセロール透過に関与している可能性が 考えられる。さらに哺乳類では近位尿細管に AQP7 が発現し、グリセロ ールの輸送に関与する可能性が指摘されている(Holmes 2012)。このこと から、凍結時のニホンアマガエル腎臓における AQP-h3BL および AQP-h9の発現や局在を解析することに加え、アマガエルにおける他の アクアグリセロポリンの同定とその発現部位の解明も必要である。ニホ ンアマガエルではAQP-h3BLとAQP-h9以外のアクアグリセロポリンは 同定されておらず、哺乳類 AQP7、AQP10および両生類特異的 AQPxlo/AQPxtoに相同なアクアグリセロポリンがニホンアマガエルに 存在するかどうか、また AQP-h3BL および AQP-h9 も含めて別のサブタ イプが存在するか否かを明らかにしなければならない。また、無尾両生 類では腎臓よりもむしろ膀胱が水再吸収器官として重要な役割を担っ ていることから、膀胱でのグリセロール再吸収の可能性も視野に入れる 必要があると考えられる。

本研究からAQP-h9が筋細胞内でのグリセロールの輸送に関与してい る可能性が示されたが、筋細胞膜での発現は見られなかった。凍結処理 していない H. chrysoscelis の筋肉中では、HC1、HC2 および HC3 のいず れも筋繊維では発現が見られず、HC1 は血管と筋周膜、HC3 は筋細胞 に接する神経のシュワン細胞に発現が認められる(Pandey et al. 2010)。こ の結果と本研究で明らかにされた AQP-h9 の局在を考え合せると、筋肉 における AQP の局在と機能は複雑に調節されていると考えられる。さ らに、哺乳類では筋細胞膜に AQP7 の存在が確認されており(Maeda 2012)、ニホンアマガエルでも、AQP7 に相同のアクアグリセロポリンが 筋肉での耐凍機構において大きな役割を担っている可能性も考えられ る。一方で、第4章で述べたとおり哺乳類では骨格筋細胞の形質膜に沿 って AQP9、AQP3 および AQP7 が局在する(Maeda 2012)という、アマ ガエルとはかなり異なるパターンを示す。このように動物綱や生物種間 の差が存在する可能性も考慮しなくてはならない。以上のことから凍結 および解凍時の筋肉におけるグリセロールの蓄積と細胞保護の仕組み を解明するためには複数のアクアグリセロポリンの動態を総合的に観 察する必要があると言える。また、そのために今後、実際に細胞内のど こに AQP-h9 および他のアクアグリセロポリンが存在するのかを電子顕 微鏡を用いて詳細に観察して明らかにする必要がある。

一方、アマガエルが凍結に曝される際に、AQP-h9 がグリセロール輸送体としてだけでなく水チャネルとして機能している可能性も想定される。凍結中の細胞の脱水および解凍後の水の再分配は、耐凍戦略において細胞を凍結による損傷から保護する重要な現象の一つとされている。序章で述べたとおり、一般的に耐凍機構を備えた種では凍結時に体内の水分のおよそ 65%までを細胞外に排出し、凍結させることが可能である(Storey 2004)。この脱水の調節に AQP が関与している可能性は高い

と考えられる。事実、酵母では AQP1 および AQP2 による水分透過が同 種の耐凍性維持に重要な役割を担っていることが示されている(Tanghe et al. 2002)。特に外気と接する表皮、眼球、呼吸器系の組織では、他の 組織と比較してより迅速な細胞からの水分排出と耐凍物質の蓄積が必 要になると考えられるため、AQP の機能が特に重要である可能性が考 えられる。

また、凍結により血中のグルコースレベルの顕著な上昇が明らかにな ったことから、グルコースの合成や輸送に関わる研究も必要であろう。 グルコースの輸送には糖輸送体が関与している可能性が高い。ニホンア マガエルの凍結耐性の調節機構の全容を解明するためには、アクアグリ セロポリン、糖輸送体、ならびにグリセロールおよびグルコースの生成 に関わる酵素について、生体内での発現部位と局在、および冬眠や凍 結・解凍による変化を解析し、さらに調節に関わるホルモンや浸透圧感 受性因子を明らかにすることも重要である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導を賜りました田中滋康名誉 教授、岡田令子講師、塩尻信義教授、および鈴木雅一教授の諸先生に深 く感謝致します。研究に関して数多くのご助言を頂きました山内清志教 授および藤原健智教授に厚く御礼申し上げます。また学外での研究進行 に際してご協力頂きました加藤尚志早稲田大学教授に深く感謝致しま す。さらに本研究を進めるに際し、様々なアドバイスとご助力を頂きま した田中研究室、鈴木研究室、岡田研究室、早稲田大学加藤研究室の皆 様に感謝致します。特に多大なサポートをしてくださった田中・岡田研 究室の滝谷優さん、鈴木研究室の坂本丞さんに深く感謝致します。

最後に本博士論文を完成させるにあたり並々ならぬお力添えを頂い た菊山榮早稲田大学名誉教授に心から感謝の意を表します。

参考文献

- Akabane G., Y. Ogushi, T. Hasegawa, M. Suzuki, and S. Tanaka. 2007. Gene cloning and expression of an aquaporin (AQP-h3BL) in the basolateral membrane of water-permeable epithelial cells in osmoregulatory organs of the tree frog. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol 292:R2340–R2351.
- Atapour M. and S. Moharramipour. 2009. Changes of cold hardiness, supercooling capacity, and major cryoprotectants in overwintering larvae of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Environ Entomol 38:260–265.
- Bolinder J., D.A. Kerckhoffs, E. Moberg, E. Hagström-Toft, and P. Arner. 2000. Rates of skeletal muscle and adipose tissue glycerol release in nonobese and obese subjects. Diabetes 49:797–802.
- Brañes M.C., B. Morales, M. Ríos, and M.J. Villalón. 2005. Regulation of the immunoexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium. Am J Physiol - Cell Physiol 288:C1048–C1057.
- Calamita G., A. Mazzone, A. Bizzoca, and M. Svelto. 2001. Possible Involvement of Aquaporin-7 and -8 in Rat Testis Development and Spermatogenesis. Biochem Biophys Res Commun 288:619–625.
- Carbrey J.M., D.A. Gorelick-Feldman, D. Kozono, J. Praetorius, S. Nielsen, and P. Agre. 2003. Aquaglyceroporin AQP9: Solute permeation and metabolic control of expression in liver. Proc Natl Acad Sci USA 100:2945–2950.

- Cheng C.-H.C. 1998. Evolution of the diverse antifreeze proteins. Curr Opin Genet Dev 8:715–720.
- Chino H. 1957. Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the *bombyx* silkworm. Nature 180:606–607.
- Churchill T.A. and K.B. Storey. 1996. Organ metabolism and cryoprotectant synthesis during freezing in spring peepers *Pseudacris crucifer*. Copeia 517–525.
- Costanzo J.P., M.C.F. do Amaral, A.J. Rosendale, and R.E. Lee. 2013. Hibernation physiology, freezing adaptation and extreme freeze tolerance in a northern population of the wood frog. J Exp Biol 216:3461–3473.
- Costanzo J.P., P.A. Callahan, R.E. Lee Jr, and M.F. Wright. 1997. Frogs reabsorb glucose from urinary bladder. Nature 389:343–344.
- Costanzo J.P., C. Grenot, and R.E. Lee. 1995. Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*. J Comp Physiol [B] 165:238–244.
- Costanzo J.P. and R.E. Lee. 2005a. Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog. J Exp Biol 208:4079–4089.
- Costanzo J.P. and R.E. Lee. 2013. Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates. J Exp Biol 216:1961–1967.
- Costanzo J.P., M.F. Wright, and R.E. Lee. 1992. Freeze tolerance as an overwintering adaptation in cope's grey treefrog (*Hyla chrysoscelis*). Copeia 1992:565.

- DeVries A.L. 1971. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. Science 172:1152–1155.
- Edwards J.R., K.L. Koster, and D.L. Swanson. 2000. Time course for cryoprotectant synthesis in the freeze-tolerant chorus frog, *Pseudacris triseriata*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 125:367–375.
- Elkjær M.-L., Z. Vajda, L.N. Nejsum, T.-H. Kwon, U.B. Jensen, M. Amiry-Moghaddam, J. Frøkiær, et al. 2000. Immunolocalization of aqp9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. Biochem Biophys Res Commun 276:1118–1128.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791.
- Finn R.N., F. Chauvigné, J.B. Hlidberg, C.P. Cutler, and J. Cerdà. 2014. The lineage-specific evolution of aquaporin gene clusters facilitated tetrapod terrestrial adaptation. PLoS One 9(11): e113686.
- Fushimi K., S. Uchida, Y. Harat, Y. Hirata, F. Marumo, and S. Sasaki. 1993. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. Nature 361:549–552.
- Goldstein D.L., J. Frisbie, A. Diller, R.N. Pandey, and C.M. Krane. 2010. Glycerol uptake by erythrocytes from warm- and cold-acclimated Cope's gray treefrogs. J Comp Physiol B 180:1257–1265.
- Hansen M., J.F.J. Kun, J.E. Schultz, and E. Beitz. 2002. A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. J Biol Chem 277:4874–4882.
- Hara-Chikuma M. and A.S. Verkman. 2005. Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. Biol Cell 97:479–486.

- Hasegawa T., H. Tanii, M. Suzuki, and S. Tanaka. 2003. Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin-dependent water-channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3. Endocrinology 144:4087–4096.
- Higgins S.A. and D.L. Swanson. 2013. Urea is not a universal cryoprotectant among hibernating anurans: Evidence from the freeze-tolerant boreal chorus frog (*Pseudacris maculata*). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 164:344–350.
- Hillman S.S., P.C. Withers, R.C. Drewes, and S.D. Hillyard. 2008. Ecological and Environmental Physiology of Amphibians. Oxford University Press. London
- Holmes R.P. 2012. The role of renal water channels in health and disease. Mol Aspects Med, Water Channel Proteins (Aquaporins and Relatives) 33:547–552.
- Inoue M., Y. Wakayama, H. Kojima, S. Shibuya, T. Jimi, H. Hara, S. Iijima, et al. 2009. Aquaporin 9 expression and its localization in normal skeletal myofiber. J Mol Histol 40:165–170.
- Ishibashi K., S. Hara, and S. Kondo. 2009. Aquaporin water channels in mammals. Clin Exp Nephrol 13:107–117.
- Ishibashi K., S. Kondo, S. Hara, and Y. Morishita. 2011. The evolutionary aspects of aquaporin family. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol 300:R566–R576.

- Ishibashi K., M. Kuwahara, Y. Gu, Y. Tanaka, F. Marumo, and S. Sasaki. 1998. Cloning and functional expression of a new aquaporin (aqp9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. Biochem Biophys Res Commun 244:268– 274.
- Ishibashi K., S. Sasaki, K. Fushimi, S. Uchida, M. Kuwahara, H. Saito, T. Furukawa, et al. 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.
- Kingsley P.D., E. Greenfest-Allen, J.M. Frame, T.P. Bushnell, J. Malik, K.E. McGrath, C.J. Stoeckert, et al. 2013. Ontogeny of erythroid gene expression. Blood 121:e5–e13.
- Kishida K., H. Kuriyama, T. Funahashi, I. Shimomura, S. Kihara, N. Ouchi, M. Nishida, et al. 2000. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. J Biol Chem 275:20896–20902.
- Knight M.R. and H. Knight. 2012. Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. New Phytol 195:737–751.
- Krogh A., Larsson B., Heijne G., and Sonnhammer E. L. L. 2001.

Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. J Mol Biol 305:567-580.

- Layne J.R. and A.L. Jones. 2001. Freeze tolerance in the gray treefrog: cryoprotectant mobilization and organ dehydration. J Exp Zool 290:1– 5.
- Layne J.R. and R.E. Lee. 1989. Seasonal variation in freeze tolerance and ice content of the tree frog *Hyla versicolor*. J Exp Zool 249:133–137.
- Liu Y., D. Promeneur, A. Rojek, N. Kumar, J. Frøkiær, S. Nielsen, L.S. King, et al. 2007. Aquaporin 9 is the major pathway for glycerol uptake by mouse erythrocytes, with implications for malarial virulence. Proc Natl Acad Sci USA 104:12560–12564.
- Maeda N. 2012. Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome. Mol Aspects Med, Water Channel Proteins (Aquaporins and Relatives) 33:665–675.
- Muise A.M. and K.B. Storey. 2001. Regulation of hexokinase in a freeze avoiding insect: Role in the winter production of glycerol. Arch Insect Biochem Physiol 47:29–34.
- Mutyam V., M.V. Puccetti, J. Frisbie, D.L. Goldstein, and C.M. Krane. 2011. Dynamic regulation of aquaglyceroporin expression in erythrocyte cultures from cold- and warm-acclimated Cope's gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*. J Exp Zool Part Ecol Genet Physiol 315A:424–437.
- Nei M. and S. Kumar. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press. London

- Ogushi Y., H. Mochida, T. Nakakura, M. Suzuki, and S. Tanaka. 2007. Immunocytochemical and phylogenetic analyses of an arginine vasotocin-dependent aquaporin, AQP-h2K, specifically expressed in the kidney of the tree frog, *Hyla japonica*. Endocrinology 148:5891– 5901.
- Pandey R.N., S. Yaganti, S. Coffey, J. Frisbie, K. Alnajjar, and D. Goldstein.
 2010. Expression and immunolocalization of aquaporins HC-1, -2, and
 -3 in Cope's gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*. Comp Biochem Physiol
 A Mol Integr Physiol 157:86–94.
- Pinder A.W., K.B. Storey, and G.R. Ultsch. 1992. Estivation and Hibernation. Pp. 250–274 in Environ Physiol Amphib. The University of Chicago Press, Chicago.
- Portincasa P., G. Palasciano, M. Svelto, and G. Calamita. 2008. Aquaporins in the hepatobiliary tract. Which, where and what they do in health and disease. Eur J Clin Invest 38:1–10.
- Rexer-Huber K.M.J., P.J. Bishop, and D.A. Wharton. 2011. Skin ice nucleators and glycerol in the freezing-tolerant frog *Litoria ewingii*. J Comp Physiol B 181:781–792.
- Rodríguez A., V. Catalán, J. Gómez-Ambrosi, and G. Frühbeck. 2011. Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control. Cell Cycle 10:1548–1556.
- Rojek A., J. Praetorius, J. Frøkiaer, S. Nielsen, and R.A. Fenton. 2008. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. Annu Rev Physiol 70:301–327.

- Rosendale A.J., R.E. Lee, and J.P. Costanzo. 2014a. Effect of physiological stress on expression of glucose transporter 2 in liver of the wood frog, *Rana sylvatica*. J Exp Zool Part Ecol Genet Physiol 321:566–576.
- Rosendale A.J., B.N. Philip, R.E. Lee Jr., and J.P. Costanzo. 2014b. Cloning, characterization, and expression of glucose transporter 2 in the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. Biochim Biophys Acta BBA
 Gen Subj 1840:1701–1711.
- Saitoh Y., Y. Ogushi, Y. Shibata, R. Okada, S. Tanaka, and M. Suzuki. 2014. Novel vasotocin-regulated aquaporins expressed in the ventral skin of semiaquatic anuran amphibians: evolution of cutaneous water-absorbing mechanisms. Endocrinology 155:2166–2177.
- Schmid W.D. 1982. Survival of frogs in low temperature. Science 215:697–698.
- Shibata Y., I. Katayama, T. Nakakura, Y. Ogushi, R. Okada, S. Tanaka, and M. Suzuki. 2014a. Molecular and cellular characterization of urinary bladder-type aquaporin in *Xenopus laevis*. Gen Comp Endocrinol in press (doi: 10.1016/j.ygcen.2014.09.001.)
- Shibata Y., T. Sano, N. Tsuchiya, R. Okada, H. Mochida, M. Suzuki, and S. Tanaka. 2014b. Gene expression and localization of two types of AQP5 in *Xenopus tropicalis* under hydration and dehydration. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 307:R44–56.
- Shima J.E., D.J. McLean, J.R. McCarrey, and M.D. Griswold. 2004. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. Biol Reprod 71:319– 330.

- Skowronski M.T., J. Lebeck, A. Rojek, J. Praetorius, E.-M. Füchtbauer, J. Frøkiær, and S. Nielsen. 2007. AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism. Am J Physiol - Ren Physiol 292:F956–F965.
- Steiner A.A., S.O. Petenusci, L.G. Brentegani, and L.G. Branco. 2000. The importance of glucose for the freezing tolerance/intolerance of the anuran amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. Rev Bras Biol 60:321–328.
- Storey J.M. and K.B. Storey. 1985. Adaptations of metabolism for freeze tolerance in the gray tree frog, *Hyla versicolor*. Can J Zool 63:49–54.
- Storey J.M. and K.B. Storey. 1986a. Winter survival of the gall fly larva, *Eurosta solidaginis*: Profiles of fuel reserves and cryoprotectants in a natural population. J Insect Physiol 32:549–556.
- Storey K.B. 2004. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Storey K.B. and J.M. Storey. 1984. Biochemical adaption for freezing tolerance in the wood frog, *Rana sylvatica*. J Comp Physiol B 155:29– 36.
- Storey J.M. and K.B. Storey. 1986b. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles. Can J Zool 64:49–56.
- Sugiura K., N. Aste, M. Fujii, K. Shimada, and N. Saito. 2008. Effect of hyperosmotic stimulation on aquaporins gene expression in chick kidney. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 151:173–179.

- Suzuki M. and S. Tanaka. 2010. Molecular diversity of vasotocin-dependent aquaporins closely associated with water adaptation strategy in anuran amphibians. J Neuroendocrinol 22:407–412.
- Suzuki-Toyota F., K. Ishibashi, and S. Yuasa. 1999. Immunohistochemical localization of a water channel, aquaporin 7 (AQP7), in the rat testis. Cell Tissue Res 295:279–285.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731–2739.
- Tanaka S., F. Mizutani, K. Yamamoto, S. Kikuyama, and K. Kurosumi. 1992. The α-subunit of glycoprotein hormones exists in the prolactin secretory granules of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) pituitary gland. Cell Tissue Res 267:223–231.
- Takata K., T. Matsuzaki, and Y. Tajika. 2004. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. Prog Histochem Cytochem 39:1–83.
- Tanghe A., P. Van Dijck, F. Dumortier, A. Teunissen, S. Hohmann, and J.M. Thevelein. 2002. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. Appl Environ Microbiol 68:5981–5989.
- Tanii H., T. Hasegawa, N. Hirakawa, M. Suzuki, and S. Tanaka. 2002. Molecular and cellular characterization of a water-channel protein, aqp-h3, specifically expressed in the frog ventral skin. J Membr Biol 188:43–53.

- Thompson J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680.
- Tsukaguchi H., C. Shayakul, U.V. Berger, B. Mackenzie, S. Devidas, W.B. Guggino, A.N. van Hoek, et al. 1998. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. J Biol Chem 273:24737–24743.
- Tsukaguchi H., S. Weremowicz, C.C. Morton, and M.A. Hediger. 1999. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. Am J Physiol - Ren Physiol 277:F685–F696.
- Verkman A.S. and A.K. Mitra. 2000. Structure and function of aquaporin water channels. Am J Physiol Ren Physiol 278:F13–F28.
- Virkki L.V., C. Franke, P. Somieski, and W.F. Boron. 2002. Cloning and functional characterization of a novel aquaporin from *Xenopus laevis* oocytes. J Biol Chem 277:40610–40616.
- Voituron Y., L. Paaschburg, M. Holmstrup, H. Barré, and H. Ramløv. 2009. Survival and metabolism of *Rana arvalis* during freezing. J Comp Physiol B 179:223–230.
- Wakayama Y., M. Inoue, H. Kojima, T. Jimi, S. Shibuya, H. Hara, and H. Oniki. 2004. Expression and localization of aquaporin 7 in normal skeletal myofiber. Cell Tissue Res 316:123–129.
- Wakayama Y., T. Jimi, M. Inoue, H. Kojima, S. Shibuya, M. Murahashi, H. Hara, et al. 2002. Expression of aquaporin 3 and its localization in normal skeletal myofibres. Histochem J 34:331–337.

- Watanabe M., T. Kikawada, N. Minagawa, F. Yukuhiro, and T. Okuda. 2002. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. J Exp Biol 205:2799–2802.
- Westh P. and H. Ramløv. 1991. Trehalose accumulation in the tardigrade Adorybiotus coronifer during anhydrobiosis. J Exp Zool 258:303–311.
- Zhang R.B., K.A. Logee, and A.S. Verkman. 1990. Expression of mRNA coding for kidney and red cell water channels in *Xenopus* oocytes. J Biol Chem 265:15375–15378.
- Zimmerman S.L., J. Frisbie, D.L. Goldstein, J. West, K. Rivera, and C.M. Krane. 2007. Excretion and conservation of glycerol, and expression of aquaporins and glyceroporins, during cold acclimation in Cope's gray tree frog *Hyla chrysoscelis*. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol 292:R544–R555.