

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
謝辞	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 (*Hyla 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 AQP-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 AQP-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の変動

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°C 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 (Muisse 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°C 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°C 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、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。

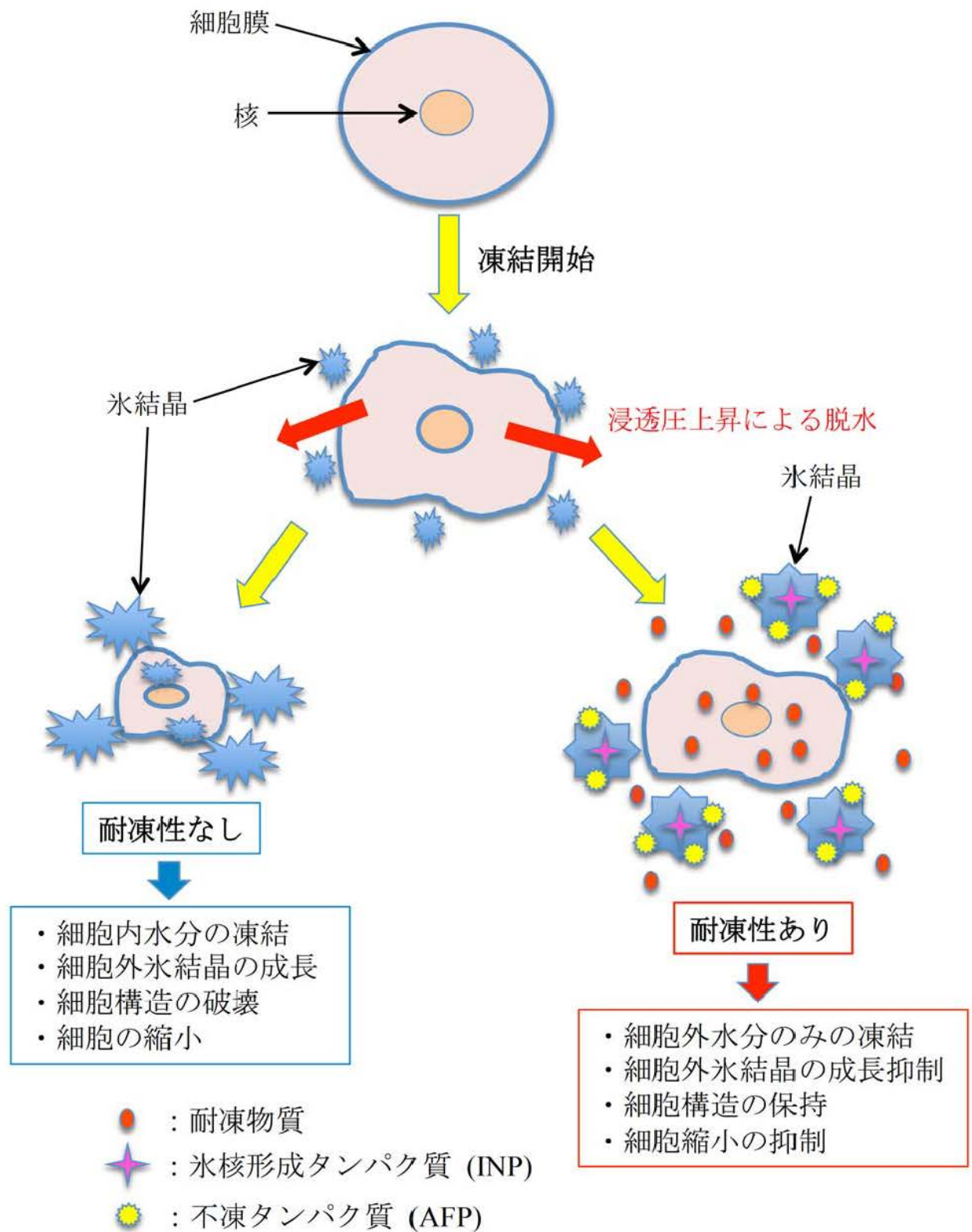


図1-1. 耐凍機構による細胞保護の仕組みの模式図

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)。

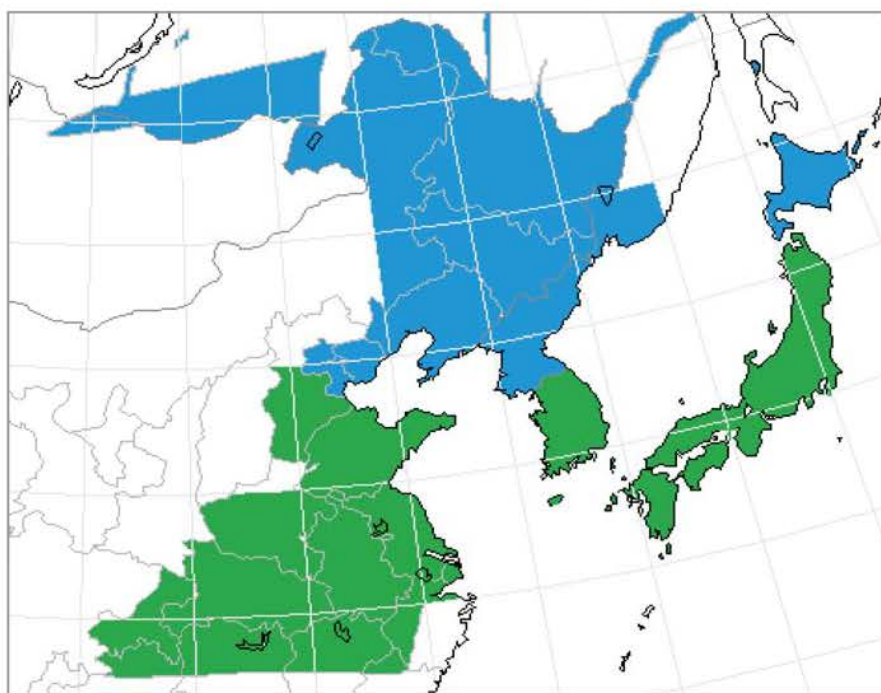


図1-2. ニホンアマガエルの分布域

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）。

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

分類	哺乳類	哺乳類での 主な発現部位	無尾両生類
クラシカルAQP (水などを透過)	AQP0	水晶体	AQP0
	AQP1	腎臓, 血管	AQP1
	AQP2	腎臓	AQP2
	AQP4	腎臓, 脳	AQP4
	AQP5	唾液腺, 肺	AQP5
	AQP6	腎臓	
	AQP8	肝臓, 腸	AQP8
	AQP11	脳, 心臓	AQP11
	AQP12	脾臓, 腸管	
			AQP _a 2(＊)
アクアグリセロポリン (尿素、グリセロールなどの 低分子溶質も透過)	AQP3	腎臓, 皮膚	AQP3
	AQP7	精巣	AQP7
	AQP9	肝臓, 精巣	AQP9
	AQP10	十二指腸, 空腸	AQP10
			AQP _a 1(＊)

(＊) 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°C 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°C 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°C）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 $450 \times g$ 、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 $0.7\times$ 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 、 $\text{pH } 7.5$) $400\text{ }\mu\text{l}$ 中でホモジェナイズし、 4°C で $20,000 \times g$ 、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°C 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 1 μl に反応試薬を 150 μl 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 μl 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的濃度を算出した。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 μl に対し、反応液 80 μl を加えて混和し、37°C 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 1 mg あたりの値として表した。

統計処理

数値は平均値 \pm 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变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）。

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に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。

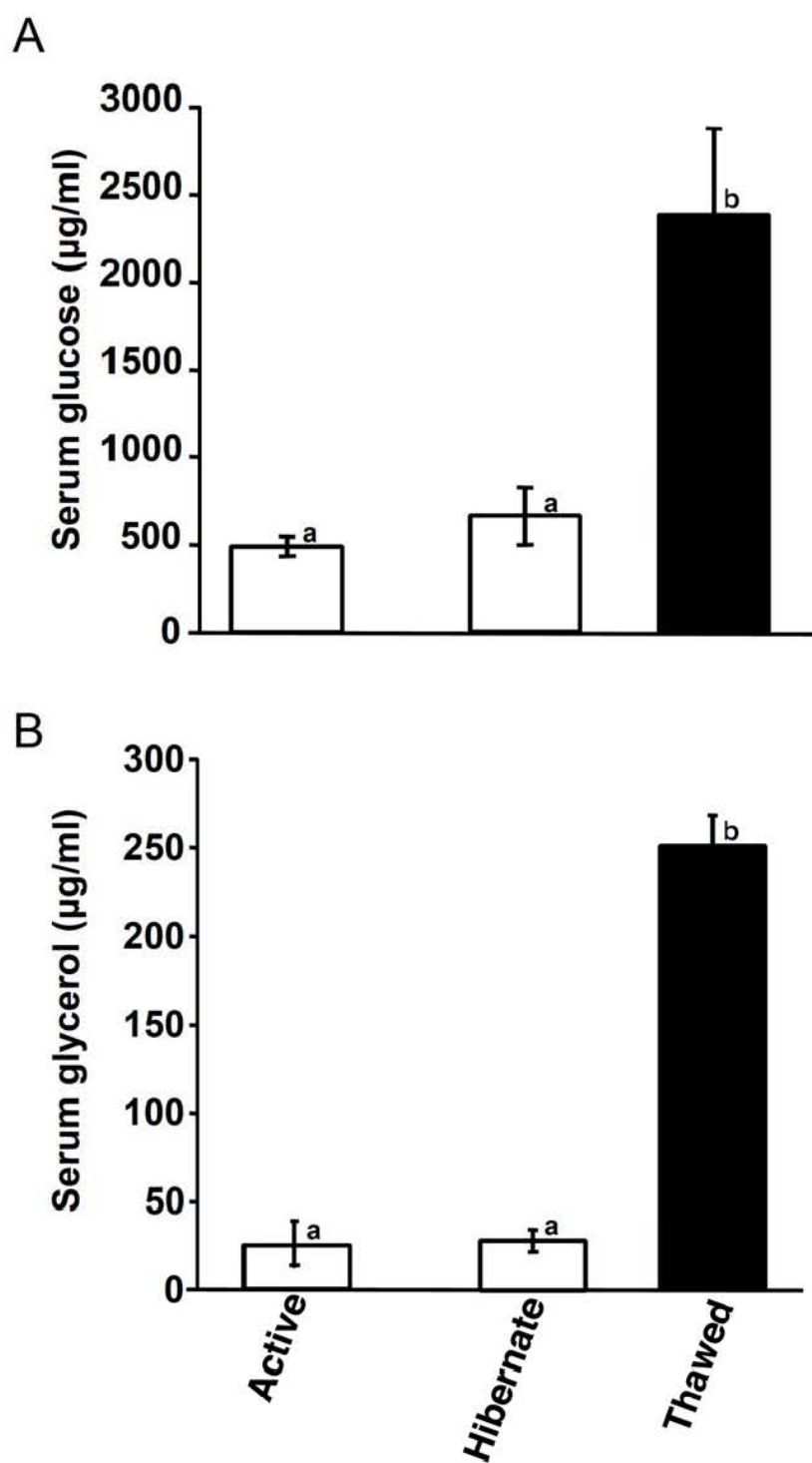


図2-1. 凍結実験がニホンアマガエル^{ニホニアマガエル}の血中グルコース (A) およびグリセロール (B) 濃度に及ぼす影響

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, $P < 0.05$)。

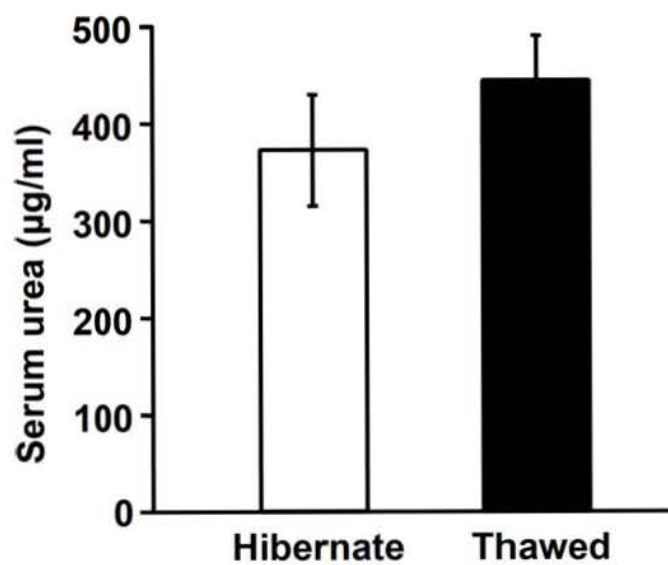


図2-2. 凍結実験がニホンアマガエルの血中尿素濃度に及ぼす影響

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, $P > 0.05$)。

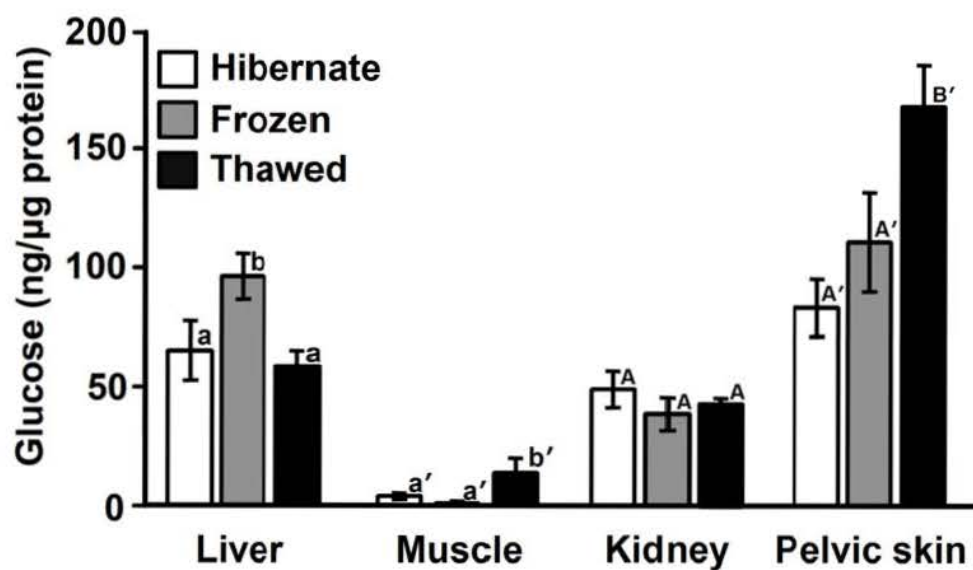


図2-3. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓、骨格筋、腎臓および下腹部皮膚中のグルコース含量

数値は平均値 \pm 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, $P < 0.05$)。

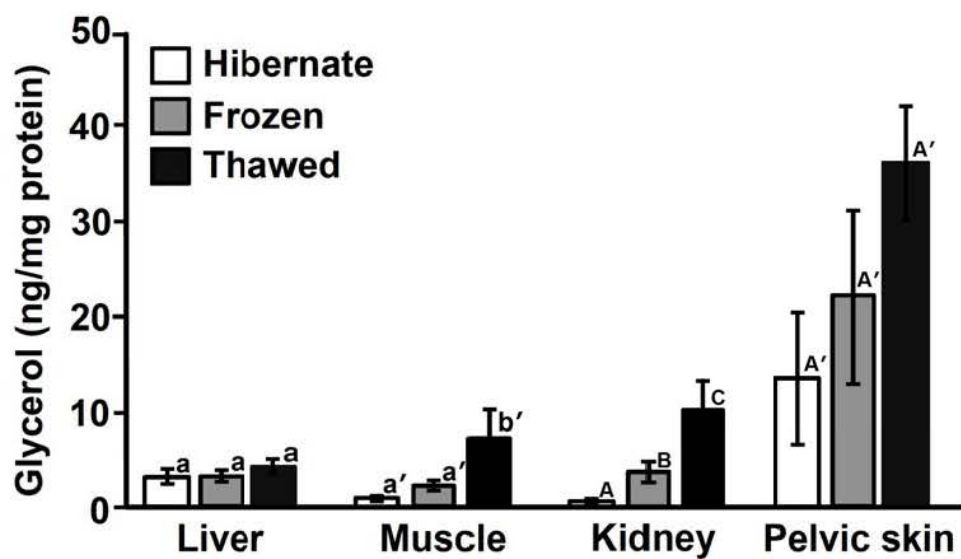


図2-4. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓、骨格筋、腎臓および下腹部皮膚中のグリセロール濃度の変化

数値は平均値 \pm 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, $P < 0.05$)。

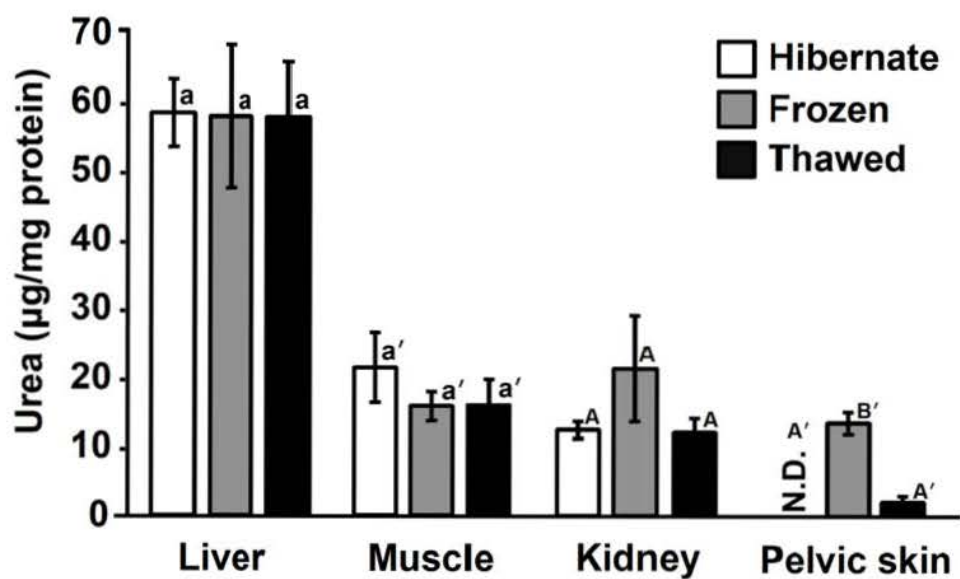


図2-5. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓、骨格筋、腎臓および下腹部皮膚中の尿素含量

数値は平均値 \pm 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://ensembl.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 AQPx10 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 AQP_{xto} が存在する(Suzuki and Tanaka 2010; Ensembl, <http://ensembl.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 AQP_{xlo} 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。

一方、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 μ g 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 μ l 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、ネットアイ

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°C、2 分間の変性反応に続いて、94°C、30 秒間の変性、60°C、30 秒間のアニーリング、72°C、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°C 、2 分間の変性に続いて 94°C 、30 秒間の変性、50°C、30 秒間のアニーリング、72°C 、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 *EcoRI* (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 $\mu\text{g/ml}$ 、ストレプトマイシン 10 $\mu\text{g/ml}$ を含む Barth の緩衝液[88 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.4 mM NaHCO_3 , 1.7 mM MgSO_4 , 0.48 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.41 mM CaCl_2 , 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 NaHCO_3 , 1.7 mM MgSO_4 , 0.48 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.41 mM CaCl_2 , 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 (P_f) 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 (P_s) は Carbrety 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 HgCl_2 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。

ウェ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、 $16,000 \times g$ 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 \pm 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 (ENSORLG00000008259) 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 AQP-h9 のものであることが示された。

考察

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	60
GACATGAGGGAAAGAAGAAGCTGTTTAGAAAACTTGCTCTGAGGAACAGCCTGGCAAGG	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
GCTACAGCAGTTCTCAACTATGGATCTTCTGGAGGAACCTTGGGTGCTACTGTTGGCTGT	240
A T A V L N Y G S S G G T L G A T V G C	59
TCATTGGCAGTCACTATGGCAATCTACGCAAGTGGAGGAGTGTGAGGAGGCCACGTC	300
S L A V T M A I Y A S G G V S G G H V N	79
CCAGCAGTTTCGTTTGGCGATGAGTATGACTGGAAAGCTGCCATGGGTCAAACCTTCCTTTC	360
P A V S F A M S M T G K L P W V K L P F	99
TACATAACAGCACAGTTCCTTGGAGCTATCACCGGATCTGCCGCTGTTTTTGGTGTAT	420
Y I T A Q F L G A I T G S A A V F G V Y	119
TATGATGCATTAATGGCATACTCAGGAGGAGTGTTAGAGTAACTGGGCCAAATGCTACA	480
Y D A L M A Y S G G V F R V T G P N A T	139
GCTCAAATTTTTGCAACATATCCATCTCCGTATCTGTCAACATTGAATGGACTTGTGAT	540
A Q I F A T Y P S P Y L S T L N G L V D	159
CAAATGATGTCTACAGCTCTGTTGCTCATGCTGATCTTTGCCATATTTGACAAAAAGAAC	600
Q M M S T A L L L M L I F A I F D K K N	179
ATGCCAGCACCAAAGGGACTAGAGCCAGTTGCTGTTGGGCTCCTCATTCTAACATTAGCC	660
M P A P K G L E P V A V G L L I L T L A	199
CTGTCTCTAGGATCCAACCTGTGGAGCCGCTATGAACCCAGCCAGAGACTTAGGCCCAAGA	720
L S L G S N C G A A M N P A R D L G P R	219
ATCTTTACAGCTCTGGCTGGCTGGGGCCCTGAAGTTTTCACTGCTGGTGGTAGCTTTTGG	780
I F T A L A G W G P E V F T A G G S F W	239
TGGATCCCTGTGGTTCGGACCAATGCTTGGAGCTGTAATCGGGTCCTACATATACATTCTT	840
W I P V V G P M L G A V I G S Y I Y I L	259
TGCATTGACATTATCACAAGAAAGAGCCAGATCATGAAATGGATCCTGATCACTTTGAA	900
C I D I H H K K E P D H E M D P D H F E	279
AAACATGAACCTGCCAACATGACTGAAAAGCCTAAAACCTCGTTGCTGAACTGTGCTCTGA	960
K H E L A N M T E K P K T R C *	294
CATCTATGGGCTACGTGCTTTTGTGTGCATAGGCCAACTTGCCTTCTTCTGTGAACATG	1020
GACCTTCTGTGATTGGTTTATGATGATGTAACCTGGGAGCCATGACTTAACTAATTACCTA	1080
CAAAATTAGAAGTTAAAATTAAAACAAAATATGAGTTTTTTTAAAGGTTCTCATTAGTA	1140
TTTTATTCCTAGCCTTCAATCTCAGACATAAAAGTATCAGGGGATAATCATAATGCCCT	1200
TAATTGCTGGGCCATAAATTATCCTTCTTAATGAAGCACTAATGGACCATAGACTGGGTC	1260
ACAAAGGTATATGCAGGTAATTGGTCTTGTCATGCATTAATGTGTAATAACTGTGATCCA	1320
TCATCAATACCATTAATAATTGCTGTGTGTTAAATGATTTTACTGTCAGAGGCCAAGAA	1380
CTTCACTTCAGTAAGATGCTGTTTCCCATCTATGAGAAAATGTATGATGCGCTGCTATCA	1440
ATTATTCTGCTAGTGAGGTCAATTTGTAAAGCCATAAACATTCAGTATCTCACAACCACT	1500
CAAACCCACTGGGCTGGAAAAGAGCTTTTAGAAACCTGCAAGATTTTCTGTAACCTTCTC	1560
AAATATTATTGCTTCTAGGGTGACCTCTGTACATTGTTCAATTACCTCCTTAGTTATAA	1620
AATAAATACCAAGGAAATAAATGTTAAATTATTGTATATTCTAATTTTAATTGTTAAAG	1680
AACAATTTCTTGCAATTGTTTTAAATTCACAATAAATGTTTTAAATCAC	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、△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。

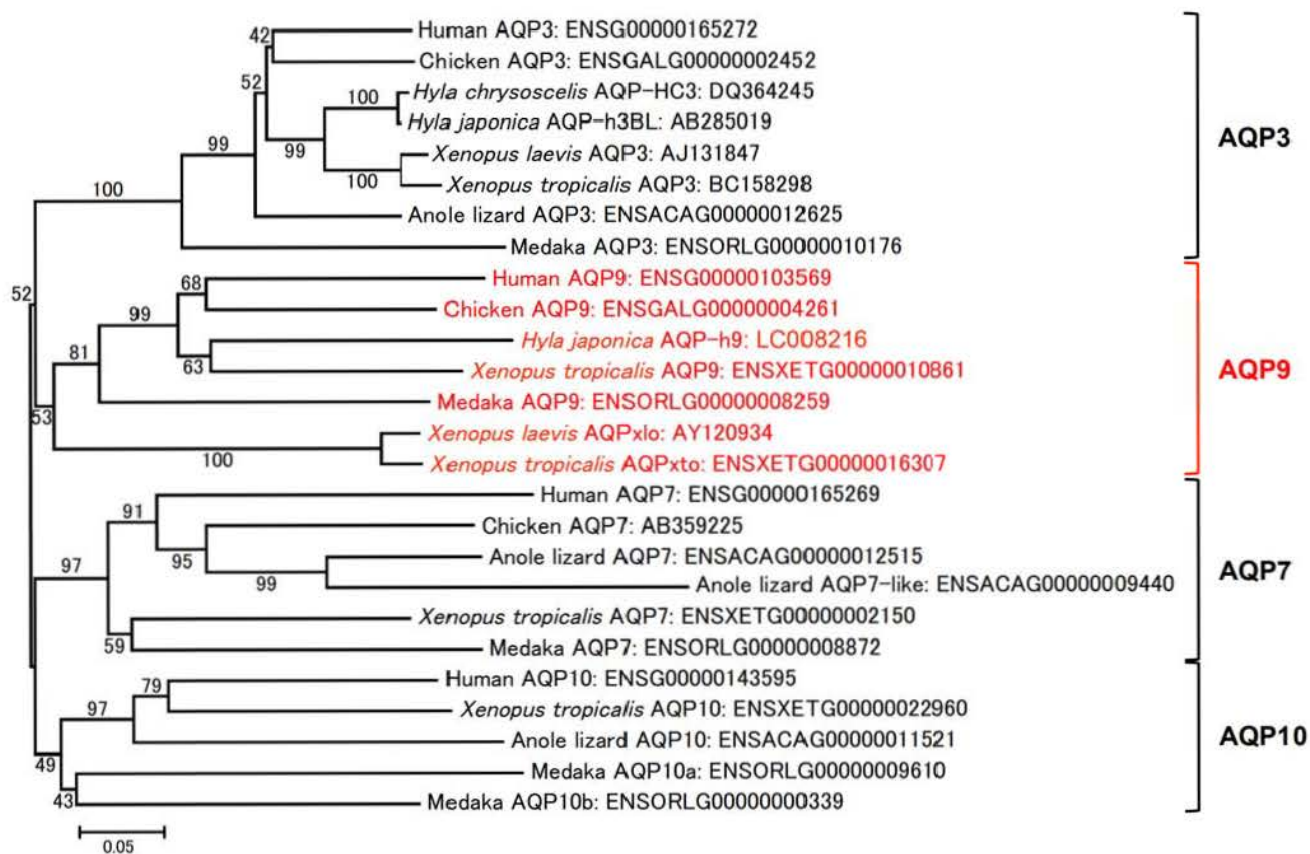


図3-2. 魚類から哺乳類までのアクアグリセロポリンの近隣結合法による分子系統樹

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	MRERRSCLEKLA----LRNSLARETLSEFFGTCLLVTFCCSIATAVLN-----YGSSGGTL	53
AQP-h3BL	MGRQKEVLNSISGMLRIRNKLIHQALAECLGTLILVMFGCGSVAQVVLS-----KGSGLFL	57
AQP-h1	-----MASEFKMAFWRAVIAEFLAMIMFVFISIGAALGFNFPIQEKTNETVGRTQDIV	54
AQP-h2K	-----MMIVRLWELRSVAFTRAVFVEFFATLLFVMFGIGSSLNW-----PGAPPSVL	47
AQP-h2	-----MKEMCTGPFTRAFAGELIGTSIFVFFGLGSAMSW-----PSALPTVL	42
AQP-h3	-----MLKELCAGFNFKAFLAELIATLVFVFVGLGSTLSW-----TGALPTVL	43
AQP-h9	GATVGC SLAVTMAIYASGGVSGGHVNPVVSFAMSMIGKLPWVKLPFYITAQFLG AITGSAAVFGV	118
AQP-h3BL	TVNLAFGFVAVMLGILIAGQVSGGHINPAVTFALCIMAREPWIKFPVYT LAQTLGAFLGAGIVYGL	122
AQP-h1	KVSLAFGLSIATMAQSVGHISGAHINPAVTLGCLLSCQISILKAVMYIIAQCLGAVVATAILSGI	119
AQP-h2K	QVALAFGLGIGTLVQAFGHISGAHINPAVTLAFMVGSQISFMRAVVFYVGAQLLGAVSGAAIIQGL	112
AQP-h2	QIAFTFGLGIGTLVQTFGHISGAHINPAVTVAFVSSQISLFRAVCYVCAQLLGAVIGAALLYQF	107
AQP-h3	QIAFTFGLGIGTMVQAVGHISGAHINPAVTIALLVGARISLIQTVFYVIAQMLGAVIGAALLYEF	108
AQP-h9	YDALMAYSGGVFRVTGHNATAQIFATYPSPYLSTLNGLVDDMMSTALLMLIFAIFDKKNMPAP	183
AQP-h3BL	YYDAIWYFANDQLYVMGRNGTAGIFATYPTHELTLMNGFFDQFIGTAALVVCVLAIVDPYNNPIP	187
AQP-h1	TSNLAGNTLG-----LNGLSNGVTAGQGLGVEIMVTFQLVLCVAVTDRRRRDV-	168
AQP-h2K	TPFEVRGNLS-----VNGLEINTEAGKAFVVELFTLQLILCIFASTDDRRDTI-	161
AQP-h2	TPEDVHGSFG-----VNMPSNATEGOAVTVEIILTQLVLCIYACTDDRRDDN-	156
AQP-h3	SPSDIRGGFG-----VNQPSINTSPGQAVAVEIILTMQLVLCIFATTDSSRRDTN-	157
AQP-h9	RGLEPVAVGLLILTALPLRSNCGAAMNPARDLGPRIFTALAGWGPEVFTAGGSFWWIPVVGPM L	248
AQP-h3BL	RGLEAFTVGFVVLVIGLSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTALAGWGTEVFSAGGQWWWPIVSP L L	252
AQP-h1	SGSVPLAIGLSVALGHLIAIDYTGCGMNPARSFGS-----AVVAKNFQYHWIFWVGPMI	222
AQP-h2K	VGSPALSIGLSVTLGHLGLIYYTGCGMNPARSFAP-----AVVTGDFNAHWVFWLGPLF	215
AQP-h2	VGSPSLSIGLSVVLGHLVGIYFTGCGMNPARSFGP-----ALVVGNFNTHWIFWIGPFV	210
AQP-h3	IGSPAISIGLSVVLGHLGLIYYTGCGMNPARSFGP-----ALITGNFEYHWIFWVAPIT	211
AQP-h9	GAVIGSYIYILCIDIHKKEPDHEMDPDHFEKHELANMTE---KPKTRC-----	294
AQP-h3BL	GAFAGVLVYQLMIGCHIEPAPESTEQ---ENVKLSNVKH---KERI-----	292
AQP-h1	GGAAAIYDFILAPRTSDIITDRLKVWTNGQVEEYELDGE---DARMEMKPK-----	271
AQP-h2K	GATVGS LMYNFIFIPNTKTFISERIAILRGELEPOEDWEERDMRRRQSMELHSTQTIPRSGMTEKV	280
AQP-h2	GAILASLIYNYVLCPEQSEISEKLSVLLGRIPAMQEEED---WEERQEQPRRKSMELQTL---	268
AQP-h3	GAIFACLIYDIYFAPQFISERLEILRGNILQENEKEER---RKQSVGLNSVYSQTSNKEKM--	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

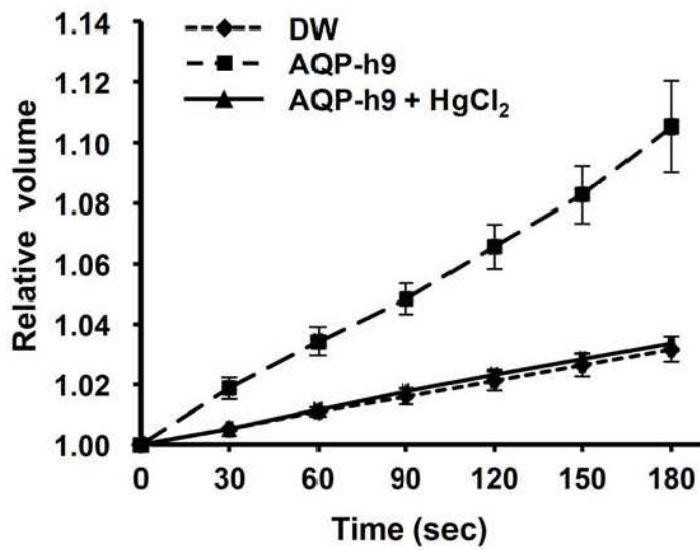
上線はAQP-h9の推定膜貫通領域、◆はNPAモチーフ、●はN型糖鎖結合部位、△はプロテインキナーゼCによるリン酸化部位、▲はプロテインキナーゼAによるリン酸化部位、◇は水銀感受性部位を示す。最適な類似性を得るためアミノ酸残基間にギャップを挿入した (-)。それぞれのAQPのアクセッション番号および引用文献は次の通りである。AQP-h9 (LC008216)、AQP-h3BL (AQP3, BAF63030)、AQP-h1 (AQP1, BAC07470)、AQP-h2K (AQP2, BAF80993)、AQP-h2 (AQPα2U, BAC82379; Shibata et al. 2014a)、AQP-h3 (AQPα2S, BAC07471; Shibata et al. 2014a)。



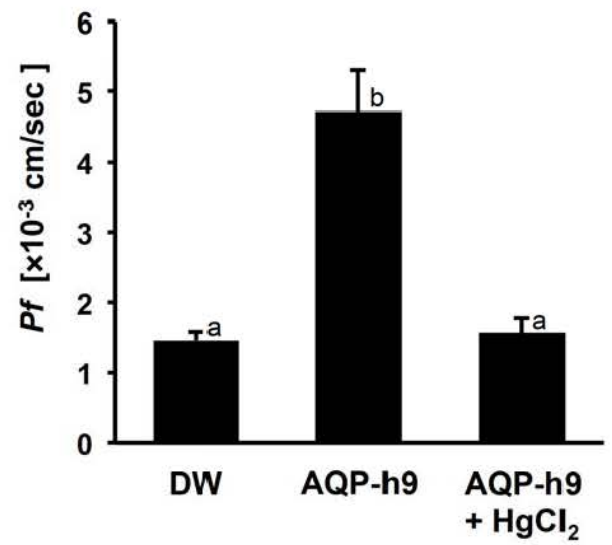
図3-4. ニホンアマガエルの種々の組織におけるAQP-h9 mRNAの発現

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。

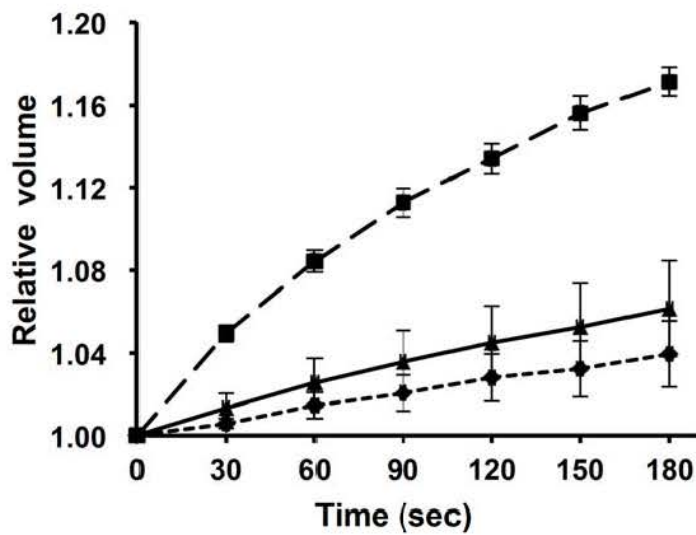
A



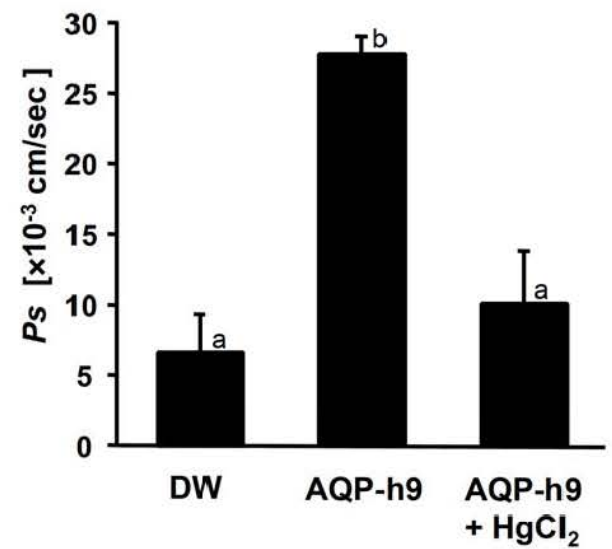
B



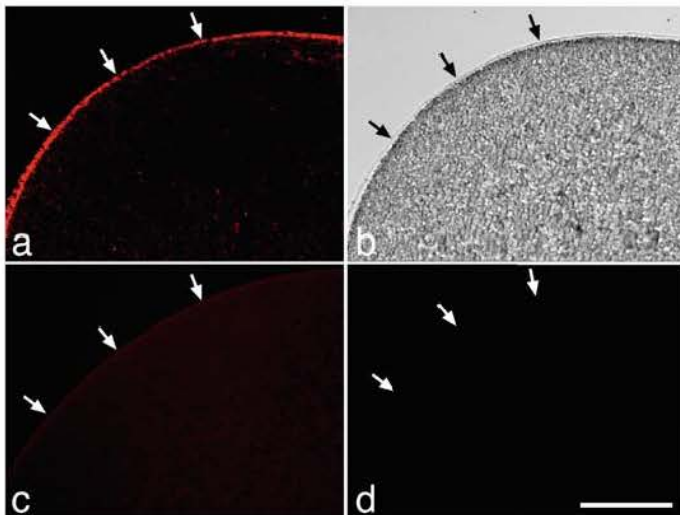
C



D



E



F

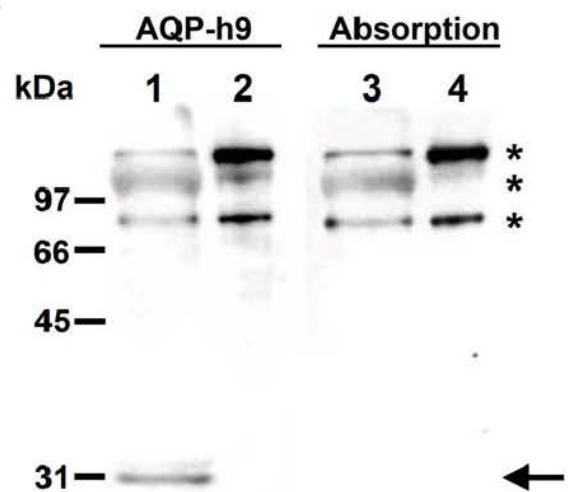


図3-5. アフリカツメガエル卵母細胞を用いたAQP-h9の水およびグリセロール透過能測定

- (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 (P_f)。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 (P_s) 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AQP-h9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ェ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 (qPCR) 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

工業（群馬）に依頼した。

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 μ m 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 μ g/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 μ l、それぞれのプライマー 0.5 μ l（終濃度 0.4 μ M）、FastStart Essential DNA Green Master 5 μ l（Roche Diagnostics）および DW を含む 10 μ l 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°C、5 分間の変性に続き、95°C、10 秒間の変性、65°C、10 秒間のアニーリング、72°C、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°C から 97°C 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。qPCR 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

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 \pm 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委縮が見られ、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

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、AQP-h9 は凍結に曝された際の赤血球の凍結耐性に寄与している可能性

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 AQP9 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 AQP9 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. chrysosceli* 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 AQP_{xto} 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://ensembl.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 AQP_{xto} 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 AQP_{xto} 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 AQP_{xto} 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-_{xt}5a および AQP-_{xt}5b, Shibata et al. 2014b) が存在し、トノサマガエル等には 2 タイプの AQP_a2 (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、AQP_{xto} 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。

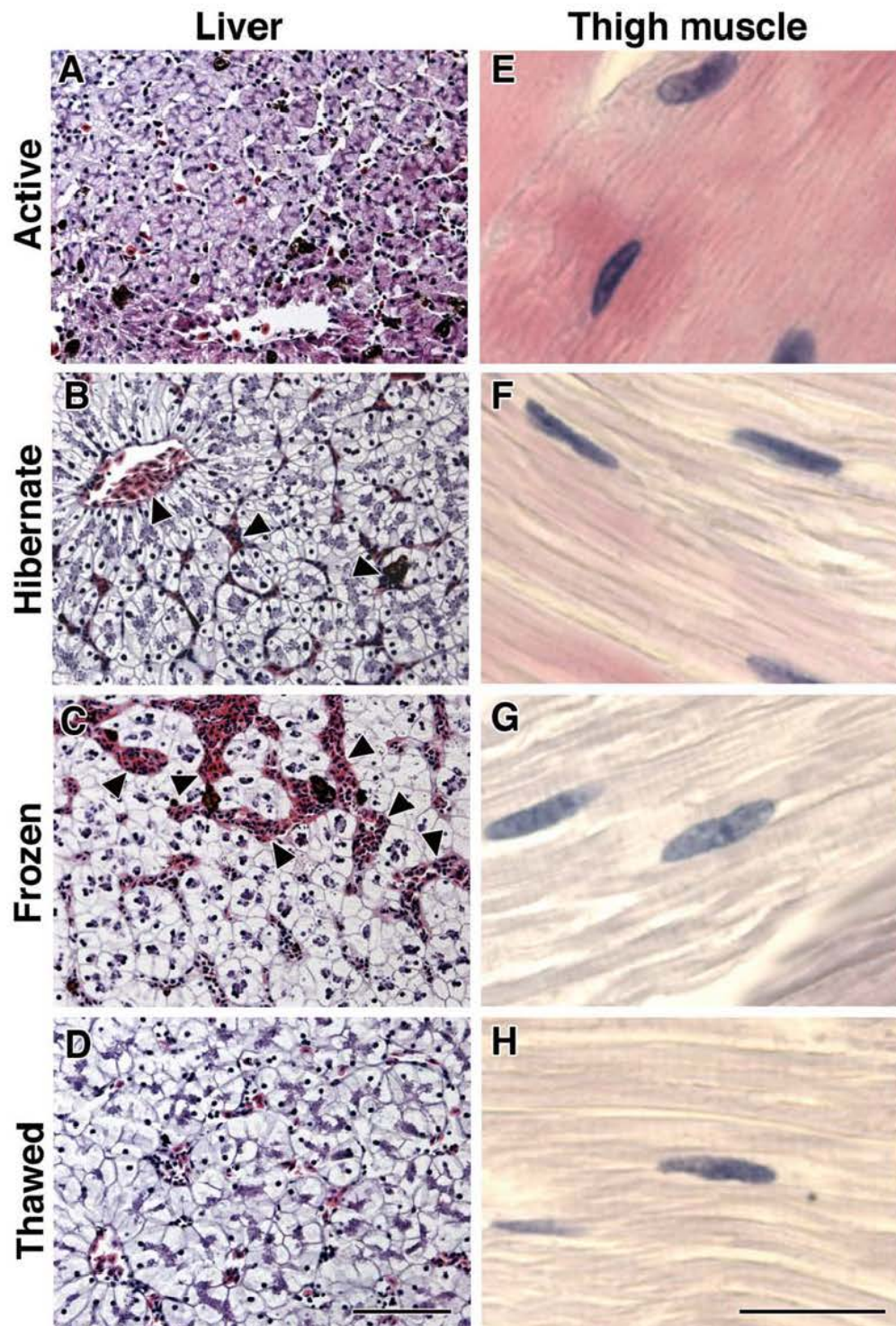


図4-1. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓および骨格筋のHE染色像

A-D: 肝臓の染色像。Bar = 50 μm 。鋳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。

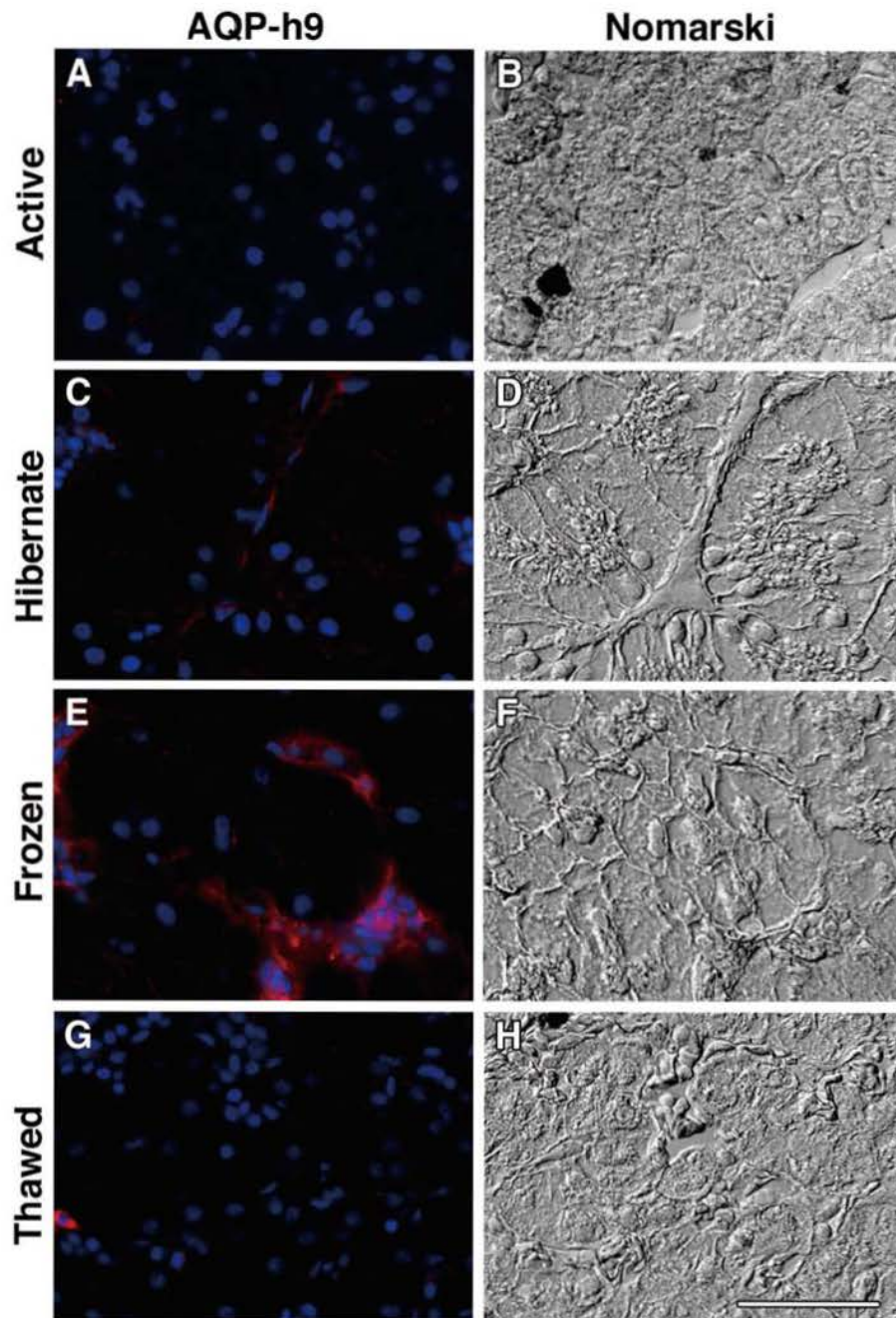


図4-2. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓におけるAQP-h9の免疫蛍光染色

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 μ m。

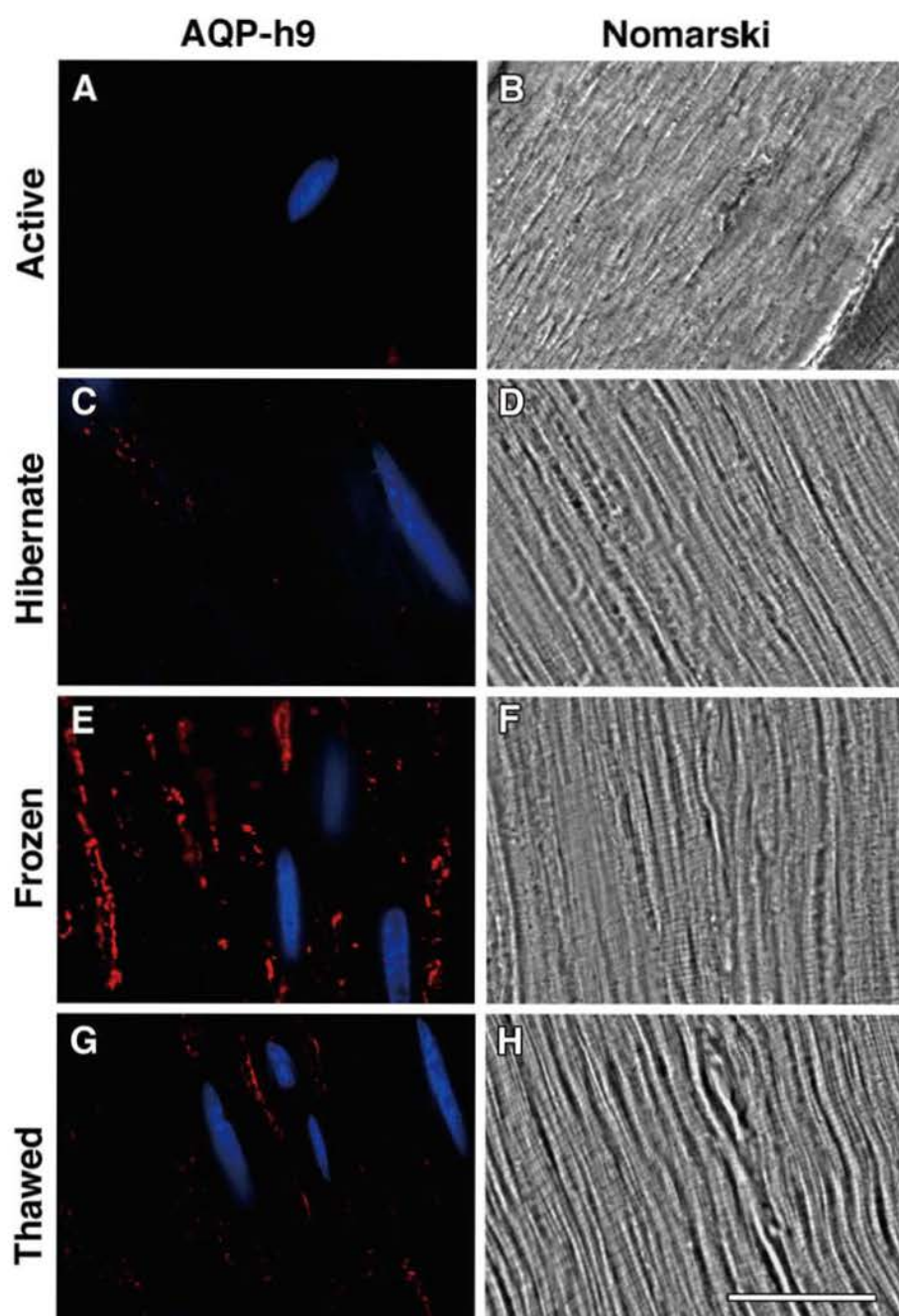


図4-3. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの骨格筋におけるAQP-h9の免疫蛍光染色

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 μ m。

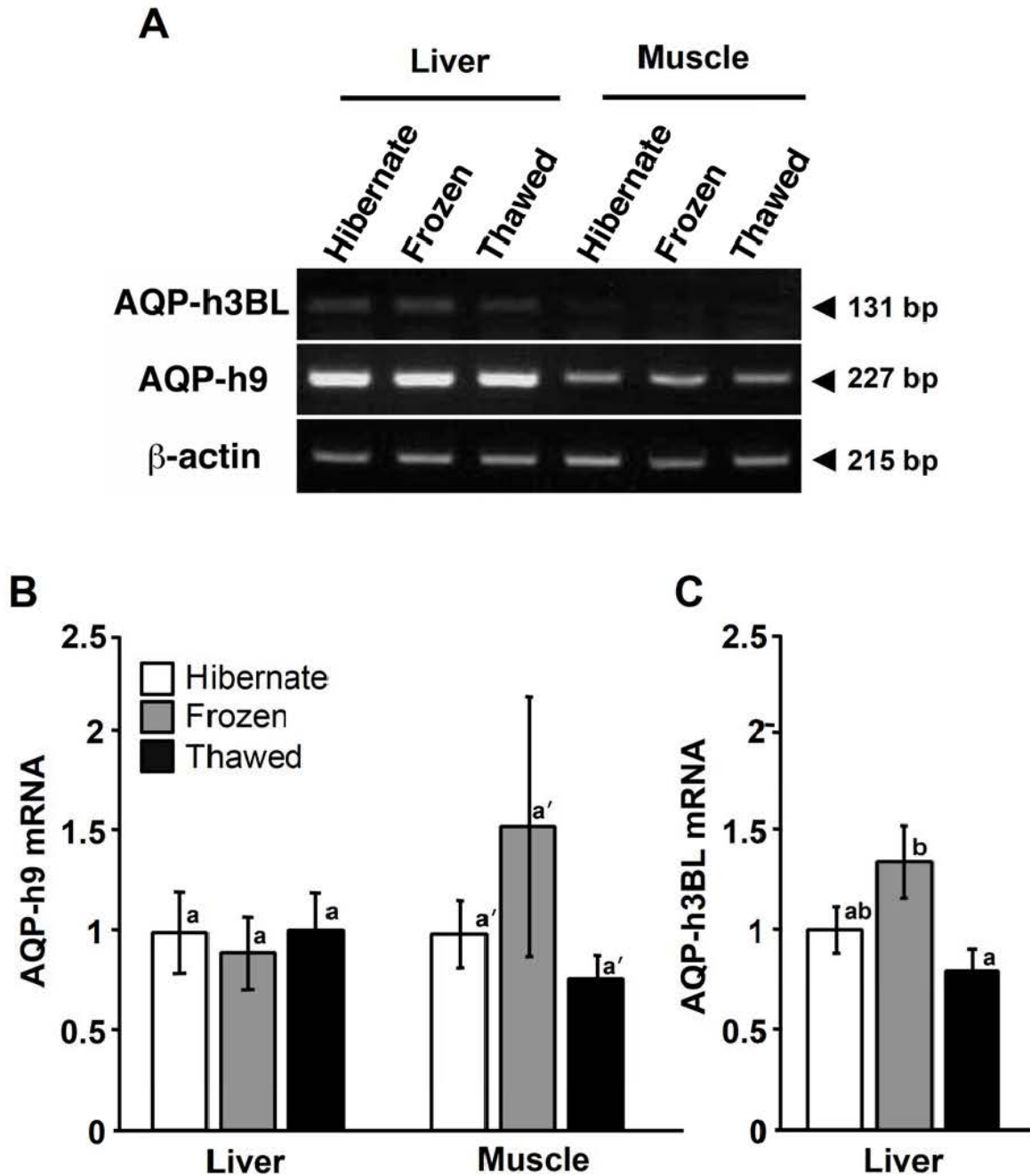


図4-4. 凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓および骨格筋におけるAQP-h3BLおよびAQP-h9の mRNAの発現

- (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 \pm 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 \pm 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どうか、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°C 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、AQP-h9 は他の脊椎動物の AQP9 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。

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°C 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 AQP-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. chrysoscelis* 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、ニホンアマガエルの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 AQP-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 AQP9 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 AQP 遺伝子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 AQP-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. chrysoscelis* 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に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. Petenunci, 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.