

(課程博士・様式7) (Doctoral qualification by coursework, Form 7)

学 位 論 文 要 旨

Abstract of Doctoral Thesis

専 攻：バイオサイエンス

氏 名：廣田 敦司

Course :

Name :

論文題目：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

Title of Thesis :

論文要旨：

Abstract :

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 bp の翻訳領域、63 bp の 5'-非翻訳領域、および 780 bp 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。