

研究紹介

ニワトリにおける肝臓と腎臓の
アクアポリン (AQP) 遺伝子発現に
対する絶食と再給餌の影響

齋藤 昇

(応用動物科学コース)

Effect of fasting and re-feeding on
aquaporin gene expression in liver and
kidney of the chicken

Noboru Saito

(Course of Applied Animal Science)

Aquaporin (AQP) which is a water channel, is also including the group (aquaglyceroporin) letting glycerol or urea go through as well as a water molecule. In mammals, AQP7 and AQP9 which are aquaglyceroporin have a role in the transportation of glycerol related to the gluconeogenesis in the liver. It is reported that AQP9 increases uptake of glycerol in the liver, when blood glucose level decreases. This study investigated the effect of AQP9 and AQP7 mRNA levels in liver and kidney in relation to the fasting and the re-feeding in the chicks. The purpose of this study was to determine whether the functions of AQP9 and AQP7 in the chicks are similar to mammals. One-day old chicks were kept with free access to water and food until 7-days old. At 7-days old, chicks were divided into three groups of 6 chicks : a control groups with free access to food and water and a fasting group with free access to water but not to water for 24 hours, a re-feeding group with free access to food and water for 6 hours after fasting treatment. At the end of the experiments all the chicks were sacrificed and blood and tissues (liver and kidney) were taken for measurement of blood glucose levels and mRNA levels. Total RNA extracted and reverse transcription was performed. AQP7 and AQP9 and the phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) mRNA levels were measured by using real-time PCR. In the fasting group, body weight significantly decreased as compared with control group, but blood glucose levels did not decrease. In the re-feeding groups, blood glucose levels significantly increased as compared with control group and fasting group. In the liver, the fasting and the re-feeding treatment did not affect AQP7 and AQP9 mRNA levels. In the kidney, the fasting did not affect AQP7 and AQP9 mRNA levels, but the re-feeding treatment significantly increased AQP7 and

AQP9 mRNA levels. In the liver, PEPCK mRNA levels significantly decreased in fasting group and further decreased in the re-feeding group. The re-feeding treatment significantly increased PEPCK mRNA levels in the kidney. From these results, kidney may play a roll in the increase of blood glucose levels at the re-feeding. But, a roll in gluconeogenesis of liver is not clear in the chicks. Therefore, further study is necessary to understand the gluconeogenesis in the chicks.

Key words : chicken, aquaporin, plasma glucose, fasting, liver

緒言

グルコースは、動物において日常のエネルギー供与体として重要であり、動物は常に血糖値（血液中グルコース濃度）をある一定範囲内に保つような機能を備えている。もし、血糖値が低下すれば、肝臓のグリコーゲンが分解され血中にグルコースを供給することとなる。しかし、グリコーゲン分解によるグルコース供給だけでは長時間の絶食には不十分であるため、糖新生として炭水化物以外の物質から糖を合成する能力が動物には備わっている。この糖新生の材料のひとつが、グリセロールである¹⁾。

グリセロールは三価アルコールであり、グリセロールと脂肪酸3分子がエステル結合したトリグリセリドとして脂肪細胞内に蓄えられている。そして、絶食時には脂肪細胞のトリグリセリドが、ホルモン感受性リパーゼによりグリセロールと遊離脂肪酸に加水分解されて血中に放出される。このグリセロールが、肝臓や腎臓などのグリセロールキナーゼを持つ器官において取り込まれ糖新生に利用される。このような糖新生のために遊離脂肪酸を輸送する機構は、解明されている^{2,3)}。他方、脂肪細胞などからのグリセロール放出や、肝臓・腎臓へのグリセロールの取り込みのメカニズムは近年まで解明されていなかった。しかし、グリセロールを通すアクアポリン (aquaporin, AQP) の発見により、そのメカニズムが次第に明らかになってきた。

AQPは、動物、植物、昆虫、酵母やバクテリアなど多岐にわたって発現している疎水性の複合膜タンパクである。現在 AQP は、選択的に水分子を通すグループと、水分子以外にもグリセロールや尿素などを通すグループ (アクアグリセロポリン, aquaglyceroporin) に機能的に区別されている。哺乳類ではこれまでに13種類の AQP が同定されているが、このうち AQP3, AQP7, AQP9, AQP10 はアクアグリセロポリンに属する⁴⁾。そして、哺乳類において、このアクアグリセロポリンの中の AQP7 が脂肪組織からのグリセロール分泌に関与するとされて

いる。また、AQP9が、肝臓におけるグリセロール取り込みを促進している。そして、AQP7とAQP9の双方の制御により血糖値が調節されているとする報告がなされている⁵⁾。AQP7は、哺乳類では主に脂肪細胞に発現し、その他にも精巣、精子、腎臓、骨格筋に発現している⁶⁾。AQP7は、脂肪細胞からのグリセロール分泌を促進し、脂肪蓄積の制御とグルコース代謝において重要な役割を担っている。AQP7欠損マウスは、加齢や高脂肪食摂取により肥満になり、2型糖尿病を呈することが報告されている^{6,7)}。また、AQP7 mRNA 発現量は、絶食により増加し、逆に再給餌やインスリンによって抑制されるということも報告されている⁸⁾。

AQP9は、水やグリセロール、尿素、乳酸といった様々な物質を通すことが報告されている。哺乳類において、AQP9は主に肝臓で発現し他にも精巣、脳、白血球などで発現している⁹⁾。ラットの肝臓におけるAQP9 mRNA 発現レベルは絶食により増加し、再給餌によって徐々に減少することが確認されている¹⁰⁾。また、AQP9 ノックアウトマウスは、血漿グリセロール濃度および血漿トリグリセリド濃度が野生型マウスより高いとした報告もある¹¹⁾。これらのことから、AQP9は、肝臓へのグリセロール取り込みに関与していると考えられている。

ニワトリの血糖値は、哺乳類の約2倍であり、絶食期においても血糖値は低下しにくく高血糖状態が保たれる¹²⁾。この要因のひとつの可能性として、ニワトリでは、肝臓と腎臓における糖新生が活発に行われていることが上げられている。哺乳類の糖新生は大部分が肝臓に由来することに対して、ニワトリの糖新生の約30%は腎臓において行われる¹³⁾。そのため、高血糖値を維持するニワトリにおけるアクアグリセロンの遺伝子発現調節機構は、哺乳類とは異なる可能性が大きい。したがって、本研究ではニワトリを用いて、絶食処理により糖新生に関わる肝臓および腎臓におけるアクアグリセロリン(AQP7とAQP9)および糖新生に関わるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)¹⁴⁾の遺伝子発現が、絶食あるいは再給餌による血糖値の変化によってどのように変化するのか調べることを目的とした。

材料および方法

1日齢の雄の白色レグホーンニワトリは、中部科学資材株式会社(名古屋)から購入した。照明条件は24時間明期とし、餌と水ともに自由摂取のもとで7日齢まで群飼した後、以下の条件のように3群に分けた。①コントロール群:餌と水ともに自由摂取とし、処理開始24時間後にサンプリングを行った。②絶食処理群:餌は与えず、水のみ自由摂取とし、処理開始24時間後にサンプリングを行った。③再給餌処理群:絶食処理群と同様の条件で24時間飼育後、餌と水ともに自由摂取の条件で6時間飼育しサンプリングを行った。

ヒヨコは、体重を測定し血液を採取した後、断頭し、肝臓と腎臓を採取した。肝臓と腎臓の組織は、採取後すぐに液体窒素によって凍結させ、total RNA 抽出まで -80°C で保存した。

1. 血糖値測定

採取した血液は、 4°C 、3000 rpm において10分間遠心分離した後、血紫のみを分離し、血糖値測定まで -20°C で保存した。血糖値の測定は、グルコース CII-ワコーテスト(和光純薬工業、東京)を用い、キットの手順にしたがい測定した。

2. 遺伝子発現解析

肝臓と腎臓からの total RNA の抽出は、QuickGene RNA tissue kit SII (RT-S2) RNA 組織キット II (FUJIFILM、東京)および QuickGene-Mini 80 (FUJIFILM、東京)を用いて行った。すべての操作は、キットの手順に従って行った。total RNA を抽出後、分光光度計(SmartSpec 3000, BIO-RAD Laboratories, CA)により RNA 濃度を測定し、抽出した total RNA 溶液は -80°C で保存した。

逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて、キットの手順に従って行った。逆転写反応液は、10倍希釈し -20°C で Real-Time PCR に用いるまで保存した。

各遺伝子の発現解析は、Real-Time PCR により行った。Real-time PCR は、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa) を用い、キットの手順にしたがい行った。PCR 反応は、MiniOpticon[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) を用い、Real-Time PCR 反応 [条件: 95°C で10秒, 95°C で5秒, 60°C で20秒, 72°C で10秒を1サイクルとして40サイクル]を行い、PCR 産物の増幅をリアルタイムでモニタリングした。用いたプライマーは、AQP7 (forward: 5' AAC TTC CAG TTT ATC TGC TTG 3'; reverse: 5' CTG TGG CAG TTG GTC CTG TCA 3'), AQP9 (forward: 5' CAG CGG CTG TCT TTG GGA TTT 3'; reverse: 5' CAA AGA TAT GTG CTG TTG CGT AAG G 3'), PEPCK (forward: 5' CAA TGG CTG TGT CCG CTT GGT 3'; reverse: 5' AAT GGG AAG CTG CCG TTT GGA 3'), S17R (forward: 5' TAC ACC CGT CTG GGC AAC GAC 3'; reverse: 5' CCG CTG GAT GCG CTT CAT CAG 3') である。得られた mRNA 量は s17 によって補正した。データはすべて平均値 \pm SEM で表した ($n=4-8$)。得られた各群のデータは、One-way Analysis of Variance (One-way ANOVA) 検定を用いて有意差の検定を行った。

結 果

1. 体 重

絶食処理群のヒヨコの体重は、24時間の絶食によりコントロール群と比べて平均で約13g 有意に減少した。一

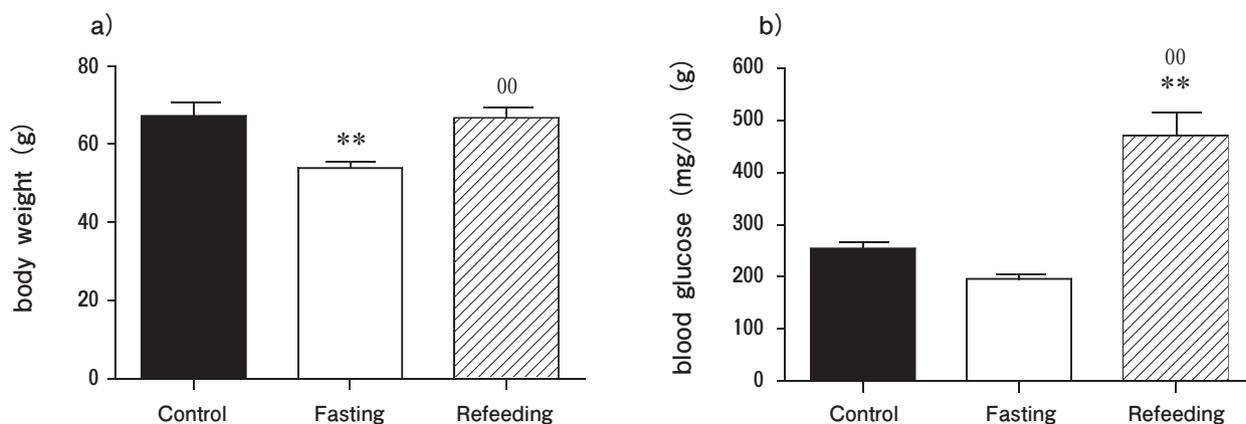


Fig. 1 Body weight and plasma glucose levels after 24 hr fasting and re-feeding. Results are indicated as the mean \pm SEM (n=4-6). ** shows significant different from the control groups ($p < 0.01$). 00 shows significant different from the fasting groups ($p < 0.01$).

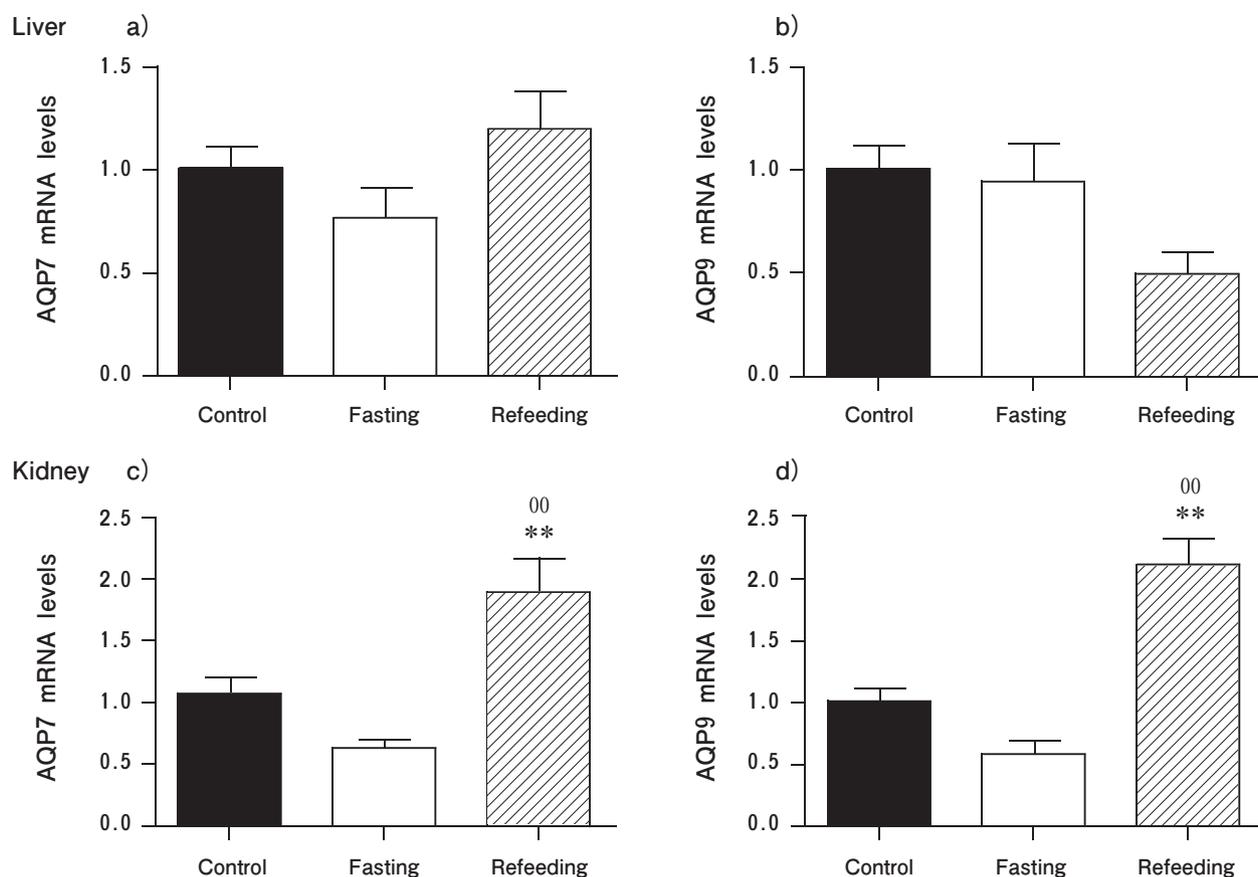


Fig. 2 AQP 7 and 9 mRNA levels in liver and kidney after 24 h fasting and re-feeding. Results are indicated as the mean \pm SEM (n=4-6). ** shows significant different from the control groups ($p < 0.01$). 00 shows significant different from the fasting groups ($p < 0.01$).

方、再給餌処理群のヒヨコの体重はコントロール群とほぼ等しかった。また、絶食処理群と再給餌処理群の体重には、有意差が見られた (Fig. 1 a)。

2. 血糖値

絶食処理群の血糖値はコントロール群と比べて減少す

る傾向がみられたが、有意差は観察されなかった。一方、再給餌処理群の血糖値はコントロール群と比べて著しく上昇し、有意差が見られた。また、絶食処理群と再給餌処理群の間の血糖値には、有意差が見られた (Fig. 1 b)。

3. 肝臓における AQP mRNA 発現量

3-1. AQP 7mRNA 発現量

絶食処理群の肝臓における AQP7 mRNA 発現量は、コントロール群と比べてやや減少傾向にあったが、有意差はみられず、再給餌処理群の発現もコントロール群と比べてほとんど変化がなく、有意差も見られなかった (Fig. 2 a).

3-2. AQP9 mRNA 発現量

絶食処理群の肝臓における AQP9 mRNA 発現量は、コントロール群と比べほとんど変化が見られなかった。再給餌処理群もコントロール群と比べて減少する傾向が見られたが、有意差が見られなかった (Fig. 2 b).

4. 腎臓における AQP mRNA 発現量

4-1. AQP7 mRNA 発現量

絶食処理群の腎臓における AQP7 mRNA 発現量は、コントロール群と比べて減少する傾向が見られたが、有意差が見られなかった。再給餌処理群は、コントロール群と比べて有意に上昇し、有意差が見られた (Fig. 2 c).

4-2. AQP9 mRNA 発現量

絶食処理群の腎臓における AQP9 mRNA 発現量は、コントロール群に比べて減少したが、有意差は見られなかった。再給餌処理群は、コントロール群に比べて増加し、有意差が見られた。絶食処理群と再給餌処理群の間にも、有意差が見られた (Fig. 2 d).

4-3. 肝臓と腎臓における PEPCK mRNA 発現量

肝臓における PEPCK mRNA 発現量は、コントロール群と比べ絶食により有意に減少し、再給餌するとさらに低下し、再給餌処理群は絶食群よりも有意に低下した (Fig. 3 a).

腎臓における PEPCK mRNA 発現量は、コントロール群と比べ絶食により増加する傾向が見られたが、有意な変化ではなかった。再給餌処理群は、PEPCK mRNA 発現量が、コントロール群や絶食群に比べ有意に増加した (Fig. 3 b).

考 察

ニワトリのヒヨコの1日の絶食では、体重は有意に減少したが、血糖値は低下傾向を示したが、有意にまで低下しなかった。このことは、ニワトリの高血糖維持の機能が哺乳類よりも強いことが示唆された。このような、絶食により血糖値が十分に低下しなかったためか、肝臓と腎臓の AQP7 と AQP9 の遺伝子発現に対しては、有意な変化が観察されなかった。マウスでは18時間の絶食で肝臓の AQP9 mRNA 発現量は約2.5倍に増加し、12時間の再給餌でコントロールの値に戻るという報告がある⁵⁾。また、ラットにおいても肝臓の AQP9 mRNA 発現量について同様の変化が報告されている¹⁰⁾。ニワトリ肝臓の AQP9 mRNA 発現量が再給餌によって変化が見られず、糖新生に関わる PEPCK の遺伝子発現も減少しており、本実験結果からは肝臓があまり糖新生と関わりがないことが示された。したがって、哺乳類と絶食や再給餌などの短期間では、肝臓はあまり糖新生と関わりがないと考えられた。

再給餌処理における血糖値の急激な上昇に対し、腎臓の AQP7 と AQP9 の遺伝子発現がともに有意に増加し、PEPCK 遺伝子発現も有意に増加し、血糖値の上昇に腎臓が大きく関わっている可能性を示唆した。それに対し、肝臓の AQP7 と AQP9 の遺伝子発現では、有意な変化が観察されず、PEPCK 遺伝子発現は低下することが観察されたことから、肝臓は血糖調節には大きく関与しない可能性が示唆され、哺乳類の大きく異なる可能性が示唆された。

ニワトリヒナの血糖値は、絶食によって有意に低下したが割合としては、哺乳類などと比べ低い割合であり、24時間の絶食の間に糖新生が新たに刺激されなかった可能性がある。腎臓においては、絶食により PEPCK 遺伝子発現の増加傾向が見られたが、有意差がみられなかつ

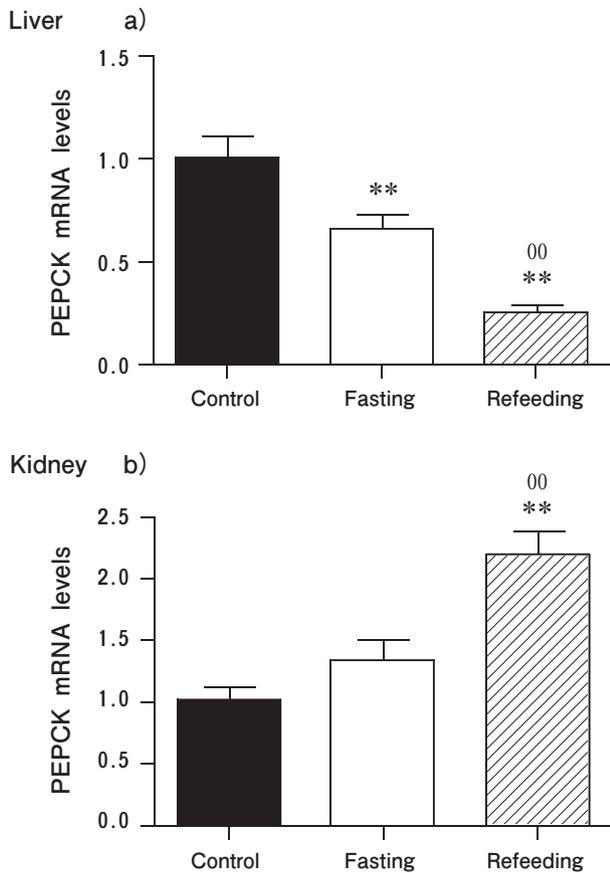


Fig. 3 PEPCK mRNA levels in liver and kidney after 24 h fasting and re-feeding. Results are indicated as the mean \pm SEM (n=4-6). ** shows significant different from the control groups (p<0.01). 00 shows significant different from the fasting groups (p<0.01).

た。他の考えとして、元々ニワトリにおいて糖新生が活発に行われており、絶食時にも糖新生のレベルが変化しなかった可能性である。ニワトリは常に糖新生を活発に行うことにより、哺乳類の約2倍という高血糖状態を維持しているのかもしれない。また、ニワトリは血糖値の変化を敏感に感知して絶食開始直後に糖新生を活発に行ったため、24時間後にはその変化がなくなったという可能性である。ニワトリは絶食時にも高血糖状態を維持するという報告がある。これは、わずかな血糖値の低下を感知して糖新生が活発に行われる能力が備わっていることに起因するのかもしれない。以上のように、絶食処理では確認ができなかったが、再給餌処理によるmRNA発現量の変化より、ニワトリ腎臓においてAQP9が糖新生におけるグリセロール取り込みに関与していることが示唆された。

また、AQP7ノックアウトマウスは、高い尿中グリセロール濃度を示すことから、腎臓においてAQP7はグリセロールの再吸収に関与している可能性が示唆されている¹⁵⁾。もし絶食によって糖新生が活発に行われたならば、AQP9 mRNA発現量は絶食により増加することが期待される。したがって、哺乳類における腎臓におけるアクアグリセロポリンは、糖新生よりもむしろグリセロールの再吸収に関与している可能性が高いと考えられる。しかし、ニワトリではPEPCKの遺伝子発現と考え合わせると、糖新生に腎臓が大きく関わっている可能性が示唆された。

本研究ではこれまでに報告のないニワトリにおけるアクアグリセロポリンをターゲットとし、その遺伝子発現が血糖値によってどのように変化するかということ初めて調査した。そして結果から、腎臓のAQP9は糖新生におけるグリセロールの取り込みに関与している可能性が示唆された。本研究がニワトリにおけるアクアグリセロポリン研究の先駆けとなり、今後さらなる調査と考察がなされることを期待している。

参考文献

- 1) Landau, R. B., J. Wahren, V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Ekberg, and S. C. Kalhan : Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J. Clin. Invest.* **98**, 378-385 (1996)
- 2) Ockner, R. K., J. A. Manning, R. B. Poppenhausen, and W. K. Ho : A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, **177**, 56-58 (1972)
- 3) Mishkin, S., L. Stein, Z. Gatmaitan, and I. M. Arias : The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins : binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* **47**, 997-1003 (1972)
- 4) Verkman, A. S. : More than just water channels : unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell. Sci.* **118**, 3225-3232 (2005)
- 5) Kuriyama, H., L. Shimomura, K. Kishida, H. Kondo, N. Furuyama, H. Nisyizawa, N. Maeda, M. Matsuda, H. Nagaretani, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa : Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*, **51**, 2915-2921 (2002)
- 6) Hara-Chikuma, M., E. Sohara, T. Rai, M. Ikawa, M. Okabe, S. Sasaki, S. Uchida, and A. S. Verkman : Progeressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7 deficient mice : adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 15493-15496 (2005)
- 7) Hibuse, T., N. Maeda, T. Funahashi, K. Yamamoto, A. Nagasawa, W. Mizunoya, K. Kishida, K. Inoue, H. Kuriyama, T. Nakamura, T. Fushiki, and S. Kihara : Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 10993-10998 (2005)
- 8) Kishida, K., I. Shimomura, H. Kondo, H. Kuriyama, Y. Makino, H. Nishizawa, N. Maeda, M. Matsuda, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Kurachi, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa : Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J. Biol. Chem.* **276**, 36251-36260 (2001)
- 9) Elkjaer, M. L., Z. Vajda, L. N. Nejsun, T. H. Kwon, D. B. Jensen, M. AmiryMaghaddam, J. Frokiaer, and S. Nielsen : Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **276**, 1118-1128 (2000)
- 10) Carbrey, J. M., D. A. Gorelick-Feldman, D. Kozono, J. Praetorius, S. Nielsen, and P. Agre : Aquaglyceroporin AQP9 : Solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 2945-2950 (2003)
- 11) Rojek, A. M., M. T. Skowronski, E. M. Fuchtbauer, A. C. Fuchtbauer, R. T. Fenton, P. Agre, J. Frokiaer, and S. Nielsen : Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 36093-614 (2006)
- 12) Belo, P. S., D. A. Romsos, and G. A. Leveille : Blood metabolites and glucose metabolism in the fed and fasted chicken. *J. Nutr.* **106**, 1135-1143 (1976)
- 13) Tinker, D. A., J. T. Brosnan, and G. R. Herzberg : Interorgan metabolism of amino acid, glucose, lactate, glycerol and uric acid in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biochem. J.* **240**, 829-836 (1986)
- 14) Hanson R. W., L. Reshef : Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 581-611 (1997)
- 15) Sohara, E., T. Rai, J. Miyazaki, A. S. Verkman, S. Sasaki, and S. Uchida : Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **289**, F1195-F1200 (2006)