

40

助成番号 0040

鳥類における浸透圧受容体について

助成研究者：齋藤 昇(名古屋大学大学院生命農学研究科)

浸透圧受容体が脳に存在し、浸透圧の上昇などを感知して抗利尿ホルモンあるいはアンギオテンシンIIなどを分泌を刺激することは、概念的には古くから言われているが実体は未だ明らかではない。

アクアポリンは細胞膜にある水を通過させるチャンネルであり、様々な器官に存在する。28 kDaのチャンネルを形成するタンパクが初めてアクアポリンとして同定された。アクアポリン4は、このグループの中で最近新たに見つかったものである。アクアポリン4は、広く体の中で分布するがそのmRNAの発現は中枢神経では他の組織に比べ10倍以上高い。insituハイブリダイゼーションの結果、ラットの脳で脳室周囲器官やSON、PVNなどの存在した。アクアポリン4のこの分布は、何らかの生理的な機能を示唆する。脳の細胞の水分の出入りがアクアポリン4を通過して起きるとするならば、アクアポリン4が浸透圧受容体の機構やAVPの分泌の中心にあるのかも知れないことを示唆している。鳥類においては、アクアポリンが現在までにどのタイプもクローニングされていない。申請者は、アクアポリンを鳥類で最初にクローニングするとともにこの遺伝子発現をしらべ、浸透圧調節との関係で生理的作用を調べるために本研究を行った。

材料及び方法

ニワトリの視床下部からtotalRNAを抽出し、そのtotalRNAを逆転写酵素によりcDNAを合成した。このcDNAを用いて、PCRを行った。プライマーは、ヒトのアクアポリン4から作成した。このPCR産物をTAベクターにサブクローニングし、シーケンスした。

孵化後2日齢のヒヨコを一日絶水したのち、脳を取り出しtotal RNAを抽出し、RT-PCRにより絶水した場合とコントロールにおける視床下部におけるアクアポリンの遺伝子発現を比較した。

結果および考察

約368bpのPCR産物の塩基配列が決まり、この塩基配列をホモロジー検索したところ、ヒトやマウスのアクアポリン4と非常に高い相関が得られた。したがって、このPCR産物は、ニワトリにおけるアクアポリン4であると考えられた。まだ、塩基配列が一部しか決められていないので、現在RACE法を用いて5'と3'末端の塩基配列の決定を進めている。

アクアポリン4の遺伝子発現は、絶水することで遺伝子発現が高くなる傾向がみられた。したがって、このクローニングされたアクアポリン4が、ニワトリにおいて何らかの浸透圧調節に関与している可能性が示唆された。

5

助成番号 0040

鳥類における浸透圧受容体について

助成研究者：齋藤 昇 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

① 研究目的

浸透圧調節には、浸透圧受容体が脳に存在し、浸透圧の上昇などを感知して抗利尿ホルモンあるいはアンジオテンシン II などの分泌を刺激することは、概念的には古くから言われているが実体は未だ明らかではない (Verney, 1947)。脳内に存在する浸透圧受容体が浸透圧の変化を感知することにより、抗利尿ホルモンであるアルギニンバソプレッシン (AVP) あるいはアンジオテンシン II が分泌されるものと考えられている (Honda et al., 1990)。鳥類においても同様に、浸透圧が上昇すると鳥類の抗利尿ホルモンであるアルギニンバソトシン (AVT) が分泌され、浸透圧調節に作用すると考えられている (Saito et al., 1998; Saito et al., 1999; Saito et al., 2001)。そして、最近では浸透圧の受容体の機構としては、浸透圧の変化に伴う細胞の容積の変化を機械的に感じるものが、基本であると考えられている (Morris and Sigurdson, 1989; Oliet and Borque, 1993)。

アクアポリンは細胞膜にある水を通過させるチャンネルであり、様々な器官に存在する。28 kDa のチャンネルを形成するタンパクが初めてアクアポリンとして同定された (Denker et al., 1988; Park and Saier, 1996)。アクアポリン 4 は、このグループの中で最近新たに見つかったものである (Jung et al. 1994)。アクアポリン 4 は、広く体の中で分布するがその mRNA の発現は中枢神経では他の組織に比べ 10 倍以上高い。in situ ハイブリダイゼーションの結果、ラットの脳で脳室周囲器官や SON、PVN などに存在した。アクアポリン 4 のこの分布は、何らかの生理的な機能を示唆する (Nielsen et al., 1997)。脳の細胞の水の出入りがアクアポリン 4 を通過して起きるとするならば、アクアポリン 4 が浸透圧受容体の機構や AVP の分泌の中心にあるのかも知れないことを示唆している (Wells, 1998)。鳥類においては、アクアポリンが現在までにどのタイプもクローニングされていない。申請者は、アクアポリンを鳥類で最初にクローニングするとともにこの遺伝子発現をしらべ、浸透圧調節との関係で生理的作用を調べるために本研究を行った。

② 研究方法

1、クローニング

ニワトリの2日齢のヒナを断頭し、脳を取り出しすばやくドライアイスで凍結した。脳は、total RNA 抽出まで-80℃で凍結保存した。total RNA 抽出直前に脳はから視床下部の部分をナイフで切断し、視床下部から Trizol を用いて、使用方法に従い total RNA を抽出した。抽出した total RNA の 3 μ g は、Oligo-dT(18) をプライマーとして用いて、Superscript の逆転写酵素により cDNA を合成した。プライマーは、ヒトのアクアポリン4の塩基配列をもとにして作成した。PCR は、denature 94℃ 30 秒、annealing 55℃ 30 秒、extend 72℃ 30 秒の条件で 40 サイクル行った。この PCR 産物は、pGEM T-easy ベクターにサブクローニングし、シークエンスした。

2、遺伝子発現

孵化後 2 日齢のヒヨコを一日絶水したのち、脳を取り出し 1 と同様な方法で total RNA を抽出し、逆転写し cDNA を作成した。クローニングにより決まったニワトリのアクアポリン4の塩基配列からプライマーを作成し、PCR を行った。PCR の温度条件は、クローニングと同じであるが、サイクル数を 20 から 35 サイクルまで 5 サイクルごと PCR を行い、30 サイクルがまだ遺伝子増幅がプラトーに達していないため、30 サイクルが適当と認めた。PCR 産物は、電気泳動後エチジウムブロマイドで染色し、バンドの濃さを絶水した場合とコントロールの場合で比較した。コントロールとして、リボソームタンパクの S17 の遺伝子発現も調べた。

③研究成果

1、クローニング

ヒトのアクアポリン4から作成したプライマーを用いて行った PCR の産物の決定した塩基配列は、368 bp であった。この塩基配列をホモロジー検索した結果、ヒト、ラットやウシのアクアポリン4の塩基配列と非常に高いホモロジーを示した。塩基配列では、85% (ヒト)、85% (ラット)、85% (ウシ) であり、予想されるアミノ酸配列においては、85% (ヒト)、85% (ラット)、85% (ウシ) であった。

2、遺伝子発現

RT-PCR によりアクアポリン4の遺伝子発現は、絶水したヒヨコにおいてコントロールに比べ増加する傾向が見られた。

④考察

PCR産物は、ホモロジー検索の結果からこの遺伝子は鳥類における初めてのアクアポリン遺伝子の一部と考えられた。特に、ホモロジー検索から、この遺伝子は哺乳類のアクアポリン4と相同であると考えられた。しかしながら、塩基配列がまだ一部の遺伝子であることから、全塩基配列を決定しその遺伝子が確かに水チャンネルとして働いているかを定める必要がある。鳥類においてもアクアポリン遺伝子が存在することが明らかになったことから、鳥類においても哺乳類と同様にアクアポリンが水チャンネルとして作用していることが示唆され、他のサブタイプのアクアポリンも存在することが示唆された。

RT-PCRの方法により、ニワトリのアクアポリン4遺伝子の発現が絶水することにより、増加することが示唆された。しかしながら、本研究ではRT-PCR法を用いており、本方法では定量性が難しいなどの問題点があるが、アクアポリン4遺伝子の発現が低いためにノーザンブロット解析では検出できないために、本方法を用いた。今後、RNAプロテクションアッセイなどの方法を用いて、より定量的に遺伝子発現を調べる予定である。

⑤今後の課題

鳥類のアクアポリン4の遺伝子の一部分はクローニング出来たがまだ全長でないために全配列の決定をしなくてはならない。また、脳内における局在性を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって明らかにする必要がある。さらに、脳内におけるアクアポリン4の機能が明らかでないために、今後これらを明らかにするために遺伝子発現の機構を明らかにすると共にタンパク質での機能の研究から、アクアポリン4の機能を明らかにする必要があると考えられた。

⑥文献

Denker B. M., Smith B. L., Kuhajda F. P. and Agree P. (1988) Identification, purification, and characterization of a novel Mr 28000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.* 263, 15634-15642.

Honda K., Negoro H., Dyball R. E. J., Higuchi T. and Takano S. (1990) The osmoreceptor complex in the rat: evidence for interactions between supraoptic and other diencephalic nuclei. *J. Physiol.* 431, 225-241.

- Jung J. S., Bhat R. V., Preston G. M., Guiggino W. B., Baraban J. M. and Agre P. (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 13052-13056.
- Morris C. E. and Sigurdson W. J. (1989) Stretch-inactivated ion channels coexist with stretch-activated ion channels. *Science* 243, 807-809.
- Nielsen S., Nagelhus E. A., Amiry-Moghaddam M., Bourque C., Agre P., Ottenger O. P. (1997) Specialized membrane domain for water transport in glia cells: high resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* 17, 171-180.
- Oliet S. H. R. and Borque C W. (1993) Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* 364, 341-343.
- Park J. H. and Saier M. H. (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel protein. *J. Memb. Biol.* 153, 225-241
- Saito N., Furuse M., Sasaki T., Arakawa K. and Shimada K. (1999) Effects of naloxone on neurohypophysial peptides release by hypertonic stimulation in chicks. *General and Comparative Endocrinology*, 115, 228-235.
- Saito N. and Grossmann R. (1998) Effects of short-term dehydration on plasma osmolality, levels of arginine vasotocin and its hypothalamic gene expression in the laying hen. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121A, 235-239.
- Saito N., Sasaki T., Furuse M., Arakawa K. and Shimada K. (2001) Effects of AVT antisense oligodeoxynucleotides on AVT release induced by hypertonic stimulation in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128A, 147-153.
- Verney E. B. (1947) The antidiuretic hormone and factors which determine its release. *Proc. R. Soc. (Biol.)* 135, 25-106

Wells T. (1998) Vesicular osmometers, vasopressin secretion and aquaporin-4: A new mechanism for osmoreception. *Mol. Cell. Endocrinol.* 136, 103-107.

chicken	2	INPAVTVAM	VCTRKISLAK	SVFYILAQCL	GAIVGAGILY
human	96	INPAVTVAM	VCTRKIS I AK	SVFYI A AQCL	GAI I GAGILY
rat	96	INPAVTVAM	VCTRKIS I AK	SVFYI T AQCL	GAI I GAGILY
bovine	96	INPAVTVAM	VCTRRIS I AK	SVFYI A AQCL	GAI I GAGILY
chicken	41	L IXPPSVVGG	LGVTA VHGD L	SAGHG L LVEL	IITFQ L VFTI
human	135	L V T P PPSVVGG	LGVT M VHG N L	T AGHG L LVEL	IITFQ L VFTI
rat	135	L V T P PPSVVGG	LGVT T VHG N L	T AGHG L LVEL	IITFQ L VFTI
bovine	135	L V T P PPSVVGG	LGVT T VHG N L	SAGHG L LVEL	IITFQ L VFTI
chicken	81	FASCDSKRSE	KXGSVALAIG	FSVAIGHLFA	IN Y TGAS M N P
human	175	FASCDSK R T D	V T G S I ALAIG	FSVAIGHLFA	IN Y TGAS M N P
rat	175	FASCDSK R T D	V T G SVALAIG	FSVAIGHLFA	IN Y TGAS M N P
bovine	175	FASCDSK R T D	V T G S I ALAIG	I SVAIGHLFA	IN Y TGAS M N P
chicken	121	ARSF			
human	215	ARSF			
rat	215	ARSF			
bovine	215	ARSF			

Figure 1. Alignment of chicken and mammalian aquaporin 4 proteins. No identical amino acids are indicated by bold and underline alphabets.

	chicken	human	rat	bovine
chicken		95	95	94
human	86		98	98
rat	84	90		98
bovine	85	92	93	

Figure 2. Homology between chicken and mammalian aquaporin 4. Numbers are percentage of homology. The upper-right indicates amino acid and the lower-left indicates nucleic acid.

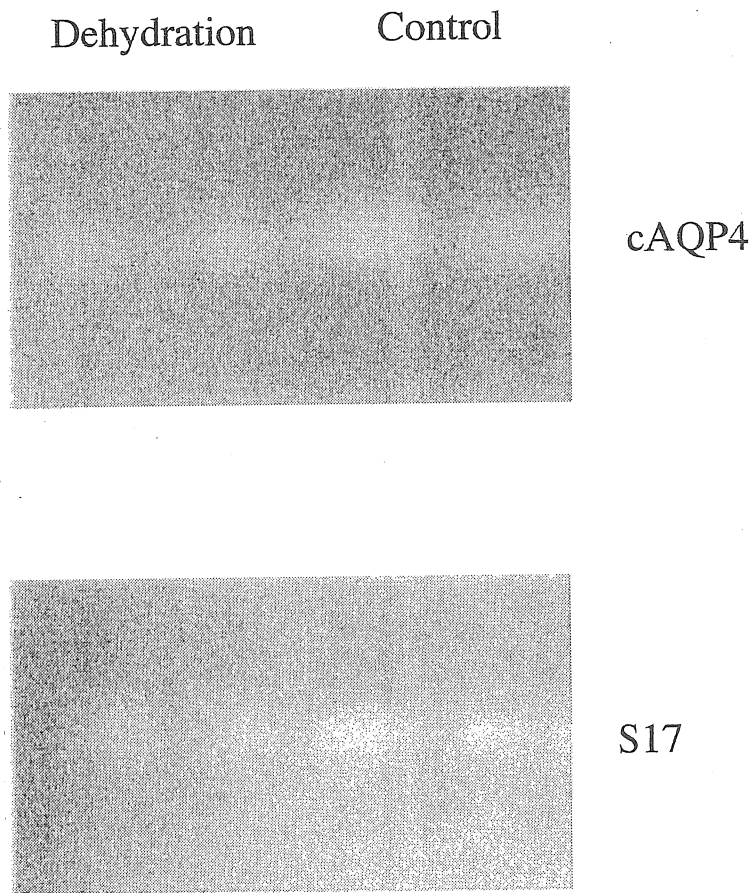


Fig. 3 cAQP4 gene expression in the brain by RT-PCT.
Upper panel: cAQP4. Lower panel: S17.

The Osmoreceptor in Birds

It is well known about the idea that antidiuresis may be controlled by cells in the hypothalamus acting as 'vesicular osmometer'. There has been considerable debate on the identity and sensitivity of such cells, focusing mainly on the neurons located in osmosensitive nuclei.

The aquaporin (AQP) family of membrane bound water transporting channels is expressed in a variety of organisms. Channel-forming integral protein of 28 kDa was the first aquaporin to be identified and characterized. AQP4 is a newly discovered membrane of this family. AQP4 is widely distributed but expression of AQP4 mRNA transcripts in the CNS is at least 10-fold higher than in other tissues. In situ hybridization studies in adult rat brain have revealed AQP4 mRNA expression in cells lining the ventricular system, the pial surface, the SON and PVN. This distribution of AQP4 suggests a particular functional significance. The movement of water into and out of brain cells through AQP4 may lie at the heart of the central mechanism of osmoreception, and the osmoregulation of AVP secretion and dipsogenesis. In birds, any AQP cDNA did not yet identified. The purpose of this study was the cloning of AQP4 cDNA from the birds and understood the physiological function of AQP4 in related with osmoreception in birds.

Material and Methods

The total RNA was extracted from one-day old chick brain and was reverse-translated into cDNA. cDNA was used for PCR with the primers designed from mammalian AQP4 cDNA sequence. The PCR product was subcloned with pGEM-T easy vector, and was sequenced.

Five one-day old chicks were dehydrated for one day and their brain was removed. In control chicks, five brains were removed without the dehydration treatment. The total RNA was extracted from the chick brain and was reverse-translated into cDNA. PCR was performed with chicken AQP4 primers.

Results and Discussion

PCR products was 376 bp. Using BLAST program, this PCR products was searched the homologous gene. The results showed that this PCR product was highly similar to AQP4 cDNA sequence of mammalian. For example, between human AQP4 and this PCR product, identity was 318/368 (86%), and Score was 333 bits, and between mouse AQP4 and this PCR product, identity was 312/368 (86%), and Score was 303 bits. These results highly suggested that this PCR product might be chicken AQP4. But, this is still partial sequence, and then we are working on the cloning of full sequence of this gene.

With RT-PCR, the AQP4 mRNA expression in the dehydrated chicken brain was slightly higher than those in control brains. This result suggest that AQP4 may be relate with osmoregulation.