



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1434号
学位記番号	第295号
氏名	片野 貴大
授与年月日	平成26年3月25日
学位論文の題名	促進拡散型 glycerol キャリアとしての aquaporin7 の機能特性
論文審査担当者	主査： 平嶋 尚英 副査： 湯浅 博昭, 今泉 祐治, 中村 克徳

名古屋市立大学学位論文

促進拡散型 glycerol キャリアとしての aquaporin 7 の機能特性

2013年度

名古屋市立大学大学院薬学研究科

薬物動態制御学分野

片野 貴大

名古屋市立大学学位論文

促進拡散型 glycerol キャリアとしての aquaporin 7 の機能特性

名古屋市立大学大学院薬学研究科

薬物動態制御学分野

片野 貴大

Functional Characteristics of Aquaporin 7 as a Facilitative Glycerol Carrier

Department of Biopharmaceutics

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

Takahiro Katano

一、本論文は、2014年3月 名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 平嶋 尚英 教授  
副査 湯浅 博昭 教授  
今泉 祐治 教授  
中村 克徳 准教授

二、本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

(基礎となる報文)

1. T. Katano, Y. Ito, K. Ohta, T. Yasujima, K. Inoue and H. Yuasa  
Functional Characteristics of Aquaporin 7 as a Facilitative Glycerol Carrier  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 244–248 (2014).
2. T. Katano, Y. Ito, K. Ohta, T. Yasujima, K. Inoue and H. Yuasa  
Competitive Inhibition of AQP7-Mediated Glycerol Transport by Glycerol Derivatives  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 348–351 (2014).

(参考論文)

1. Y. Ohgusu, K. Ohta, M. Ishii, T. Katano, K. Urano, J. Watanabe, K. Inoue and H. Yuasa  
Functional Characterization of Human Aquaporin 9 as a Facilitative Glycerol Carrier  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **23**, 279–284 (2008).
2. M. Ishii, K. Ohta, T. Katano, K. Urano, J. Watanabe, A. Miyamoto, K. Inoue and H. Yuasa  
Dual Functional Characteristic of Human Aquaporin 10 for Solute Transport  
*Cell Physiol. Biochem.*, **27**, 749-756 (2011).

三、本論文の基礎となる研究は、湯浅 博昭 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

## 目次

序論	1
本論	
第1章 AQP7による glycerol 輸送の速度論的特性	4
第2章 AQP7による glycerol 輸送の制御因子	8
第3章 AQP7による glycerol 輸送に対する各種阻害剤の影響	13
第4章 AQP7による glycerol 輸送に対する glycerol 誘導体の阻害様式の評価	15
結論	20
実験の部	
1. 試薬	21
2. 実験方法	
2-1 hAQP7のクローニング	21
2-2 細胞の培養	23
2-3 安定発現株の作製	23
2-4 取り込み実験	23
2-5 放射性標識化合物の定量	24
3. データ解析	
3-1 細胞内取り込みの評価	25
3-2 統計処理	26
Appendix	27

謝辭 29

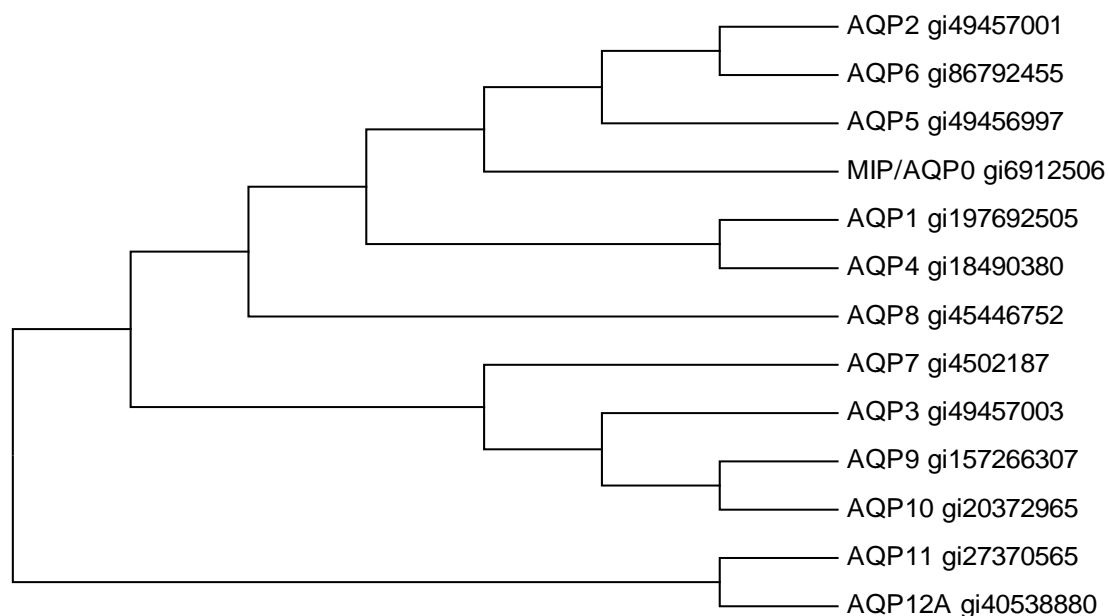
引用文獻 30



## 序論

aquaporin (AQP) は微生物から植物, ヒトにまで幅広く存在しており, 水分子のみを選択的に透過することから, 水チャネルとして知られる<sup>1-3)</sup>. AQPは細胞の浸透圧調整や体内の水分量の調節等に関わっており, 生体恒常性を維持する上で非常に重要な分子であるといえる. AQPの分子構造は2つのNPAモチーフと6回膜貫通領域からなり, このNPAモチーフが厳密な水分子の選択性に貢献することが知られている<sup>4,6)</sup>. ヒトのaquaporinは, AQP0 - 12の13種類が同定されており, MIP/AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5及びAQP6は水選択的なaquaporinと呼ばれる. 一方, AQP3, AQP7, AQP9及びAQP10はglycerol等の低分子化合物も輸送することから, aquaglyceroporinと呼ばれる<sup>6-10)</sup>. さらに, AQP11及びAQP12はsuperaquaporinに分類され<sup>11-14)</sup>, AQP8ほどのサブファミリーにも属さない (Fig. 1).

aquaglyceroporin 類による glycerol 輸送は, 基質濃度に対して飽和性を示さないチャネル様輸送機能によるものと考えられてきた. ところが, 本研究室における



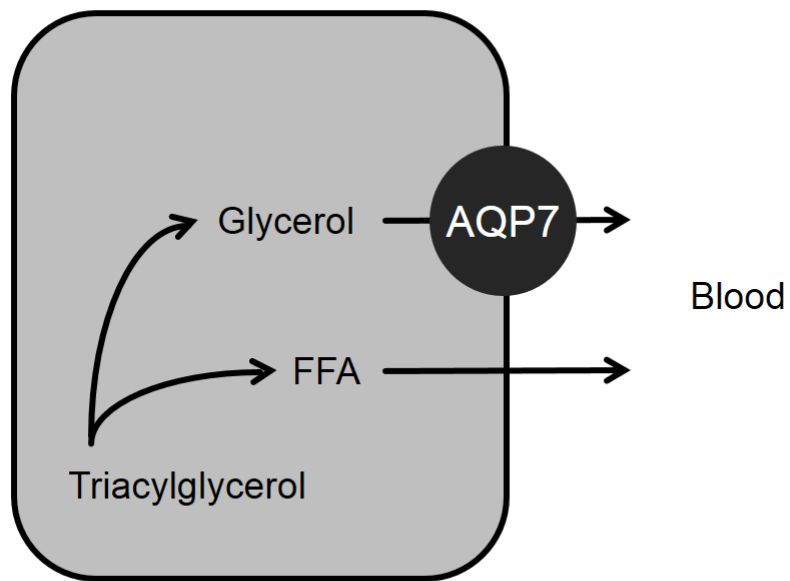
**Fig. 1. Phylogenetic tree of human aquaporin**

The analyses were conducted in MEGA6<sup>15)</sup>.



glycerol輸送特性の検討の結果、肝臓に多く発現するAQP9は顕著な飽和性を伴う促進拡散型glycerolキャリアとしての性質を示すことが見出された<sup>16)</sup>。次いで、小腸に多く発現するAQP10は、glycerolキャリアの性質とともに、glycerolチャネルとしての性質も備えた双機能性を示すことが明らかとなった<sup>17)</sup>。他のaquaglyceroporin類（AQP3、AQP7）に関しても、同様なglycerol輸送特性が予想される場所であり、glycerol類似の薬物等の輸送への関与の可能性と併せて、非常に興味深いところである。

aquaglyceroporin類の基質であるglycerolは、生体内において2分子の脂肪酸及びリン酸と結合したリン脂質として存在し、細胞膜を構成する。また、脂肪組織においては、3分子の脂肪酸とエステル結合したtriacylglycerolとして貯蔵されている。カテコールアミン等の刺激により、triacylglycerolはホルモン感受性リパーゼによって脂肪酸とglycerolに分解され、これらは血液中に放出される<sup>18-21)</sup>。遊離脂肪酸がエネルギー源として利用されることは広く知られているが、血液中に放出されたglycerolについても、肝臓での糖新生等のエネルギー源として利用されることがわかっている<sup>22-24)</sup>。さらに、飢餓状態においては、健常者及び肥満者の血漿中glycerolの、それぞれ75%及び95%程度がglucoseに変換される（これは糖新生の40%及び80%程度を占める）との報告<sup>25)</sup>もされており、glycerolはエネルギー源として重要な物質であるといえる。これまで、脂肪組織から血液中へのglycerolの移行は、生体膜（脂質二重層）を介する単純拡散によるものと考えられてきたが、近年、AQP7がその移行過程に関与することが明らかとなっている（Fig. 2）<sup>26-29)</sup>。AQP7は脂肪組織<sup>27,30-32)</sup>、腎臓<sup>27,32,33)</sup>及び精巣<sup>30,32-35)</sup>に多く発現し、そのノックアウトマウスにおいて、脂肪細胞からのglycerol放出の減少、それに伴う脂肪組織の肥大及び尿中glycerol排出量の増大等の症状を示すことが明らかにされている<sup>28,29,31,32,36)</sup>。一方、ヒトにおいては、glycerol輸送能を持たないミスセンス変異（G264V）により、運動時の血漿glycerol濃度上昇が観察されないこと<sup>37)</sup>、また、プロモーター領域の変異により、脂肪細胞におけるAQP7発現量が低下し、女性における肥満リスクが上昇するとの示唆がされている<sup>38)</sup>。このように、AQP7の脂質代謝への関与の可能性<sup>39-44)</sup>は、前述のAQP7のglycerol輸送特性の問題と併せて、興味深いところである。



**Fig. 2. AQP7 を介した脂肪細胞からの glycerol の放出機構**

FFA, free fatty acids

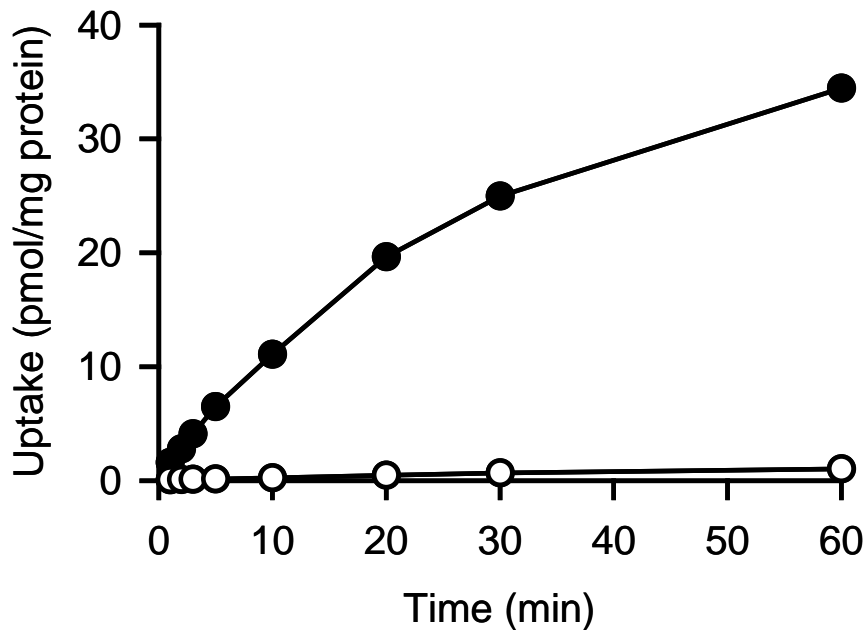
以上のような背景のもとに、本研究では、AQP7 の glycerol 輸送特性の解明に取り組み、薬物動態への関与及び生理的役割を探っていくための手掛かりとすることを目指した。さらに、一連の glycerol 誘導体による阻害の様式、強さの比較検討により、基質認識特性を探ることを試みた。

## 本論

### 第1章 AQP7による glycerol 輸送の速度論的特性

本研究では、ヒト AQP7 をクローニングして MDCKII 細胞に安定発現させ、AQP7 の機能解析に用いた。AQP7 の機能解析に先立ち、AQP7 安定発現 MDCKII 細胞株における AQP7 特異的な glycerol 取り込みとその時間推移を確認した。Fig. 3 に示したように AQP7 安定発現細胞での glycerol の取り込みは、mock 細胞での取り込みに比べて著しく大きく、AQP7 の高い glycerol 輸送活性が確認された。mock 細胞株での glycerol 取り込みは非常に低レベルであったことから、host として用いた MDCKII 細胞における内因性のトランスポーターあるいは単純拡散による glycerol 取り込み活性は小さいものであるといえる。

AQP7 安定発現細胞における glycerol 取り込み (AQP7 特異的な取り込みとほぼ同等) は 20 分までほぼ時間に比例して増大したので、この時間範囲内において取り込み初速度の評価が可能であると判断した。以後の検討では、取り込み初速度の解析を行うこととし、その時間範囲内の 5 分を取り込み時間として設定した。また、mock 細胞での glycerol 取り込みはごく低レベルではあったが、これを AQP7 安定発現細胞での取り込みから差し引いて、AQP7 特異的な取り込みを評価し、解析を行った。



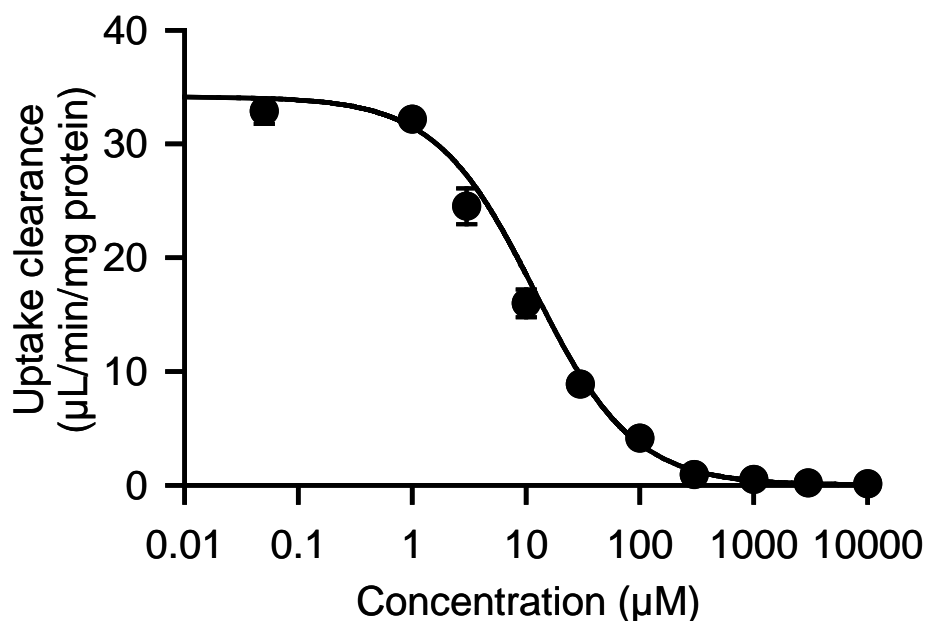
**Fig. 3. Time course of glycerol uptake in MDCKII cells stably expressing AQP7**

The uptake of [ $^3$ H]glycerol (0.05  $\mu$ M) was evaluated at 37°C and pH 7.4 in AQP7-MDCKII(●) and mock cells(○). Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

AQP7 特異的な glycerol 取り込みの速度論的特性を評価するため、取り込み試験液中の基質である glycerol 濃度を変化させ、取り込みクリアランスへの影響を調べた (Fig. 4). glycerol 濃度の上昇に伴い、取り込みクリアランスは著しく減少し、取り込みの飽和性が観察された。この飽和性はキャリア型輸送の特徴のひとつであり、AQP7 がキャリア型の輸送特性を持つことを示唆している。また、1 mM 以上の高濃度域において、取り込みクリアランスがほぼ検出不能なレベルにまで低下した。このことから、AQP7 が、高濃度域においても一定の取り込みクリアランスを維持するというチャンネル型の特徴は併せ持たないことが示唆された。

本検討により得られた glycerol 濃度に対する取り込みクリアランスの飽和性を

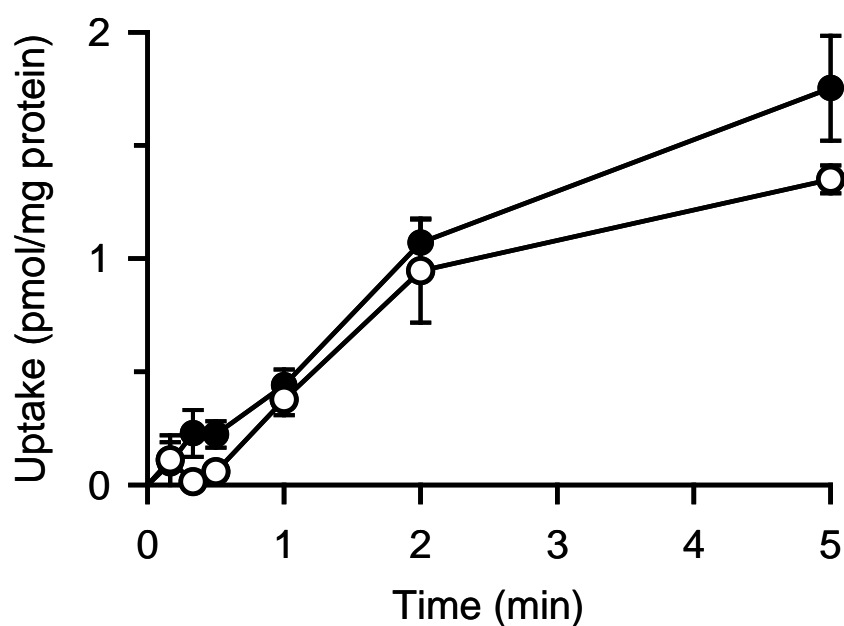
Michaelis-Menten式に当てはめたところ、最大輸送速度 $V_{\max}$ は  $406 \pm 33$  pmol/min/mg protein, Michaelis定数 $K_m$ は  $11.9 \pm 1.2$   $\mu\text{M}$ と算出された. 血漿中のglycerol濃度は数十から数百 $\mu\text{M}$ であり<sup>23,45,46</sup>, この $K_m$ 値をやや上回るが, AQP7 による十分に高い輸送効率が期待される範囲である. また, 過去に報告されたヒトAQP9 ( $K_m = 9.2$   $\mu\text{M}$ ) 及びAQP10 ( $K_m = 10.4$   $\mu\text{M}$ ) とも同程度の値であった<sup>16,17</sup>.



**Fig. 4. Concentration dependence of glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells**

The specific uptake of [ $^3\text{H}$ ]glycerol was evaluated for 5 min at  $37^\circ\text{C}$  and pH 7.4. The  $V_{\max}$  and  $K_m$  are  $406 \pm 33$  pmol/min/mg protein and  $11.9 \pm 1.2$   $\mu\text{M}$ , respectively, as the computer-fitted parameters with SE. Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

ureaもaquaglyceroporin類の代表的な基質として知られているが、先のAQP10に関する研究<sup>17)</sup>では、チャンネル型メカニズムによってのみ輸送されることが示唆されている。そこで、チャンネル型の機能を持たないAQP7はurea輸送活性を持たない可能性が高いと考え、その点についての検討を試みた (Fig. 5)。ureaの取り込みを評価したところ、AQP7安定発現細胞とmock細胞との間で取り込みに差はみられず、予想通り、AQP7はurea輸送活性を持たないことが示唆された。一方、AQP7がurea輸送活性を有するとの報告もあるため<sup>33)</sup>、チャンネル型機能によると推察されるurea輸送活性を持つ可能性を完全に否定できないが、少なくともその機能・輸送活性は、きわめて弱いものと考えられる。

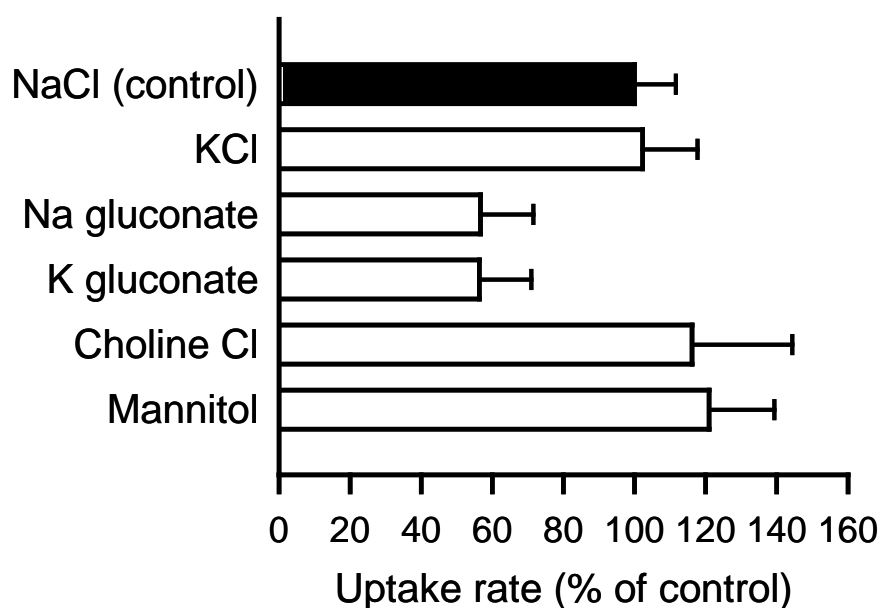


**Fig. 5. Time course of urea uptake in MDCKII cells stably expressing AQP7**

The uptake of [<sup>14</sup>C]urea (0.7 μM) was evaluated at 37°C and pH 7.4 in AQP7-MDCKII(●) and mock cells(○). Data are presented as means ± SE (*n* = 4).

## 第2章 AQP7による glycerol 輸送の制御因子

AQP7による glycerol 輸送の制御因子としての、イオン類の関与について、取り込み試験液中の NaCl を他の塩類等に置換し、検討を行った (Fig. 6)。Na<sup>+</sup>イオンの K<sup>+</sup>イオンや choline イオンへの置換による glycerol 取り込みへの影響は観察されなかったことから、AQP7 特異的な glycerol 取り込みは Na<sup>+</sup>非依存性であることが示唆された。Cl<sup>-</sup>イオンを gluconate への置換した際に、glycerol 取り込みの低下傾向がみられたが、同様に Cl<sup>-</sup>イオンを含まない mannitol への置換では、glycerol 取り込みに影響がみられなかったことから、Cl<sup>-</sup>イオンの関与の可能性も低いものと考えられる。

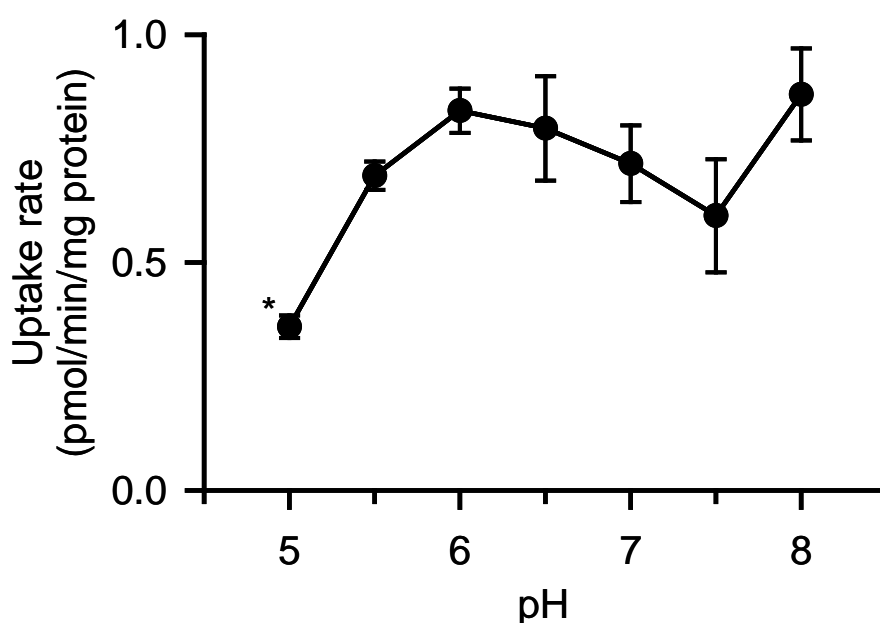


**Fig. 6. Effect of ions on glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells**

The specific uptake of [<sup>3</sup>H]glycerol (0.05 μM) was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4. NaCl in the control medium was replaced as indicated. The control value was 1.03 pmol/min/mg protein. Data are presented as means ± SE (*n* = 3).

さらにプロトンの関与について調べるため、取り込み試験液の pH を変化させ、glycerol 取り込みへの影響を検討した (Fig. 7). しかし、AQP7 による glycerol 取り込みは pH の影響をほとんど受けず、AQP7 の機能へのプロトンの関与もないことが示唆された. なお、pH5.0 において取り込みの低下が観察されたが、過度に低い pH であることから、生理的な意義は特にないものと考えられる.

以上のように、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{H}^+$  といった 2 次性能動輸送に関わる代表的なイオン類の関与がないとみられることから、AQP7 のキャリア機能は促進拡散型である可能性が高いと考えられる.

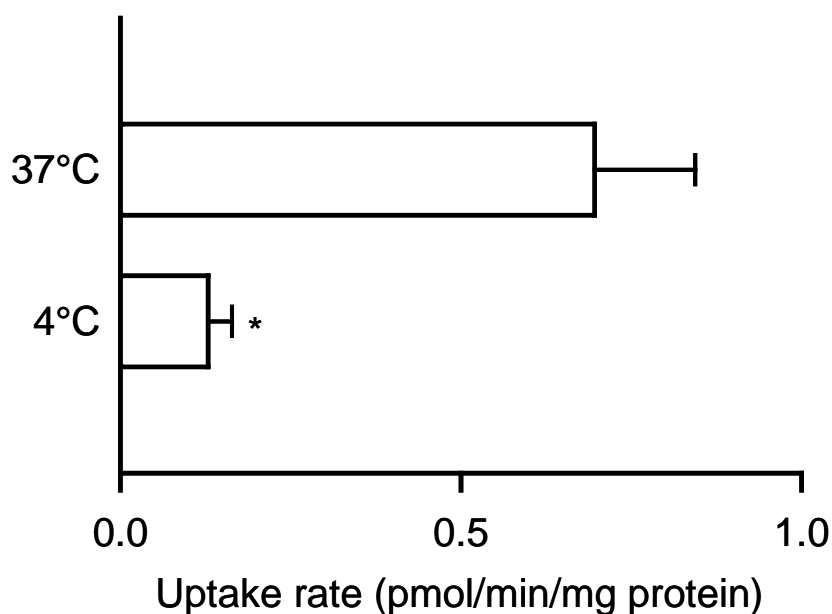


**Fig. 7. Effect of pH on glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells**

The specific uptake of [ $^3\text{H}$ ]glycerol (0.05  $\mu\text{M}$ ) was evaluated for 5 min at 37°C. Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$  compared with the values at all the other pH's.



キャリア型輸送機能は、一般にヒトの体温の付近を至適温度として高い輸送活性を示し、低温においてその活性が低下する。そこで、AQP7の輸送機能に対する温度の影響を検討した (Fig. 8)。温度を通常の37°Cから4°Cに低下させることにより、glycerol取り込みが著しく低下し、輸送活性の温度依存性が示された。輸送活性の温度依存性は、飽和性とともにキャリア型輸送の特徴であり、AQP7がキャリア型の輸送特性を持つことを支持するものである。



**Fig. 8. Effect of temperature on glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells**

The specific uptake of [<sup>3</sup>H]glycerol (0.05 μM) was evaluated for 5 min at pH 7.4. Data are presented as means ± SE (*n* = 3). \* *p* < 0.05 compared with the value at 37°C.

脂肪組織からのglycerol放出はAQP7を介して行われるが、AQP7によるglycerol輸送が濃度勾配に従う促進拡散型の特性を持つこと、また、血漿中のglycerol濃度が数十から数百 $\mu\text{M}$ 程度であることを併せて考えると、脂肪細胞内のglycerol濃度はAQP7の $K_m$ 値(11.9  $\mu\text{M}$ )より十分に大きく、AQP7によるglycerol輸送はほとんど飽和しているものと推察される。従って、脂肪細胞からのglycerol放出は、その発現量や細胞内局在による制御に加えて、AQP7の最大輸送能によっても制限を受けるものと考えられる。

また、AQP7は腎臓や精巣等の臓器においても発現していることが示されている。腎臓において、AQP7は近位尿細管の管腔側に存在する<sup>8,32,36</sup>。AQP7ノックアウトマウスにおいて、尿中glycerol排出量の増大がみられることから<sup>8,32,47</sup>、糸球体濾過を受けたglycerolはAQP7を介して再吸収されることが示唆される。しかし、前述のようにAQP7は促進拡散型キャリアであると考えられるため、原尿からのglycerol再吸収には尿細管管腔側から細胞内への濃度勾配が必要である。ウサギ腎近位尿細管において高glycerolキナーゼ活性が認められるとの報告がされており<sup>48</sup>、これがAQP7の発現する部位とよ

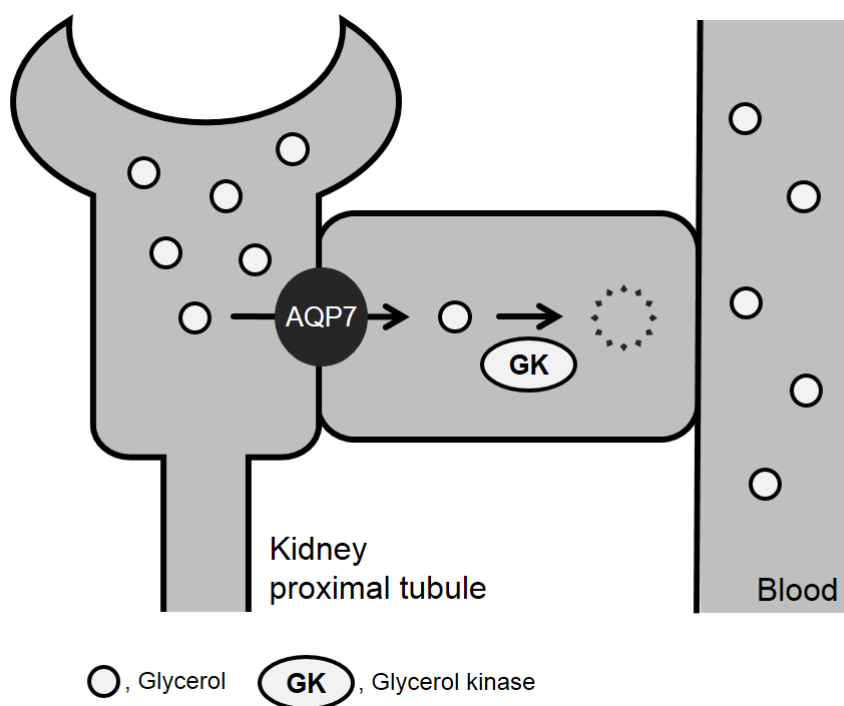
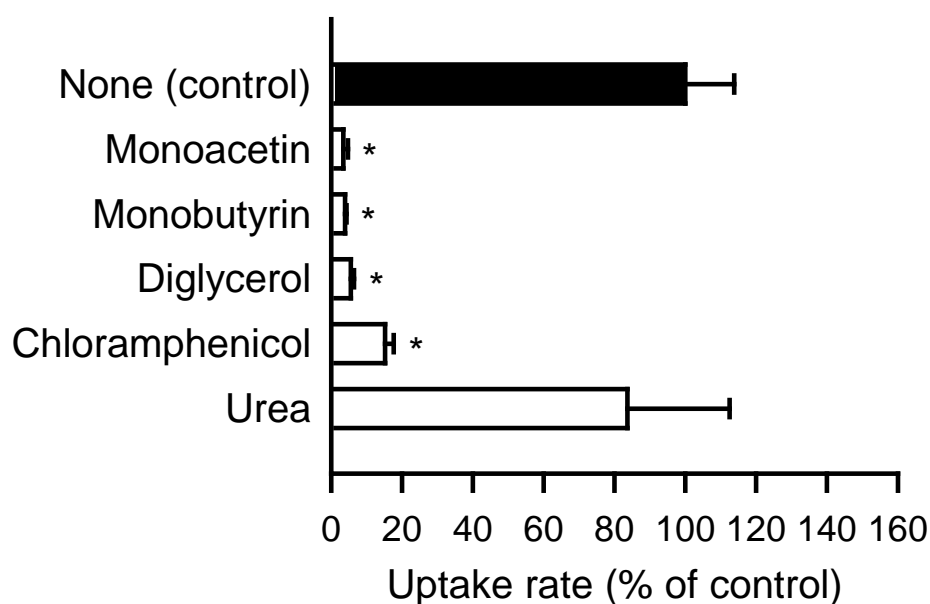


Fig. 9. 近位尿細管における AQP7 及び glycerol kinase による glycerol 再吸収モデル

く合致する。このことから、原尿中のglycerolは腎近位尿細管細胞内に取り込まれたのち、glycerolキナーゼにより代謝され、管腔側とのglycerol濃度勾配を形成するものと推察できる (Fig. 9)。これは、glycerolキナーゼ欠損症患者において、尿中glycerol排出量の増加が認められることとも矛盾しない<sup>49)</sup>。また、精巣においても特異的なglycerolキナーゼの存在が示唆されており<sup>50)</sup>、同様のglycerol濃度勾配が生じるものと推察できる。

### 第3章 AQP7による glycerol 輸送に対する各種阻害剤の影響

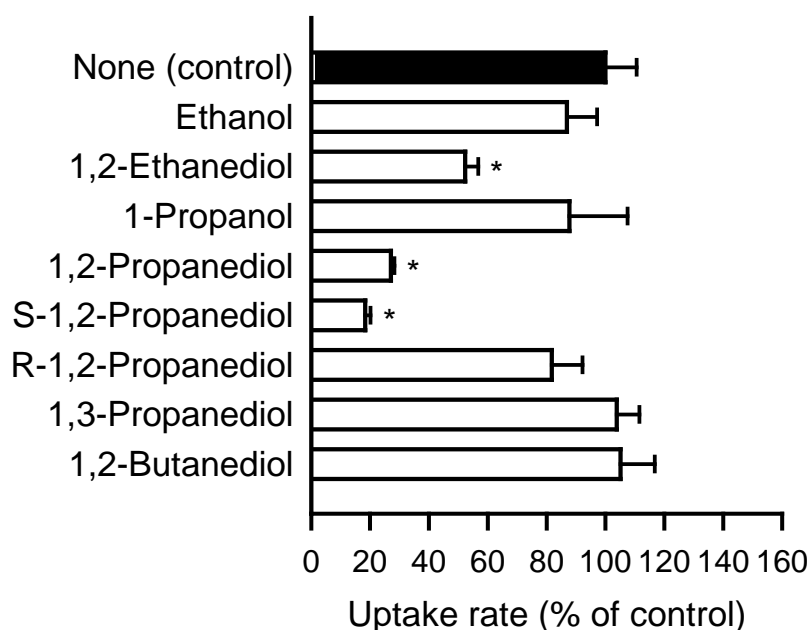
AQP7の基質認識特性を探るため、glycerol誘導体等を用いて、glycerol輸送への阻害作用を調べた (Fig. 10)。その結果、glycerolのアセチルエステルである monoacetin、ブチリルエステルである monobutyryn、glycerol エーテルである diglycerol だけでなく、その構造中に glycerol 様構造をもつ chloramphenicol により、著しい阻害効果がみられ、基質認識における競合の可能性が示唆された。一方、urea による阻害は観察されなかった。この点については、前述のように AQP7 が urea 輸送活性を示さず、urea は AQP7 の基質としては認識されないとみられること (Fig. 5) と矛盾しない結果である。また、阻害剤として monostearin (100  $\mu$ M) を用いて検討を行ったが、阻害効果は認められなかった。



**Fig. 10. Effect of various compounds on glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells**

The specific uptake of [ $^3$ H]glycerol (0.05  $\mu$ M) was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of a test compound (10 mM) or in its absence. The control value was 0.66 pmol/min/mg protein. Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$  compared with the control.

glycerol が単純な構造の 3 価のアルコールであることに着目し, glycerol 類似の各種アルコール類の glycerol 輸送への阻害効果を調べた (Fig. 11). その結果, 1,2-ethanediol により 50% 程度, 1,2-propanediol により 70% 程度の阻害が観察された. 一方, 1,2-butanediol による阻害はみられなかったことから, AQP7 に認識される基質構造は基本骨格の炭素数が 2 または 3 の場合に限定されるものと示唆された. 加えて, 炭素数が 2 または 3 であっても, 水酸基を 1 つしか持たない ethanol や 1-propanol による阻害が観察されなかったことから, 1,2-diol 構造が AQP7 による基質認識において重要であると考えられる. また, 1,2-propanediol においては, その S 体が著しく glycerol 取り込みを阻害した一方, R 体は有意な阻害効果を示さず, AQP7 による基質認識における立体選択性が示唆された.



**Fig. 11. Effect of various alcohols on glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells**

The specific uptake of [<sup>3</sup>H]glycerol (0.05 μM) was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of an alcohol (10 mM) or in its absence. The control value was 0.55 pmol/min/mg protein. Data are presented as means ± SE (n = 3). \* p < 0.05 compared with the control.

#### 第4章 AQP7による glycerol 輸送に対する glycerol 誘導体の阻害様式の評価

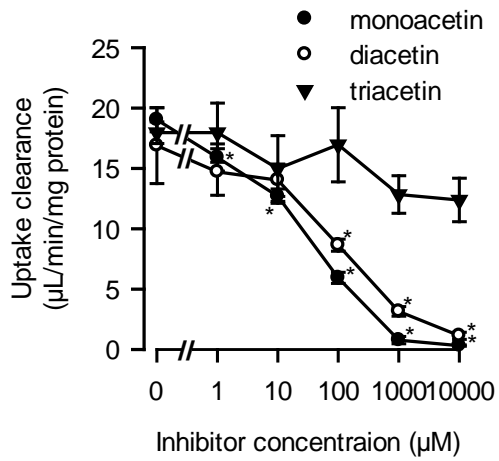
AQP7による glycerol 輸送に対して glycerol のエステル誘導体等が強い阻害効果を示し、また、基質認識要件としての 1,2-diol 構造の関与が示唆されたことを踏まえ、一連の glycerol 誘導体の阻害効果に関してさらに詳細な検討を加えることにした (Fig. 12).

はじめに、glycerol のアセチルエステル類について検討を行った。AQP7 特異的な glycerol 輸送は、モノアセチルエステルである monoacetin によって強く阻害され、その 1 mM 存在下で阻害率はほぼ 100%に達した。ジアセチルエステルである diacetin も強い阻害効果を示したが、阻害活性はやや弱く、その 10 mM 存在下で、阻害率がほぼ 100%に達した。一方、トリアセチルエステルである triacetin は、10 mM においても有意な阻害効果を示さなかった。このことから、glycerol のアセチルエステル化によって、基本炭素骨格の有するヒドロキシル基数が減少するのに伴い阻害活性が低下するものとみられた。

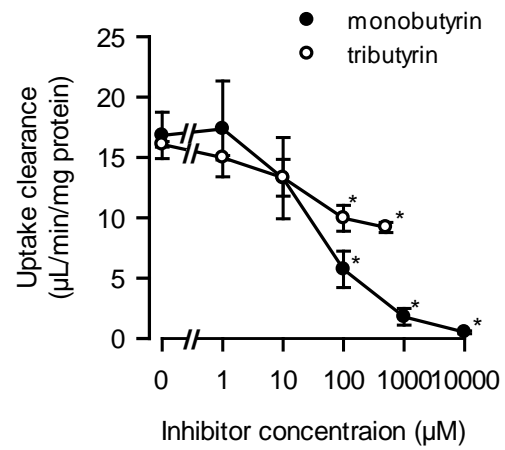
次に、glycerol のブチリルエステル類についても検討を行った。モノブチリルエステルである monobutyryn は monoacetin と同様に強い阻害効果を示したが、トリブチリルエステルである tributyrin による阻害効果は弱く、実験実施可能であった最高濃度の 500  $\mu$ M においても、阻害率は 30%程度にとどまった。今回、入手できなかった dibutyryn (ジブチリルエステル) についての検討は行っていないが、ブチリルエステル化体についても、アセチルエステル化体の場合と同様に、glycerol の有するヒドロキシル基のエステル化に伴い、阻害活性が低下するものと推察できる。

glycerol エーテルである diglycerol についても同様の検討を行ったところ、やはり強い阻害効果がみられ、その阻害活性は、diacetin の阻害活性と同程度であった。

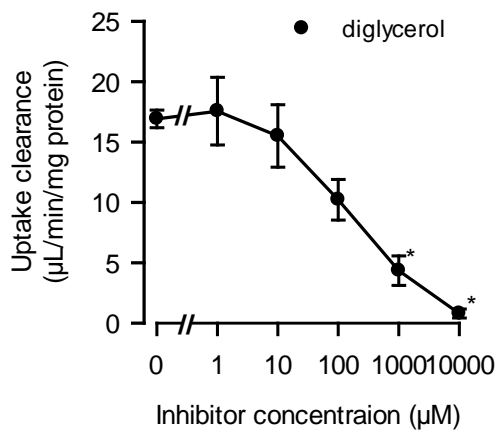
A



B



C



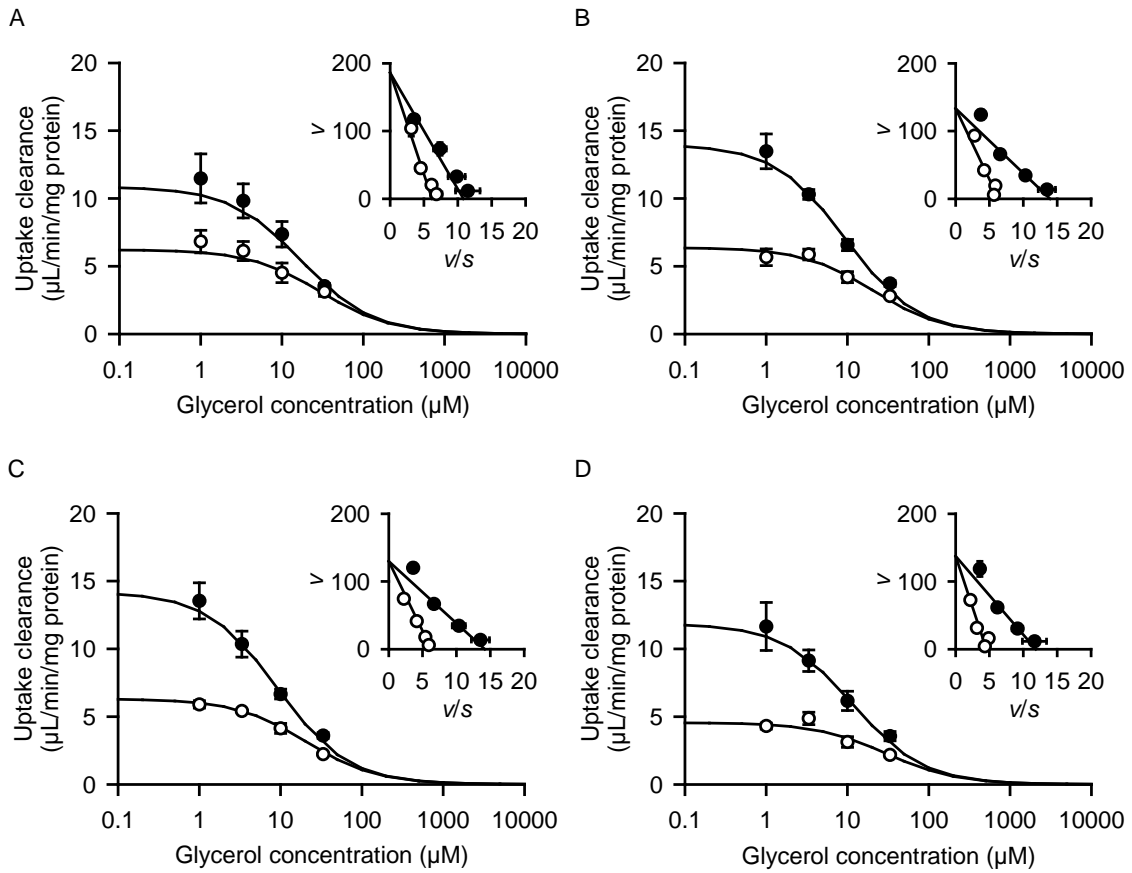
**Fig. 12. Effect of various glycerol derivatives on glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells**

The specific uptake of [ $^3$ H]glycerol (0.05  $\mu$ M) by AQP7 was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of a glycerol derivative (inhibitor) at varied concentrations or in its absence. Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$  compared with the control in the absence of inhibitors, as assessed using ANOVA followed by Dunnett's test.

強い阻害効果を示した4種の glycerol 誘導体について、引き続き阻害様式の解明に取り組んだ (Fig. 13). 阻害剤としての glycerol 誘導体の濃度は、100  $\mu\text{M}$  (monoacetin 及び monobutyryn) または 500  $\mu\text{M}$  (diacetin 及び diglycerol) として、濃度依存的な glycerol 輸送への影響を解析した. トリアシルエステルである triacetin 及び tributyrin については、阻害効果が弱かったため、本検討からは除外した.

検討対象とした glycerol 誘導体は、いずれも競合的な阻害様式を示したことから、glycerol と競合する基質として AQP7 に認識されている可能性が高いと考えられる. また、エステル誘導体の阻害定数は monoacetin = monobutyryn < diacetin であった. glycerol 輸送の Michaelis 定数 (11.9  $\mu\text{M}$ ) が monoacetin や monobutyryn の阻害定数よりも小さく、トリアシルエステルが阻害効果をほとんど示さなかったことを併せて考えると、AQP7 への親和性は、glycerol > monoacetin = monobutyryn > diacetin > triacetin = tributyrin の順であり、glycerol の基本炭素骨格の有するヒドロキシル基の数に依存していることが示唆された. さらに、monoacetin と monobutyryn の阻害定数は同程度であったことから、アシル鎖の2炭化水素分の伸長は AQP7 への親和性に影響しないものと考えられる. 一方、diglycerol の阻害定数 (親和性) は、diacetin のものと同程度であった. diglycerol は4つのヒドロキシル基を持つが、AQP7 への親和性に関しては、ヒドロキシル基の数の少ないアシル誘導体に劣るものと考えられる.





**Fig. 13. Competitive inhibition of glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells by various glycerol derivatives**

The specific uptake of [<sup>3</sup>H]glycerol by AQP7 was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of a glycerol derivative (open circles) or in its absence (closed circles). The profiles of uptake clearance *versus* glycerol concentration were used for curve fitting analyses for the estimation of kinetic parameters and Eadie-Hofstee plots are presented for graphical inspection. In the panels of A for monoacetin (100 μM), B for diacetin (500 μM), C for monobutyryn (100 μM) and D for diglycerol (500 μM), the values of  $V_{max}$  (pmol/min/mg protein) were  $186 \pm 26$ ,  $133 \pm 20$ ,  $130 \pm 9$  and  $137 \pm 20$ , respectively, and those of  $K_m$  (μM) were  $17.1 \pm 5.0$ ,  $9.5 \pm 2.4$ ,  $9.1 \pm 1.6$  and  $11.6 \pm 2.2$ , respectively. The values of  $K_i$  (μM) of monoacetin, diacetin, monobutyryn and diglycerol were  $134 \pm 17$ ,  $420 \pm 111$ ,  $80 \pm 18$  and  $312 \pm 69$ , respectively. Data and parameters are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). The  $K_i$  values of monoacetin and monobutyryn were significantly different from

that of diacetin at  $p < 0.05$ , as assessed using ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. Differences between all the other pairs of  $K_i$  values were statistically insignificant.

## 結論

本研究では、AQP7 安定発現細胞株を作製し、その glycerol 輸送特性の検討の結果、以下の知見を得た。

1. AQP7 による glycerol 輸送は、基質濃度増加に伴う取り込みクリアランスの低下（飽和性）を示し、キャリア型の輸送特性を持つことが示唆された。また、Michaelis-Menten 式による解析の結果、その親和性は 11.9  $\mu\text{M}$  と算出された。
2. 輸送に関わる制御因子の検討の結果、glycerol 取り込みは温度依存性のみを示し、イオン要求性、pH 感受性は観察されなかったことから、AQP7 による glycerol 輸送は促進拡散型の輸送メカニズムによるものと示唆された。
3. AQP7 における glycerol 輸送に対し、glycerol 誘導体による阻害や 1,2-propanediol における立体特異的な阻害効果の差異が観察された。さらに、glycerol 誘導体 (monoacetin, diacetin, monobutylin 及び diglycerol) による阻害様式の検討の結果、いずれも競合的であり、これらの glycerol 誘導体が glycerol に対する AQP7 の競合基質として認識される可能性が示唆された。また、その親和性はヒドロキシル基の数に依存することが示唆された。glycerol 誘導体が glycerol と同様に認識され、競合するとみられる点については、AQP7 における glycerol 輸送が、キャリア型の輸送特性であることを支持するものである。

以上、AQP7 は促進拡散型 glycerol キャリアであることが明らかとなり、その基質認識をはじめとする特性の解明を進展させることができた。本研究により得られた知見が、今後、glycerol 類似の薬物等の体内動態における AQP7 の役割を探るうえで、また、AQP7 のドラッグデリバリーへの利用の可能性等を探るうえで役立つものと期待したい。また、脂肪細胞からの glycerol 放出メカニズムをはじめとする glycerol 動態における AQP7 の生理的役割の理解の進展に役立つことも期待したい。

## 実験の部

### 1. 試薬

放射性標識体としてPerkinElmer (Boston, MA, USA) 製の[2-<sup>3</sup>H(N)]glycerol (29.6 GBq/mmol) 及びMoravek Biochemicals (Brea, CA, USA) 製の[<sup>14</sup>C]urea (2.07 GBq/mmol) を用いた.

### 2. 実験方法

#### 2-1 AQP7 のクローニング

ヒト AQP7 遺伝子のクローニングを行うにあたり, ヒト精巣 total RNA (Clontech, Mountain View, CA, USA) から cDNA を合成した. 逆転写反応は total RNA を 3 µg を鋳型に, オリゴ dT プライマーを用いて ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) により行った. 得られた cDNA をテンプレートとして, KOD-Plus-Neo polymerase (Toyobo) を用いた PCR によって, ヒト AQP7 遺伝子を増幅させた. PCR 条件は, 94°C で 2 分の熱変性ステップの後, 98°C で 10 秒, 59°C で 30 秒, 68°C で 1 分の 3 ステップを 33 回繰り返した. また, プライマーの配列はヒト AQP7 遺伝子 (GenBank accession number, AB006190) を参考に設計し, 以下に記した.

Forward primer : 5'-AAG ATC AAG ATG CGC TGT AAC TGA G-3'

Reverse primer : 5'-ATT GGG GAA TGG ATG GGA TCA C-3'

得られた PCR 産物の一部を用い, 1×TAE 緩衝液における 1% アガロースゲル電気泳動により, 目的の長さの DNA が増幅されていることを確認した.

残りの PCR 産物の一部をテンプレートに, KOD-Plus-Neo polymerase を用いて nested PCR を行った. PCR 条件は, 94°C で 2 分の熱変性ステップの後, 98°C で 10 秒, 65°C で 30 秒, 68°C で 1 分の 3 ステップを 33 回繰り返した. なお, 発現ベクターへの組み込み

に利用するため、プライマーは制限酵素認識配列（下線部）を含むように設計した。

Forward primer (XhoI) : 5'-TCA CTC GAG ACA TGG TTC AAG CAT CCG-3'

Reverse primer (XbaI) : 5'-GTC TCT AGA TCA CAA ATA ATC TCT G-3'

得られた PCR 産物の一部を用い、1×TAE 緩衝液における 1%アガロースゲル電気泳動により、目的の長さの DNA が増幅されていることを確認した。

残りの PCR 産物をフェノール/クロロホルム沈殿法及びエタノール沈殿法により精製した。精製した PCR 産物及び哺乳類発現ベクターである pCI-neo ベクター (Promega, Madison, WI, USA) を制限酵素 XhoI (Toyobo) と XbaI (Toyobo) で処理し、1%アガロースゲル電気泳動により分離、目的の長さの DNA 断片を含むゲル断片を切り出した。このゲル断片より、QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて目的の DNA 断片をそれぞれ抽出し、これを Ligation-convenience kit (Nippon gene, Tokyo, Japan) によりライゲーションした。ライゲーション産物はヒートショック (42°C, 1 分) により大腸菌に導入し、抗生物質を含まない 2×TY 培地を加えて 37°C, 1 時間の前培養を行った。この一部を 100 µg/mL ampicillin を含む LB プレートに撒き、37°Cで一晩 (約 12 時間) 培養した。

LB プレート上に得られたコロニーを 100 µg/mL ampicillin を含む Terrific Broth 培地に採取し、37°Cで約 10 時間振とう培養した。この培養液から、Wizard SV Minicolumn (Promega) を用いてプラスミド DNA を抽出し、制限酵素処理の後、電気泳動によりインサートチェックを行った。目的の長さの DNA を含むプラスミドは、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) による反応後、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によりその塩基配列を解読し、AQP7 遺伝子の ORF 全長に変異がないことを確認した。塩基配列に変異がないことが確認されたプラスミドを再び大腸菌に形質転換し、上記と同様の手順で LB プレートにコロニーを得た。得られたコロニーを 100 µg/mL ampicillin を含む 2×TY 培地に採取し、37°Cで約 10 時間振とう培養した。この培養液を約 50 mL にスケールアップし、さらに約 10 時間振とう培養した後、PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてプラスミドの抽出を行った。得られたプラスミドは濃度を調整し、実験に用いた。

## 2-2 細胞の培養

イヌ腎由来MDCKII (Madin-Darby canine kidney type II) 細胞は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより提供を受けた。MDCKII細胞の培養には、10% FBS (Invitrogen), 100 U/mL penicillin及び100 µg/mL streptomycin (共にSigma, St. Louis, MO, USA) を含むD-MEM (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を使用し、37°C, 95% air-5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。

## 2-3 安定発現株の作製

MDCKII細胞は継代に際し、血球計数盤を用いて  $4.0 \times 10^5$  cells/mLとなるように調製し、24-wellプレートに500 µL/wellずつ播種した。この際、抗生物質を含まない培地を用いた。その直後、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いてリポフェクション法によりプラスミドを導入した。6時間後、抗生物質を含む培地に交換し、さらにその24時間後に24-wellプレート中の全細胞をはがし、細胞培養フラスコに移した。この際、培地として0.8 mg/mL G418 (Sigma) を含むD-MEMを用いた。培地は数日に1回交換した。細胞が80%コンフルエントになった時点で細胞をはがし、5 cells/mLとなるように調製し、これを96-wellプレートに100 µL/wellずつ播種した。半日後に顕微鏡で1 cell/wellとなっているwellを探し、これを数週間培養してG418耐性クローンを得た。得られたクローンのglycerol輸送活性を測定し、その活性が高いものを安定発現株として実験に用いた。また、空のpCI-neoベクターを用いて同様の処理を行い、mock細胞を得た。

## 2-4 取り込み実験

AQP7安定発現細胞の継代に際し、血球計数盤を用いて  $2.0 \times 10^5$  cells/mLとなるように調製した。これを24-wellプレートに1 mL/wellずつ播種し、37°C, 95% air-5% CO<sub>2</sub>イ

ンキュベーター内で2日間培養した。また、取り込み実験を行うにあたり、緩衝液として10 mM HEPESを含むHanks' solution (136.7 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.952 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.812 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.441 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.385 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM D-glucose) を作製し、NaOH水溶液を用いてpH7.4 となるように調整した。

細胞がコンフルエントであることを確認した後、well 中の培地を吸引除去し、37°Cの緩衝液1 mLを加え、プレインキュベーションを行った。5分経過後、これを取り除き、放射性標識された基質化合物を含む37°Cの緩衝液(取り込み試験液)0.25 mLを加えることにより、取り込みを開始させた。所定の時間経過後、2 mLの氷冷した緩衝液を加えることにより、取り込みを停止させ、速やかにこれを取り除いた。同様に、氷冷した緩衝液で2度洗浄することにより、細胞内に取り込まれなかった放射性化合物を取り除いた。

イオン類の取り込みへの影響を評価する際には、緩衝液中のNaClを他の塩類で置換した。さらに、Na<sup>+</sup>を含まない緩衝液についてはNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>をK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>で置換した。これをプレインキュベーション、取り込み、停止及び洗浄の各ステップに用いた。

細胞外 pH の取り込みへの影響を評価する際には、NaOH 水溶液により目的の pH に調整した。pH5.0 - 6.5 の緩衝液については HEPES の代わりに MES を用いた。これをプレインキュベーション、取り込み、停止及び洗浄の各ステップに用いた。

阻害実験の際には、取り込み試験液のみに阻害剤を添加して用いた。

## 2-5 放射性標識化合物の定量

取り込み実験を行った well に 0.5% SDS を含む 0.2 M NaOH を 0.5 mL 加え、1 時間放置することにより、細胞を可溶化させた。well 中をマイクロピペットにより攪拌し、その全量をカウンティングバイアルに移した。これに液体シンチレーションカクテル Clear-sol I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 3 mL 加え、ボルテックスミキサーにより攪拌し、放射活性測定用検体とした。その放射活性は液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka, Tokyo, Japan) により測定した。また、取り込み実験を行って

ない well において、培地を除去した後、緩衝液を用いて細胞を洗浄した。これに 0.2M NaOH を 0.5 mL 加え、タンパク定量用サンプルとした。タンパク定量は BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて行い、その標準物質としてウシ血清アルブミンを用いた。

### 3. データ解析

#### 3-1 細胞内取り込みの評価

細胞内への薬物の取り込み速度 ( $v$ ) は、細胞への取り込み量 (*Uptake*) を取り込み時間 ( $t$ ) で割って求めた。

$$v = \frac{Uptake}{t} \quad (1)$$

また、取り込みクリアランス ( $CL_{up}$ ) は取り込み試験液中の基質薬物濃度 ( $s$ ) で割ることにより求めた。

$$CL_{up} = \frac{v}{s} \quad (2)$$

速度論的特性の評価については、Michaelis-Menten 式に従う担体輸送を仮定して解析を行った。

$$CL_{up} = \frac{V_{max}}{K_m + s} \quad (3)$$

ここで、 $V_{max}$  は最大取り込み速度、 $K_m$  は Michaelis 定数である。非線形最小 2 乗法プログラム WinNonlin (Pharsight, Mountain View, CA, USA) を用い、 $CL_{up}$  と  $s$  との関係を (3) 式に当てはめ、 $V_{max}$  及び  $K_m$  を求めた。

阻害様式の検討の際には、WinNonlin を用いて、阻害剤の存在下における  $CL_{up}$  と  $s$  との関係を次式 (競合阻害を伴う Michaelis-Menten 速度論の式) に当てはめた。 $V_{max}$  及び  $K_m$  には、阻害剤非存在下における  $CL_{up}$  と  $s$  との関係を (3) 式に当てはめて得られた値を用い、阻害定数 ( $K_i$ ) を推定した。



$$CL_{\text{up}} = \frac{V_{\text{max}}}{K_m \left( 1 + \frac{i}{K_i} \right) + s} \quad (4)$$

ここで、 $i$  は取り込み試験液中の阻害剤濃度である。

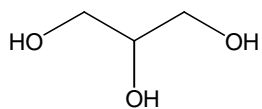
### 3-2 統計処理

データは原則として平均値±標準誤差として示した。2群間の検定には Student's t-test を用い、多重比較を要する場合には ANOVA の後、Dunnett's test または Student-Newman-Keuls test を用いた。

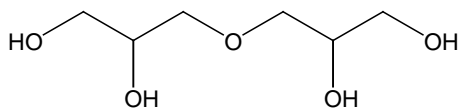
## Appendix

### Chemical structure of glycerol, its derivatives and various compounds

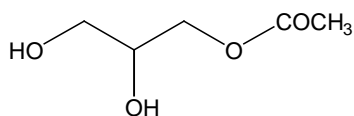
Glycerol



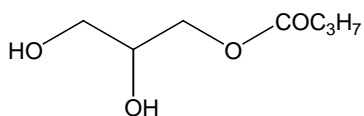
Diglycerol



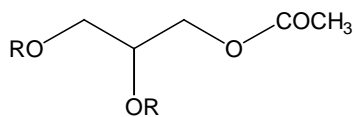
Monoacetin



Monobutyryn

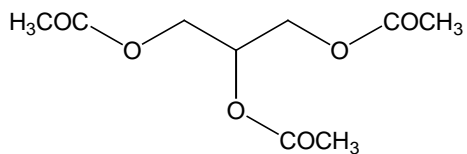


Diacetin

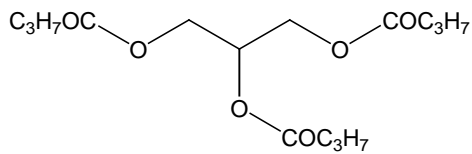


R = H or COCH<sub>3</sub> (1:1)

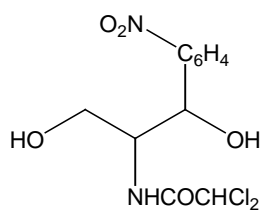
Triacetin



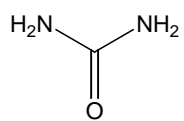
Tributyryn



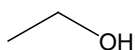
Chloramphenicol



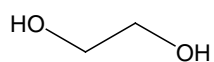
Urea



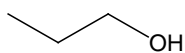
Ethanol



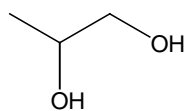
1,2-Ethandiol



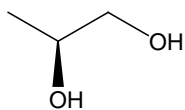
1-Propanol



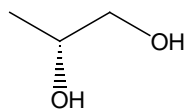
1,2-Propanediol



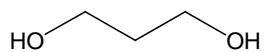
S-1,2-Propanediol



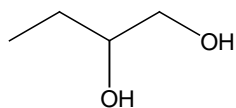
R-1,2-Propanediol



1,3-Propanediol



1,2-Butanediol



## 謝辞

本研究を行うにあたり，終始ご指導，ご鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 湯浅 博昭 教授に深く感謝いたします。

また，本論文作成にあたり，種々の有益なご助言と，ご校閲を賜りました名古屋市立大学薬学研究科 平嶋 尚英 教授，今泉 祐治 教授ならびに中村 克徳 准教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり，熱心なご指導及びご助言を賜りました東京薬科大学 井上 勝央 教授に深く感謝いたします。

研究途上，種々のご便宜を図って下さいました名古屋市立大学大学院薬学研究科 薬物動態制御学分野の卒業生，在室生及び研究員の皆様，また RI 施設員各位に感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Agre, P., Bonhivers, M., and Borgnia, M. J.: The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J. Biol. Chem.*, **273**: 14659-14662 (1998).
- 2) Gomes, D., Agasse, A., Thiébaud, P., Delrot, S., Gerós, H., and Chaumont, F.: Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**: 1213-1228 (2009).
- 3) Ishibashi, K., Kondo, S., Hara, S., and Morishita, Y.: The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **300**: R566-R576 (2011).
- 4) van Os, C. H., Deen, P. M., and Dempster, J. A.: Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**: 291-309 (1994).
- 5) Verkman, A. S., and Mitra, A. K.: Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **278**: F13-F28 (2000).
- 6) Kruse, E., Uehlein, N., and Kaldenhoff, R.: The aquaporins. *Genome Biol.*, **7**: 206 (2006).
- 7) Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., and Stroud, R. M.: Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, **290**: 481-486 (2000).
- 8) King, L. S., Kozono, D., and Agre, P.: From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**: 687-698 (2004).

- 9) Verkman, A. S.: More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.*, **118**: 3225-3232 (2005).
- 10) Huang, H. F., He, R. H., Sun, C. C., Zhang, Y., Meng, Q. X., and Ma, Y. Y.: Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum. Reprod. Update*, **12**: 785-795 (2006).
- 11) Morishita, Y., Sakube, Y., Sasaki, S., and Ishibashi, K.: Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms. *J. Pharmacol. Sci.*, **96**: 276-279 (2004).
- 12) Itoh, T., Rai, T., Kuwahara, M., Ko, S. B., Uchida, S., Sasaki, S., and Ishibashi, K.: Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **330**: 832-838 (2005).
- 13) Ishibashi, K.: Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**: 989-993 (2006).
- 14) Gorelick, D. A., Praetorius, J., Tsunenari, T., Nielsen, S., and Agre, P.: Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem.*, **7**: 14 (2006).
- 15) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S.: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, **30**: 2725-2729 (2013).
- 16) Ohgusu, Y., Ohta, K. Y., Ishii, M., Katano, T., Urano, K., Watanabe, J., Inoue, K., and Yuasa, H.: Functional characterization of human aquaporin 9 as a facilitative glycerol carrier. *Drug*

- Metab. Pharmacokinet.*, **23**: 279-284 (2007).
- 17) Ishii, M., Ohta, K., Katano, T., Urano, K., Watanabe, J., Miyamoto, A., Inoue, K., and Yuasa, H.: Dual functional characteristic of human aquaporin 10 for solute transport. *Cell. Physiol. Biochem.*, **27**: 749-756 (2011).
- 18) Fain, J. N., and García-Sáinz, J. A.: Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid Res.*, **24**: 945-966 (1983).
- 19) Arner, P., Kriegholm, E., Engfeldt, P., and Bolinder, J.: Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J. Clin. Invest.*, **85**: 893 (1990).
- 20) Lönnqvist, F., Nyberg, B., Wahrenberg, H., and Arner, P.: Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue of the elderly. *J. Clin. Invest.*, **85**: 1614 (1990).
- 21) Fernandez, C., Hansson, O., Nevsten, P., Holm, C., and Klint, C.: Hormone-sensitive lipase is necessary for normal mobilization of lipids during submaximal exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**: E179-E186 (2008).
- 22) Vernon, R. G., and Walker, D. G.: Glycerol metabolism in the neonatal rat. *Biochem. J.*, **118**, 531-536 (1970)
- 23) Landau, B. R., Wahren, J., Previs, S. F., Ekberg, K., Chandramouli, V., and Brunengraber, H.: Glycerol production and utilization in humans: sites and quantitation. *Am. J. Physiol.*, **271**: E1110-E1117 (1996).
- 24) Brisson, D., Vohl, M. C., St - Pierre, J., Hudson, T. J., and Gaudet, D.: Glycerol: a neglected variable in metabolic processes?. *Bioessays*, **23**: 534-542 (2001).

- 25) Bortz, W. M., Paul, P., Haff, A. C., and Holmes, W. L.: Glycerol turnover and oxidation in man. *J. Clin. Invest.*, **51**: 1537-1546 (1972).
- 26) Kuriyama, H., Kawamoto, S., Ishida, N., Ohno, I., Mita, S., Matsuzawa, Y., Matsubara, K., and Okubo, K.: Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**: 53-58 (1997).
- 27) Kishida, K., Kuriyama, H., Funahashi, T., Shimomura, I., Kihara, S., Ouchi, N., Nishida, M., Nishizawa, H., Matsuda, M., Takahashi, M., Hotta, K., Nakamura, T., Yamashita, S., Tochino, Y., and Matsuzawa, Y.: Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **275**: 20896-20902 (2000).
- 28) Hara-Chikuma, M., Sohara, E., Rai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Sasaki, S., Uchida, S. and Verkman, A. S.: Progressive Adipocyte Hypertrophy in Aquaporin-7-deficient Mice  
ADIPOCYTE GLYCEROL PERMEABILITY AS A NOVEL REGULATOR OF FAT  
ACCUMULATION. *J. Biol. Chem.*, **280**: 15493-15496 (2005).
- 29) Hibuse, T., Maeda, N., Funahashi, T., Yamamoto, K., Nagasawa, A., Mizunoya, W., Kishida, K., Inoue, K., Kuriyama, H., Nakamura, T., Fushiki, T., Kihara, S., and Shimomura, I.: Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**: 10993-10998 (2005).
- 30) Kishida, K., Shimomura, I., Kondo, H., Kuriyama, H., Makino, Y., Nishizawa, H., Maeda, N., matsuda, M., Ouchi, N., Kihara, S., Kurachi, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y.: Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J. Biol. Chem.*, **276**: 36251-36260 (2001).



- 31) Maeda, N., Funahashi, T., Hibuse, T., Nagasawa, A., Kishida, K., Kuriyama, H., Nakamura, T., Kihara, S., Shimomura, I., and Matsuzawa, Y.: Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**: 17801-17806. (2004).
- 32) Skowronski, M. T., Lebeck, J., Rojek, A., Praetorius, J., Füchtbauer, E. M., Frøkiær, J., and Nielsen, S.: AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **292**: F956-F965 (2007).
- 33) Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Suzuki, F., Marumo, F., and Sasaki, S.: Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J. Biol. Chem.*, **272**: 20782-20786 (1997).
- 34) Saito, K., Kageyama, Y., Okada, Y., Kawakami, S., Kihara, K., Ishibashi, K., and Sasaki, S.: Localization of aquaporin-7 in human testis and ejaculated sperm: possible involvement in maintenance of sperm quality. *J. Urol.*, **172**: 2073-2076 (2004).
- 35) Yeung, C. H., Callies, C., Tüttelmann, F., Kliesch, S., and Cooper, T. G.: Aquaporins in the human testis and spermatozoa—identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. *Int. J. Androl.*, **33**: 629-641 (2010).
- 36) Sohara, E., Rai, T., Miyazaki, J. I., Verkman, A. S., Sasaki, S., and Uchida, S.: Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **289**: F1195-F1200 (2005).
- 37) Kondo, H., Shimomura, I., Kishida, K., Kuriyama, H., Makino, Y., Nishizawa, H., Matsuda,

- M., Maeda, N., Nagaretani, H., Kihara, S., Kurachi, Y., Nakamura, T., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y.: Human aquaporin adipose (AQPap) gene. *Eur. J. Biochem.*, **269**: 1814-1826 (2002)
- 38) Prudente, S., Flex, E., Morini, E., Turchi, F., Capponi, D., De Cosmo, S., Tassi, V., Guida, V., Avogaro, A., Folli, F., Maiani, F., Frittitta L., Dallapiccola, B., and Trischitta, V.: A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities. *Diabetes*, **56**: 1468-1474 (2007).
- 39) Kuriyama, H., Shimomura, I., Kishida, K., Kondo, H., Furuyama, N., Nishizawa, H., Maeda, N., Matsuda, M., Nagaretani, H., Kihara, S., Nakamura, T., Tochino, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y.: Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*, **51**: 2915-2921 (2002).
- 40) MacDougald, O. A., and Burant, C. F.: Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**: 10759-10760 (2005).
- 41) Hibuse, T., Maeda, N., Nagasawa, A., and Funahashi, T.: Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**: 1004-1011 (2006).
- 42) Frühbeck, G., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., and Rodríguez, A.: Aquaporin-7 and glycerol permeability as novel obesity drug-target pathways. *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**: 345-347 (2006).
- 43) Madeira, A., Camps, M., Zorzano, A., Moura, T. F., and Soveral, G.: Biophysical Assessment of Human Aquaporin-7 as a Water and Glycerol Channel in 3T3-L1 Adipocytes. *PLoS one*, **8**: e83442. (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0083442

- 44) Lebeck, J.: Metabolic impact of the glycerol channels AQP7 and AQP9 in adipose tissue and liver. *J. Mol. Endocrinol.*, (2014). DOI, 10.1530/JME-13-0268
- 45) FEINMAN, L., and LIEBER, C. S.: Effect of ethanol on plasma glycerol in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, **20**: 400-403 (1967).
- 46) Robergs, R. A., and Griffin, S. E.: Glycerol. Biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. *Sports Med.*, **26**: 145-167 (1998).
- 47) Sohara, E., Rai, T., Sasaki, S., and Uchida, S.: Physiological roles of AQP7 in the kidney: lessons from AQP7 knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**: 1106-1110. (2006).
- 48) Wirthensohn, G., Vandewalle, A., and Guder, W. G.: Renal glycerol metabolism and the distribution of glycerol kinase in rabbit nephron. *Biochem. J.*, **198**: 543-549. (1981).
- 49) Walker, A. P., Muscatelli, F., Stafford, A. N., Chelly, J., Dahl, N., Blomquist, H. K., Delanghe, J., Willems, P. J., Steinmann, B., and Monaco, A. P.: Mutations and phenotype in isolated glycerol kinase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, **58**: 1205 (1996).
- 50) Lin, E. C. C.: Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annu. Rev. Biochem.*, **46**: 765-795 (1977).