

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03870

研究課題名(和文) 魚類の淡水・海水適応を担う膜輸送体のホルモンによる制御機構の解明

研究課題名(英文) Hormonal regulation of membrane transport proteins involved in acclimation of fishes to fresh water and seawater

研究代表者

加藤 明 (Kato, Akira)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：40311336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：真骨魚のエラ、腸、腎臓の輸送上皮細胞に発現する様々な膜輸送体の同定により、淡水・海水順応における水電解質代謝を分子レベルで説明できるようになりつつある。エラ、腸、腎臓の機能は様々なホルモンにより制御されるが、ホルモンによる膜輸送体の制御機構の多くは明らかでない。我々はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた膜輸送体を電気生理学的に測定するシステムを用い、膜輸送体の活性制御機構を解析した。トラフグ腎臓の発現解析の結果、腎臓に発現するホルモン受容体を同定した。また、集合管に発現する水チャネルとカリウムチャネルを同定し、海水魚腎臓による水再吸収を担う新たなメカニズムを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集合管は腎尿細管の最終部位として出口に位置し、膀胱へと流出する尿の組成を最終的に調節する重要な部位である。海水魚において集合管は活発に水とNaClを再吸収して尿量を減少させ、2価イオンを濃縮させた等張尿の産生と2価イオン排出に寄与する。一方、淡水魚集合管はNaClのみを活発に再吸収する一方で水は再吸収せず、その結果、多量の低張尿を産生し水排出に寄与する。すなわち、集合管を介した水再吸収制御は淡水・海水順応に極めて重要であるが、その分子機構は明らかでなかった。本研究により、海水魚の集合管に発現して尿量を制御する新たなメカニズムが明らかとなり、魚類生理学の発展に大きく寄与できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of water electrolyte metabolism of teleost fishes during acclimation to fresh water and seawater has become clearer at molecular level by the identification of membrane transport proteins in transport epithelia of the gill, intestine and kidney. The functions of the gill, intestine, and kidney are regulated by various hormones, however the mechanisms of hormonal regulations of these membrane transport proteins have not been clarified yet. We expressed various membrane transport proteins in *Xenopus* oocytes and analyzed the functions by electrophysiology. Expression analysis of a marine pufferfish *Takifugu rubripes* identified hormone receptors, aquaporins and a potassium channel expressed in the collecting duct cells, and proposed a novel model to explain the regulation of water reabsorption of the kidney of a marine teleost.

研究分野：魚類生理学

キーワード：魚類生理学 イオントランスポーター ホルモン受容体 輸送上皮細胞 淡水・海水適応

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景(本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ、応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯、これまでの研究成果を発展させる場合にはその内容等)

真骨魚体液のイオン組成や浸透圧はヒト体液とほぼ同じである。淡水産真骨魚(以下淡水魚)はエサを食べなくても淡水中に含まれるわずかなイオンを吸収して体液浸透圧を維持することができる。一方、高塩濃度の環境に生息する海産真骨魚(以下海水魚)はエラや腎臓からイオンを積極的に排出し、体液のイオン濃度や浸透圧の上昇を防ぐ。濃度勾配に逆らったイオン輸送を介した順応機序を解明することは、魚類の生存戦略を理解する上で不可欠である。我々は、2002年に魚類で最初にゲノム配列が公開されたトラフグ(海水魚)とその近縁種で淡水・海水の両方で棲息可能なメフグ、時にはゼブラフィッシュをモデルに用い、真骨魚の淡水・海水順応を担う上皮輸送機構の解析を行ってきた。ゲノム配列のベースにした網羅的な発現解析、細胞レベルでの局在解析、およびイオン輸送体の電気生理学的な活性測定により、様々なイオンの上皮輸送モデルを提唱してきた。海水魚の腸が飲水した海水中のカルシウムを炭酸塩として析出させるための重碳酸輸送体、海水魚腎臓による SO_4^{2-} 、 Ca^{2+} 、ホウ酸、 Mg^{2+} 排出を担うイオン輸送体、淡水魚腎臓による低張尿産生を担う Na^+/Cl^- 輸送体、淡水魚エラ塩類細胞が淡水中の微量の Na^+ を取り込むために働く $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ 交換輸送体などを同定し、魚類の淡水・海水順応の分子メカニズムの解明に広く寄与してきた。

淡水・海水順応を担う上皮輸送メカニズムが解明されつつあるが、未だ open question とされる不明な経路も数多く存在する。上皮輸送はホルモンなどにより制御されることが報告されている。例えば淡水魚の低浸透圧順応にプロラクチンが重要な役割を担うことは古くから知られているが、ホルモンのシグナルがどのように受容体を介して輸送体に作用するかは全く明らかでない。

2. 研究の目的

我々はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた膜輸送体を電気生理学的に測定する優れたシステムを構築しつつある。本申請でそのシステムを完成させると共に、これまで同定してきたイオン輸送体を卵母細胞に発現させてその活性の詳細を測定することにより、ホルモンや細胞内シグナル因子による輸送体活性制御機構を解析する。また主に腎臓の発現解析などを行い、これまで明らかにされてこなかった上皮輸送機構を解明する。

3. 研究の方法

海水魚のモデルとしてトラフグ、淡水魚のモデルとしてゼブラフィッシュを用いた。魚類の淡水・海水順応に関わるとされるイオン輸送体の活性測定やその制御機構の解析のため、イオン選択性微小電極法、二電極膜電位固定法、およびこれらを組み合わせて電位を固定した状態で細胞内イオン濃度を安定的に測定するシステムを構築した。これらのシステムを用いて魚類に由来するイオン輸送体を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の細胞内イオン濃度、膜電位、膜電流、またそれらの培地イオン濃度の変化に対する応答を測定することにより、イオン輸送体の活性を明らかにした。イオン輸送体の活性の強さは電流もしくは細胞内イオン濃度の変化率として定量した。ホルモン受容体との共発現や細胞内シグナル因子の活性化剤の添加によるイオン輸送体の活性強度の変化を測定し、イオン輸送体の活性を制御するシグナルを評価した。

新たな上皮輸送機構の解明のためトラフグ腎臓から尿細管を単離し、先進ゲノム支援による支援の下、RNA-Seq 解析を行った。得られた情報から尿細管に高発現している膜輸送体を同定した。それらの組織分布を RT-PCR により解析し、局在部位は特異的抗体を用いた免疫組織化学により決定した。

4. 研究成果

(1) 海水魚集合管における水再吸収を担うアクアポリンの同定

集合管はネフロンの最終部に位置し、膀胱に送り出す尿の成分を決める重要な部位である。海水魚の集合管は Na^+ 、 Cl^- を活発に再吸収することを駆動力に水を活発に再吸収し、尿量を減少させ、2 価イオンを濃縮した等張尿を産生する。海水魚トラフグ (*Takifugu rubripes*) のゲノムからアクアポリンファミリーをコードする 16 遺伝子を同定した。トラフグ腎臓から単離した集合管、及び全腎臓からそれぞれ RNA を抽出し発現解析を行ったところ、集合管に発現する主要なアクアポリンはこの 16 種の Aqp の中で TrAqp1a 及び TrAqp4 であることを特定した。これらの部分配列に相当するペプチドを合成してウサギに免疫した結果、TrAQP1a と TrAQP4 を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製することに成功した。これらの抗体を用いて海水で飼育したトラフグ腎臓の組織切片を染色した結果、集合管細胞のアピカル膜とバソラテラル膜にそれぞれ TrAQP1a と TrAQP4 が局在することを確認した。以上の結果から、トラフグ魚集合管における水再吸収は TrAQP1a と TrAQP4 が担っていることが明らかとなった。

魚類腎臓は淡水や汽水などの低浸透圧環境下では活発に低張尿を産生し、水の排出と体液浸透圧維持に寄与する。この時、集合管は水の透過性を無くした状態で Na^+ 、 Cl^- を活発に再吸収する。従って魚類集合管に発現するアキュポリンの活性を抑制する制御機構が必要になる。アキュポリンの活性制御は転写や翻訳後レベルで行われることが想定された。哺乳動物の集合管では、Aqp2 の活性が protein kinase A (Pka) によるリン酸化により抑制されることが知られている。そこでこれらのトラフグ由来のアキュポリンの活性がリン酸化によって負の制御を受けるかどうか、検証した。アフリカツメガエル卵母細胞に TrAqp1a, TrAqp4 および比較として TrAQP1b をコードする cRNA を注入して発現させ、細胞を低張液に晒して水を細胞内に流入させてそれらの水輸送活性を体積増加率として解析 (swelling assay) したところ、TrAqp1a, TrAqp4 の強い水輸送活性を検出した。Pka の活性化剤 (IBMX, forskolin) や protein kinase C (Pkc) の活性化剤 (PBDu) を培地に添加したところ、これら Aqp の水輸送活性の変化を検出することはできなかったことから、TrAqp1a や TrAqp4 の活性はこれらのリン酸化酵素以外の機構により制御されることが示唆された。集合管における TrAqp の活性機構を明らかにするため、トラフグ腎臓に発現する受容体の同定を試みた。トラフグゲノムデータの解析から 4 種のバソトシン受容体、1 種のプロラクチン受容体、2 種のイソトシン受容体を同定し、RT-PCR 法により組織分布を網羅的に解析した結果、V1aa 及び Prlr の 2 種がトラフグ腎臓に高発現することを明らかにした。

(2) 海水魚集合管のアピカル膜に局在するカリウムチャネルの同定

海水魚の集合管は上記の様に Na^+ 、 Cl^- 及び水を活発に再吸収して尿量を減少させる。一方、淡水魚の集合管は Na^+ 、 Cl^- のみを活発に再吸収する事で低張尿を産生し、体液浸透圧を上昇させる。海水魚、淡水魚どちらの集合管も Na^+ 、 Cl^- を活発に再吸収するが、過去の解析により、海水魚集合管のアピカル膜には Nkcc2 ($\text{Na}^+/\text{K}^+2\text{Cl}^-$ cotransporter 2, Slc12a1) が高発現し、淡水魚集合管のアピカル膜には Ncc (Na^+/Cl^- cotransporter, Slc12a3) が高発現することを見出している。尿中の K^+ 濃度は Na^+ 、 Cl^- に比べて低濃度であることから、Nkcc2 は K^+ チャネルと共局在することにより K^+ を細胞内外で循環させ Na^+ 、 Cl^- の再吸収を促進するが、その K^+ チャネルは魚類においては特定されていない。哺乳動物の腎臓では、Nkcc2 と Kenj1 (renal outer medullary potassium channel, ROMK) が遠位直尿細管のアピカル膜に共局在する。トラフグ TrKenj1 の組織発現を RT-PCR により調べたところ、TrKenj1 はエラに高発現していたが腎臓には発現していなかった。この結果はトラフグ腎臓では別の K^+ チャネルが TrNkcc2 の活性を制御していることを示唆した。トラフグ集合管と全腎臓の発現解析から、新たな K^+ チャネルとして TrKenj15 が全腎臓及び集合管に高発現していることを見出した。TrKenj15 の部分配列に相当するペプチドを合成してウサギに免疫した結果、Kenj15 を特異的に認識する抗体を作製することに成功した。この抗体を用いて海水で飼育したトラフグ腎臓の組織切片を染色した結果、集合管細胞のアピカル膜に Kenj15 が局在することを確認した。これらの結果から、トラフグ魚集合管アピカル膜における Na^+ 、 Cl^- の再吸収は TrNkcc2 と TrKenj15 が担っていることが明らかとなった。

哺乳動物において Nkcc2 は腎臓特異的に発現することが知られる。一方、魚類では Nkcc2 は腎臓の他、腸にも高発現する。従って Nkcc2 は魚類の腸における Na^+ 、 Cl^- の主要な吸収経路として機能することが示唆されている。前述の様に Nkcc2 活性の維持には共局在する K^+ チャネルの存在が不可欠であるが、Kenj1 は腸にも発現しておらず、その K^+ チャネルは特定されていない。RT-PCR の結果、興味深いことに TrKenj15 は腸においても高発現することが明らかになった。抗 Kenj15 抗体を用いてトラフグ腸の組織切片を染色した結果、腸吸収上皮細胞において TrKenj15 と TrNkcc2 が共局在することがあきらかとなった。これらの結果から、TrNkcc2 と TrKenj15 は腸における Na^+ 、 Cl^- の吸収経路としても機能することが明らかとなった。

(3) 淡水魚エラ塩類細胞のアピカル膜に局在するイオン輸送体の活性制御機構の解析

塩類細胞はエラなど体表に散在しイオンの能動輸送を行う。淡水魚のエラでは、塩類細胞のアピカル膜に Nhe3 や Slc12a10 などイオン輸送体が発現し、淡水に含まれる僅かな Na^+ 、 Cl^- を濃度勾配に逆らって体内に吸収するとされている。Nhe3 は細胞内の H^+ や NH_4^+ と交換に環境水から Na^+ を吸収するとされていたが、我々は過去の解析からアフリカツメガエルに発現させたゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) DrNhe3b の Na^+/H^+ 交換輸送活性、及び $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ 交換輸送活性を測定し、それらの説が正しいことを示すことに成功した。哺乳動物において Nhe3 の活性は Pka や Pkc により抑制されることが知られるため、同様の制御機構の有無を明らかにするために DrNhe3b を発現させた卵母細胞に Pka や Pkc の活性化剤を添加してその活性を定量したところ、 Na^+/H^+ 交換輸送活性に有意な差を検出することはできなかった。また魚類では下垂体から分泌されるプロラクチンが淡水順応能を維持することが知られる。そこでゼブラフィッシュの 2 種類のプロラクチン受容体 (DrPrlra, DrPrlrb) を発現するベクターを作製して Nhe3b と共発現させ、培地にプロラクチンを添加して Na^+/H^+ 交換輸送活性を評価したが、有意な活性変化を検出するに至っていない。DrNhe3b の活性制御に細胞内の Nhe regulatory factor (Nherf) ファミリーの存在が必要な可能性を検討するため、ゼブラフィッシュゲノムデータから Nherf ファミリーに属する 6 遺伝子を同定して網羅的に組織分布を解析した結果、DrNherf1a と DrNherf2 の 2 種類がエラに局在していることを見出した。今後、DrNherf と DrNhe3b を共発現して同様の解析を継続する必要がある。DrNhe3b の新たな輸送基質を探索したところ、DrNhe3b を発現させた卵母細胞は細胞外 K^+ 濃度に依存的な H^+ 排出と K^+ 流入を促進することを見出した。魚類のエラによる K^+ 代謝の役割やそ

の分子機構は明らかでない。本実験の結果は DrNhe3b が K^+/H^+ 交換輸送体として機能すること、並びに K^+ 代謝に関与することを示唆するものとなった。

エラ塩類細胞のアピカル膜に発現するイオン輸送体としては、Slc12a10 が他に知られる。Slc12a10 は Slc12a3 (Ncc) と相同性を有することから Slc12a3 と同様に Na^+/Cl^- 共輸送活性を有すると考えられてきたが、その活性を直接測定した報告例は無い。我々はアフリカツメガエル卵母細胞にゼブラフィッシュ DrSlc12a10.2 を発現させ、その活性解析を試みた。 Na^+ 電極を用いた解析から、DrSlc12a10.2 を発現させた卵母細胞の細胞膜において Na^+ 透過性の上昇を観察した。

(4) 海水魚近位尿細管に発現する Mg^{2+} 輸送体の活性測定

腎臓は海水魚にとって 2 価イオンを排出する主要な経路として重要で、海水魚近位尿細管は活発に Mg^{2+} を尿中に分泌することが知られる。この機構を明らかにするために我々は過去の研究によりメフグ近位尿細管に高発現する Mg^{2+} 輸送体の同定に成功した。これらの Mg^{2+} 輸送活性の詳細やその制御を明らかにするため、 Mg^{2+} 選択性微小電極による細胞内 Mg^{2+} 活性の測定条件を最適化し、アフリカツメガエル卵母細胞の細胞内 Mg^{2+} の測定する手法の構築に成功した。一般的にアフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜は内在性のイオン輸送活性が小さいことから、強制発現したイオン輸送体の活性解析に有用であることが多い。 Mg^{2+} 選択性微小電極を用いた解析の結果、卵母細胞の細胞膜に個体ごとに異なるレベルの内在性 Mg^{2+} 輸送活性を検出した。従って卵母細胞を用いて Mg^{2+} 輸送体の活性を解析するには、内在性 Mg^{2+} 輸送活性の低い個体を選別するなどさらなる条件検討が必要になったことが明らかになった。

(5) 魚類ホウ酸輸送体の同定と輸送基質選択性

海水はホウ酸を含み海水魚は海水を飲むことから、海水魚はホウ酸を排出する必要がある。我々は過去の研究から、メフグ近位尿細管のアピカル膜に局在する Slc4a11a が $B(OH)_4^-$ 輸送体として機能しホウ酸を分泌し、尿中にホウ酸を排出するメカニズムを明らかにしてきた。加えてトラフグ Aqp ファミリーの活性解析を行い、 $B(OH)_3$ チャンネルとして機能する TrAqp を同定し、その $B(OH)_3$ 輸送活性は尿素輸送活性と非常によく相関することを見出した。ヒト (*Homo sapiens*) HsAQP の同様な解析からも $B(OH)_3$ 輸送活性を持つ HsAQP を同定した。トラフグとヒトの比較では、多くの Aqp の $B(OH)_3$ 輸送活性は保存されていたが、Aqp10 の活性が進化の過程で変化したことを見出した。すなわち、HsAQP10 は水、グリセロール、尿素、ホウ酸を輸送する活性を有する一方、トラフグ TrAqp10b は水、グリセロールを輸送するが尿素、ホウ酸を輸送しないことが明らかとなった。関連種に由来する Aqp10 の解析を行ったところ、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) XlAqp10 はヒト AQP10 と同じ活性を有し、ゼブラフィッシュ DrAqp10b はトラフグ TrAqp10 と同じ活性を有していたことから、この活性の違いは四肢動物、真骨魚のそれぞれの系統の中で保存されていることが明らかとなった。この活性の違いと配列の違いを詳細に解析すれば、Aqp ファミリーの輸送基質選択性を決定する新たな分子機構の解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 加藤 明, 渡邊 恵理香, 潮 和敬	4. 巻 86 (2)
2. 論文標題 マグネシウムの細胞膜輸送機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 144-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件／うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Ushio K, Watanabe E, Kumagai S, Kamiya T, Fujiwara T, Romero MF, Kato A.
2. 発表標題 Boric Acid Transport Activity of Aquaporins in Vertebrates.
3. 学会等名 BioMedical Transporters 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oka H, Motoshima T, Kato A.
2. 発表標題 Na ⁺ transport activity of Slc12a10.2 expressed in Xenopus oocytes.
3. 学会等名 14th TOIN International symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe E, Fujimori K, Suzuki Y, Kato A.
2. 発表標題 Identification of factors responsible for water reabsorption regulation in collecting ducts of pufferfish.
3. 学会等名 14th TOIN International symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 晴香、Michel F. Romero、加藤 明.
2. 発表標題 ゼブラフィッシュのカリウム保持を担う分子メカニズムの解析.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 恵理香、潮 和敬、神谷 岳洋、藤原 徹、Michael F. Romero、加藤 明.
2. 発表標題 アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたヒトAQPのホウ酸輸送活性.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 恵理香、潮 和敬、神谷 岳洋、藤原 徹、Michael F. Romero、加藤 明.
2. 発表標題 哺乳動物におけるホウ酸輸送体の同定と機能解析.
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋元 仁、潮 和敬、渡邊 恵理香、古田 忠臣、Michel F. Romero、加藤 明.
2. 発表標題 ヒトAQP10とトラフグAQP10の基質選択性の違いに寄与する分子機構の解析.
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kato A
2. 発表標題 Mechanisms of ion transport in fish epithelia as elucidated using Xenopus expression systems
3. 学会等名 13th International Congress on the Biology of Fish (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oka H, Romero MF, Kato A
2. 発表標題 Study of molecular mechanisms involved in potassium homeostasis in zebrafish
3. 学会等名 13th TOIN International symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujimori K, Mizutani G, Suzuki Y, Kato A
2. 発表標題 Gene expression analyses of pituitary and renal tissues in pufferfish acclimated to brackish water and seawater
3. 学会等名 「先進ゲノム支援」国際シンポジウム -Frontiers of Genome Science- (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kumagai S, Mizutani G, Kim J, Romero MF, Kato A
2. 発表標題 Electrophysiological analysis of boric acid transport by aquaporins
3. 学会等名 12th TOIN International symposium on Biomedical Engineering 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊谷詩織、加藤明、水谷学、キムジュユン、Michael F. Romero
2. 発表標題 アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたアクアポリンのホウ酸輸送活性
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 ComBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ushio K, Akimoto J, Imaizumi G, Watanabe E, Furuta T, Michael F. Romero, Kato A
2. 発表標題 Analysis of mechanisms for substrate transport selectivity in an aquaglyceroporin AQP10
3. 学会等名 15th TOIN International symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Watanabe E, Kato A
2. 発表標題 A water channel responsible for the water reabsorption in the apical membrane of the collecting ducts of a saltwater fish
3. 学会等名 15th TOIN International symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京工業大学 生命理工学院 加藤研究室 http://kato.bio.titech.ac.jp/index.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------