

機関番号：13801
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570055
 研究課題名（和文）ホルモン依存性水吸収機構の原理と進化プロセスに関する分子生物学的研究
 研究課題名（英文）Study on the evolutionary processes of hormone-dependent water movement
 研究代表者
 鈴木 雅一（SUZUKI MASAKAZU）
 静岡大学・理学部・准教授
 研究者番号：60280913

研究成果の概要（和文）：「眼の水晶体で機能する AQP0 をコードする遺伝子が重複し、AQP0 のパラログから腎臓型の抗利尿ホルモン(ADH)応答性 AQP 遺伝子が誕生した。そして、無尾両生類への進化の過程では、腎臓型 ADH 応答性 AQP 遺伝子がさらに2度重複し、そのパラログから下腹部皮膚型と膀胱型の ADH 応答性 AQP 遺伝子が進化した」という仮説を発表した。この AQP の遺伝子重複とその後の機能分化により、無尾両生類は水分が乏しい環境へと生息域を拡大することができた可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although more genomic data are needed, it is suggested that a duplicated *AQP0* might be the ancestor gene for *AQP2*, *AQP5*, and *AQPpa2*. A current scenario is that *AQP0* had arisen early in vertebrate evolution, and a gene duplication event then generated a *AQP0* paralogue, prior to the divergence of the actinopterygian lineage and sarcopterygian lineage giving rise to tetrapods. Before the emergence of anuran amphibians, the *AQP0* paralogue evolved to kidney-type *AQP2* and *AQP5*, undergoing a tandem gene duplication. The resultant *FAIM2*-(*AQP2*, *AQP5*)-*RACGAP1* gene linkage was basically inherited to contemporary tetrapods (Ensembl). Within the amphibian lineage to anurans, kidney-type *AQP2* further underwent local gene duplications between *FAIM2* and *RACGAP1*, leading to the occurrence of ventral skin-type and urinary bladder-type *AQPpa2* genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究代表者の専門分野：内分泌学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：アクアポリン、無尾両生類、バソトシン、水吸収、進化

1. 研究開始当初の背景

生体の約3分の1は水で、生命を維持するために水は必要不可欠である。無尾両生類(カエル類)では、成体は口から水を飲まず、下腹部の皮膚から水を吸収して、腎臓で尿を産生

する。そして、膀胱で尿を貯留しつつ水を再吸収することで、体内の水バランスを維持している。無尾両生類は多様な環境に生息しており、その生活様式から、水棲型、半水棲型、陸上型、樹上型の4つのタイプに分類される。

より陸環境に適応したカエルは、動物史上初めて ADH 応答性の水吸収機構を獲得し、下腹部皮膚と膀胱で水吸収を調節している。この水吸収調節機構は重要で、下腹部皮膚における ADH に対する反応性は、カエル種の生息地と密接に関係している。私は、アクアポリン(aquaporin: AQP)分子に着目して、両生類の水適応機構を研究してきた。AQP とは水分子を選択的に透過させる水チャネルであり、哺乳類では 13 種類存在する。そのうち AQP2 は腎臓の集合管に局在し、ADH に応答して細胞内のプールから細胞膜にトランスロケーションし、水再吸収を促進する ADH 応答性 AQP である。私はこれまでに、樹上型のアマガエルから AQP2 様分子を 3 種類(AQP-h2, -h3, -h2K)発見し、これらが ADH に応答することを実証し、AQP-h2 が膀胱型、AQP-h3 が下腹部皮膚型、そして AQP-h2K が腎臓型であると提唱した。さらに、水棲型と半陸上型のカエルでは、下腹部皮膚に下腹部皮膚型 AQP が 1 種類しか存在しないが、樹上型と陸上型のカエルでは、下腹部皮膚に下腹部皮膚型と膀胱型の 2 種類の AQP が発現していることを見出し、この変化が水分の乏しい環境への適応を可能にした原因の一つであることを指摘した。このように、アマガエルでは ADH 応答性の水吸収機構が、下腹部皮膚、膀胱、腎臓の 3 箇所で見られるが、この事実は ADH 応答性水吸収機構に関わる全遺伝子がこの 3 つの器官で発現していることを意味している。そこで私は、「アマガエルで、3 種類の ADH 応答性 AQP の遺伝子の共通点と相違点を解析することが、ADH 応答性水吸収機構に関わる全遺伝子や進化プロセスを解明する糸口になる」と考え、本研究を計画した。

なお、両生類の AQP に関しては、米国カリフォルニア大の Ma T ら(*Am J Physiol* 271, C1699-C1704, 1996)、米国デイトン大学の Zimmerman SL ら(*Am J Physiol* 292, R544-R555, 2007)などが cDNA クローニングしているが、国内外を通じて遺伝子レベルでの研究は皆無である。

2. 研究の目的

無尾両生類における AQP の機能を解析すると共に、樹上型両生類アマガエルの AQP-h2, -h3, -h2K の遺伝子がクラスターを形成していると予想されるゲノム領域の塩基配列(約 300kbp と予測)を決定し、魚類、水棲型無尾両生類、哺乳類の相同なゲノム領域と比較し、脊椎動物におけるホルモン応答性 AQP 遺伝

子の進化を推察する。

3. 研究の方法

(1) cDNA クローニングにより、無尾両生類から新規 AQP を同定して、特異的抗体を作製し、生理学的実験により、AQP の機能を解析する。(2)アマガエルゲノムの Fosmid ライブラリーを作製し、AQP-h2(膀胱型)、AQP-h3(下腹部皮膚型)、AQP-h2K(腎臓型)の遺伝子が位置する領域の塩基配列を決定する。ゲノムデータベースを利用して、魚類(メダカ、ゼブラフィッシュ、フグ)、水棲型無尾両生類(*Xenopus tropicalis*)、哺乳類(マウス、ヒト)の相同なゲノム領域と比較し、脊椎動物におけるホルモン応答性 AQP の進化を推察する。

4. 研究成果

(1)樹上型アマガエル(*Hyla japonica*)の下腹部皮膚からの水吸収は、イソプロテレノールにより促進され、プロプラノロールにより阻害された。ADH とプロプラノロールを同時に作用させると、下腹部皮膚型 AQP と膀胱型 AQP のトランスロケーションが一部の細胞では認められられたが、他の細胞では認められなかった。この結果から、下腹部皮膚からの水吸収は、ADH のみならず、アドレナリン β 受容体を介した刺激でも促進されることが示唆された。

(2)膀胱型 AQP は、陸上型のオオヒキガエル(*Bufo marinus*)の大腿部と下腹部皮膚に認められたが、半水棲型のウシガエル(*Rana catesbeiana*)、ニホンアカガエル(*Rana japonica*)、トノサマガエル(*Rana nigromaculata*)では検出できなかった。一方、下腹部皮膚型 AQP はオオヒキガエルの大腿部、下腹部、胸部の皮膚に認められた。下腹部皮膚型 AQP は、上記 *Rana* 属 3 種の大腿部にも認められ、ウシガエルでは下腹部皮膚にも検出された。AQP が発現している部位では、ADH 応答性の水吸収が認められ、大腿部皮膚では、hydrin 1 と 2 にも応答した。膀胱型 AQP が半水棲型の *Rana* 属の大腿部や下腹部皮膚で発現せず、陸上型の *Bufo* 属の大腿部や下腹部皮膚で発現していることは、これらの種の生息域を決定する要因の一つになっていると考えられる。

(3)水棲型の *Xenopus laevis* では、下腹部皮膚に下腹部皮膚型 AQP の mRNA が発現しているが、AQP タンパク質の産生が検出されなかった。cDNA の解析により、この種の下腹部皮膚型 AQP の C 末端部分は 11 アミノ酸残基長いと予想された。この部分のアミノ酸残基を置換したり、キメラ分子を作製して研究をした結果、この延長部分のアミノ酸残基、あるいはこの部分をコードする mRNA の領域により、AQP タンパク質の産生が阻害されている可能性が示唆された。この現象は、水棲型の *Xenopus laevis* に環境水が流入し過ぎる

のを防ぐのに重要な役割を果たしていると考えられる。

(4)アマガエル Fosmid ライブラリーから AQP-h2K、AQP-h3、RACGAP1 の遺伝子を含むゲノム DNA の配列が得られた。

AQP-h2K では、転写開始点から上流 840bp および下流 1,952bp までを含む 12,111bp の配列、その他 15,310bp、1,069bp、878bp、1,269bp、976bp の 6 つの AQP-h2K 遺伝子周辺のゲノム配列のコンティグが得られた。各コンティグ間には複数の反復配列があるため、コンティグ同士をつなげることができなかった。AQP-h2K は 4 つのエキソンからなり、第 1 エキソンが 400bp、第 2 エキソンが 165bp、第 3 エキソンが 81bp、第 4 エキソンが 410bp であった (図 3-9A)。転写開始点の上流 16bp に TATA ボックス、上流 279bp に GATA ボックスが確認された (図 3-9B)。AQP-h2K とヒト AQP2 の上流 840bp から下流約 1,650bp までのゲノム配列を rVISTA と PipMarker を用いて解析した結果、エキソン以外の領域では高い保存性は見られなかった。

AQP-h3 では、上流 1,923bp と第 1 エキソンを含む 2,475bp の配列、第 2 エキソンと第 3 エキソンと下流 364bp を含む 6,788bp の配列、その他 2,655bp、2,188bp、12,732bp の 5 つの AQP-h3 遺伝子周辺のゲノム配列のコンティグが得られた。各コンティグ間には複数の反復配列があるため、コンティグ同士をつなげることができなかった。AQP-h3 は 3 つのエキソンからなり、第 1 エキソンが 398bp、第 2 エキソンが 165bp、第 3 エキソンが 81bp、第 4 エキソンが 782bp であった (図 3-11A)。転写開始点の上流 395bp に GATA ボックスが確認された。また、上流約 1,693bp から 821bp にかけて ACTCTGGAGCTGTA CACTACTATTCTGCTGGTGAGGTC ACTGTGTACATACATTA CATTACTTATCCTGTACTGATCCTGAGTTAT ATCCTGTATTAT の反復配列、最後のエキソンの上流に位置するイントロンに ACAAGCTGGGCACTGTACTACTGAGG の反復配列が存在していた。

RACGAP1 では、34,771bp の RACGAP1 遺伝子周辺のゲノム配列が得られた。このゲノム配列には RACGAP1 の全エキソンが含まれていた。アマガエルの RACGAP1 をコードする塩基配列は 1,884bp であり、アミノ酸配列は 628 残基から構成されており、70.7kDA であると推定された (図 3-12)。17 のエキソンからなり、第 1 エキソンが 85bp、第 2 エキソンが 203bp、第 3 エキソンが 140bp、第 4 エキソンが 70bp、第 5 エキソンが 54bp、第 6 エキソンが 78bp、第 7 エキソンが 115bp、第 8 エキソンが 128bp、第 9 エキソンが 165bp、第 10 エキソンが 96bp、第 11 エキソンが 199bp、第 12 エキソンが 106bp、第 13 エキソンが 133bp、第 14 エキソンが 130bp、第 15 エキソ

ンが 109bp、第 16 エキソンが 50bp、第 17 エキソンが 23bp であった (図 3-13)。アマガエル RACGAP1 のアミノ酸配列について相同性検索したところ、ヒト RACGAP1 と 74.5%、マウス RACGAP1 と 68.6%、ネッタイツメガエル RACGAP1 と 82.8% という相同性を示した。

本解析により、AQP-h2K および AQP-h3 の各コンティグ間、および AQP-h3 の上流やイントロンに反復配列が存在していることが判明した。これらの反復配列は AQP 遺伝子の重複に関与している可能性がある。

(5)公開されている脊椎動物のゲノムデータを解析し、膀胱型 AQP、下腹部皮膚型 AQP、腎臓型 AQP の遺伝子が FAIM2 と RACGAP1 の間にクラスターを形成している可能性があることを指摘した。さらに、「眼の水晶体で機能する AQP0 をコードする遺伝子が重複し、両生類が分岐する前に、AQP0 のパラログから腎臓型の ADH 応答性 AQP 遺伝子が誕生し、哺乳類まで引き継がれた。そして、無尾両生類への進化の過程では、腎臓型 ADH 応答性 AQP 遺伝子がさらに 2 度重複し、そのパラログから下腹部皮膚型と膀胱型の ADH 応答性 AQP 遺伝子が進化した」という仮説を発表した。この AQP の遺伝子重複とその後の機能分化により、無尾両生類は水分が乏しい環境へと生息域を拡大することができた可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Suzuki M, Tanaka S. Molecular diversity of vasotocin-dependent aquaporins closely associated with water adaptation strategy in anuran amphibians. *J Neuroendocrinol*、査読有、22、2010、407-412
- ② Ogushi Y, Tsuzuki A, Sato M, Mochida H, Okada R, Suzuki M, Hillyard SD, Tanaka S. The water-absorption region of ventral skin of several semiterrestrial and aquatic anuran amphibians identified by aquaporins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*、査読有、299、2010、R1150-1156
- ③ Ogushi Y, Akabane, G, Hasegawa T, Mochida H, Matsuda M, Suzuki M, Tanaka S. Water adaptation strategy in anuran amphibians: molecular diversity of aquaporin. *Endocrinology*、査読有、151、2010、165-173
- ④ Ogushi Y, Kitagawa D, Hasegawa T, Suzuki M, Tanaka S. Correlation between aquaporin and water permeability in response to vasotocin, hydrin, and β -adrenergic effectors in the ventral pelvic skin of the tree frog,

- Hyla japonica. J Exp Biol、査読有、213、2010、288-294
- ⑤ M. Suzuki & S. Tanaka. Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol、査読有、153、2009、231-241
- ⑥ Mochida H, Nakakura T, Suzuki M, Hayashi H, Kikuyama S, Tanaka S. Immunolocalization of a mammalian aquaporin 3 homolog in water-transporting epithelial cells in several organs of the clawed toad *Xenopus laevis*. Cell Tissue Res、査読有、333、2008、297-309

〔学会発表〕(計 15 件)

- ① 松田学、尾串雄次、佐野貴太、岡田令子、鈴木雅一、田中滋康. アフリカツメガエル皮膚アクアポリン AQP-x3 の尿素依存性発現. 第 35 回日本比較内分泌学会大会、2010 年 11 月 19、静岡・グランシップ
- ② 柴田侑毅、佐野貴太、滝田優、持田弘、岡田令子、松田学、鈴木雅一、田中滋康. 乾燥状態におけるネッタイツメガエルの水恒常性維持に関する研究. 第 35 回日本比較内分泌学会大会、2010 年 11 月 19 日、静岡・グランシップ
- ③ 佐藤脩示、小林牧人、尾串雄次、田中滋康、鈴木雅一. キンギョの精液産生に關与するアクアポリンの解析. 第 35 回日本比較内分泌学会大会、2010 年 11 月 19 日、静岡・グランシップ
- ④ 黒木謙信、持田弘、鈴木雅一、田中滋康. 無尾両生類眼球およびその周辺部における水チャネルアクアポリンの発現解析. 第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 25 日、東京・東京大学
- ⑤ 柴田侑毅、原純也、岡田令子、松田学、鈴木雅一、田中滋康. 乾燥状態におけるネッタイツメガエルに発現する新規アクアポリン AQP-xt5'. 第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 23 日、東京・東京大学
- ⑥ 尾串雄次、岡田令子、松田学、鈴木雅一、田中滋康. 半水棲無尾両生類の大腿部に発現する新規水チャネルアクアポリンの同定と機能解析. 第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 23 日、東京・東京大学
- ⑦ 佐野貴太、都築亜純、岡田令子、松田学、成瀬清、田中景子、椎名隆、井ノ上逸朗、鈴木雅一、田中滋康. ネッタイツメガエル *Xenopus tropicalis* の乾燥適応におけるアクアポリンの発現解析. 第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 23 日、東京・東京大学
- ⑧ 佐野貴太、鈴木雅一、田中滋康. ネッタイツメガエルにおけるアクアポリン遺伝子の発現調節. 第 34 回日本比較内分泌学会

大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会、2009 年 10 月 23、大阪・千里ライフサイエンスセンター

- ⑨ 尾串雄次、都築亜純、鈴木雅一、田中滋康. 半陸上棲無尾両生類の pelvic patch における皮膚型アクアポリンの局在. 第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会、2009 年 10 月 23、大阪・千里ライフサイエンスセンター
- ⑩ 尾串雄次、中倉敬、赤羽根弦、佐藤恵、持田弘、鈴木雅一、田中滋康. ニホンアマガエル下垂体における哺乳類アクアポリンに相同な AQP-h3BL の発現. 第 80 回日本動物学会大会、2009 年 9 月 17 日、静岡・グランシップ
- ⑪ 佐藤脩示、小林牧人、尾串雄次、田中滋康、鈴木雅一. 硬骨魚の lobule 型精巣で機能するアクアポリンの解析. 第 80 回日本動物学会大会、2009 年 9 月 17 日、静岡・グランシップ
- ⑫ M. Suzuki, S. Tanaka. Molecular diversity of aquaporins closely associated with water adaptation strategy in anuran amphibians. th world congress on neurohypophysial hormones. 8th Sept, 2009. Kitakyushu, Japan
- ⑬ 鈴木雅一 「両生類におけるアクアポリンの多様性と AVT 応答性の進化」第 19 回バゾプレシン研究会、2009 年 1 月 22 日、東京・慶応義塾大学病院. 研究奨励賞受賞
- ⑭ 鈴木雅一、田中滋康. カエルの水適応におけるアクアポリンの多様性とホルモン調節. 第 35 回日本比較内分泌学会大会、2008 年 12 月 6 日、広島・広島大学
- ⑮ 尾串雄次、赤羽根弦、鈴木雅一、田中滋康. アフリカツメガエルに発現する下腹部皮膚型アクアポリンの発現調節. 第 79 回日本動物学会大会、2008 年 9 月 5 日、福岡・福岡大学

〔図書〕(計 1 件)

Tanaka S, Suzuki M. Nova science publishers, inc. Integrative biology of aquaporins in anuran amphibians. In: "Synthetic and integrative biology: parts and systems, design theory and applications" Editor: JT Gevona. 2010 41-60.

〔その他〕

静岡大学のオープンキャンパス等で本研究の結果を中・高校生らに解説した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 雅一 (SUZUKI MASAKAZU)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：60280913

(2) 連携研究者

成瀬 清 (NARUSE KIYOSHI)

基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・

准教授

研究者番号：50208089