

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15604

研究課題名（和文）ウナギの河川侵入および淡水適応における中枢性ナトリウム利尿ペプチドの役割

研究課題名（英文）Role of central natriuretic peptides in invasion into freshwater environment

研究代表者

片山 侑駿（Katayama, Yuki-toshi）

岡山大学・自然科学研究科・客員研究員

研究者番号：00837601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：CNP4および本研究で新たに同定したCNP4bの脳内発現領域をウナギで明らかにした。またその行動生理学的機能を実験的に明らかにした。比較対象としてメダカやゼブラフィッシュで調べたところ、真骨魚類の進化の過程でCNP4bが生じたあと、一時的にCNP4aとの機能分担が生じたこと、そしてそれがウナギより後に進化した魚類では再び消滅したことが思いがけず明らかになった。この成果は、Cell and Tissue Research（インパクトファクター：4.061）に公表され、水産学のみならず医学生命科学の研究者にも高い評価を得た。すなわち、本研究はおおむね順調に推移した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の進化プロセスに関する基礎的知見が得られた。また、ウナギの保全に関わる知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：We identified mRNA localization of CNP4 and a newly identified CNP4b in the eel brain, and experimentally revealed their behavioral and physiological functions. When compared to medaka and zebrafish, it was unexpectedly revealed that after the emergence of CNP4b during the evolution of bony fish, there was a temporary functional division between CNP4a and CNP4b, which disappeared in fish that evolved later than eels. These findings were published in Cell and Tissue Research (impact factor: 4.061) and were highly regarded by researchers not only in fisheries science but also in medical and life sciences. Therefore, this study proceeded smoothly for the most part.

研究分野：海洋生物学

キーワード：ウナギ 変態 ホルモン 進化

1. 研究開始当初の背景

ナトリウム利尿ペプチド (NP) ファミリーは、円口類から哺乳類まで脊椎動物に広く存在するペプチドホルモンであり、ウナギにおいても心房性 NP (ANP) や B 型 NP (BNP) がホルモンとして血圧調節や飲水行動を調節することがわかってきた (Takei et al., Am J Physiol, 2014)。一方で、傍分泌機能を有する CNP の中枢機能は脊椎動物を通してほとんど明らかになっていない。分子進化学的研究によって、祖先型の CNP が硬骨魚類以前の遺伝子重複により 4 つ (CNP1-4) に分岐したことがわかっている。硬骨魚類ではすべての CNP のサブタイプが保存されていること、そしてそれらの遺伝子が脳に高発現することから、ウナギを含む硬骨魚類の中枢において重要な機能があると予想されている。そこで申請者は、ウナギにおいて CNP1-4 をクローニングし、in situ hybridization を行なって脳内発現マップを作成した。その結果、自律神経と内分泌機能を統合する視床下部に CNP1 と CNP4 が発現していることがわかった。また、延髄において自律的な体液調節に関わる領域に、CNP3 や CNP4 が強く発現していた。驚くべきことに、傍分泌型とされている CNP3 は、内分泌器官である下垂体前葉にも発現していた。では、これらの CNP はどのような生理機能を持っているのであろうか。そしてそれは、ウナギのユニークな回遊生態にどのように関わっているのだろうか。

2. 研究の目的

ウナギの脳および下垂体において、CNP の中枢機能を明らかにする。また、下垂体に発現する CNP3 の淡水適応における役割と、CNP3 がシラスウナギ(稚魚)の淡水適応能の獲得 (または喪失) に関与するのかを検討する。

3. 研究の方法

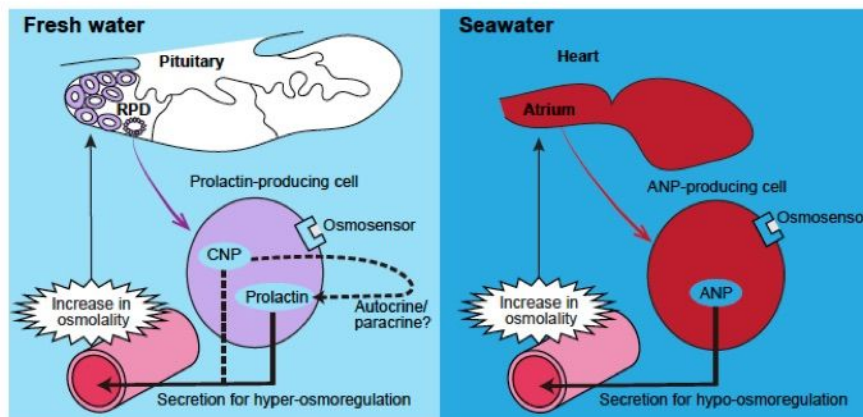
本研究を進める過程で新たに発見した CNP 遺伝子 (CNP4b と命名) を含む脳内発現マップを作るため、in situ hybridization により mRNA の局在を調べた。特に CNP4b は発現量が小さく、通常的手法では解析が困難であったため、in situ hybridization chain reaction 法を魚類で初めて適用した。脳内発現マップをもとに成魚ウナギにおける CNP の機能を予測し、局所投与などの in vivo 実験系および細胞培養などの in vitro 実験系を用いて統合生理学的に解析した。行動実験については、海水に馴致したウナギを異なる浸透圧環境に移し、「パイプアウト行動」を観察することで、ホルモンが淡水への選択的な移動 (侵入) に与える影響について調べる基盤を作った。

4. 研究成果

令和 2 年度 ~ 令和 4 年度の研究期間全体を通じて、おおむね順調に推移した。以下の成果の一部は、Molecular and Cellular Endocrinology (インパクトファクター: 4.369) および Cell and Tissue Research (インパクトファクター: 4.061) に公表した。また日本下垂体研究会等で発表し、水産学のみならず医学生命科学の研究者にも高い評価を得た。

CNP3 発現細胞のクロライド依存的な浸透圧応答

CNP3 の発現領域を in situ hybridization により調べたところ、下垂体のプロラクチン産生細胞や膵島のグルカゴン産生細胞に発現していた。淡水ウナギを海水に移すとその発現量が減少した。さらに、下垂体に発現する CNP3 は血漿クロライドイオン濃度と負の相関があることがわかった。本研究により、魚類の CNP3 が下垂体前葉の新規のホルモンであり、クロライドイオンに反応して淡水適応に重要な役割を担うホルモンであることが示唆された (下図)。近年ヒトでもプロラクチン産生細胞に CNP が発現する場合があることが明らかになりつつあり、以上の成果は医学の分野にも大きく貢献できると考えられる。

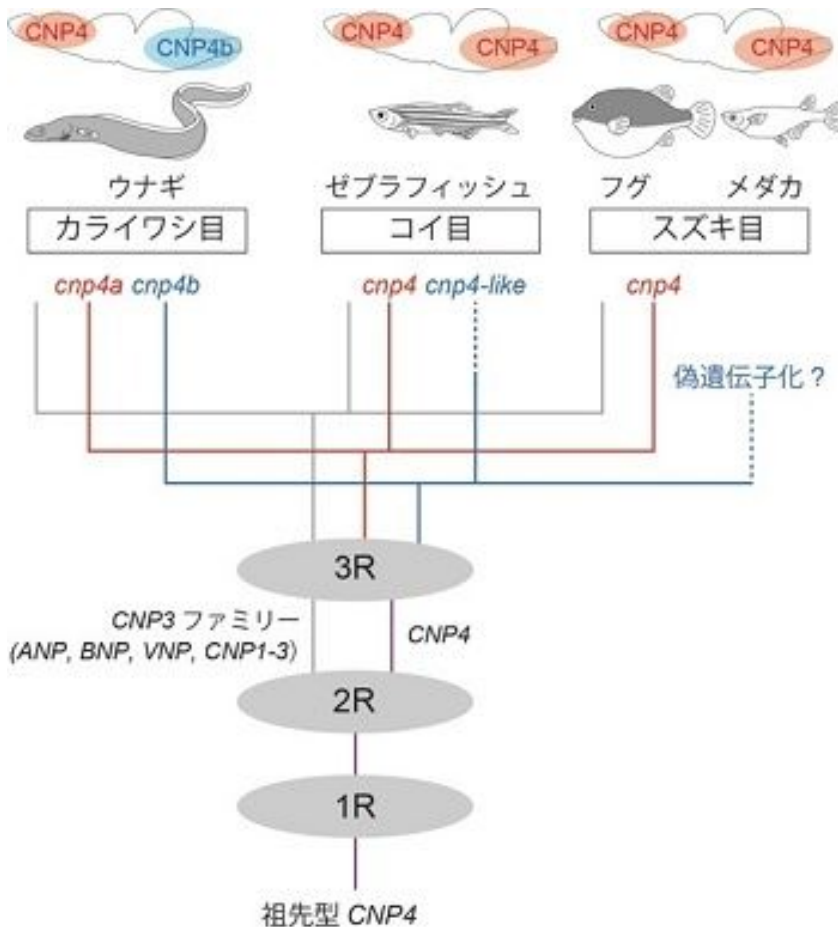


ウナギ脳から新規の CNP 遺伝子を発見

ウナギのゲノムデータベースを用いて CNP 遺伝子を探索したところ、未知の CNP 遺伝子断片を発見した。この情報をもとにウナギ脳組織から新規 CNP 遺伝子のクローニングを行い、その全長構造を決定しました。その遺伝子配列を用いて系統樹解析とシステマティック（構造類似性）解析を行ったところ、今回見つかった新規 CNP は、既存の CNP4 遺伝子のパラログであることがわかり、CNP4b と命名した。これまで脊椎動物において CNP4 遺伝子の重複は確認されていなかったが、ウナギの CNP4b 遺伝子の発見により真骨魚類の進化の過程で起こった全ゲノム重複後で CNP4 遺伝子が 2 つに分化したことがわかった。興味深いことに、この CNP4b に相当する遺伝子は、メダカやフグなどのスズキ目ではすでに偽遺伝子化しており、コイ目のゼブラフィッシュにおいては、遺伝子（CNP4-like と命名）は存在するものの発現はしておらず、機能を失っていることが推測された。つまり、真骨魚類の中でも特に原始的なカライワシ目のウナギを研究材料に用いることで初めて CNP4b 遺伝子の存在を明らかにすることができた。

CNP4 と CNP4b は脳機能を分担している

CNP4 と CNP4b の中枢機能を調べるために、新規 mRNA 検出法である in situ hybridization chain reaction 法を用いて、CNP4 と CNP4b の発現部位を特定することに成功した。CNP4 は終脳（ヒトでは大脳に相当）に発現し、CNP4b は延髄に発現していたことから、それぞれ別の脳機能を有することが示唆された。また、CNP4b が偽遺伝子化しつつある魚種（メダカ・ゼブラフィッシュ）を用いて、CNP4 遺伝子の脳内発現分布を調べたところ、CNP4 は終脳と延髄の両方に発現していた。つまり、進化的に新しい魚種では、CNP4b の偽遺伝子化にともない、CNP4 が終脳と延髄における両方の機能を担うようになったことが示唆された。すなわち、硬骨魚類の進化の過程で CNP4b が生じたあと、一時的に CNP4a との機能分担が生じたこと、そしてそれがウナギより後に進化した魚類では再び消滅したことが明らかになった（下図）。この成果は研究開始当初は予想していなかったものであり、実験対象をウナギにこだわらずメダカやゼブラフィッシュをも活用することで初めて明らかにできたといえる。



CNP が淡水への選択的な移動（侵入）に与える影響

当初予定していた稚魚を用いた行動実験は実行できなかったものの、銀化（変態）した成魚と銀化前の成魚を比較して行動解析を行うことで、淡水域侵入に関わる組織や浸透圧受容体の候補を明らかにすることができた。この成果は研究期間終了後に論文化する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Katayama Yukitoshi, Saito Ami, Ogoshi Maho, Tsuneoka Yousuke, Mukuda Takao, Azuma Morio, Kusakabe Makoto, Takei Yoshio, Tsukada Takehiro	4. 巻 なし
2. 論文標題 Gene duplication of C-type natriuretic peptide-4 (CNP4) in teleost lineage elicits subfunctionalization of ancestral CNP	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-022-03596-y	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Katayama Yukitoshi, Wong Marty Kwok-Shing, Kusakabe Makoto, Fujio Megumi, Takahashi Natsuki, Yaguchi Miku, Tsukada Takehiro	4. 巻 507
2. 論文標題 Seawater transfer down-regulates C-type natriuretic peptide-3 expression in prolactin-producing cells of Japanese eel: Negative correlation with plasma chloride concentration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 110780 ~ 110780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2020.110780	査読の有無 有
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------