

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770077

研究課題名（和文） 魚類の海水適応を担うにがり成分排出トランスポーターの同定と分子機構の解明

研究課題名（英文） Identification of transporters involved in bittern excretion in marine teleost fish

研究代表者

加藤 明 (KATO AKIRA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：40311336

研究成果の概要（和文）：

海水魚は体液の約3倍の高浸透圧環境で生存しているため、常に体液中の水を環境水に奪われる。そこで海水魚は海水を飲み、エラ塩類細胞 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ )、腸 ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )、腎臓 ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , ホウ酸,  $\text{Ca}^{2+}$ ) から余剰なイオンを排出して体液浸透圧を維持する。フグゲノムを利用したイオン輸送体の発現解析及び活性測定の結果、 $\text{SO}_4^{2-}$ , ホウ酸,  $\text{Ca}^{2+}$  の腎排出を担うイオン輸送体を特定した。

研究成果の概要（英文）：

In marine teleost fish, dehydration is avoided through continuous drinking of seawater (SW) and subsequent elimination of excess, acquired ions from the gill ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), intestine ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), and kidney ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , borate,  $\text{Ca}^{2+}$ ). By the expression and functional analyses of ion transporters in the fugu kidney using fugu genome database, we identified ion transporters involved in renal excretion of  $\text{SO}_4^{2-}$ , borate, and  $\text{Ca}^{2+}$ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

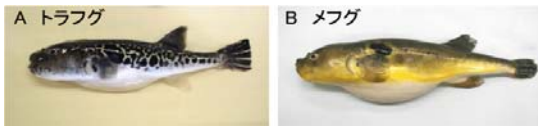
キーワード：生理学, 遺伝子, 海水適応, フグゲノム, イオントランスポーター, 尿管

## 1. 研究開始当初の背景

淡水魚がなぜ淡水中で水ぶくれにならないか。海水魚がなぜ海水中で塩漬けにならないか。魚類はヒトとほぼ同じ体液組成を有しているが、塩濃度が体液の1/100以下の淡水や体液の約3倍の塩分を含む海水の環境下でも体液の組成を一定に保っている。魚類の体液の恒常性は輸送上皮細胞（エラの塩類細胞、腎臓の尿管、腸の粘膜上皮細胞）によるイオンや水の吸収・排出によって維持され、それら上皮細胞に配置されたイオン輸送体、イ

オンチャネル、イオンポンプの収支として統合的に理解できる。本研究では、主に海水魚によるにがり成分（マグネシウム、硫酸、ホウ酸、カルシウム）の排出に着目し、フグゲノム資源とユニークな実験動物（淡水と海水を行き来するメフグ、図1）を駆使して輸送上皮細胞のにがり輸送モデルを構築し、海水魚の繁栄と多様化の謎に迫る。フグゲノム資源を生理学研究に効果的に利用する本手法は、フグモデルとして世界的に認められつつある。

図1 (A) トラフグ (海水魚)。2002年にゲノム配列が公開された。(B) メフグ (淡水・海水のどちらでも生息可能)。トラフグの近縁種。



ム配列が公開された。(B) メフグ (淡水・海水のどちらでも生息可能)。トラフグの近縁種。

## 2. 研究の目的

海水魚は体液の約3倍の高浸透圧環境で生存しているため、常に体液中の水を環境水に奪われる。そこで海水魚は海水を飲み、エラ塩類細胞 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ )、腸 ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )、腎臓 ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , ホウ酸,  $\text{Ca}^{2+}$ ) から余剰なイオンを排出して体液浸透圧を維持する (図2)。本研究ではこれまで解析が進んでいなかった  $\text{NaCl}$  以外の海水成分 (にがり成分:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , ホウ酸,  $\text{Ca}^{2+}$ ) の尿濃縮・腎排出に着目し、フグゲノムを利用した輸送体遺伝子の特定及び腎排出モデルの構築を目指した。

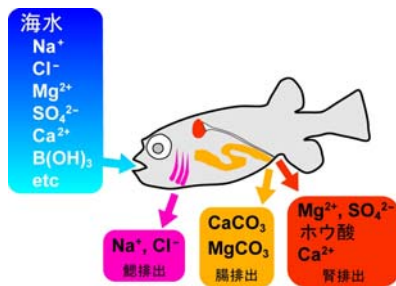


図2 海水魚のイオン排出。

## 3. 研究の方法

「淡水魚では淡水適応に必要な遺伝子が高発現し、海水魚では海水適応に必要な遺伝子が高発現する」という作業仮説を立て、腎臓に高発現するイオン輸送体を網羅的に解析した。フグゲノムデータベースのコンピューター解析により、 $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , ホウ酸,  $\text{Ca}^{2+}$ イオン輸送体のリストを作成し、アミノ酸配列および系統関係を解析した。得られた情報を元に淡水や海水で飼育したメフグ及び海水で飼育したトラフグにおける各遺伝子の組織分布 (脳, 心臓, エラ, 腎臓, 肝臓, 腸, 脾臓, 血液, 鰾, 膀胱など) を網羅的に調べ、腎臓で高発現する遺伝子を特定した。次に腎臓における発現量を淡水メフグと海水メフグで比較し、海水飼育時に発現が誘導される遺伝子を特定した。

候補となるイオン輸送体に対して作製したポリクローナル抗体を用いてフグ腎臓の免疫組織化学的な解析を行い、イオン輸送体が尿側 (apical 膜) と体液側 (basolateral 膜) の

どちらの細胞膜に局在するか明らかにした。その後 *Xenopus oocyte* を用いた電気生理学的な解析により輸送体の特性を調べ、にがり成分 ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , ホウ酸,  $\text{Ca}^{2+}$ イオン) の腎排出モデルの構築を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 硫酸イオンの腎排出モデルの構築: 腎尿細管における硫酸排出を担うトランスポーター *Slc26a6A* を同定し、フグ *Slc26a6A* が哺乳動物の相同遺伝子 (マウス *Slc26a6*) に比べて 10~100 倍の硫酸透過性を有することを明らかにした (図3)。受理された論文 (業績④) は Editorial Focus で紹介された。

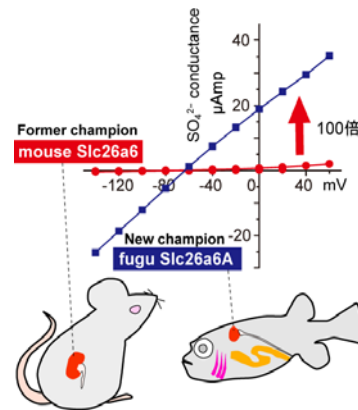


図3 フグ *Slc26a6A* とマウス *Slc26a6* の活性比較。グラフは *Xenopus oocyte* に発現させたフグ *Slc26a6A* とマウス *Slc26a6* の硫酸イオン依存的な電流-電圧特性を示す。

(2) ホウ酸イオンの腎排出モデルの構築: 海水魚がホウ酸を尿中に濃縮して排泄することを初めて見だし、その担い手となるホウ酸輸送体 *Slc4a11* を同定した。また *Slc4a11* が尿細管の原尿側細胞膜上に発現することを免疫組織化学により明らかにした。*Xenopus oocyte* を用いた電気生理学的な解析の結果、フグ *Slc4a11* は起電性の排出型ホウ酸イオンチャネルであることを明らかにした (図4, 投稿中)。

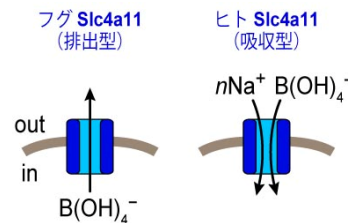


図4 フグ *Slc4a11* (本研究) とヒト *Slc4a11* (Park et al. 2004) の活性比較。

(3) マグネシウム, カルシウムの腎排出モデルの構築: 海水魚の尿は約 140 mM の

Mg<sup>2+</sup>を含む。フグ腎臓に発現する Mg<sup>2+</sup> 輸送体遺伝子の網羅的な発現解析の結果、尿細管に高発現する Mg<sup>2+</sup> 輸送体遺伝子を3種特定した。今後、特異的抗体による免疫組織化学および *Xenopus oocyte* や培養細胞を用いた活性測定を行う。

また海水魚の尿は 7.5~40 mM の Ca<sup>2+</sup> を含むが、その腎排出機構はよく調べられていない。哺乳動物の神経や筋肉の細胞膜で Ca<sup>2+</sup> 排出を担う Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交換輸送体 (Slc8a2, NCX2) がフグ腎臓に高発現することを見だし、フグ NCX2 による Ca<sup>2+</sup> の腎排出モデルを提案した (図5, 投稿中)。

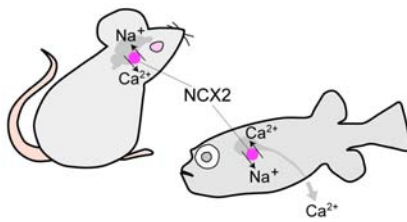


図5 マウス脳およびフグ腎臓における NCX2 発現。

(4) 海水魚腎臓における尿濃縮モデルの構築：海水魚は尿中から Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O を再吸収して Mg<sup>2+</sup> や SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> を濃縮する。トラフグ腎臓の集合管に Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter 2 が高発現することを見だし、尿濃縮モデルを提案した (業績②)。

#### 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5件)

- ① Kato A, Romero MF. Regulation of electroneutral NaCl absorption by the small intestine. *Annu Rev Physiol* 73: 261-281, 2011 (査読無し)
- ② Kato A, Muro T, Kimura Y, Li S, Islam Z, Ogoshi M, Doi H, Hirose S. Differential expression of Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter 2 in the distal nephrons of euryhaline and seawater pufferfishes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R284-97, 2011 (査読有り)
- ③ Nawata CM, Hirose S, Nakada T, Wood CM, and Kato A. Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure. *J Exp Biol* 213: 3150-3160, 2010 (査読有り)
- ④ Kato A, Chang MH, Kurita Y, Nakada T, Ogoshi M, Nakazato T, Doi H, Hirose S, Romero MF. Identification of renal

transporters involved in sulfate excretion in marine teleost fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297, R1647-R1659, 2009 (査読有り)

- ⑤ Kato A, Maeno T, Hirose S. Brief migration of the grass puffer, *Takifugu niphobles*, to fresh water from salt water. *Ichthyol Res*, 57(3), 298-304, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計6件)

- ① Kimura Y, Kurita Y, Kato A, Doi H, Hirose S. Mechanism of Borate Secretion by the Kidney of Seawater Fish. The 5<sup>th</sup> TOIN International Symposium on Biomedical Engineering (November 6, 2010, Yokohama, Japan)
- ② Islam Z, Kato A, Hirose S. Expression analysis of Mg<sup>2+</sup> transporters in the kidney of marine and euryhaline pufferfishes. The 5<sup>th</sup> TOIN International Symposium on Biomedical Engineering (November 6, 2010, Yokohama, Japan)
- ③ Nawata CM, Hirose S, Nakada T, Wood CM, Kato A. Molecular Physiology of Ammonia Excretion in the Pufferfish (*Takifugu rubripes*). The Society for Experimental Biology (SEB) Meeting 2010 (June 30, 2010, Prague, Czech)
- ④ Hirata T, Kato A, Chang MH, Hirose S, Romero MF. Pufferfish Slc26a5 (prestin) exchanges Cl<sup>-</sup> for oxalate, sulfate, and bicarbonate. *Experimental Biology* 2010 (April 6, 2010, Anaheim, USA)
- ⑤ Islam Z, Kato A, Hirose S. Identification of kidney magnesium transporters in marine teleost fish. The 4<sup>th</sup> TOIN International Symposium on Biomedical Engineering (October 30, 2009, Yokohama, Japan)
- ⑥ Kimura Y, Kurita Y, Kato A, Doi H, Hirose S. Excretion of Borate by the Kidney of Seawater Fish. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences. (August 1, 2009, Kyoto, Japan)

[その他]

ホームページ

<http://www.hirose.bio.titech.ac.jp/>

米国生理学会 (The American Physiological Society, APS) の比較進化生理学部門で、New Investigator Award を受賞 (2011年2月15日) [http://www.titech.ac.jp/topics/news/detail\\_1713.html?id=topics](http://www.titech.ac.jp/topics/news/detail_1713.html?id=topics)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 明 (KATO AKIRA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
助教  
研究者番号：40311336