

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 8月 23日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770061

研究課題名（和文）

両生類の発生過程で起こる窒素代謝変換をトリガーする因子の探索とその作用機構の解明

研究課題名（英文）

Explore of the regulatory factors involved in the nitrogen metabolic conversion in the ontogeny of amphibians

研究代表者

今野 紀文（KONNO NORIFUMI）

富山大学・大学院理工学研究部・助教

研究者番号：50507051

研究成果の概要（和文）：

アフリカツメガエルの発生過程で起こるアンモニア排泄型から尿素合成・排泄型への窒素代謝変換をトリガーする因子を探索した。その結果、アンモニアから尿素を合成する律速酵素（CPS I）とグルココルチコイド受容体（GR）の発現パターンが類似した。また、幼生個体へのコルチコステロン処理によってCPS1発現レベルが上昇し、GRアンタゴニスト処理によってCPS1発現レベルが低下することを確認した。発生初期段階におけるCPS1の発現にコルチコステロンとその受容体GRが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

During amphibian metamorphosis, the liver begins to synthesize the urea cycle enzymes necessary to create urea from carbon dioxide and ammonia. We explored the regulatory factor involved in a shift of nitrogen metabolism from ammonotelic to ureotelic. The expression of carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) mRNA was first detected at st.47 tadpoles, suggesting that early tadpole produces and excretes urea. We examined the mRNA expression changes in glucocorticoid receptor (GR), CREB, HNF3 $\alpha$ , and C/EBP $\alpha$  during ontogeny. In the results, GR expression was markedly increased in st.44-45 tadpole. We also revealed that corticosterone treatment for *Xenopus* tadpole (st.44) increased the expression level of CPS I mRNA. Accordingly, CPS I expression (urea synthesis) in early tadpole of *Xenopus laevis* appears to be mediated by corticosterone and its receptor (GR).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・形態・構造

キーワード：比較内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

両生類はその発生過程において“変態”というきわめてユニークなイベントを経験する。変態過程では多くの組織や器官が幼生型から成体型へと再構築されるだけでなく“生

理システムの変換”も同時に起こる。その1つに“窒素代謝システムの変換”が挙げられる。体内のアミノ酸やタンパク質の分解によって生じた有害なアンモニアを、オタマジャクシ（幼生）は魚類と同様に直接鰓から水中

に排泄できるが、成体ではアンモニア排泄に要する水の喪失を抑制するために、肝臓の尿素回路を通して毒性の低い尿素へと変換して尿中に排泄する。この窒素代謝変換の仕組みは、変態現象のトリガー因子である“甲状腺ホルモン”によって誘導されると古くから考えられてきた。しかし、最近、申請者は、尿素回路の律速酵素であるカルバミルリン酸合成酵素 (CPS I) が変態より以前の幼生初期で既に発現し、尿素も排泄していること、また同時期に副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンの血中レベルがピークに達していることを発見した。これらの知見から、窒素代謝変換がこれまで考えられてきた定説とは異なり、そのトリガー因子も甲状腺ホルモンではない別の因子 (コルチコステロン?) である可能性が高まった。

両生類と同様の仕組みを持つと予想される我々、哺乳類成体では、これまで肝臓での尿素合成機構は詳細に調べられている。その一方で、母体の胎盤を通してアンモニアを排泄する胎児 (幼生型) の窒素代謝機構や、出生直前に起こる窒素代謝変換の仕組みはほとんど解明されていない。さらに窒素代謝変換が起こることで新生児期に発症する尿素サイクル異常症 (アンモニアの過剰蓄積) は未だ有効な治療法が確立されていない。その理由は哺乳類の個体発生が母体内で進行するために胎児でのメカニズムを研究する有効な実験系が無いことに起因している。それに対して、両生類の発生は体外で進行するため顕微鏡下で容易に実験・観察ができ、尿素合成に働く分子群も哺乳類と完全に一致していることから、哺乳類の発生過程における窒素代謝機構を解明する上で優れたモデル動物となりうる。

## 2. 研究の目的

本研究は両生類の発生過程で起こるアンモニア排泄型から尿素合成・排泄型への窒素代謝変換をトリガーする因子を探索し、その作用機構の解明を目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究では、両生類の代表的なモデル動物であるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を用いて、個体発生における尿素合成酵素 (CPS I) の発現を誘導する因子を探索した。個体発生における CPS I 遺伝子や種々の転写因子 (グルココルチコイド受容体 (GR)、cAMP 応答配列結合タンパク質 1 (CREB1)、HNF3 $\alpha$ 、C/EBP $\alpha$ ) の発現動態はリアルタイム PCR 法によって定量した。幼生が実際に尿素の合成および排泄を行っているかを確かめるため、飼育水中の尿素濃度をウレアーゼ・インドフ

ェノール法により定量した。また、生体内での CPS1 発現と局在を時間・空間的に可視化するためのトランスジェニック *Xenopus* の作成に取り組んだ。これまでに CPS1 プロモーター配列と GFP 遺伝子を連結させたコンストラクトを作成した。受精卵へのコンストラクトの導入は I-SceI メガスクレアーゼ法により行う。発生初期に尿素を産生する生物学的意義を探るための研究において、尿素回路が肝臓や消化管、腎臓に存在する糖新生経路を介してグルコース産生に関わっていることが考えられたため、*Xenopus* の初期発生における糖新生酵素遺伝子 (PEPCK, FBP, G6Pase) の発現動態をリアルタイム PCR 法により解析した。現在、初期発生における尿素産生において、尿素回路酵素と糖新生経路との関連性について探っている。

## 4. 研究成果

我々はアフリカツメガエルを用いて、アンモニアから尿素を合成する律速酵素 (CPS I) の発現を誘導する因子を探索した。まず、発生過程における CPS I 遺伝子の発現動態をリアルタイム PCR 法によって定量したところ、受精後 5 日目の st. 47 から顕著な CPS I 遺伝子の発現が検出された。st. 47 幼生が実際に尿素の合成および排泄を行っているかを確かめるため、飼育水中の尿素濃度をウレアーゼ・インドフェノール法により定量した。その結果、st. 47 幼生から飼育水中に尿素が検出され、この時期にアンモニア排泄に加えて、尿素も合成し排泄していることが示された。CPS I 遺伝子の発現を調節する因子を探索するため、CPS I 遺伝子の 5' 上流領域の転写因子結合サイトを予測したところ、グルココルチコイド応答配列や cAMP 応答配列の他、肝細胞核因子 3 $\alpha$  (HNF3 $\alpha$ ) や CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 (C/EBP $\alpha$ ) の結合サイトが確認された。そこで、グルココルチコイド受容体 (GR)、cAMP 応答配列結合タンパク質 1 (CREB1)、HNF3 $\alpha$ 、C/EBP $\alpha$  の個体発生における発現変化を解析した結果、CREB1、HNF3 $\alpha$  と C/EBP $\alpha$  は顕著な変化を示さなかったが、GR は受精後 4 日の st. 44~45 をピークとする発現変化を示した。したがって、発生初期段階における CPS1 の発現にコルチコステロンとその受容体 GR が関与している可能性が示唆された。また、幼生個体へのコルチコステロン処理によって CPS1 発現レベルが上昇すること、グルココルチコイド受容体アンタゴニスト処理によって CPS1 発現レベルが低下することを確認した。また、生体内での CPS1 発現と局在を時間・空間的に可視化するためのトランスジェニック *Xenopus* の作成に取り組んだ。これまでに CPS1 プロモーター配列と GFP 遺伝子を連結させたコンストラクトを

作成したが、トランスジェニック個体の作成には至っていない。さらに、発生初期に尿素を産生する生物学的意義を探るための研究も進めた。尿素回路において、アルギニノコハク酸からアルギニンへの代謝産物として生じるフマル酸は肝臓や消化管、腎臓に存在する糖新生経路を介してグルコース産生に関わっていることが知られている。そこで、*Xenopus* の発生初期における糖新生酵素遺伝子 (PEPCK, FBP, G6Pase) の発現動態を解析した。その結果、CPS1 発現が上昇する st47 (受精後 5 日) 付近でこれらの遺伝子発現量も増加していることが示された。現在、発生初期における尿素産生において、尿素回路酵素と糖新生経路との関連性について探っている。

#### 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) Uchiyama M, Kumano T, Konno N, Yoshizawa H, Matsuda K. Ontogeny of ENaC expression in the gills and the kidneys of the Japanese black salamander (*Hynobius nigrescens* Stejneger). *Journal of Experimental Zoology B Mol. Dev. Evol.*, 316B, 2011, 135-145.

(2) Kamiyo M, Kojima K, Maruyama K, Konno N, Motohashi E, Ikegami T, Uchiyama M, Shioda S, Ando H, Matsuda K. Neuropeptide Y in tiger puffer (*Takifugu rubripes*): distribution, cloning, characterization and mRNA expression responses to prandial condition. *Zoological Science*, 28, 2011, 882-890.

(3) Kaiya H, Koizumi Y, Konno N, Yamamoto K, Uchiyama M, Kangawa K, Miyazato M. Ghrelin receptor in two species of anuran amphibian, bullfrog (*Rana catesbeiana*) and Japanese tree frog (*Hyla japonica*). *Frontiers in Experimental Endocrinology*, 2, 2011, 1-13.

(4) Uchiyama M, Komiyama M, Yoshizawa H, Shimizu N, Konno N, Matsuda K. Structures and immunolocalization of Na(+), K(+)-ATPase, Na(+)/H(+) exchanger 3 and vacuolartype H(+) -ATPase in the gills of blennies (Teleostei: Blenniidae) inhabiting rocky intertidal areas. *Journal of Fish Biology*, 80, 2012, 2236-2252.

(5) Yamaguchi Y, Kaiya H, Konno N, Iwata E, Miyazato M, Uchiyama M, Bell JD, Toop T, Donald JA, Brenner S, Venkatesh B, Hyodo S. The fifth neurohypophysial hormone receptor is structurally related to the V2-type receptor but functionally similar to V1-type receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 178, 2012, 519-528.

(6) Uchiyama M, Maejima S, Yoshie S, Kubo Y, Konno N, Joss J. The epithelial sodium channel in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* (Osteichthyes: Dipnoi). *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 2012, 4795-4802.

[学会発表] (計 14 件)

(1) Mamoru Hanatachi, Kouhei Matsuda, Minoru Uchiyama, Norifumi Konno. Effect of cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) on early development of *Xenopus laevis*. 第 44 回日本発生生物学会, 2011 年 5 月 18 日-21 日, 沖縄コンベンションセンター

(2) 今野紀文, 宮岸佳奈, 花立 守 富山県の野生メダカの分布と遺伝子汚染の現状について、平成 23 年度日本動物学会中部支部大会、2011 年 7 月 30 日-31 日、福井大学

(3) 花立 守, 松田恒平, 内山 実, 今野紀文 アフリカツメガエルの発生初期段階における塩化カドミウムの影響 平成 23 年度日本動物学会中部支部大会、2011 年 7 月 30 日-31 日、福井大学

(4) 今野紀文, 海谷啓之, 小池俊貴, 山口陽子, 兵藤 晋, 松田恒平, 内山 実 メダカで見つかった 7 種の神経葉ホルモン受容体の機能的特徴づけ 第 82 回日本動物学会、2011 年 9 月 21 日-23 日、旭川大雪アリーナ

(5) 今江春香, 海谷啓之, 松田恒平, 内山 実, 今野紀文 アフリカ肺魚における神経葉ホルモン受容体のクローニングと夏眠での発現変化 第 82 回日本動物学会、2011 年 9 月 21 日-23 日、旭川大雪アリーナ

(6) 宮岸佳奈, 海谷啓之, 山口陽子, 兵藤 晋, 松田恒平, 内山 実, 今野紀文 メダカにおける新規バソトシン受容体 (V1c/V4R) の特徴づけ 第 36 回日本比較内分泌学会、2011 年 11 月 23 日-26 日、都道府県会館

(7) 木次祐介, 松田恒平, 内山 実, 今野紀

文 ツメガエルの個体発生におけるカルバミルリン酸合成酵素 1 (CPS1) の発現制御機構 第 36 回日本比較内分泌学会、2011 年 11 月 23 日-26 日、都道府県会館

(8) 藤井優哉、松田恒平、内山 実、今野紀文 ツメガエルの脊髄に存在する神経分泌細胞の探索 第 36 回日本比較内分泌学会、2011 年 11 月 23 日-26 日、都道府県会館

(9) 花立 守、加藤 明、松田恒平、内山 実、今野紀文 メダカの腎臓における V2R と NCC を介したナトリウム調節 第 83 回日本動物学会、2012 年 9 月 13 日~2012 年 9 月 15 日、大阪大学豊中キャンパス

(10) 今野紀文、藤井優哉、今江春香、松田恒平、内山 実 アフリカツメガエルのウロテンシン II 受容体の局在から新しいホルモン作用を探る 第 83 回日本動物学会、2012 年 9 月 13 日~2012 年 9 月 15 日、大阪大学豊中キャンパス

(11) 丸山剛史、内山 実、前嶋 翔、N. Preyavichyapugdee、C. Wanichanon、松田恒平、今野紀文 汽水棲カニクイガエルの乾燥と海水順化における尿素輸送体と水チャネルの発現 日本動物学会中部支部大会、2012 年 11 月 17 日~2012 年 11 月 18 日、松本

(12) 富山詩織、藤井優哉、松田恒平、内山 実、今野紀文 アフリカツメガエルのウロテンシン II とその関連ペプチド (URP) は白血球遊走を促進する 日本動物学会中部支部大会、2012 年 11 月 17 日~2012 年 11 月 18 日、松本

(13) 宮岸佳奈、海谷啓之、山口陽子、兵藤晋、松田恒平、内山 実、今野紀文 メダカにおける新規バソトシン受容体 V2bR の免疫組織学的解析 第 37 回日本比較内分泌学会、2012 年 11 月 30 日~2012 年 12 月 01 日、福井大学

(14) 今江春香、藤井優哉、椋田崇生、松田恒平、内山 実、今野紀文 ウロテンシン II 受容体はツメガエルとラットの軟骨細胞に発現する 第 37 回日本比較内分泌学会、2012 年 11 月 30 日~2012 年 12 月 01 日、福井大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今野 紀文 (KONNO NORIFUMI)

研究者番号：50507051

