

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440165

研究課題名(和文)両生類におけるアクアポリンの多様性と進化、および環境適応に関する分子生物学的研究

研究課題名(英文) Diversity and molecular evolution of aquaporins in amphibians

研究代表者

鈴木 雅一 (Suzuki, Masakazu)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：60280913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカのサヘルに生息する無尾両生類では、膀胱でAQP6/a2Uが水再吸収に関与している可能性が示唆された。さらに、ネッタイツメガエルの表皮の解析により、AQP6/a2Sが水が少ない環境に順応する際に重要である可能性が示唆された。また、抗利尿ホルモン応答性の経上皮水輸送機構の起源が無尾類と有尾類の祖先種まで遡る可能性が示唆された。カエルツボカビ症については、症状の発現にAQP6/a2S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)：Our study suggested that in some African toads, AQP6/a2U may be involved in water reabsorption from the urinary bladder. Further, our analysis of the skin of tropical clawed frogs suggested that AQP6/a2S may play an important role in the acclimation of this species to dry environments. It was also suggested that the molecular machinery for antidiuretic hormone-regulated transepithelial water transport may originate in a common ancestor to anurans and urodeles.

研究分野：内分泌学

キーワード：アクアポリン 両生類 無尾類 有尾類 水輸送

## 1. 研究開始当初の背景

無尾両生類は、淡水域、水辺、森林、砂漠など、多様な環境に適応放散している。無尾類の成体は、通常水を口から飲むことはなく、多くの種では腹側皮膚から吸水する。そして、腎臓で水を再吸収し、さらに膀胱でも水再吸収をすることで、体内の水恒常性を維持している。これらの浸透圧調節器官における水移動は、抗利尿ホルモンなどにより調節されることが知られている。私達はこれまでに、1) 無尾両生類では、腹側皮膚、膀胱、腎臓の上皮細胞の頂部側に異なる抗利尿ホルモン応答性 AQP (腹側皮膚型 AQP6/a2, 膀胱型 AQP6/a2, および腎臓型 AQP2) が存在し、水の取り込みに関わることなどを報告してきた。本研究プロジェクトでは、無尾類としてネッタイツメガエル、Amietophrynus 属のカエル、イエアメガエル、そして有尾類としてブチイモリを対象とした。ネッタイツメガエルは通常水生種とされるが、アフリカ西部の生息地では乾季に水が欠乏し、陸に上がることが知られている。しかしながら、その際の水恒常性維持機構についてはほとんど報告がない。Amietophrynus 属のカエルについては、アフリカのサヘルに生息するが、その環境適応に必須な水調節機構についてはほとんど知られていない。イエアメガエルについては、ツボカビ感受性が高いことが世界的問題となっているが、水調節の観点からの研究が不十分である。そして、有尾類については、AQP に関する知見がほとんどない。

## 2. 研究の目的

無尾類：ネッタイツメガエルは水中で飼育すると水生型であるが、減水条件で飼育すると陸生型に誘導されるので、この2つの生理状態の特性を調べ、比較する。さらに、RNA-seq 解析により、発現している AQP の種類と発現量の変化を明らかにする。Amietophrynus 属のカエルについては、膀胱での水再吸収機構を解析する。

有尾類：陸生種のブチイモリの水恒常性維持機構を AQP の観点から明らかにし、比較する。さらに、無尾類の結果と総合して、両生類の水恒常性維持機構の進化様式について推察する。ツボカビ：樹上種のイエアメガエルを感染させ、生理状態の変化を解析する。

## 3. 研究の方法

無尾類：ネッタイツメガエルについては、Ussing chamber を用いた *in vitro* の実験系で、皮膚の水透過率を測定した。さらに、免疫蛍光染色により、腹側皮膚型 AQP6/a2 の発現動態を解析した。さらに、水中および減水条件で飼育した成体から、下腹部皮膚を採取して RNA-seq 解析を行った。Amietophrynus 属のカエルについては、共同研究者の Ouedraogo 博士 (University of Ouagadougou, Burkina Faso, Africa) が抗利尿ホルモンを膀胱に作用させて、PLP 固定を行い、静岡大

の当研究室に送付した。その後、静岡大学で AQP6/a2 の細胞での挙動を免疫蛍光染色により調べた。

有尾類：陸生の野生種ブチイモリについては、共同研究者の Hillyard 教授 (University of Nevada, USA) が、米国で下腹部皮膚をサンプリングし、静岡大学の当研究室に送付した。その後、静岡大学で cDNA クローニングと免疫蛍光染色を行った。

ツボカビ：共同研究者の宇根有美教授 (麻布大学) の研究室でイエアメガエルにツボカビを感染させ、腹側皮膚をサンプリングした。そして、静岡大学で cDNA クローニングと免疫蛍光染色を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 無尾類における水輸送機構

ネッタイツメガエル：水生のネッタイツメガエルでは、水中生息時に腹側皮膚型 AQP (AQP6/a2S) mRNA の発現が認められず、転写が抑制されていた。しかし、減水環境下で飼育すると AQP6/a2S の mRNA およびタンパク質が検出された。さらに、減水環境下で飼育したツメガエルの皮膚の水透過能を Ussing chamber を用いて解析した結果、皮膚の水透過性が増加することも示された。したがって、ネッタイツメガエルは、減水環境下では腹側皮膚を介して水吸収を行うことにより、乾燥した環境に順応している可能性がある。

本結果を自然環境下のツメガエルで検証するため、共同研究者の Ouedraogo 博士がアフリカ・ブルキナファソで乾季に野生のツメガエルを採取し、皮膚の水透過性を解析したが、個体差が大きく、水中時と減水時で有意差は認められなかった。

本種に関しては RNA-seq 解析を行い、水中および減水条件下の表皮で発現する RNA を総合的に比較解析した。その結果、減水条件下で AQP6/a2S の発現が著しく亢進することが判明し、乾季を生きながらえる際の本分子の重要性が示された。

Amietophrynus 属のカエル：アフリカのサヘルに生息するカエルでは、膀胱に抗利尿ホルモンを作用させると AQP6/a2U が管腔側上皮の主細胞である顆粒細胞の頂端側に検出された。生理実験の結果と総合すると、AQP6/a2U は膀胱での水再吸収に関与していると推察される。この分子機構は、本種が水の乏しい環境に生息する上で重要な役割を果たしている可能性がある。

### (2) 有尾類における水輸送機構

ブチイモリ：陸生のブチイモリは、陸上では約1時間で体重が10%減少し、その後再び水に浸すと約1時間で体重が元のレベルまで回復した。成体の腹側皮膚を用いて AQP6/a2S の局在を解析すると、AQP6/a2S は抗利尿ホルモンに反応して表皮最外顆粒細胞の頂端側細胞膜に移行した。これらの結果は、ブチイモリが多くの陸生無尾両生類と同様に、抗利尿ホルモン応答性 AQP の局在を変化させるこ

とで、腹側皮膚から水を吸収し水恒常性を維持していることを示唆している。本研究により、有尾類が無尾類と同様の腹側皮膚型 AQP を介した水吸収機構を有していることが示され、ホルモン応答性経上皮水吸収機構の起源がカエル目とイモリ目の共通の祖先種まで遡る可能性が示唆された。

### (3) カエルツボカビ症

イエアメガエル：カエルツボカビを樹上生種のイエアメガエルに感染させた結果、感染個体では表皮細胞における AQP6/a2S の局在が攪乱されていることが判明した。ホルモン応答性経上皮水吸収機構の攪乱が、ツボカビ感染症によるカエルの死因の一つである可能性が考えられる。

### 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)

M. Suzuki, Y. Shibata, Y. Ogushi, & R. Okada. Molecular machinery for vasotocin-dependent transepithelial water movement in amphibians: aquaporins and evolution Biol. Bull., 229, 109-119, 2015. [査読] 有  
DOI: 10.1086/BBLv229n1p109

Y. Shibata, I. Katayama, T. Nakakura, Y. Ogushi, R. Okada, S. Tanaka, & M. Suzuki. Molecular and cellular characterization of urinary bladder-type aquaporin in *Xenopus laevis*. Gen. Comp. Endocrinol., 222, 11-19, 2015. [査読] 有  
DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.09.001

柴田侑毅, 鈴木雅一. 水中および乾燥順応時のネツタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) における2種類のAQP5 (AQP-xt5a および AQP-xt5b) の遺伝子発現と局在. 比較内分泌学 40, 128-130, 2014. [査読] 無

Y. Shibata, T. Sano, N. Tsuchiya, R. Okada, H. Mochida, S. Tanaka, & M. Suzuki. Gene expression and localization of two types of AQP5 in *Xenopus tropicalis* under hydration and dehydration. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 307, R44-R56, 2014. [査読] 有  
DOI: 10.1152/ajpregu.00186.2013

Y. Saitoh, Y. Ogushi, Y. Shibata, R. Okada, S. Tanaka, & M. Suzuki. Novel vasotocin-regulated aquaporins expressed in the ventral skin of semiaquatic anuran amphibians: evolution of cutaneous

water-absorbing mechanisms. Endocrinology, 155, 2166-2177, 2014. [査読] 有  
DOI: 10.1210/en.2013-1928

鈴木雅一, 田中滋康. アクアポリンの構造, 機能, およびその多様性 - 脊椎動物を中心として. 生化学 86, 41-53, 2014. [査読] 有

#### [学会発表](計13件)

鈴木雅一. 両生類の環境適応におけるアクアポリンの役割. 第3回「水シグ、ナリングの分子動態から病態へ」研究会. 2017年03月7~8日, アオッサ(福井・福井市)

鈴木雅一. 両生類の水代謝. 日本比較内分泌学会大会. 2016年12月10日, 北里大学(神奈川・相模原市)

S. Hillyard, Y. Shibata, R. Ishii, T. Nagai, M. Suzuki. Further characterization of anuran-like aquaporins in the urinary bladder of urodeles, *Notophthalmus viridescens* and *Cynops phrrhogaster*. Experimental Biology 2016. 2016年4月2~6日, San Diego(米国)

嘉手苅将, 柴田侑毅, 常盤俊大, 鈴木雅一, 宇根有美. カエルツボカビ感染が皮膚水吸収に与える影響. 第3回獣医学専門家協会学術集会. 2016年3月29~30日, 三鷹市公会堂(東京・三鷹市)

石井凌, 柴田侑毅, 内山実, 嘉手苅将, 常盤俊大, 宇根有美, スタンリー・ヒルヤード, 長井孝紀, 鈴木雅一. 両生類における新規AQPの同定及びAQPの分子進化. 日本動物学会第86回新潟大会. 2015年9月17~19日, 朱鷺メッセ(新潟・新潟市)

S.D. Hillyard, Y. Shibata, T. Nagai, M. Suzuki. Anuran-like aquaporins in the skin and urinary bladder of a urodele, evidence for early gene duplication in the lissamphibia. Experimental Biology 2015. 2015年3月28日~4月1日, Boston(米国)

M. Suzuki, Y. Shibata, R. Okada. Molecular evolution and physiological roles of aquaporins expressed in anuran osmoregulatory organs. The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology. 2014年11月7~9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知・岡崎市)

T. Ueno, Y. Shibata, H. Sano, S. Yamashita, M. Suzuki. Spatial and

temporal expression of aquaporins, AQP2 and AQP3, in the kidney during metamorphosis of the tree frog, *Hyla japonica*. The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology. 2014年11月7~9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知・岡崎市)

Y. Shibata, T. Sano, R. Okada, S. Tanaka, & M. Suzuki. Expression and function of aquaporins in *Xenopus tropicalis* under hydration and dehydration. 第39回日本比較内分泌学会大会. 2014年11月7~9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知・岡崎市)

柴田佑毅, 嘉手苅将, 常盤俊大, 宇根有美, 鈴木雅一. カエルツボカビ(*Batrachochytrium dendrobatidis*)が無尾両生類の皮膚を介した水透過性に与える影響. 平成26年度日本動物学会中部支部大会能登大会. 2014年11月22~24日, 金沢大学環日本海域環境研究センター臨海実験施設(金沢・能登町)

Y. Shibata, M. Suzuki, T. Nagai, S.D. Hillyard. Anuran-specific aquaporin 2 ortholog in a urodele, evidence for early gene duplication in amphibian evolution. APS fall meeting. 2014年10月5~8日, San Diego(米国)

柴田佑毅, S.D. Hillyard, 岡田令子, 鈴木雅一, 長井孝紀. 有尾両生類における腹側皮膚型アクアポリン(AQP2S)の機能と分子進化. 第85回日本動物学会大会. 2014年9月11~13日, 東北大学川内北キャンパス(宮城・仙台町)

Y. Shibata, S. Kadokaru, T. Tokiwa, Y. Une, M. Suzuki. Influence of the chytrid fungus on cutaneous water permeability of anuran amphibians. ELSU symposium 2014. 2014年9月29~30日, B-Nest(静岡・静岡市)

〔図書〕(計2件)

鈴木雅一. ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ 第5巻 ホメオスタシスと適応-恒-, 第7章 皮膚, 裳華房, 106~121, 2016

Y. Shibata, M. Suzuki. Advances in Animal Science and Zoology, Chapter 9 Aquaporins and water homeostasis in *Xenopus*, Nova Science Publishers, 119~133, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木雅一(SUZUKI, Masakazu)  
静岡大学・理学部・教授  
研究者番号: 60280913

(2) 研究分担者

宇根有美(UNE, Yumi)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号: 40160303

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

Stanley D. Hillyard  
University of Nevada, USA, Professor

Youssoufou Ouedraogo  
University of Ouagadougou, Burkina Faso,  
Lecturer