

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650110

研究課題名(和文)単離腎ネフロン分節からのトランスクリプトーム：広塩性のマスター分子解明に向けて

研究課題名(英文) Transcriptome analysis using an isolated nephron segment to identify important factors for euryhalinity of fish

研究代表者

兵藤 晋 (HYODO, SUSUMU)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：40222244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、軟骨魚類では数少ない広塩性種であるオオメジロザメをモデルに、広塩性と狭塩性の違いを決定する因子を見出すことを目的としている。オオメジロザメ腎臓のRNA-seq、de novoアセンブリによって非モデル生物である軟骨魚類のリファレンスコンティグセットを作成するとともに、海水・淡水環境で発現が変化する遺伝子を網羅的に同定した。後部遠位尿管や集合細管が淡水移行により顕著な発現変化を引き起こす重要な分節であり、プロラクチンをはじめとする広塩性支配に関わる候補因子を複数同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify crucial factors that contribute to the euryhalinity of fish by using bull shark (*Carcharhinus leucas*), a unique euryhaline species in cartilaginous fishes, as a model organism. We conducted RNA-seq of bull shark kidney using seawater- and freshwater-acclimated fish, and have found a large number of important genes; expression levels of which were considerably up-regulated or down-regulated following the freshwater acclimation. The late distal tubule and the collecting tubule of the bull shark nephron are considered to be crucial segments for the euryhalinity of bull shark. We successfully found candidate factors important for the euryhalinity, such as prolactin, insulin-like growth factors, and stanniocarcin.

研究分野：魚類生理学、比較生理学、比較内分泌学

キーワード：広塩性 オオメジロザメ 腎臓 ネフロン 膜輸送体 ホルモン プロラクチン

1. 研究開始当初の背景

体内(細胞内)の恒常性を維持することは、生物が生存するために必要不可欠である。あらゆる生物は生息する環境に様々な仕組みで適応しており、そのため多くの生物は極端に異なる環境には適応できない。例えば海水魚を淡水に入れると死んでしまう。そのような中、海水にも淡水にも適応できる「広塩性魚」は、その驚くべき能力ゆえに研究者の注目を集めてきた。

では、広塩性を可能にする仕組みとは何だろうか? 鰓や腎臓・消化管といった「現場の器官」では、環境変化によってオンオフされる分子、例えばイオン輸送に関わる膜輸送体が多数見つかってきている。一方で、その上流に存在するマスター分子の存在が想定されているものの、未だ不明である。最近では、次世代シーケンサーによる大規模解析が可能となり、広塩性のマスター分子を狙ったトランスクリプトーム解析(RNA-seq)も行われつつある。しかしここでの問題は、鰓や腎臓・消化管などの体液調節器官が、異なる機能、そして異なるトランスクリプトームを持つ細胞の集まりだということである。それらをまとめて解析に供することが、重要な因子の発見を妨げてしまっているのではないかと常々考えてきた。

サメ類のほとんどは海水環境でしか生きられない狭塩性種であるが、オオメジロザメはサメ類の中で唯一の広塩性種である。我々はオオメジロザメの研究から、海水環境から淡水環境に移行させた時に、腎ネフロンの特定の部位で膜輸送体の発現が顕著に変化することを見出した。広塩性に関わる標的部位を単離し、均一な機能を持つ部位に限定したRNA-seqを行うことができれば、転写因子やホルモンなど、広塩性を規定するマスター分子の発見にたどり着けるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、海水環境と淡水環境で機能に大きな変化が起こる腎ネフロン分節を単離し、RNA-seqを行うことで、転写因子やホルモンなどの広塩性を規定するマスター分子の発見につなげることである。そのためには、まず、機能が変化する腎ネフロン分節を同定することが必要である。軟骨魚類の腎臓は、尿細管の周囲を静脈血が満たすサイナス領域と、尿細管が細胞性の膜で包まれるバンドル領域からなる。一本の尿細管はサイナス領域とバンドル領域を4回のループにより行き来し、形態学的に少なくとも10種類の異なる分節から成ることが、我々のグループを含めた研究により明らかになっている。そこで、これら多数の分節のうち、オオ

メジロザメを淡水移行させたときに機能が大きく変化し、しかも狭塩性種ではそのような変化が起こらない分節を同定することを最初の目的とした。

一方で、特定の分節を単離するためには、膜輸送体などを特異的なマーカーとして抗体染色などを行い、染色された分節を顕微鏡かで単離する方法がもっとも確実だと考えた。そこで、固定・染色した組織から良質なRNAを抽出し、PCRによる増幅を効率的に行う手法を確立することも必要である。この方法が確立できた後に、特定の分節から抽出したRNAを用いてRNA-seqを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

オオメジロザメは、沖縄美ら海水族館で飼育繁殖された7個体を使用した。そのうちの海水飼育4個体は麻酔後採血・採尿し、腎臓を含むさまざまな組織を採取し、凍結あるいは複数の固定液で処理した。3個体は容量約15トンの飼育水槽に移し、毎日10-20%ずつ塩分濃度を低下させ、1週間でほぼ淡水レベルまで下げた。淡水移行1-3日後に海水群と同様にサンプリングを行った。

オオメジロザメ腎臓の組織化学的解析は、パラホルムアルデヒド固定あるいはブアン固定した組織を用いて行った。パラフィン切片を作製した後、すでに確立した手法を用いて*in situ* hybridizationを行い、膜受容体遺伝子の発現部位を調べた(Takabe et al., 2016)。また、Na/K-ATPase(NKA)は市販の抗体を使用し、NaCl共輸送体(NCC)はオオメジロザメのNCCに対する特異的抗体を作製し、免疫組織化学染色を行った。腎ネフロンの形態と分節の同定は、ゾウギンザメなどでのこれまでの知見を元に行なった(Kakumura et al., 2015; Hasegawa et al., 2016)。

RNA-seqは、理研CDBの工場のもとで稼働しているイルミナのHiSeq 1500にて行った。固定組織からのRNA調整のためには、パラホルムアルデヒド固定した腎臓組織をコラゲナーゼ処理によりほぐし、染色後、RNA調整を行った。

4. 研究成果

(1) オオメジロザメの淡水移行

オオメジロザメはサメ類の中でほぼ唯一淡水環境にも生息できることが示されてきているが、飼育実験下で海水環境から淡水環境へと移行させた例はない。実験の結果、急激な塩濃度の低下には耐えられないものの、段階的な環境塩濃度の低下に対しては、問題なく生存できることがわかった。淡水環境でも、血漿中には高濃度のイオンと尿素を保持し、その浸透圧は約700ミリオスモルであっ

た。尿のデータはこれまでほとんど存在しなかったが、淡水環境では糸球体濾過量を増やし、イオンや尿素などの再吸収を亢進していることが明らかになった。また、さまざまな組織の凍結ならびに個体サンプルを入手することができた。本研究に加え、今後さまざまな研究に対して、さらには国内外の研究者コミュニティに貴重なサンプルの提供が可能となった。

(2) オオメジロザメ腎臓の RNA-seq

非モデル生物である軟骨魚類で RNA-seq を行う難しさは、リファレンスとなる大規模配列情報が存在しない点にある。そこでまず、オオメジロザメ腎臓のリファレンスコンテイングセットを作成することと、腎臓全体での発現変動を明らかにすることを目的として、海水飼育 2 個体と淡水飼育 2 個体を用いて、RNA-seq を行った。HiSeq によりシーケンシングを行った後、Trinity ソフトを用いて de novo アセンブリを行うことでコンテイングセットを作成した。得られたアセンブリがどの程度の網羅性を持つかを調べたところ、70% 以上のオーバーラップが存在する条件であっても、80% 程度の網羅性を持つことがわかった (Hara et al., 2015)。サンプル間の発現量の統計的な比較には edgeR プログラムを用いた。発現プロファイルをクラスタリング解析したところ、海水飼育群と淡水飼育群で明確な独立クラスターを形成することが確認され、発現変動を調べるツールとして優れたデータセットを得られたことがわかった。

発現が変動する遺伝子を調べたところ、すでに我々が見出している NCC に加え、上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) など多くの膜輸送体の発現が淡水移行により上昇することが明らかになった。ENaC は硬骨魚真骨類には存在しないと考えられており、軟骨魚類で発見され、しかも環境塩濃度の変化にตอบสนองすることがわかったことは、環境適応機構の進化を理解する上できわめて重要な発見である。一方で、淡水移行により発現が減少する遺伝子も多数見つかった。その一例が Slc26 ファミリー遺伝子である。最近我々は Slc26a1 と Slc26a6 が、尿細管の第 2 ループを構成する近位尿細管 II 分節において、体内に過剰となる二価イオンを排出する輸送体であることを見出している (Hasegawa et al., 2016)。海水環境では二価イオンは体内に過剰となるために腎臓から排出するが、淡水環境では逆に体内に不足するため、Slc26 の発現が低下すると考えられた。上記の NCC や Slc26 を含め、発現が上昇あるいは低下する

ことが示唆された主要な遺伝子に関しては、独立に定量 PCR を行い、発現がたしかに変化していることを検証した。

(3) 膜輸送体の発現が変化する尿細管分節の解析

我々はすでに、NaCl の再吸収に関わる NCC という膜輸送体が、海水環境ではほとんど発現がみられないのに対し、淡水移行により第 4 ループを構成する遠位尿細管後部 (LDT) で顕著に発現が高まることを見出していた。淡水移行により膜輸送体の発現が制御される分節を単離するためには、発現が変動しないコントロールとなる分節を見出すことも必要である。また、その現象が広塩性のオオメジロザメだけに起こり、ドチザメのような狭塩性種では起こらないことを確認することも必要である。そこで、NCC や ENaC をはじめとする NaCl 輸送分子群、尿素輸送体などに注目し、発現部位と発現量を組織化学的に検討した。

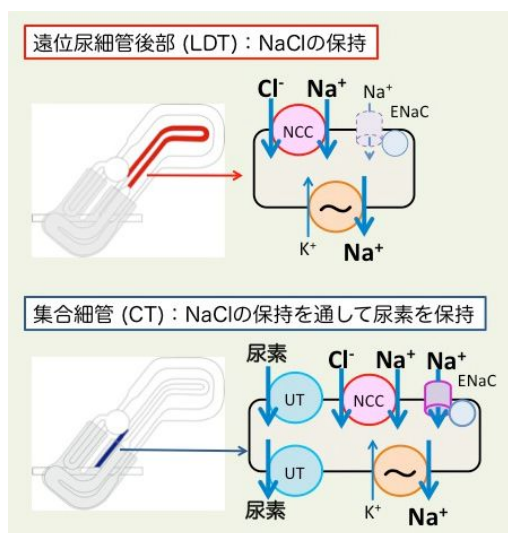
オオメジロザメでは、我々の予備実験結果と一致して、NCC の発現は淡水移行により LDT で顕著に上昇した。ただし、LDT だけでなく、最終分節である集合細管の前半部にも、淡水移行により発現するようになることが新たにわかった。ENaC は、やはり淡水移行により LDT での発現が上昇した。LDT に加えて、集合細管全体で、淡水移行により発現が顕著に上昇することがわかった。一方、NaCl の輸送体の中でも、NaKCl 共輸送体 2 (NKCC2) の発現は第 3 ループを構成する遠位尿細管前部 (EDT) にみられ、その発現は淡水移行によりほとんど変化することはなかった。NaCl 輸送の駆動力を生み出す NKA の発現は淡水移行により上昇したが、LDT と集合細管だけでなく EDT でも上昇した。

さらに、前述したとおり、第 2 ループに発現する二価イオン輸送体は淡水移行により減少した。オオメジロザメ腎臓には複数の水チャネル (アクアポリン、AQP) が発現していたが、そのうちの AQP1 と AQP4 の発現が淡水移行により上昇することがわかった。ゾウギンザメでは AQP4 は第 1 ループを構成する近位尿細管第 1 分節に発現することを最近見出した (長谷川ら、未発表データ)。第 1 ループと第 3 ループ、そして集合細管はバンドル領域に存在し、細胞性の膜で包まれている。バンドル領域における水と NaCl の再吸収は、最終的に尿素を再吸収するために必要不可欠な現象だと我々は考えている (Hyodo et al., 2014)。したがって、第 1 ループにおける AQP 発現の上昇や集合細管における NCC や ENaC の発現の上昇は、水や NaCl の再吸収が最終目的ではなく、軟骨魚類にとって最重要課題である「尿素の再吸収・保持」機能を亢

進するために必要なことだと考えている（今関ら、未発表データ）。一方で、LDTにおけるNCCとENaC、NKAの発現上昇は、NaClを体内に保持することを目的としており、それゆえ海水環境ではNCCやENaCの発現が非常に低いのだと考えられる。

狭塩性のドチザメでは、NCCの発現量はとても低かった。ドチザメは淡水環境では生存できないものの、希釈海水には耐えることができる。しかしながら、希釈海水に移行させても、NCCの発現はわずかにしか上昇せず、発現する部位もLDTの末端部のみであった。そのため、オオメジロザメと比べると、NCCの発現量は1/100以下というきわめて低いものであった。

本研究の結果から、第4ループを構成するLDTがNCCとENaCを発現して淡水環境でのNaCl再吸収を引き起こす本体であることがわかり、これらの発現を制御する因子を明らかにすることが、広塩性を支配するマスター分子に近づくことであることがわかった。ただし、NCCの発現は集合細管前部でも、ENaCの発現は集合細管全体で上昇することから、LDTと集合細管前部、集合細管後部で同じ制御がはたらくのか、制御メカニズムが異なるのか、これまで想定していたものよりも、複雑な制御メカニズムの存在が示唆された。また、第1ループでの水再吸収、第2ループでの二価イオン輸送も淡水移行により大きく変化することから、これらの動きも考えながらネフロン分節の単離を行わなければならないことが明らかとなった。



(4) 固定組織からのRNA抽出とPCR増幅

哺乳類など、他の脊椎動物の腎臓では、ネフロンが比較的整然とならんでいるため、ピンセットなどで剥がしてだけでネフロンを単離できる。しかしながら、軟骨魚類の腎臓では、ネフロンが非常に長く絡み合っ

おり、しかもバンドル領域は5つの分節が膜状の鞘に包まれており、さらにそれらが互いに巻き付いている。したがって、コラゲナーゼなどの化学的処理を行うこととした。本研究では個体の入手が容易なドチザメを使用し、集合細管にのみ発現する尿素輸送体の抗体で染色することにより、集合細管を単離することに成功した。そこからのRNA抽出も、収量に関しては問題ないことがわかった。しかしながら、尿素輸送体 mRNAの増幅を試みたところ、その増幅効率は非常に低いことがわかった。パラフィン切片からの核酸抽出試薬等も試みたものの、顕著な改善は見られなかった。ただし、増幅長を50塩基程度まで短くすると、その増幅効率は上昇した。これらのことから、メチル化など核酸の修飾が高頻度におこり、そのために長い領域の増幅を阻害してしまったのかもしれない。一方で、微量RNAを元にしたRNA-seqにおいて、オリジナルに近い発現プロファイルを維持したライブラリを作成できるQuartz-Seqプロトコルの改変など、微量RNAからのRNA-seqを行うための技術開発を進めることはできた。上記の課題に加え、各ネフロン分節の環境応答機構が想定していたものよりもきわめて複雑であることがわかったこともあり、単離分節からのRNA-seqを行うまでには至らなかった。今後の課題である。

(5) 淡水移行により発現が変化するホルモン：マスター分子候補の探索

(2)で行ったRNA-seqの結果、腎臓において発現が変化するホルモンならびにその受容体も複数明らかになった。中でも興味深いものとして、スタニオカルシンとインスリン様成長因子があげられる。スタニオカルシンはもともと硬骨魚で発見されたホルモンであり、その後哺乳類でも見つかった。軟骨魚類では初めての発見であることに加え、スタニオカルシンは硬骨魚類において血中カルシウム濃度を低下させるホルモンであるが、オオメジロザメでは淡水移行によって発現が上昇した。その役割ならびに産生部位は未解明であるが、カルシウム濃度や浸透圧などを感受した情報がスタニオカルシン産生細胞に送られ、尿管での再吸収機能を制御している可能性がある。インスリン様成長因子は海水適応に重要であることが硬骨魚真骨類で知られている。オオメジロザメを淡水に移行させると、その発現は10倍近く上昇し、その作用を抑制する結合タンパク質の発現が減少した。スタニオカルシンと同様、真骨魚での変動とは逆であるが、オオメジロザメの腎機能の制御に重要な役割を果たすことが示唆される。

並行して行っていた脳下垂体のRNA-seqに

においてはプロラクチンが、腎臓組織からはプロラクチン受容体と考えられる遺伝子がえられた。プロラクチンは真骨魚類では淡水適応に重要なホルモンだが、これまで30年以上にわたる研究にもかかわらず軟骨魚類には見つからず、存在しないのではないかと考えられてきた。我々の研究から軟骨魚類にもプロラクチンが存在することを世界で初めて発見し (Yamaguchi et al., 2015)、腎臓にその受容体が発現していることから、オオメジロザメの広塩性との関係が注目される。以上のとおり、特定のネフロン分節からのRNA-seqなど課題も残されたが、腎ネフロンの機能と広塩性との関係、さらには広塩性に関与する可能性があるホルモンを複数同定するなど、本研究開始時には想定していなかった成果もあげることができた。RNA-seqデータには未解析の候補分子が多数存在しており、本研究はオオメジロザメの広塩性、さらには魚類の広塩性を制御する分子の発見に向けての意義の大きな萌芽研究となったと考えている。

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14件)

Hasegawa K, Kato A, Watanabe T, Takagi W, Romero MF, Bell JD, Toop T, Donald JA, Hyodo S. (2016) Sulfate transporters involved in sulfate secretion in the kidney are localized in the renal proximal tubule II of the elephant fish (*Callorhynchus milii*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 310, in press. doi: 10.1152/ajpregu.00477.2015 査読有

Takabe S, Inokuchi M, Yamaguchi Y, Hyodo S. (2016) Distribution and dynamics of branchial ionocytes in houndshark reared in full-strength and diluted seawater environments. *Comp Biochem Physiol A*, 198, 22-32. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.03.019 査読有

Kakumura K, Takabe S, Takagi W, Hasegawa K, Konno N, Bell JD, Toop T, Donald JA, Kaneko T, Hyodo S. (2015) Morphological and molecular investigation of the holocephalan elephant fish nephron: the existence of a countercurrent-like configuration and two separate diluting segments in the distal tubule. *Cell Tissue Res*, 362, 677-688. doi: 10.1007/s00441-015-2234-4 査読有

Onimaru K, Kuraku S., Takagi W, Hyodo S., Sharpe J, Tanaka M. (2015) A shift in anterior-posterior positional information underlies the fin-to limb evolution. *eLife*, 4, e07048. doi: 10.7554/eLife.07048 査読有

Yamaguchi Y, Takagi W, Kuraku S., Moriyama S, Bell JD, Seale AP, Lerner DT,

Grau EG, Hyodo S. (2015) Discovery of conventional prolactin from the holocephalan elephant fish, *Callorhynchus milii*. *Gen Comp Endocrinol*, 224, 216-227. doi: 10.1007/s00441-015-2234-4 査読有

Tatsumi K, Nishimura O, Itomi K, Tanegashima C, Kuraku S. (2015) Optimization and cost-saving in tagmentation-based mate-pair library preparation and sequencing. *Biotechniques* 58: 253-257, 2015. doi: 10.2144/000114288 査読有

Hara Y, Tatsumi K, Yoshida M, Kajikawa E, Kiyonari H, Kuraku S. (2015) Optimizing and benchmarking de novo transcriptome sequencing: from library preparation to assembly evaluation. *BMC Genomics* 16: 977. doi: 10.1186/s12864-015-2007-1 査読有

Takagi W, Kajimura M, Tanaka H, Hasegawa K, Bell JD, Toop T, Donald JA, Hyodo S. (2014) Urea-based osmoregulation in the developing embryo of oviparous cartilaginous fish (*Callorhynchus milii*): contribution of the extraembryonic yolk sac during the early developmental period. *J Exp Biol*, 217, 1353-1362. doi: 10.1242/jeb.094649 査読有

Hyodo S., Kakumura K, Takagi W, Hasegawa K, Yamaguchi Y. (2014) Morphological and functional characterization of the kidney of cartilaginous fishes: with special reference to urea reabsorption. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 307, R1381-R1395. doi: 10.1152/ajpregu.00033.2014 査読有

Feiner N, Meyer A, Kuraku S. (2014) Evolution of the vertebrate Pax4/6 class of genes with focus on its novel member, the Pax10 gene. *Genome Biol Evol*, 6, 1635-1651. doi: 10.1093/gbe/evu135 査読有

Godard BG, Coolen M, Le Panse L, Gombault A, Ferreiro-Galve S, Laguerre L, Lagadec R, Wincker P, Poulain J, Da Silva C, Kuraku S., Carre W, Boutet A, Mazan S. Mechanisms of endoderm formation in a cartilaginous fish reveal ancestral and homoplastic traits in jawed vertebrates. *Biol Open*, 3, 1098-1107. doi: 10.1242/bio.20148037 査読有

[学会発表](計14件)

今関到、広塩性軟骨魚オオメジロザメの腎機能に関する分子生理学的研究。平成28年度日本水産学会春季大会、2016年3月28日、東京海洋大学(東京)

井上夏紀、Distribution and function of neurohypophysial hormone receptors in catshark。日本比較内分泌学会第40回大会。2015年12月12日、JMSアステールプラザ 広島(広島)

位寄あゆこ、Dynamics of plasma corticosteroid in cannulated houndsharks under various stress

condition. 日本比較内分泌学会第 40 回大会。2015 年 12 月 12 日、JMS アステール蒲ラザ広島（広島）。

長谷川久美、アクアポリンの局在から明らかとなった軟骨魚類腎臓における尿素再吸収機構。日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日。新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ（新潟）。

内田勝久、トラザメの下垂体における糖タンパク質ホルモン cDNA のクローニングと発現部位の同定。日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日。新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ（新潟）。

Kuraku S., Vanishing phylogenetic signals? Revisiting molecular phylogenies of cyclostome genes. Symposium on palaeontological and molecular approaches to early vertebrate evolution. 2015 年 5 月 12 日、Uppsala University (Sweden)。

Kuraku S., Assessing vertebrate homolog space. 4th Wuest for Orthologs Meeting. 2015 年 5 月 26 日、Barcelona Biomedical Research Park, Barcelona (Spain)。

工樂樹洋、脊椎動物ファイローム～分子生物学の基本ツールとしての分子系統学へ～。新学術領域「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」第 7 回オープンセミナー、2014 年 12 月 11, 12 日、東京大学柏キャンパス（千葉）。

兵藤晋、軟骨魚類ゾウギンザメの脳下垂体からのプロラクチンの発見。第 85 回日本動物学会大会、2014 年 9 月 13 日、東北大学（宮城・仙台）。

Takagi W., A functional shift of urea-producing site from extraembryonic yolk sac to liver in the developing embryos of two oviparous cartilaginous fishes. 11th International Congress on the Biology of Fish. 2014 年 8 月 5 日、Heriot-Watt University, Edinburgh (Scotland)。

Hyodo S., Molecular-histochemical investigation of cartilaginous fish kidney. 11th International Congress on the Biology of Fish. 2014 年 8 月 4 日、Heriot-Watt University, Edinburgh (Scotland)。

〔図書〕(計 1 件)

Hyodo S. Neurohypophysial hormone family. In Handbook of Hormones, Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research. pp. 39-52, 2015, Academic Press.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://seiri-aori.org/index.php?id=12> (兵藤)

<http://www2.clst.riken.jp/phylo/> (工樂)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵藤 晋 (HYODO SUSUMU)
東京大学・大気海洋研究所・准教授
研究者番号：40222244

(2) 研究分担者

工樂樹洋 (KURAKU SHIGEHIRO)
国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー
研究者番号：40391940