

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07468

研究課題名(和文) 魚類と両生類の比較解析から解き明かすバソプレシン/バソトシンV2受容体の機能進化

研究課題名(英文) Comparative analyses of vasotocin V2 type receptor in fish and amphibians

研究代表者

今野 紀文 (Norifumi, Konno)

富山大学・学術研究部理学系・講師

研究者番号：50507051

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)：四肢動物において、バソプレシン/バソトシンは腎臓に発現するV2型受容体を介して水の再吸収の促進に作用する。しかし、水中生活を営む魚類のバソトシンの働きについてはほとんど解っていなかった。本研究では広塩性魚であるメダカのバソトシンの機能について調べた。V2型受容体を機能喪失させたメダカの作成に成功し、その表現型を解析したところ、鰓のAQP3の発現がKO個体で減少していることが明らかとなった。この結果は、魚類において、バソトシンが鰓に発現するV2受容体を介してAQP3発現を調節し、水電解質代謝に関与している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陸上に進出した両生類以降の脊椎動物では、バソプレシン/バソトシンは腎臓に発現するV2受容体を介してAQP2の発現を増加させて抗利尿に作用する。しかし、水中生活を営む魚類でのバソトシン-V2受容体系の働きは不明であった。魚類でのバソトシン-V2受容体系の機能解明は、我々、陸上動物が進化の過程で、いつ、どのように抗利尿作用を獲得したのかという脊椎動物の進化に影響を与え得る。魚類にAQP2が無いこと、バソトシン-V2受容体が鰓のAQP3の発現に関わるという本研究の結果は、魚類のバソトシン-V2受容体系が四肢動物とは異なる機能を有していること、抗利尿作用は四肢動物系統で発達したことを明確にした。

研究成果の概要(英文)：In tetrapods(mammal, avian, reptile, and amphibians), vasopressin/vasotocin is involved in water reabsorption via V2-type receptor expressing in the kidney. However, it has not been cleared the functions of vasotocin in teleost fish. In the present study, we examined the functions of vasotocin and V2-type receptor in the euryhaline Japanese medaka (*Oryzias latipes*). We succeeded in generating a V2-type receptor knockout medaka by using the genome editing technique TALEN. As the results of phenotype analyses, we founded a significant decrease in the branchial water channel AQP3 expression. It has been known that AQP3 requires to promote glycerol and urea permeability and water transport across cell membranes in vertebrates. This results suggest that vasotocin may act on water and ion regulation through AQP3 expression via V2-type receptor in fish.

研究分野：比較内分泌

キーワード：バソプレシン バソトシン 抗利尿 水再吸収 腎臓 メダカ 進化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、陸上には、ヒトを含め多種多様な脊椎動物が繁栄している。“脊椎動物は、いつ、どのようにして、水から離れて陸上環境に適応できたのだろうか？”その答えのひとつが、我々の祖先が進化という長い時間の中で、“水を体内に保持する”仕組みを獲得したことにある。その“水の保持”に必須の役割を果たすのが、抗利尿ホルモンとも呼ばれるバソプレシンである。バソプレシンは腎臓に発現する V2 受容体 (V2aR) を介して水チャネルの発現を調節し、原尿からの水を再吸収して体内に戻す働きを制御している。この V2aR の異常は腎性尿崩症という深刻な疾患を引き起こし、尿を濃縮できずに水を失ってしまう (脱水)。それ故、脊椎動物の陸上進出の歴史を明らかにするための鍵として、V2aR を介するバソプレシンの抗利尿作用が多くの研究者の注目を集めてきた。

バソプレシンとそのオーソログであるバソトシンは全ての脊椎動物に存在するが、V2aR は両生類以降の動物群 (四肢動物) でしか見つかっていなかった。そのため、V2aR を介した水保持機構は最初に陸上に上がった両生類で獲得されたと考えられてきた。しかし、最近、申請者は四肢動物に最も近縁な魚類である肺魚類の腎臓に V2aR が発現しており、その抗利尿作用は夏眠と呼ばれる陸生適応時にのみ現れ、水中生活時には機能しないことを発見した。これは、V2aR を介する抗利尿作用が肺魚のような原始的な肉鰭類ですでに備わっており、陸上への進化に重要な役割を果たしたことを示唆している。しかし、その後の研究で、メダカをはじめとする真骨魚類にも機能的な V2aR が存在することを発見した。ただし、水中生活を営むメダカの V2 受容体に抗利尿作用は確認されておらず、その役割は未だ不明である。

### 2. 研究の目的

肺魚の V2aR は夏眠 (陸生化) に伴って抗利尿作用に働くが、実は水中生活時にも発現している。さらに V2aR はメダカの腎臓でも発現が確認されている。では、水生動物において、V2aR は一体、何に働いているのだろうか？陸上動物で抗利尿作用に働く V2aR は、もともとどのような役割をもつ受容体だったのだろうか？本研究の目的は、真骨魚類において、V2aR の機能を明らかにすることである。魚類でのバソトシン-V2aR の機能を明らかにすることで、V2 受容体の機能進化が脊椎動物の環境適応の歴史 (水生から陸生への進化) にどのような影響を与えたのかという、生命進化の謎の解明に貢献する。

### 3. 研究の方法

#### (1) V2a 受容体ノックアウトメダカの作出

メダカはゲノム配列が解読されているだけでなく、淡水と海水の両方の環境に適応できる広塩性を示すことから、浸透圧調節研究の優れた実験モデルである。また、遺伝子組換えやゲノム編集といった遺伝子工学も簡便に行えるというアドバンテージをもつ。そこで、メダカの V2aR 遺伝子をゲノム編集でノックアウトしたメダカ (V2aR-KO) の作出を行い、その表現型を解析することで、メダカにおけるバソトシン-V2aR の機能を探った。ゲノム編集は TALEN 法により行い、遺伝子型は RFLP 法によって判別した。また、V2aR だけでなく、V1aR についても KO メダカの作出とその表現型の解析を行った。

#### (2) V2a 受容体ノックアウトメダカの表現型解析

V2aR-KO メダカを用いた表現型解析は、正常個体と KO 個体を、淡水から海水へ、海水から淡水へと浸透圧環境を変化させた際に、KO 個体でどのような生理的变化を伴う表現型が出現するのかを調べる。もし、メダカの V2aR が四肢動物と同様に抗利尿作用を示すのであれば、KO メダカは体液よりも高張な海水環境では生存できないことが予想される。これらの解析で特定の表現型が観察された場合は、V2 受容体を介した機能の作用点 (標的分子) を同定し、その現象に至る作用機序を明らかにする。標的とする遺伝子の発現量比較はリアルタイム-PCR 解析で行い、標的遺伝子の細胞局在は *in situ* hybridization 法により評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) V2a 受容体ノックアウトメダカの作出

メダカ V2aR 遺伝子の第一エクソン領域で二本鎖切断が起こるように TALEN を設計し、TALEN mRNA を合成した。その後、メダカ受精卵にマイクロインジェクションして発生させ、RFLP 法を用いた遺伝子型判別とシーケンズ解析により、V2aR 機能が欠失した変異体のスクリーニングを行った。その結果、第一エクソン内の 13 塩基が欠失して stop コドンが出現する変異体が得られ、V2aR-KO メダカの系統化に成功した。

#### (2) V2a 受容体ノックアウトメダカの表現型解析

V2aR の機能を探索するため、作製した V2aR-KO メダカと野生型メダカ (WT) を低張飼育水 (淡水) 等張飼育水 (300 mOsm 人工海水) 高張飼育水 (600 mOsm 人工海水) に順化させた後、それらの筋肉水分率と血漿 Na<sup>+</sup>濃度を測定し、両群で比較した。その結果、いずれの処理群においても、筋肉水分率および血漿 Na<sup>+</sup>濃度に有意な差異は認められなかった。四肢動物において、

V2aR の機能欠損は腎臓での水再吸収ができずに脱水を引き起こすことが知られているが、メダカでは高張液処理にもかかわらず脱水が起こらなかった。これは魚類の V2aR は四肢動物がもつような抗利尿作用に関与しないことを示唆している。また、V2aR-KO メダカの鰓において AQP3 水チャネルの発現が野生型に比べて低下していることを見出した。鰓に発現する AQP3 は通常、淡水環境下で発現が高く、高張環境下でほとんど発現していないことが示されており、V2aR-KO メダカは両環境下で発現が顕著に低かった。鰓の AQP3 発現が VT-V2aR 系による制御を受けている可能性が示唆された。

### (3) 鰓における V2aR と AQP3 の局在

メダカの鰓に V2aR mRNA が発現していることから、鰓での AQP3 と V2aR の局在について、in situ hybridization 法により調べた。その結果、AQP3 mRNA に対する標識は Na-K-ATPase が高発現する塩類細胞に観察された。しかしながら、V2aR mRNA に対する標識は観察されず、その発現量が輸送体などに比べてかなり低いことに起因した結果となった。今後は、低発現の mRNA をより高感度に検出できる実験系（チラミド増感）を用いて、再度、V2aR mRNA の局在を調べたい。

### (4) 培養細胞を用いたメダカ V2aR と AQP3 との関連性

鰓の AQP3 の発現制御にバソトシン-V2aR 系が関連していると仮説し、以下のことを調べた。メダカ V2aR を安定発現させた培養細胞(HEK293)を樹立し、その細胞に AQP3 の 5' 上流領域(約 2.3 kbp)とレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)を連結した発現ベクターを導入後、リガンド添加によるレポーター遺伝子の発現をルシフェラーゼアッセイにより調べた。ポジティブコントロールの cAMP 応答配列+レポーター遺伝子の導入ではリガンド添加により顕著な反応が見られたが、導入した AQP3 の 5' 上流領域に対する反応は検出されなかった。導入したプロモーター領域内に発現制御に関わるサイトが存在しなかった可能性が考えられ、さらなる 5' 上流領域やイントロン領域も含めたアッセイが必要である。

### まとめ

魚類の AQP3 は、その発現を制御することで細胞内のグリセロール濃度を維持することや、細胞容積の調節を通して浸透圧感知機構に寄与することが推測されている。また、海水移行によりニホンウナギの鰓における AQP3 の局在が塩類細胞に限局すること、AQP3 が塩類細胞における浸透圧調節に関与する可能性が推測されている。また、カダヤシ、ニホンウナギおよびヨーロッパウナギの鰓における AQP3 発現は、海水環境よりも淡水環境で高いことが示されている。さらに、ニジマスのバソトシン mRNA 発現量は海水環境下に比べて、淡水環境下で高いことが示されていることから、バソトシンおよび AQP3 は主に淡水環境下で水や低分子の輸送に働いている可能性が示唆される。しかしながら、本研究では鰓の AQP3 発現が塩類細胞に発現していること、淡水環境下で高く、汽水および海水環境下で低いことが示されたのみで、その機能は明らかにできなかった。今後は、鰓の AQP3 発現が VT-V2aR 系により直接制御されているという仮説を検証するとともに、鰓における AQP3 の機能についても調べる必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamachi T, Tanigawa A, Konno N, Shioda S, Matsuda K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression Patterns of PACAP and PAC1R Genes and Anorexigenic Action of PACAP1 and PACAP2 in Zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fendo.2019.00227.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sachuriga, Iinuma N, Shibata H, Yoshida D, Konno N, Nakamachi T, Matsuda K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Intracerebroventricular administration of sulphated cholecystokinin octapeptide induces anxiety-like behaviour in goldfish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e12667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12667.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamachi T, Kamata E, Tanigawa A, Konno N, Shioda S, Matsuda K.	4. 巻 103
2. 論文標題 Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 2 in zebrafish brain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 40-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.03.006.	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 Matsuda K, Matsumura K, Shimizu SS, Nakamachi T, Konno N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Neuropeptide Y-Induced Orexigenic Action Is Attenuated by the Orexin Receptor Antagonist in Bullfrog Larvae.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2017.00176.	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19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 汲田尚史、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカの塩分選好性行動と海水適応能獲得に要する時間
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂田紗也加、石原美穂、中町智哉、松田恒平、今野紀文、海谷啓之
2. 発表標題 メダカにおけるグレリン - モチリン系とそれら受容体の特徴づけ
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川陽菜、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカ培養細胞を用いた浸透圧ストレス転写因子1 (Ostf1) の機能探索
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋夏美、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 ゲノム編集によるV1a受容体ノックアウトメダカの作出とその表現型の探索
3. 学会等名 2019年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川陽菜、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカ培養細胞を用いた浸透圧ストレス転写因子1の機能の探索
3. 学会等名 2019年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Konno N, Takano M, Tomiyama S, Fujii Y, Nakamachi T, Matsuda K.
2. 発表標題 Distribution of Urotensin II receptor in the African clawed frog provides insights into novel functions of Urotensin II
3. 学会等名 The 29th Conference of European Comparative Endocrinologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ichikawa H, Tanaka R, Nakamachi T, Matsuda K, Konno N.
2. 発表標題 Osmotic stress transcription factor 1b (Ostf1b) triggers hyperosmotic responses in the chloride cells of gills in Japanese Medaka
3. 学会等名 The 29th Conference of European Comparative Endocrinologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今野 紀文
2. 発表標題 尿素を用いた体液調節の仕組みから俯瞰する脊椎動物の環境適応と進化
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川陽菜, 中町智哉, 松田恒平, 今野紀文
2. 発表標題 メダカの海水適応における浸透圧ストレス転写因子1の発現動態とコルチゾルによる発現調節
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川陽菜, 中町智哉, 松田恒平, 今野紀文
2. 発表標題 メダカの海水適応におけるOstf1bの発現動態とコルチゾルによる発現調節
3. 学会等名 日本動物学会中部支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 汲田尚史, 中町智哉, 松田恒平, 今野紀文
2. 発表標題 メダカの塩分選好性行動とそれに伴う海水適応能獲得に関する研究
3. 学会等名 日本動物学会中部支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野 萌, 三浦浩一, 海谷啓之, 中町智哉, 松田恒平, 今野紀文
2. 発表標題 魚類と両生類におけるウロテンシン 受容体サブタイプの細胞内情報伝達機構
3. 学会等名 日本動物学会中部支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今野 紀文
2. 発表標題 神経葉ホルモン受容体ノックアウトメダカの作製とその表現型解析
3. 学会等名 第28回バソプレシン研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 市川 陽菜, 今野 紀文
2. 発表標題 メダカの海水適応におけるOsmotic stress transcription factor 1の発現動態とコルチゾールによる発現調節
3. 学会等名 第28回バソプレシン研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 稲垣祐香、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカの鰹におけるバソトシンV2a受容体とAQP3の機能連関の可能性
3. 学会等名 第32回 日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野 萌、海谷啓之、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカとツメガエルにおけるウロテンシン 受容体サブタイプの同定
3. 学会等名 第88回日本動物学会大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 稲垣祐香、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカの鰓におけるバソトシンV2a受容体とAQP3の機能的関連性
3. 学会等名 第88回日本動物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野 萌、海谷啓之、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカとツメガエルにおけるウロテンシン 受容体サブタイプの同定
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井口わかな、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 バソトシンノックアウトメダカの自発遊泳行動の解析
3. 学会等名 第12回シンポジウム「水生動物の行動と神経系」
4. 発表年 2017年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----