

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570055
 研究課題名（和文） サメのユニークな尿素保持機構：腎臓単離ネフロンの分子解剖による新展開
 研究課題名（英文） Unique urea retention system in sharks: a new approach by molecular anatomy using isolated renal nephrons
 研究代表者
 氏名（アルファベット）兵藤 晋（HYODO SUSUMU）
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・海洋研究所・准教授
 研究者番号 40222244

研究成果の概要：

軟骨魚類が海に生きるために、体内に尿素を蓄積することは必要不可欠で、複雑な構造を持つ腎臓での尿素再吸収がそのことを可能にしている。ゾウギンザメで新規尿素輸送体を複数同定し、飼育下のドチザメでは尿素輸送体が環境浸透圧の変化によって細胞膜への集積が可逆的に制御されることを見出した。進行中の広塩性アカエイや培養系での解析とあわせ、軟骨魚類の腎機能、脊椎動物での腎機能の進化の解明に大きく貢献した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：魚類生理学、比較生理学、比較内分泌学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：軟骨魚類、腎臓、尿素、再吸収、ゾウギンザメ、輸送体、ネフロン

1. 研究開始当初の背景

腎臓は脊椎動物にとってきわめて重要な器官である。老廃物を排泄するという代謝機能の他、体液バランスの維持に必要不可欠である。たとえば、私たち哺乳類は水から離れて陸上生活を営むが、常に水を体内に保持しなければならない。そのためには腎臓での水再吸収が必要不可欠で、再吸収の異常は尿崩症という深刻な病気を引き起こし、多量の水

摂取無しには死に至る。

一方、水（特に海）の中に生きる魚類の腎臓は構造・機能的に未発達で、体液調節への重要性もあまり高くないと考えられてきた。そのような中で、軟骨魚類（サメやエイ）は極めて特殊である。サメの腎臓は、全ての生物の中で最も複雑と言っても過言ではない。哺乳類の腎ネフロン（尿細管）が、有名なヘンレのループを含む2回ループ構造であるのに対し、サメの腎ネフロンはその倍の4回

ものループを持つ。なぜこのような構造を持つのだろうか？どのようにこの構造が発達・進化したのだろうか？

サメ・エイの体液調節の特徴は、尿素を体内にため込むことである。このことにより、海という高浸透圧環境でも脱水の危機から免れることができる。サメ・エイの腎臓は、その尿素保持にとって必須の器官であり、糸球体で濾過されてしまう尿素のほとんどを再吸収して体内に戻している。しかしながらその複雑さが障害となり、再吸収のしくみは未だ不明のままである。

2. 研究の目的

我々はユニークなサメ・エイの体液調節の研究を進めており、高度に発達した腎臓での尿素再吸収システムの解明に焦点を当ててきた。尿素輸送体の局在を同定し、尿素再吸収部位を世界に先駆けて発見した。腎機能を調節するホルモンの候補も見出してきた。しかしながら、これまで研究者に立ちはだかってきた壁、すなわちネフロン（腎小体）の複雑さが障害となり、通常的手法ではこれ以上の解明は難しい。そこでブレークスルーとなる新たな戦略を考案し、この壁を乗り越えようと考えた。すなわち、輸送体やホルモン受容体分子をできる限り同定し、ネフロン上にマッピングする「分子解剖」を行う。このことにより、尿素や水・イオンの動きをモデル化し、尿素を動かす原動力や再吸収の全体像、ホルモンによる調節を明らかにする。さらにはネフロンを単離して培養系に移行することにより、より直接的な方法で物質輸送の動態を解明しようとするものである。

3. 研究の方法

本研究では、ゾウギンザメとドチザメという、2種類の動物を研究対象として用いた。ゾウギンザメはサメやエイ（板鰓類）とは異なる全頭類というグループに属するが、オーストラリアと共同で研究を進めており、発生・適応・繁殖の研究にとって優れたモデルとなると考えている。何よりも、現在ゲノム解析が進められているため、分子構造を解析するためには最適な軟骨魚である。一方、ドチザメは日本沿岸で容易に捕獲でき、おとなしくて飼育実験にも強い。我々はすでに尿素

輸送体が集合細管というネフロンの最終分節にのみ存在することを示しており、尿素輸送の解析には最適である。

ゾウギンザメはオーストラリア・ビクトリア州の Western Port Bay で捕獲し、実験所に運搬してサンプリングを行った。組織は日本に持ち帰り、RNA の抽出ならびに cDNA の合成を行い、クローニングに使用した。

ドチザメは、神奈川県城ヶ島漁協から購入したものを海洋研究所に運搬し、2トンあるいは1トン水槽で飼育し、実験に用いた。環境変動が尿素輸送体に与える影響を調べるため、ドチザメを徐々に130%濃縮海水あるいは30%希釈海水という異なる塩分環境に移行させ、血漿ならびに腎臓組織を得た。血漿からは尿素・イオン・浸透圧などのパラメータを測定するとともに、脳下垂体神経葉ホルモンのパソトシン濃度を測定した。腎臓は半分を凍結、半分を固定し、尿素輸送体遺伝子の発現ならびに尿素輸送体タンパク質の分布を調べた。分布の解析には蛍光標識した二次抗体を使用し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて半定量的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規尿素輸送体分子の発見

これまでに我々はドチザメで尿素輸送体の分布を同定し、ネフロンの集合細管という特定の分節の、原尿と接する頂端膜に尿素輸送体が存在することを示してきた。しかしながら、尿素を原尿から再吸収して体内に戻すためには、ネフロン分節の側基底膜や血管内皮細胞にも尿素を輸送するためのしくみが必要である。これらのことから、我々は未知の尿素輸送体分子が存在するのではないかと考えた。

まず、これまでに知られている尿素輸送体分子の情報をもとに、ゾウギンザメのゲノムデータベースを検索したところ、尿素輸送体と相同性の高いフラグメントが合計18種類得られた。それらの発現を調べたところ、いずれも腎臓で発現していることがわかった。全てのフラグメントに対して特異的なプライマーを作成し、PCRによる増幅を行ったところ、18種類のフラグメントは3種類のcDNAを構成することがわかった。RACE法により全長を決定し、3種類のcDNAをefUT-1, efUT-2, efUT-3と命名した。さらにefUT-1とefUT-2

には、アミノ末端の配列の異なる 2 種類の cDNA が存在することがわかった（それぞれ efUT -1a, efUT -1b, efUT -2a, efUT -2b と命名した）。

それぞれの mRNA から翻訳された分子が、本当に尿素輸送体としての機能を持っているかどうかを、アフリカツメガエルの卵母細胞を使用する機能解析実験により調べた。コード領域全長を含むコンストラクトから cRNA を合成し、卵母細胞に微量注入後、放射標識した尿素を含む液で培養し、尿素の取り込み量を調べた。その結果、バリエーションを含む 5 種類全ての分子で尿素取り込み量が大きく上昇した。その上昇は、卵母細胞をフロレチンという薬剤で前処理することにより、ほとんど消失した。フロレチンは促進型尿素輸送体の阻害剤としてよく知られており、以上の結果から、ゾウギンザメ腎臓から得られた 5 種類の遺伝子産物が、機能的な尿素輸送体

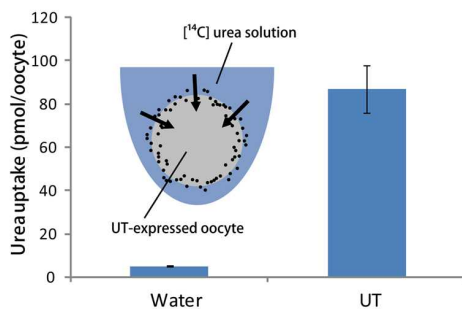


図 1. ゾウギンザメで発見した新規輸送体の尿素透過性であることが証明された。

3 種類の尿素輸送体は全て腎臓で発現していたが、その他の組織での発現は種類ごとに異なり、それぞれが異なる機能を持つことが示唆された。バリエーション間での発現には大きな違いは見られなかったが、バリエーション同士を比較すると、リン酸化部位に違いがあることがわかった。尿素輸送体はリン酸化によって細胞膜への集積や尿素輸送活性が変化するという報告があるため、同じ遺伝子であってもバリエーション間で機能的に違いが生じてきている可能性がある。このことは、いかに複雑かつ精巧に尿素が調節されているかを示す結果だと考えている。

分子系統解析により、今回得られた尿素輸送体の進化的背景を調べたところ、efUT -1 はこれまでに知られている板鰓類の尿素輸送体のオルソログであることがわかった。efUT -2 は、軟骨魚類の系統で efUT -1 と別れ

た遺伝子であり、このことは他の板鰓類にも efUT -2 に相同な分子が存在することを示唆している。一方、efUT -3 は全く異なる遺伝子であり、硬骨魚真骨類のみで見つかった UT -C と相同な分子ではないかと考えている。現在、efUT -1, -2, -3 を特異的に認識する抗体の作成を進めており、予備的な染色結果からは efUT -2 と efUT -3 はすでにドチザメで同定した尿素輸送体とは異なる尿細管分節に存在しており、尿素再吸収の分子機構解明のための大きな手がかりになることは間違いない。NaKCl 共輸送体や水チャネルなど、尿素輸送のための原動力を生み出す分子群の同定も順調に進んでおり、これらの輸送分子群を総合的にマッピングしていくことにより、尿素再吸収の全貌を明らかにしていくことができると考えている。

ひとつの動物種から 3 種類の尿素輸送体が発見されたのは今回が初めてであり、軟骨魚類の尿素代謝機構を解明するための大きなブレークスルーとなるだけでなく、哺乳類を含めた脊椎動物の尿素代謝研究にとっても大きな成果である。

(2) 尿素輸送体の動態の解析

我々はこれまでに、ドチザメをはじめとする軟骨魚を異なる塩分環境に移行させると、外環境に体液浸透圧を合わせるために尿素とイオン濃度を上下させ、特に尿素濃度が浸透圧変化を良く反映することを示している。そこで、このような体液中の尿素濃度変化が、どのように調節されているのかをドチザメを用いて調べた。

異なる塩分環境に移行させた個体を用い、肝臓での尿素合成活性、腎臓での尿素輸送体遺伝子の発現など複数のパラメータを検討した結果、腎臓での尿素輸送体分子の局在に顕著な変化が見られることがわかった。尿素輸送体は集合細管の頂端膜に集積することが通常海水の個体で観察されるが、低塩分（30%海水）環境で飼育したものでは、頂端膜上のシグナルがほぼ消失している像が認められた。

この変化を定量的に解析する方法を開発した。蛍光標識した二次抗体を使用することで輝度の変化をとらえられるようにし、レーザー共焦点顕微鏡により特定の厚さからの蛍光だけを検出するようにした。このことで、全ての個体について、同じ条件で免疫陽性反

応を蛍光輝度としてとらえられるようになる。さらに、解析には3種類の方法を考案した。まずは集合細管の断面全体の蛍光強度を解析する whole tubule analysis、二つ目としてそれぞれの細胞膜ごとに蛍光強度を測定する line profile analysis、さらには頂端膜だけを調べる whole apical analysis である。

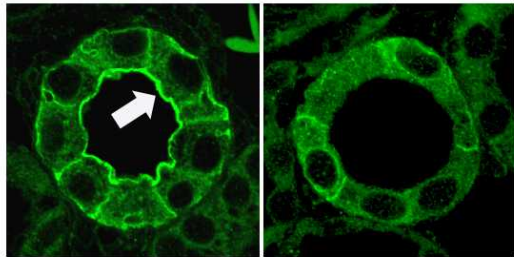


図2. 頂端膜上の蛍光(矢印)は、希釈海水への移行で消失する(右図)

解析した結果、集合細管全体でも蛍光輝度が減少していたが、特に頂端膜においてその変化が顕著であった。通常海水のコントロール個体では、蛍光反応は頂端膜に集積しており、130%濃縮海水の個体では頂端膜上の蛍光強度がさらに上昇していた。一方、30%希釈海水中では頂端膜上の蛍光がほぼ消失していた。頂端膜上の蛍光強度と血液中の尿素濃度の間の関係を調べると、強い正の相関が見られ、頂端膜上の尿素輸送体の量が、血液中の尿素量、すなわち腎臓での尿素再吸収に関わることが示唆された。

30%海水という環境は、ドチザメにとっては通常経験するものではないため、上記の結果が正常な反応を反映しているのかを調べる必要がある。そこで、いったん30%海水に移行した個体を、再び100%の通常海水環境に戻し、腎臓での尿素輸送体の動態を調べた。最初の実験結果と同様、30%海水に移行させた個体では、集合細管の頂端膜から尿素輸送体の存在を示す蛍光が消失した。一方、再び通常海水に戻した個体では、頂端膜上に強い蛍光反応が見られ、100%通常海水に飼育し続けたコントロール個体よりも強い反応が見られた。蛍光強度と血中尿素濃度にはやはり強い正の相関が見られた。これらのことから、集合細管の頂端膜上で見られた変化は可逆的な生理的な変化であり、頂端膜上の尿素輸送体量が腎臓での尿素再吸収量を反映することが明らかとなった。

現在のところ、環境変化がどのようにして尿素輸送体の変化に至ったのか、その制御機構に関しては全くわかっていない。今回、血液中の下垂体神経葉ホルモン(バソトシン)の濃度を測定したところ、集合細管頂端膜での尿素輸送体量と正の相関を示すことがわかった。哺乳類の腎臓でも、尿素輸送体はバソプレシンにより膜への集積が促進されることがわかっており、軟骨魚でも同様の制御機構が存在する可能性を示唆している。

(3) 単離ネフロンによる培養系の確立

集合細管における尿素輸送体の動態を直接的に調べるためには、培養系での解析が必要不可欠である。哺乳類や四肢動物ではネフロン一本を単離して、培養系で調べる手法が確立されている。そこでドチザメの腎臓を取り出してコラゲナーゼ処理を行い、ネフロン一本を単離することを試みたが、ネフロン同士が複雑に絡み合っており、不可能であった。そこで、コラゲナーゼ処理の後、部分的にほぐした状態で解析ができないかと考えた。まだ培養系での解析には至っていないが、ほぐしたものをを用いて免疫組織化学染色を行ったところ、集合細管での尿素輸送体をホルマウントの状態では検出することが可能であった。このことは、この培養系を用いて様々なホルモンや物質を作用させ、ホルマウントで染色した後に、頂端膜での輸送体の量をそのまま解析できることを示している。さらには、染色後、染色された管(すなわち集合細管)だけを回収することが可能であることを意味している。集合細管だけを回収してそこに存在するホルモン受容体などがクローニングできれば、そのホルモンが作用することを直接証明できる。このように、今後の研究にとって貴重な解析系を確立することができた。

(4) 広塩性板鰓類アカエイの解析

ゾウギンザメ、ドチザメともに海水環境でしか生息できないが、海と川の両方の環境で生息できる広塩性種も存在する。そのひとつがアカエイである。アカエイは通常完全な淡水環境に入ることは無いが、実験的に淡水に移行させても生息できる。この時、血漿中の尿素濃度は約250mMという高い値を維持していた。このことはオオメジロザメやノコギリエイなど他の広塩性板鰓類での結果と同じで

ある。ドチザメを 30%海水に移行させた時の血漿尿素濃度と比べても非常に高い尿素濃度を維持しており、これが広塩性板鰓類の淡水中での高い浸透圧の元となっている。

この広塩性板鰓類における尿素濃度の維持に、腎臓での尿素再吸収がどのように関わるかを調べるために、アカエイの腎臓から尿素輸送体をクローニングした。100%海水と20%海水で飼育したアカエイの腎臓における尿素輸送体遺伝子の発現量を比較したところ、有意な変化は見られなかった。現在特異的な抗体を作成中であり、ドチザメで行ったものと同様の解析を進める予定である。

(5) 今後の展望

本研究により、新規の尿素輸送体の同定、環境変化にともなう輸送体の変動など、多くの知見が得られた。特にゾウギンザメの有用性は高く、今後軟骨魚類研究を推進するために極めて重要なモデル種となることは間違いない。軟骨魚類は脊椎動物有顎類の最も原始的な現生グループとして動物学的に重要なだけでなく、海洋生態系あるいは水産学など応用面でも重要なグループで、社会にとってのインパクトも高い。そのことは、近年ほとんどの水族館でサメ・エイが重要な展示対象として注目されていることから明らかである。軟骨魚類研究の推進は、基礎生物学だけでなく、今後社会的にも大きなインパクトを与えるものと確信している。

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 10 件)

1. Takahashi, A., Kobayashi, Y., Moriyama, S. and Hyodo, S. Evaluation of posttranslational processing of proopiomelanocortin in the banded houndshark pituitary by combined cDNA cloning and mass spectrometry. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 157, 41-48 (2008). 有
2. Katsu, Y., Kohno, S., Hyodo, S., Ijiri, S., Adachi, S., Hara, A., Guillette, L.J. and Iguchi, T. Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of estrogen receptors from phylogenetically ancient fish. *Endocrinology*, 149, 6300-6310 (2008). 有
3. 兵藤 晋 ユニークな体液調節、海水およ

び淡水環境への適応のしくみ。特集：軟骨魚類の不思議。生物の科学、遺伝、62, 47-51 (2008). 無

4. 兵藤 晋、今野紀文、内山実 尿素を利用する体液調節：その比較生物学 1：軟骨魚類（サメ・エイ）を中心に。比較内分泌学、34, 137-145 (2008). 無

5. Tsukada, T., Nobata, S., Hyodo, S. and Takei, Y. Area postrema, a brain circumventricular organ, is the site of antidipsogenic action of circulating atrial natriuretic peptide in eels. *J. Exp. Biol.*, 210, 3970-3978 (2007). 有

6. Jennings, B.L., Bell, J.D., Hyodo, S., Toop, T. and Donald, J.A. Mechanisms of vasodilation in the dorsal aorta of the elephant fish, *Callorhynchus milii* (Chimaeriformes: Holocephali). *J. Comp. Physiol. B*, 177: 557-567 (2007). 有

7. Konno, N., Hyodo, S., Matsuda, K. and Uchiyama, M. AVT promotes urea permeability through urea transporter expressed in the toad urinary bladder cells. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 152: 281-285 (2007). 有

8. Hyodo, S., Bell, J.D., Healy J.M., Kaneko, T., Hasegawa, S., Takei, Y., Donald, J.A. and Toop, T. Osmoregulation in elephant fish, *Callorhynchus milii* (Holocephali), with special reference to the rectal gland. *J. Exp. Biol.*, 210: 1303-1310 (2007). 有

9. Hashimoto, H., Hyodo, S., et al. (12人2番目) Adrenomedullin 2 (AM2)/intermedin is a more potent activator of hypothalamic oxytocin-secreting neurons than AM possibly through an unidentified receptor in rats. *Peptides*, 28: 1104-1112 (2007). 有

10. Konno, N., Hyodo, S., Yamada, T., Matsuda, K. and Uchiyama, M. Immuno-localization and mRNA expression of the epithelial Na⁺ channel α -subunit in the kidney and urinary bladder of the marine toad, *Bufo marinus*, under hyperosmotic conditions. *Cell Tissue Res.*, 328: 583-594 (2007). 有

[学会発表](計 12 件)

1. 角村佳吾、新しい軟骨魚類研究のモデル：ゾウギンザメ、日本水産学会、2009年3月30日、東京海洋大学。
2. 高部宗一郎、ドチザメの鰓で発見した新規塩類細胞様構造物、日本水産学会、

2009年3月30日、東京海洋大学。

3. 兵藤 晋、ハワイのシュモクザメを用いた日米共同研究、板鰓類研究会、2008年12月11日、東京大学海洋研究所。

4. 兵藤 晋、ゾウギンザメ：新しい軟骨魚類研究モデル、日本比較内分泌学会、2008年12月6日、広島大学。

5. 今野紀文、肺魚の陸生適応に働く水保持機構：魚類から四肢動物への進化を探る、日本比較内分泌学会、2008年12月5日、広島大学。

6. 山口陽子、軟骨魚類の海洋環境への適応機構：サメ腎臓における尿素輸送体の動態、日本比較内分泌学会、2008年12月5日、広島大学。

7. Keigo Kakumura, Existence of multiple urea transporter proteins in the kidney of elephant fish. 5th World Fisheries Congress, 2008年10月23日、パシフィコ横浜。

8. 兵藤 晋、サメの鰓隔膜に発見した新規塩類細胞様構造と体液調節、日本動物学会、2008年9月5日、福岡大学。

9. Susumu Hyodo, An ongoing project between Japan and Hawaii: comprehensive research on feeding, growth and adaptation of elasmobranch fish using the Hammerhead shark in Hawaii, UH and UT Joint Symposium on Ocean and Coastal Sciences. 2008年3月14日、東京大学海洋研究所。

10. 兵藤 晋、軟骨魚類は環境適応研究に貢献するか、研究集会：魚類の適応と進化の統合生物学、2007年11月16日、東京大学海洋研究所。

11. 山口陽子、サメ腎臓における尿素輸送体のトランスロケーション：尿素再吸収との関連、日本動物学会、2007年9月22日、弘前大学。

12. 兵藤 晋、軟骨魚全頭類ゾウギンザメの体液調節、日本動物学会、2007年9月22日、弘前大学。

〔図書〕(計 1件)

1. 兵藤 晋、南江堂、ホルモンハンドブック新訂 eBook 版、2007年、214-302。

〔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

<http://physiol.ori.u-tokyo.ac.jp/seiri/hyoudo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵藤 晋 (HYODO SUSUMU)

東京大学・海洋研究所・准教授

研究者番号：40222244

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし