

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570061

研究課題名（和文） ゾウギンザメの体液調節：軟骨魚類研究の新規モデルの創生

研究課題名（英文） Osmoregulation in elephant fish: introduction of a new model animal for cartilaginous fish research

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

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ゲノムプロジェクトによる分子基盤を利用でき、繁殖期の成魚と受精卵を使用できるゾウギンザメを用いることで、軟骨魚類の適応生理学、繁殖生理学、発生学研究を推進するものである。腎臓での尿素保持機構については、分子マッピングによりネフロンでの尿素再吸収の分子モデルを提唱した。加えて、発生過程での体液調節、ホルモンによる制御など、軟骨魚類のホメオスタシス維持機構の理解を大きく進めた。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to investigate adaptive, reproductive and developmental physiologies of the cartilaginous fish by using elephant fish as a model organism, for which the public genome database is available. We have proposed a urea reabsorption model in the renal nephron by mapping of various transporting proteins for urea, water and ions. In the present study, we also found contribution of the yolk-sac membrane to body fluid regulation in the early developmental stages, and a novel neurohypophysial hormone receptor that is likely to be involved in the maintenance of homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、尿素、ゾウギンザメ、腎臓、初期発生、ホルモン受容体

1. 研究開始当初の背景

生物にとって、体内のホメオスタシスを維持することは、個体の生存・種の維持にとって必要不可欠である。例えば、海洋は高塩分・高浸透圧環境であり、そこに生息する動物たちはさまざまな戦略で海洋環境に適応

している。硬骨魚真骨魚類の場合には、体液の組成は我々哺乳類とほぼ等しく、そのため水が奪われると同時に塩分が流入する。このことを克服するために、真骨魚は海水を飲んで水分を確保し、過剰となる塩類を主に鰓の塩類細胞から排出する。

一方で、軟骨魚類の戦略は、真骨魚とは全く異なる。体内に多量の尿素を蓄積し、体液の浸透圧を環境の海水レベルに高めることで、高浸透圧環境でも水を失うことなく適応できる。この尿素により水を体内に保持するという戦略は、硬骨魚肉鰭類のシーラカンスと無尾両生類でも同様であり、さらには我々哺乳類でも腎臓内に相似の現象が存在する。すなわち脊椎動物に広く見られる基本的な現象であり、この現象の解明は脊椎動物の環境適応と進化という観点からも重要である。

尿素の合成には肝臓を中心とする器官が重要であり、尿素を体外に逃がさないためには腎臓での尿素再吸収が重要である。しかしながら腎臓での尿素再吸収については、腎臓の構造があまりにも複雑であることから、そのしくみはほとんどわかっていなかった。そのなかで我々は、尿素を輸送する膜タンパク質がドチザメネフロン最終分節のみに存在することを示し、この集合細管が尿素再吸収に重要であることを初めて明らかにした (Hyodo et al., 2004)。

一方で、尿素の合成については、肝臓以外の器官の重要性も示唆されるようになってきた。筋肉や消化管など、種によっても異なるが、それまで考えられてきた以上に、様々な器官が尿素保持に関わる可能性が考えられた。

このように軟骨魚類の体液調節研究の必要性は明白だが、最大の問題は、分子レベルの研究に適したモデルの欠如であった。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、ドチザメ、アカエイ、シュモクザメ、ゾウギンザメなど、複数の軟骨魚類を研究対象に用いてきた。その過程でゾウギンザメのゲノムプロジェクトが開始され、部分的ではあるがウェブ上に公開されることとなった。上記の通り、軟骨魚類研究が進まない問題のひとつが、遺伝子情報を利用できるモデル種の欠如であった。特に、腎臓での分子マッピングにおいては、重要と考える分子をどれだけ迅速に同定できるかが鍵であり、ゾウギンザメはこの問題を克服できる新規モデル生物となり得ると考えた。

そこで、腎臓での分子マッピングをゾウギンザメで行うとともに、ゾウギンザメが広く軟骨魚類研究の有用なモデルとなることを証明すべく、尿素合成器官の同定、発生初期

の体液調節機構、体液調節に関わるホルモン制御の研究を行った。

3. 研究の方法

ゾウギンザメはふだん水深 200m 程度の大陸棚に生息しているが、繁殖期のみオーストラリア南岸をはじめとする浅い湾内に産卵回遊してくる。そこで成魚雌を 3-4 月にオーストラリア・ビクトリア州の Western Port 湾で捕獲し、クイーンズクリフの Victoria Marine Science Consortium (VMSC) に運搬して飼育した。1-2 ヶ月間の飼育で約 160 個の受精卵を得た。受精卵は VMSC の水槽にて孵化 (半年後の 9-10 月) まで飼育し、間隔をおいてさまざまな発生ステージのサンプリングを行った。また、受精卵を採集し終わった雌からは組織を採取し、凍結あるいは固定サンプルとして日本に持ち帰った。

凍結サンプルからは RNA を抽出し、クローニング用に cDNA の合成を行った。発現量の測定は、抽出した RNA を DNase 処理した後に cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR にて定量を行った。固定サンプルはパラフィン切片を作成後、*in situ* hybridization あるいは免疫組織化学染色にて分子の局在を調べた。

受容体の解析は、国立循環器病センターの海谷博士との共同研究により、受容体遺伝子を発現させた哺乳類培養細胞を用い、さまざまなリガンドを処理した後の細胞内伝達系の活性を測定した。

4. 研究成果

(1) ゾウギンザメの尿素産生部位

尿素は、板鰓類では主に肝臓などの器官でアンモニアから積極的に産生される。ゾウギンザメでは、肝臓が尿素を合成するというものの他は、尿素産生に関わる知見が全くなかった。そこでまず、ゾウギンザメ成魚の尿素産生機構を調べた。

尿素回路を構成する主要な酵素群、すなわちカルバミルリン酸合成酵素 (CPSIII)、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC)、グルタミン合成酵素 (GS)、アルギナーゼ (ARG) を同定した。GS 遺伝子は 2 種類同定され、そのうち GS2 はミトコンドリア移行シグナル (MTS) を持たず、尿素合成には直接関わらない。一方、GS1 には長鎖型 (MTS 配列を持つ) と短鎖型 (MTS 配列を持たない) というスプライシングバリエーションが存在した。したがって、遺伝子重複

やスプライシングの制御によって、尿素合成の第一段階であるアンモニアの取り込み過程が調節されることがわかった。

全ての酵素の遺伝子発現、活性は肝臓で最も高かった。長鎖 GS1 を持つことなどからも、肝臓が体内尿素濃度の調節に主要な役割を果たすことがわかった。筋肉でも全酵素の遺伝子発現と活性が認められ、組織重量を考慮すると、肝臓に匹敵する尿素量が合成されると予想された。特筆すべきことは、腎臓でも高い発現と活性が見出されたことで、やはり長鎖 GS1 を発現していた。軟骨魚類の腎臓は原尿から尿素を再吸収して、尿素を体内に保持する。ゾウギンザメ腎臓の近位尿細管で、GS、OTC、アンモニア輸送体の共局在を確認しており、貴重な窒素源であるアンモニアを再吸収し、尿素に変換して体内に戻すという、腎臓の新たな機能を提唱した (Takagi et al., 2012)。

(2) 腎臓での尿素再吸収の分子機構

軟骨魚類の腎臓は、脊椎動物で最も複雑なネフロン構造を持つ。腎小体に始まるネフロンは、2つの領域を行き来して4回のループを持つ。我々はドチザメにおいて、最終分節である集合細管に尿素輸送体 (UT) を発見し、ここが尿素再吸収の場であることを見出した (図の緑色、Yamaguchi et al., 2009)。

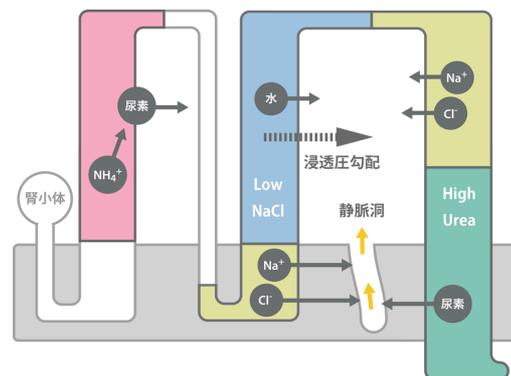
ゾウギンザメのゲノムデータベースを検索したところ、UT-1 と UT-2、UT-3 という3種類の UT 分子を発見した。UT-1 は構造的特徴に加え、集合細管にのみ局在したことから、ドチザメで同定した UT と相同な分子であった。UT-2 も集合細管に検出されたが、その機能はまだ不明である。一方、UT-3 は腎臓特異的で、近位尿細管 (第2ループ) に局在した (図の赤色)。この部位は前述した尿素合成系が存在する部位に近く、合成した尿素を体内に戻す働きを持つ可能性がある (Kakumura et al., 2009)。

UT は促進型の輸送体であり、尿素を濃度の高いところから低いところに向かって移動させる。それゆえ、尿素を原尿から体内に再吸収するためには、集合細管に入るまでに、原尿中の尿素を濃縮する機構があると考えた。そこで、NaCl ならびに水の輸送タンパク質に注目した。ゲノムデータベースから、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (NKA)、 $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC2)、水チャネル (AQP3) を得て、

尿細管にマッピングしたのが下図である。

NKCC2 は NKA と共存し、これは NaCl を能動的に再吸収する diluting segment の特徴である。哺乳類ではヘンレループの太い上行脚に存在するが、ゾウギンザメでは2ヶ所発見した。ひとつが第3ループ上行脚、もう1ヶ所は第4ループの後半である (図の黄色)。一方、AQP3 は2つの diluting segment に挟まれた、第4ループの前半に存在した (図の青色)。以上の結果をもとに、以下に述べるような尿素再吸収モデルを提唱する。

まず、第3ループ (黄色) で NaCl が原尿から再吸収され、原尿の浸透圧が下がる。第4ループの前半 (青色) では、生じた浸透圧差により水が原尿から静脈血へと移動する。さらに、AQP3 は尿素も透過させるため、水の再吸収により原尿の尿素濃度が上昇し、AQP3 を介して尿素も原尿から静脈血へと移動する。水の移動による尿素濃度の上昇は尿素の移動を誘導し、尿素の移動による浸透圧の低下は水の移動を誘導する。第4ループ後半 (黄色) では、水と尿素の再吸収により濃縮された NaCl を再び再吸収し、尿素が濃縮された原尿となる。最終分節の集合細管に入ると、UT を介して尿素が再吸収される (緑色)。集合細管での尿素再吸収は、対向流交換系といった特殊なしくみを介するものと考えている。集合細管で再吸収された尿素は、central vessel とよばれるリンパ様の盲管によって静脈へと運ばれる。



(3) 発生初期の体液調節機構

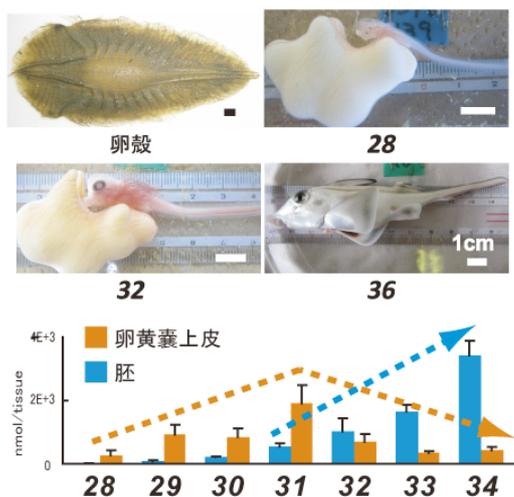
これまでに述べたとおり、軟骨魚類の成魚においては肝臓や筋肉、腎臓での尿素合成や、腎臓での尿素再吸収が体液浸透圧の維持に重要である。それでは、肝臓などの器官が未発達な発生初期には、胚は生息環境にどのように適応しているのだろうか？軟骨魚類に限らず、魚類の発生初期の環境適応について

は知見が非常に少ない。

軟骨魚類は個体発生という観点からも特徴的である。卵生種では、受精して卵殻が形成されると海水中に生みだされ、多くは約半年という長い時間をかけて発生・成長し、孵化に至る。この長い期間を通して、胚がどのような環境に置かれ、適応しているのかを知ることが、軟骨魚類の発生や生理の理解にとどまらず、絶滅危惧種が急増する軟骨魚類の保護、生物多様性の維持という観点からも重要である。

まず卵殻内部の浸透圧・イオン組成を調べたところ、発生の初期から孵化まで、卵殻内の環境は海水とほぼ同じであることがわかった。すなわち、卵生種の胚は発生初期から浸透圧調節を行う必要がある。少なくともステージ30の胚では、成魚と同じ濃度の尿素を体内に保持していることもわかった。そこで、発生段階を追って尿素回路酵素遺伝子の発現量変化を解析した結果、発生初期には胚体よりも卵黄囊上皮での発現が高いことがわかった。受精後2ヶ月頃まで、卵黄囊上皮における酵素遺伝子の発現量は上昇し、その後、卵黄が胚体に吸収されるとともに、発現量は徐々に減少していく。一方で、発生の進行とともに胚体、特に肝臓での発現が上昇する(下図)。

以上のことから、1) 成魚では肝臓を代表とする複数の器官が尿素産生を担うこと、2) 尿素合成器官が未発達な発生初期には、卵黄を包む卵黄囊上皮が尿素産生を担うこと、3) 発生の進行とともに胚体の肝臓へと尿素産生の役割が移行することがわかった。



(4) 体液調節ホルモンの研究

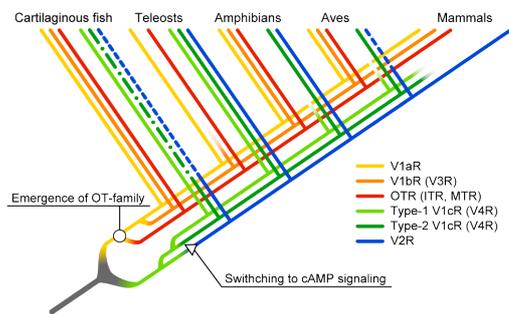
本研究によって、腎臓での尿素再吸収など

分子機構も解明されつつある。しかしながら、それらの機能が環境変化によってどのように制御されているのか、そのしくみは全くわかっていない。特に腎機能はさまざまなホルモンの制御下にあると予想され、ドチザメでは血液中の下垂体神経葉ホルモン(バソトシン)の濃度が集合細管頂端膜での UT 量と正の相関を示した。哺乳類の腎臓でも、UT 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がある。そこで、神経葉ホルモン受容体の同定から、その働きにアプローチしようと考えた。

脊椎動物の神経葉ホルモンはバソプレシン属とオキシトシン属に大別され、複数の異なる G タンパク質共役型受容体を介して機能する。現在までに 3 種類のバソプレシン受容体 (V1R、V2R および V3R) と 1 種類のオキシトシン受容体 (OTR) が知られており、それぞれ血管での昇圧効果や肝臓での糖新生、腎臓での水再吸収の促進、下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモンの分泌、子宮収縮や乳汁分泌などに関わる。このうち V1R、V3R および OTR が細胞内の PLC/PKC 経路とカップルして細胞内 Ca 濃度を上昇させるのに対して、V2R は AC/PKA 経路を介して細胞内 cAMP 濃度を上昇させる。

ゲノムデータベースを検索したところ、6 種類の神経葉ホルモン受容体様遺伝子が同定された。全長をクローニングし、分子系統解析を行ったところ、V1R、V3R および OTR に加え、これまで報告されていない新規の受容体を発見した。この受容体は既知 V2R に配列相同性を示すものの、細胞内情報伝達には V2R が用いる cAMP ではなく、V1R や V3R と同様に Ca²⁺を用いる。相同な受容体は条鰭類のメダカとクマノミからも同定され、やはり細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させた。またゲノムデータベース検索から、新規受容体が両生類、鳥類、哺乳類にも存在することを見出した。分子系統解析とシステマティック解析の結果、新規受容体が既知 4 種類の神経葉ホルモン受容体とは独立した群を形成することが示され、V4R と命名した。V4R はさらに、魚類特異的な type-1 (V4R1) と、主に四肢動物に存在する type-2 (V4R2) に区分される。ゾウギンザメは機能的な V4R1 のほかに、偽遺伝子化した V4R2 遺伝子を有する。哺乳類ではオポッサムに偽遺伝子化した V4R2 遺伝

子が存在するが、そのほかの種では V4R 遺伝子を確認できないことから、恐らく V4R は哺乳類では機能を喪失していると考えられる。V4R は脳や心臓、腎臓、生殖腺で発現が見られ、その機能の解明が待たれる。また、ゾウギンザメの下垂体では、ACTH 分泌に重要な V3R に加えて V1R も発現していることが確認された。V1R が下垂体で発現する例はこれまでに報告がなく、ゾウギンザメ下垂体からのホルモン分泌制御に関して、バソトシンが何らかの未知の機能を担うと考えられる。ゾウギンザメゲノムからは既知 V2R に相同な受容体は発見できず、この受容体の起源と進化については今後の課題である。



(5) 今後の展望

本研究により、軟骨魚類の生理学研究を推進する上で、ゾウギンザメが新規モデルとして有用であることが証明された。公開されているゲノムデータベースはまだ部分的なものに過ぎないが、本研究でも尿素やイオン、水などの膜輸送分子群、尿素合成に関わる酵素遺伝子群、さらにはホルモンやその受容体など、研究の第一歩である分子の網羅的な同定が可能であったことが、研究を飛躍的に進められた原因であった。

軟骨魚類は脊椎動物顎口類の原始的な現存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資源といった応用面でも重要である。軟骨魚類研究の推進は、基礎生物学だけでなく、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。今後はゾウギンザメの特長を活かしてさらに研究を進めるとともに、ゾウギンザメで明らかになったことを他のサメやエイにも広げ、軟骨魚類という重要な生物群の理解を深めていきたい。

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 16 件)

- ① Yamaguchi, Y., Kaiya, H., Konno, N., Iwata, E., Miyazato, M., Uchiyama, M., Bell, J.D., Toop, T., Donald, J.A., Brenner, S., Venkatesh, B., Hyodo, S. (2012) The fifth neurohypophysial hormone receptor (V4R) is structurally related to the V2-type receptor but functionally similar to V1- and V3-type receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.*, in press. 査読有
- ② Takabe, S., Teranishi, K., Takaki, S., Kusakabe, M., Hirose, S., Kaneko, T., Hyodo, S. (2012) Morphological and functional characterization of a novel Na⁺/K⁺-ATPase-immunoreactive, follicle-like structure on the gill septum of Japanese banded houndshark. *Cell Tissue Res.*, 348: 141-153. DOI: 10.1007/s00441-012-1344-5 査読有
- ③ Takagi, W., Kajimura, M., Bell, J.D., Toop, T., Donald, J.A., Hyodo, S. (2012) Hepatic and extrahepatic distribution of ornithine urea cycle enzymes in holocephalan elephant fish. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 161, 331-340. doi:10.1016/j.cbpb.2011.12.006 査読有
- ④ 兵藤晋 (2010) 軟骨魚類の生理学研究：体液調節を中心にライフサイクルを追う。板鯧類研究会報、46、1-7. 査読無
- ⑤ Konno, N., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Matsuda, K., Uchiyama, M. (2010) Vasotocin/V2-type receptor/aquaporin axis exists in African lungfish kidney but is functional only in terrestrial condition. *Endocrinology*, **151**, 1089-1096. doi:10.1210/en.2009-1070 査読有
- ⑥ Kawatsu, S., Sato, K., Watanabe, Y., Hyodo, S., Breves, J.P., Fox, B.K., Grau, E.G., Miyazaki, N. (2010) A new method to calibrate attachment angles of data loggers in swimming sharks. *Eurasip J. Advance in Signal Processing*, 732586. doi:10.1155/2010/732586 査読有
- ⑦ Nakada, T., Westhoff, C.M., Yamaguchi, Y., Hyodo, S., Li, X., Muro, T., Kato, A., Nakamura, N., Hirose, S. (2010) Rhesus glycoprotein p2 (Rhp2) is a novel member of the Rh family of ammonia transporters highly expressed in shark kidney. *J. Biol. Chem.*, 285, 2653-2664. doi:10.1074/jbc.M109.052068 査読有

- ⑧ Kakumura, K., Watanabe, S., Bell, J.D., Donald, J.A., Toop, T., Kaneko, T., Hyodo, S. (2009) Multiple urea transporter proteins in the kidney of holocephalan elephant fish. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 154, 239-247. doi:10.1016/j.cbpb.2009.06.009 査読有
- ⑨ Yamaguchi, Y., Takaki, S., Hyodo, S. (2009) Subcellular distribution of urea transporter in the collecting tubule of shark kidney is dependent on environmental salinity. *J. Exp. Zool.* 311A, 705-718. DOI: 10.1002/jez.558 査読有
- ⑩ Konno, N., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Kaiya, H., Miyazato, M., Matsuda, K., Uchiyama, M. (2009) African lungfish possess an arginine vasotocin receptor homologous to the tetrapod V2-type receptor. *J. Exp. Biol.*, 212, 2183-2193. doi:10.1242/jeb.029322 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① 高木 互、卵生軟骨魚類の発生過程における浸透圧調節。平成 24 年度日本水産学会、2012 年 3 月 28 日、東京海洋大学。
- ② 角村 佳吾、ゾウギンザメ腎臓における尿素輸送体および尿素輸送関連分子の局在と機能。平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 28 日、東京海洋大学。
- ③ 山口 陽子、脊椎動物における新規バソプレシン/オキシトシン受容体、V1cR ファミリーの発見。第 22 回バソプレシン研究会、2012 年 1 月 7 日、慶應義塾大学病院。
- ④ 山口 陽子、脊椎動物における新規神経葉ホルモン受容体 V1cR ファミリーの発見-軟骨魚類の研究から-。第 36 回日本比較内分泌学会、シンポジウム、2011 年 11 月 23 日、都道府県会館。
- ⑤ Hyodo, S., Identification and mapping of urea- and ion-transporting molecules in the kidney of cartilaginous fish. International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011 年 6 月 1 日、名古屋国際会議場。
- ⑥ Takabe, S., Morphological and functional characteristics of a novel Na⁺/K⁺-ATPase-immunoreactive, follicle-like structure in the gill septum of Japanese banded houndshark. International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011 年 6 月 2

日、名古屋国際会議場。

- ⑦ Takagi, W., Ornithine urea cycle enzymes in holocephalan elephant fish. International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011 年 6 月 4 日、名古屋国際会議場。
- ⑧ 兵藤 晋、サメ、エイ、ギンザメ：体液調節を中心にそのライフサイクルを追う、第 11 回日本比較三学会合同シンポジウム、2010 年 11 月 20 日、静岡グランシップ。
- ⑨ 山口 陽子、ドチザメにおけるカルバミルリン酸合成酵素 III の分布と環境塩分変化の影響、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23 日、東京大学教養学部。
- ⑩ 兵藤 晋、ゾウギンザメは軟骨魚類研究のブレイクスルーをもたらすか、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 18 日、静岡グランシップ。
- ⑪ 兵藤 晋、サメの鰓は塩分排出器官か、日本比較内分泌学会第 34 回大会、2009 年 10 月 23 日、千里ライフサイエンスセンター。

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：