

令和元年6月10日現在

機関番号：15201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06876

研究課題名(和文)ヌタウナギの体液ホメオスタシス：体液調節能力はどこから来たか？

研究課題名(英文)Body fluid homeostasis of hagfish: origin of vertebrate osmoregulatory ability

研究代表者

山口 陽子 (Yamaguchi, Yoko)

島根大学・学術研究院農生命科学系・特任助教

研究者番号：70801827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々ヒトを含む脊椎動物は、体液イオン組成と浸透圧を常に海水の1/3程度に維持する優れた能力を持つ。本研究では我々の体液調節能力の起源と進化を探るため、現生脊椎動物で最も早くに分岐した円口類のヌタウナギに着目した。本種は鰓や腎臓などの体液調節器官を持つが、海産無脊椎動物と同様、体液は海水とほぼ同組成である。飼育実験とRNA-Seq解析の結果、ヌタウナギにも既知の体液調節関連分子が存在するが、積極的な塩類調節は行わないことが分かった。一方で、本種ではアミノ酸を利用した細胞単位での体液調節が重要であり、腎臓がこれを補助することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヌタウナギは進化上重要な位置を占める生物だが、生理学研究はきわめて遅れている。本研究では、ヌタウナギの鰓・腎機能の分子基盤について、初めて網羅的なデータを得ることができた。これは、近年ゲノム配列情報が公開されたこととあわせ、本種を「生理学研究の新たなモデル生物」として確立する第一歩となる成果である。また、ヌタウナギの体液調節戦略において、魚介類の旨味成分として知られるアミノ酸が重要であることが示唆された。将来的には、本研究成果の水産分野への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Most extant vertebrates possess the remarkable ability to maintain body fluid homeostasis. Our plasma osmolality and ions are of approximately one-third of seawater, which is achieved by osmoregulatory machineries in the gill and kidney. Among the extant vertebrates, hagfish is the only osmo-ionoconforming animal, similar to marine invertebrates. In the present study, to understand the origin of vertebrate osmoregulatory ability, the renal and branchial functions in hagfish were examined. The results suggest that the hagfish conducts osmoregulation at the single cell level, but not at the organism level. The intracellular accumulation of amino acids seems to be important for overcoming osmotic stress, and the kidney may play a supplementary role in this process.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：ヌタウナギ 環境適応 体液調節 内分泌系 腎臓 筋肉 アミノ酸

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

### 1. 研究開始当初の背景

あらゆる生命現象は、生体分子間の化学反応で成り立っている。生物体内の水とイオンのバランスは、こうした生化学反応の安定性に直結する。このため、体液バランスを維持する能力、すなわち体液調節能力は、生物の環境適応戦略においてきわめて重要である。

海産無脊椎動物は体液組成が海水とほぼ等しい「イオン・浸透圧順応型」である。「順応型」生物では、外環境の変動がそのまま体内に反映される。これに対して、硬骨魚真骨類から哺乳類までの分類群は、体液イオン組成と浸透圧を常に海水の1/3程度に維持する「イオン・浸透圧調節型」である。この「調節型」のしくみを獲得したことで脊椎動物は生息域を広げ、現在の繁栄に至っている。「調節型」能力の実体は、鰓や腎臓といった体液調節器官と、それらを支配する内分泌系である。例えば真骨類は、体液より高張な海水中では脱水の危機に晒されるため、海水を飲んで水分を補給し、余分な塩類を鰓から排出する。淡水環境では逆に鰓からイオンを取り込み、体液より低張な尿を大量に排出する。陸生の四肢動物は、腎臓における高度な水再吸収機構によって体内に水分を保持している。脳下垂体後葉から分泌される抗利尿ホルモン・バソプレシンをはじめとする体液調節ホルモンが、これら器官を支配する。

体内環境を高度に制御する我々「調節型」のしくみは、いったいいつ、どのように獲得されたのだろうか？鍵を握るのは、現生脊椎動物で最も早くに分岐した円口類のヌタウナギである。ヌタウナギは真骨類と同様に鰓や腎臓を持つにもかかわらず、現生脊椎動物で唯一「順応型」の戦略をとるユニークな生物である。つまり、ヌタウナギの鰓や腎臓の機能や制御系を明らかに出来れば、我々の体液調節能力の進化的起源に迫ることができる。しかし現生種の多くが深海性で捕獲・飼育が困難なこと、ゲノム配列情報が整備されていなかったことなどから、ヌタウナギの生理学研究はきわめて遅れていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的アプローチで鰓と腎臓に発現する機能分子レパートリーを明らかにし、外環境塩分変化に伴う動態を調べることで、各器官の体液調節における役割を検証することを目的とした。特に「調節型」生物で報告されている体液調節関連分子に着目した。しかしヌタウナギの鰓や腎臓の形態・構造は顎口類と比較して原始的であり、その機能に関して、「調節型」の顎口類での常識が通用しない可能性が考えられる。そこで、解析対象を限定しない大規模遺伝子発現変動解析により、新規の体液調節関連分子を探索した。

### 3. 研究の方法

(1)既知体液調節分子の探索：ヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) の鰓および腎臓から total RNA を抽出し、strand-specific mRNA-Seq (paired-ended, 150bp, 9Gb) を実施した。得られたリードを de novo アセンブルし、網羅的な遺伝子発現プロファイルを得た。これをデータベースとするローカル blast により、既知体液調節関連分子 (各種輸送体やホルモン受容体) のホモログを検索した。解析には国立遺伝学研究所のスーパーコンピューターを使用した。

(2)塩分環境移行実験：ヌタウナギを通常海水、高濃度海水および低濃度海水に1週間馴致し (各群  $n = 6$ ) 組織を採取して分子生物学的解析に用いた。(1)で同定した体液調節関連分子について、鰓と腎臓における発現変動を qPCR で調べたほか、下記(3)により発現変動遺伝子を網羅的に同定した。

(3)differential expression (DE) 解析：塩分環境移行実験で使用した全18個体の鰓、腎臓および筋肉で RNA-Seq (paired-ended, 150bp, 3Gb) を実施した。2018年1月に公開されたヌタウナギゲノム配列情報をレファレンスとして、得られたリードをマッピング・定量し、実験群間で発現が変動する遺伝子を抽出した。マッピングと定量は kallisto および sleuth を用いて行った。BiomaRt により、各発現変動遺伝子に対応するゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) ホモログ情報を Ensembl データベースから取得した。このゼブラフィッシュホモログ情報を用いて、DAVID で遺伝子オントロジーエンリッチメント解析 (GO 解析) を行った。本項目は研究開始当初は予定していなかったものだが、2018年度予算状況を鑑みて実施を決断した。

### 4. 研究成果

(1)既知体液調節分子の探索：鰓と腎臓の網羅的な遺伝子発現プロファイルから、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  共輸送体 (NKCC)、水チャネルのアクアポリン (AQP)、バソプレシンの非哺乳類ホモログであるバソトシンの受容体 (VTRs) など、既知体液調節分子のホモログを見出した。qPCR による解析で、これら遺伝子の一部について、外環境塩分濃度変化に伴う発現変動が確認された。これらは、「順応型」のヌタウナギが「調節型」と共通する機能分子レパートリーを持つことを意味する。一方で、「調節型」との違いも見られた。真骨類では鰓と腎臓で異なる NKCC アイソフォームが発現するのに対し、ヌタウナギでは1種類の NKCC が両器官に発現する。また、真骨類では NKCC と同じ輸送体ファミリーに属する  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  共輸送体 (NCC) が塩類の取り込みを担い、淡水適応に重要な役割を果たすが、ヌタウナギの鰓・腎臓のいずれにおいても NCC の発現は確認できなかった。VTRs は先行研究で6種類が報告されており、ヌタウナギと同じ円口類のヤツメウナギ

でも5種類が同定されているが、ヌタウナギでは2種類のみ見られた。VTRsは脊椎動物の進化の早い段階で多様化したとされ、大きくV1型(V1aRおよびV1bR)とV2型(V2aR, V2bR, V2cRおよびV2dR)に分かれる。分子系統解析において、2種類のヌタウナギVTRsはそれぞれV1型とV2型のクレードに属した。このことから、VTRs多様化の第一段階はヌタウナギの分岐以前に完了したことが示唆される。

(2)DE解析による新規体液調節関連分子の同定：DE解析ならびにGO解析の結果、鰓・腎臓のいずれにおいてもNaCl輸送系の変動は検出されなかった。これは「ヌタウナギは積極的なNaCl調節能を持たない」という先行研究の知見を支持する。鰓で発現変動が確認された遺伝子は、粘液の主成分である糖タンパク質や糖脂質の合成・輸送に関与するものであった。実際にヌタウナギの鰓上皮には多数の粘液細胞が存在することから、検出された遺伝子が最終的に粘液産生に寄与することが考えられる。これに対し腎臓では、solute carrier family 6に属するアミノ酸輸送体や、プロトンポンプ・V-ATPaseの発現変動が検出された。このことはヌタウナギの腎臓がアミノ酸再吸収や酸塩基調節を行うことを示唆する。アミノ酸はヌタウナギや海産無脊椎動物の細胞内に高濃度で蓄積され、浸透圧調節に働くことが報告されている。そこで細胞レベルでの体液調節機構についても検証が必要と考え、筋肉をモデル組織として同様の解析を実施した。その結果、腎臓と連動するアミノ酸輸送系が検出された。つまり、「調節型」生物の体液バランスが個体レベルで維持されるのに対し、ヌタウナギではアミノ酸を用いる細胞単位での浸透圧調節がメインであり、腎臓がこれを補助する可能性が示された。同時に、真骨類とは異なり、ヌタウナギの体液調節における鰓の役割が限定的であることが示唆された。

本研究により、ヌタウナギの体液調節機構について基礎的知見が得られた。特に腎臓についてはこれまで形態学的な観察しか行われておらず、本研究で分子生物学的解析を実施した意義は大きい。本研究成果について、2019年中に招待講演での発表を予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。