

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19207005  
 研究課題名（和文） 水生から陸生にともなう飲水機構の進化：魚類を用いてその原点を探る  
 研究課題名（英文） Evolution of drinking mechanism from aquatic to terrestrial habitat:  
 Exploring its origin using fishes  
 研究代表者  
 竹井 祥郎（TAKEI YOSHIO）  
 東京大学・海洋研究所・教授  
 研究者番号：10129249

研究成果の概要（和文）：本研究において、グアニリン、アドレノメデュリン、リラキシンなどのイオン排出・降圧ホルモンが魚類で多様化しており、それらが魚類の浸透圧調節に重要であることを明らかにした。また、飲水を抑制するナトリウム利尿ペプチドと促進するアンジオテンシンが、延髄の最後野に作用して嚥下による反射的な飲水を調節していることを明らかにした。この結果は、前脳に作用して「渇き」という動機づけにより飲水する陸上動物と異なる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that guanylin, adrenomedullin and relaxin form a family of diversified members in teleost fishes and play important roles in osmoregulation, particularly in seawater adaptation. We also found that natriuretic peptides that suppress drinking and angiotensin that induces drinking act on the area postrema in the medulla oblongata to regulate reflex swallowing in aquatic fishes, which is in contrast to terrestrial animals where they regulate thirst by acting on the forebrain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	15,500,000	4,650,000	20,150,000
2008年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2009年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
年度			
年度			
総計	38,900,000	11,670,000	50,570,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：浸透圧調節、飲水行動、ホルモン、水生動物、脳内神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 海水適応に必要なホルモンの探索

浸透圧調節、特に高浸透圧環境（海水）への適応機構は 20 世紀初頭から多くの研究者の興味を惹きつけてきた。浸透圧調節のようにホメオスタシスをともなう調節には、ホル

モンが重要な役割を果たしている。これまでは、淡水と海水双方に適応できる広塩性魚（ウナギ、ニジマス、ティラピアなど）を用いて、淡水から海水に移行した際に鰓や腸を海水型につくり変える成長ホルモンやコルチゾルが海水適応ホルモンとして示唆されていた。これらのホルモンは分泌されたのち

にしばらく血液中に残り、新規遺伝子の発現を促進して新しい環境に適するように組織を作りかえるホルモンである。いっぽう、私どもは心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) がウナギを海水に移行させると一過性に分泌され、過剰な飲水を抑制することにより血漿浸透圧の急激な上昇を抑え、初期の海水適応に重要な役割を果たすことを明らかにした。実際に、海水ウナギに ANP を投与すると、飲水の抑制と共に血漿浸透圧が下がる。一方、ANP の抗体を投与して血液中の ANP をなくすと飲水が促進され、血漿浸透圧が上昇する。しかし、陸上動物における抗利尿ホルモンのように、それがないと生死にかかわるほどに重要であるとは言えず、他により必須なホルモンがあるのではないかと考えた。

#### (2) 飲水行動に関わる脳内機構

真骨魚類は海水の 3 分の 1 の体液浸透圧をもつため、海水中では鰓などの体表から水を失う。そのため、飲水は海水魚が生きる上で必須である。これまでに私どもは、アンジオテンシンが飲水を惹起して ANP が抑制すること、陸上動物では渇きの中樞である前脳の一部を破壊するとアンジオテンシンは飲水を惹起しなくなるが、水生であるウナギでは前脳全体を摘出してもアンジオテンシンを投与すると飲水を惹起することを明らかにしていた。すなわち、ウナギではアンジオテンシンは前脳で生じる「渇き」を感じることなく、延髄レベルの反射的な嚥下を惹起することにより飲水させていることが示唆された。しかし、アンジオテンシンが延髄のどの部位に作用して嚥下を調節しているかは未知であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は大きく 2 つにわかれる。第 1 の目的は海水適応になくしてはならないホルモンの探索である。特に海水適応の初期に重要であると考えられる低分子のペプチドホルモンの同定を試みる。これらのホルモンは環境変化にすばやく反応して分泌され、浸透圧調節上皮に存在するさまざまな輸送体・チャネルの活性を調節することにより急激な体内変化を和らげるように働く。特に近年哺乳類で見つかった体液調節ホルモンであるグアニリン、アドレノメデュリン、リラキシンに着目している。アドレノメデュリンも哺乳類において強力な降圧作用とナトリウム利尿作用をもつ。また、グアニリンは腸で作られるホルモンで、クロライドチャネルを通して Cl<sup>-</sup>を腸管内に分泌させることにより下痢をおこすことが哺乳類で知られている。また、リラキシンは分娩時に恥骨結合を弛緩させるホルモンとして見つかったが、近年にな

って体液調節や血圧調節にも関与することが示唆されている。

第 2 の目的は、本当に海水魚の飲水が延髄レベルの嚥下により調節されているのか、また延髄のどこに嚥下調節の中樞があるのかを明らかにすることである。これを明らかにすることにより、水生から陸生への進化にともなう飲水調節機構の進化の歴史が明らかになるであろう。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規海水適応ホルモンの探索

これまでに海水適応に重要であることが明らかになったナトリウム利尿ペプチドは、ANP, BNP, CNP の 3 種が存在する哺乳類と比べて、ウナギでは 7 種類に多様化している。遺伝子が重複しても消失しないことは、重要な作用が複数のホルモンにより保障されていることを示唆する。そこでアドレノメデュリン、グアニリン、リラキシンが真骨魚類で多様化しているか否かを、ゲノムデータベースを利用できるトラフグ、ゼブラフィッシュ、メダカで調べた。次にゲノムから得られた配列情報を基に遺伝子を発現している組織を RT-PCR で調べ、その組織を用いてウナギで cDNA を得た。ウナギを用いた理由は、本研究室で個体レベルの生理学実験の手法が確立しているためである。

cDNA の配列情報を基に成熟ホルモンを合成して抗体を作成するとともに、血漿ホルモン濃度の変動を測定するためラジオイムノアッセイ系を確立した。生理実験は、まずウナギを海水に移行させた後のホルモン遺伝子発現や血漿レベルの変動を調べた。変動がみられた場合はホルモンを投与して、飲水や尿量の変動、血漿イオン濃度の変動を個体レベルで調べるとともに、in vitro で腸の袋状標本や Ussing chamber を用いた実験により輸送体やチャネルに対する作用を調べた。

### (2) 飲水に関する延髄の調節中枢の同定

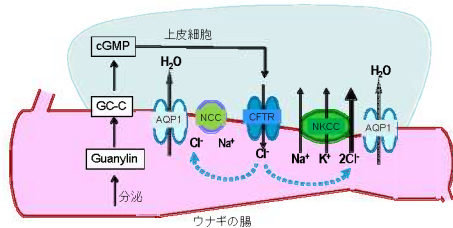
ウナギの飲水調節に関する研究は 1970 年代より行われており、血液量の減少 (容量刺激) は飲水を促進するが、陸上動物で最も強力な飲水刺激である血漿浸透圧の上昇 (浸透圧刺激) はウナギでは飲水を抑制する。また、さまざまなホルモンがウナギの飲水を変化させるが、明らかに哺乳類と比べると促進するホルモンの数が少なく活性も低い、抑制ホルモンの数が多くまた活性が高い。これらの飲水調節刺激が延髄のどの部位に作用するか、換言すると延髄の嚥下調節中枢を同定することを試みた。ホルモンが脳に作用する場合は、血液脳関門がない部位に作用することが知られている。延髄には最後野とよばれる脳室周囲器官があり、ウナギの血液中に色素を注射するとその部位が染まったため、こ

の部位に注目した。そこで最後野を熱凝固（神経細胞だけではなく軸索も破壊される）あるいはカイニン酸投与（神経細胞のみが破壊される）で破壊したのちに血液中に飲水調節刺激を与え、破壊の影響を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) グアニリン

哺乳類のグアニリン系は2種のホルモンと1種の受容体からなるが、ウナギでは3種のホルモンと2種の受容体に多様化していることが明らかになった。また、ホルモンと受容体遺伝子の発現が腸や腎臓に局限しており、ウナギを海水に移行させると発現が上昇することがわかった。そこで発現が多い腸に着目して Ussing chamber を用いてイオン輸送に対する作用を調べたところ、グアニリンは CFTR 型クロライドチャンネルを活性化することにより腸管内に Cl<sup>-</sup> イオンを分泌させることがわかった (図)。海水ウナギの腸は、



Na-K-2Cl 共輸送体 (NKCC) を用いて4分子のイオンを吸収するとともに水を吸収しているが、海水中にはほぼ同じ量の Na と Cl が含まれているため、NKCC が働くと Cl が不足する。グアニリンは哺乳類では CFTR を活性化して下痢を起こすが、海水ウナギでは不足する Cl を補充することにより NKCC を活性化して水の吸収を増加させ、海水適応を促進する可能性が示唆された。哺乳類の腸では吸収型の NKCC が存在しないため NaCl を吸収する能力が低く、海水を飲むと十分なイオンと水を吸収できないため下痢をする。

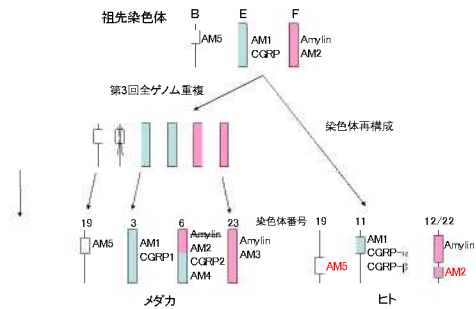
##### (2) ナトリウム利尿ペプチド (NP)

ウナギにおいて心房性 NP (ANP) は海水に移行させると一過性に分泌され、過剰な飲水を抑制することにより急激な血漿ナトリウム濃度の上昇を和らげ、海水適応を促進することをこれまでに明らかにしてきた。また、哺乳類では3種しかない NP ファミリーが真骨類では7種あることを報告した。本研究では、ウナギでは6種の NP が存在し、特に心臓から分泌されるホルモンとして3種 (ANP, BNP, VNP) を同定した。魚類ではすべての種で BNP が存在するため、ウナギで見つけた BNP の効果を他の NP と比べて、血圧作用や浸透圧作用双方とも ANP や VNP が BNP よりも強力であった。また、ANP が海水ウナギで、CNP1 が淡水ウナギでミネラルコルチコイド作用をもつコルチゾルの分泌を促進することをこ

れまでに明らかにしてきたが、コルチゾルの分泌器官である間腎腺の培養細胞に ANP や CNP1 を投与しても分泌が促進されなかった。そこで、脳下垂体から分泌される ACTH と共に投与したところ、ACTH の作用を増強した。生体内では ACTH が常に存在するため、NP は単独では作用をもたないが ACTH の作用を増強することによりコルチコイド分泌を促進することが明らかになった。すなわち、NP は速効性ホルモンとして ACTH とともに遅効性ホルモンであるコルチゾルの分泌を促進することが明らかになった。

##### (3) アドレノメデュリン

アドレノメデュリンは魚類では5種のパラログ (AM1~AM5) からなるファミリーを作っていることが明らかになった。この発見がもとで哺乳類の AM が AM1 のオルソログであり、哺乳類でも新たに AM2 と AM5 が発見された (図)。すなわち、AM ファミリーは AM1/4、



AM2/3 および AM5 の3種からなり、真骨類で独自に起こった全ゲノム重複により AM1 と AM2 が重複して今でも残っていることが明らかになった。ウナギの AM1, 2, 5 をウナギに投与すると、AM2 と AM5 がとりわけ強力な降圧作用と飲水刺激作用をもつことがわかった。また、AM はさまざまな組織で発現しており、ウナギを海水に移しても明らかな遺伝子発現の変化が見られなかった。しかし、AM2 は脳で遺伝子が盛んに発現しており、脳で局所的に飲水を刺激して海水適応を促進している可能性が残る。

##### (4) リラキシン

リラキシン (RLN) は、分娩時に恥骨結合を弛緩させて容易に分娩させるホルモンとして発見されたが、血圧作用や体液調節作用をもつことが明らかになってきた。さらに、リラキシンもいくつかのパラログからなるファミリーを作っていることがわかってきた。そこで、飲水調節に着目して脳で特異的に発現をしている RLN3 を真骨類で調べたところ、3種 (RLN3a-c) からなるファミリーを作っていることが明らかになった。RLN3c は明らかに配列は RLN3 に類似しているが、シクエン解析により RLN3c は哺乳類の RLN2 のオルソログであることが明らかになった。また、ウナギの脳では RLN3a が発現しており、RLN3b はほとんど発現が見られなかった。

RLN3a の発現部位は、哺乳類の RLN3 と同様に中脳と後脳の境の灰白質にある nucleus incertus であることがわかった。この部位における遺伝子発現が淡水ウナギと海水ウナギで違いが見られなかったが、今後培養細胞で発現させて活性ペプチドを作り、脳内に投与して飲水に対する効果を調べる予定である。

(5) ウナギの脳における飲水調節部位

ウナギはアンジオテンシン、AM2 および脱血により飲水が促進され、ANP、浸透圧刺激などで飲水が抑制される。延髄にあり嚙下に関わるとされる最後野は血液脳関門を欠き、血液と脳室双方からホルモンが作用する。そこで、最後野を局所的に破壊して、その後これらの飲水調節刺激を与えたところ、刺激前の通常の飲水には有意な変化が見られなかったが、最後野の破壊後はこれらの刺激による飲水の変化が消失した。したがって、これらのホルモンや水・電解質バランスの変化による飲水に最後野が関わっていることが示唆された。

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 26 件)

①Takei, Y., Hashimoto, H., Inoue, K., Osaki, T., Yoshizawa-Kumagaye, K., Watanabe, T. X., Minamino, N., and Ueta, Y. Central and peripheral cardiovascular actions of adrenomedullin 5, a novel member of the calcitonin gene-related peptide family, in mammals. *J. Endocrinol.* 査読有, 197, 2008, 391-400.

②Takei, Y. Exploring novel hormones essential for seawater adaptation in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 査読有, 157, 2008, 3-13.

③Takei, Y., Ogoshi, M., and Inoue, K. A 'reverse' phylogenetic approach for identification of novel osmoregulatory and cardiovascular hormones in vertebrates. *Frontiers Neuroendocrinol.* 査読有, 28, 2007, 143-160.

[学会発表] (計 49 件)

①Takei, Y., Yuge, S. and Ando, M. Multiple guanylin and their receptors in the eel assume their important roles in seawater adaptation. Sixteenth International Congress of Comparative Endocrinology, June 22-26, 2009, Hong Kong. (State-of-Art Lecture).

②Takei, Y., Tsukada, T., Yuge, S., Ogoshi, M., and Inoue, K. Exploring essential seawater-adapting hormones in fish. Sixth International Symposium on Fish Endocrinology, June 22-27, 2008, Calgary, Canada. (Invited speaker)

③Takei, Y., and Ogoshi, M. Evolutionary history of the CGRP family in vertebrates. Sixth International Symposium on the CGRP family. October 31-November 2, 2007, San Diego, USA. (Invited speaker)

[図書] (計 10 件)

①Takei, Y., and Loretz, C. A. The gastrointestinal tract as an endocrine, paracrine and autocrine organ. In: *Fish Physiology Vol. 30: The Multifunctional Gut of Fish* (M. Grosell, A. P. Farrell, and C. J. Brauner), Academic Press, San Diego, 2010, in press.

②Takei, Y., Ogoshi, M., Wong, M. K., and Nobata, S. Molecular and functional evolution of the adrenomedullin family in vertebrates: What do fish studies tell us? In: *The Calcitonin Gene-Related Peptide Family: Form, Function and Future Perspectives*. (Eds. D. L. Hay and I. Dickerson). Springer Verlag, Berlin. 2009, pp.1-21.

③Takei, Y., and Balment, R. J. The neuroendocrine regulation of fluid intake and fluid balance. In: *Fish Physiology, Vol. 28: Fish Neuroendocrinology* (Eds. N. Bernier, G. Van Der Kraak, A. P. Farrell and C. J. Brauner). Academic Press, Burlington: Academic Press, 2009, pp. 365-419.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹井 祥郎 (TAKEI YOSHIO)  
東京大学・海洋研究所・教授  
研究者番号: 10129249

(2) 研究分担者

安藤 正昭 (ANDO MASAOKI)  
広島大学・総合科学部・准教授  
研究者番号: 10100976  
(H19-H20 年度まで)

坂本 竜哉 (SAKAMOTO TATSUYA)  
岡山大学・自然科学研究科・准教授  
研究者番号: 10100976  
(H19 年度まで)