

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15912

研究課題名(和文) 魚類塩類細胞分化誘導シグナリングの解明から迫る広塩性決定因子の同定と応用

研究課題名(英文) Identifications of the ionocytes functional differentiation factors in fish

研究代表者

宮西 弘 (Miyanishi, Hiroshi)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：30726360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の浸透圧調節は体内環境の恒常性の維持に重要であり、その機構の解明は魚類の健全な育成を目指す上で資するところが大きい。魚類は主に淡水および海水という体内とは異なる浸透圧環境に生息しているため、水圏環境での生存には主にNa⁺とCl⁻などの塩分調節が必要不可欠であり、その機能を担うのが鰓などに分布する塩類細胞である。本研究で、新たな塩類細胞の分化誘導に関わる遺伝子群を同定した。これらの成果は、「なぜ魚類が異なる塩分環境に適応できたか？」という問いに迫れる可能性を示し、淡水および海水適応マーカーとして評価し、多様な塩分環境での増養殖を活性化する技術開発に向けた基盤確立に寄与できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

塩類細胞分化誘導因子を新規に同定し、そのシグナリング機構の全容を分子レベルで解明することに挑んだ。海洋環境に生息する魚類・爬虫類・鳥類の持つ塩類排出器官におけるイオン排出モデルは共通している。よって、魚類の海水型塩類細胞の分化誘導機構を解明することは、なぜ生物が海水への適応能力を得たかという根源的な疑問に一石を投じるものである。また、ヒト内耳にも魚類の塩類細胞と相同な細胞が哺乳類の内耳におけるリンパ液の浸透圧調節を担う点で共通性があり、メニエール病や内耳性難聴となるペンドレッド症候群の原因遺伝子の解明に寄与できる。本研究課題は、理学・水産学および基礎・臨床医学分野へも学術的波及を生み出せる。

研究成果の概要(英文)：Osmoregulation in fish is important for maintaining the body fluid homeostasis. The understanding of its mechanism will contribute to improve the aquaculture in fish. Fish live mainly in freshwater and seawater. Osmoregulation, mainly Na⁺ and Cl⁻, is essential for fish to adapt to an osmotic environment that differs greatly from that in the body. Ionocytes distributed in gills are essential for osmoregulation. In this study, we identified novel target genes involved in the ionocytes functional differentiation. These results may lead us to answer the question, "Why are fish able to adapt to different saline environments?" In addition, the evaluation of the target genes can be established as markers of freshwater and seawater adaptation, and contribute to the development of technologies to stimulate aquaculture in various saline environments.

研究分野：魚類生理学

キーワード：メダカ 浸透圧調節 塩類細胞 分化 トランスクリプトーム解析 1細胞解析

1. 研究開始当初の背景

魚類は、進化の過程で淡水と海水環境との往来を行い、環境適応機構を獲得したと考えられている。水棲生物にとって、直に接する水は、多様な塩分濃度環境であり、環境適応機構における浸透圧調節は、生存を左右する。魚類の生息する水圏環境は、ほぼ塩分のない淡水と海水(約1000 ミリオスモル)間で約1000倍の浸透圧差が生じる。しかし、魚類の体液浸透圧は淡水・海水中においても海水の約1/3(約300 ミリオスモル)程度に保たれている。そのため、淡水魚では水の流入と塩分の流出が生じ、海水魚では脱水と塩分の流入による塩分過多が生じる。魚類が淡水または海水環境で生存するためには、 Na^+ や Cl^- を主とするイオンを生理的範囲内に調節することが必須である。サケやウナギに代表される通し回遊魚同様に、メダカは淡水および海水の両環境で生存可能な広塩性魚である。広塩性魚の浸透圧調節は、低浸透圧環境である淡水中で不足する Na^+ や Cl^- を取り込み、逆に高浸透圧環境の海水中では過剰となる Na^+ や Cl^- を排出するという、両環境間で全く逆の調節を行う点で非常に興味深い。この浸透圧調節という重要な生理機能を担うのが、鰓などに多数分布する塩類細胞である。塩類細胞は、塩分の不足する淡水中では、能動的に NaCl を取り込む淡水型塩類細胞となり、塩分排出が必須な海水中では NaCl を排出する海水型塩類細胞に機能分化し、環境に合わせた機能的可塑性を有する。特に、海水魚における NaCl の排出は、99%が鰓の塩類細胞を介して行われる。つまり、塩分の排出には、鰓の塩類細胞が不可欠、かつ、支配的な役割を担っている(Tsukada et al. Gen Comp Endocrinol, 2006, Miyanishi et al., Zool Sci, 2011)。海水適応時の魚類の鰓には、海水型塩類細胞が存在する一方、淡水でしか生きられない魚類は、海水型塩類細胞が存在しないことから、魚類の海洋環境への適応には、海水型塩類細胞の分化と塩分排出という機能発現の、ふたつの局面が鍵となると考えられる。しかし、異なる塩分環境下における塩類細胞の機能的発現が、どのような分子メカニズムによって分化誘導されるかは、未だに知見は皆無に等しい。本研究グループは、広塩性メダカ(*Oryzias latipes*)を題材に、水圏環境適応に必須な新規生理機構の解明に取り組み、これまでに海水型塩類細胞の増加は海水適応能を上昇させること、転写因子 forkhead box I (FOXI) 3は、全ての塩類細胞の分化・増殖に必須であり、メダカ FOXI3 遺伝子ノックダウン胚は海水中で生存できないことを示している(Miyanishi et al., Zoological Lett, 2016, 宮西ら, 月刊海洋, 2017)。これらの事実は、FOXI3が淡水型および海水型塩類細胞の分化・誘導に必須であり、FOXI3シグナリングのさらに下流に機能の異なる塩類細胞を分化誘導するカスケードが存在することを強く示唆している。従って、この分化誘導カスケードの中で、淡水型および海水型塩類細胞の機能的発現を決定づける分化誘導因子が、塩分環境適応の鍵となり、この分化誘導因子を同定することで、「なぜ魚類が異なる塩分環境に適応できたか？」に迫れる可能性が見えてきた。

2. 研究の目的

本研究では、塩類細胞分化誘導因子を新規に同定し、そのシグナリング機構の全容を分子レベルで解明することを目的とし、基礎生理学および先端的な分子生物学的手法を導入した複合的なアプローチで課題解決に挑む。これまで、淡水型および海水型塩類細胞の分化誘導機構を分子レベルで統合的に解明した研究成果は無い。特に、海洋環境に生息する魚類・爬虫類・鳥類の持つ塩類排出器官において、細胞・分子レベルでのイオン排出モデルは共通している。よって、魚類の海水型塩類細胞の分化誘導機構を解明することは、なぜ生物が海水への適応能力を得たかという根源的な疑問に一石を投じるものである。これは、脊椎動物の海水への適応や放散を、浸透圧調節や塩類細胞の機能分化機構の側面から理解する基盤となり、脊椎動物の適応生理機構の進化や普遍性の理解にも繋がる、極めて独創的な研究である。また、多様な塩分環境での増殖を活性化する技術開発には、塩分調節機構の理解が重要である。本研究により、淡水および海水に適応可能種であるかを評価するマーカーを同定し、地域の塩分環境特性に合った魚種の選定と飼育法の確立に繋げる。また、FOXI3ホモログはヒト内耳にも発現し、魚類の塩類細胞と相同な細胞が哺乳類の内耳におけるリンパ液の浸透圧調節を担う点で共通性が認められる。この内リンパ液の浸透圧調節の異常がメニエール病などの内リンパ水腫を引き起こす他、内耳性難聴となるペンドレッド症候群の原因遺伝子の一つがFOXI3ホモログである。このような背景から、本研究で取り組む魚類の鰓塩類細胞の分化誘導機構の学術知見が、未だ理解されていないヒト疾患の発症機序の解明に寄与でき、基礎・臨床医学分野へも大きな学術的波及を生み出せる。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝学的・分子生物学的アプローチを行うため、実験魚としてメダカ *Oryzias latipes* を用いた。メダカは、淡水および海水に適応可能な広塩性魚であり、先行研究により淡水型および海水型塩類細胞のタイプの同定もされている。さらに、ゲノム情報、ノックダウン等の機能解析法が確立している点で最適なモデル魚である。

(1) 生体染色による塩類細胞の可視化およびマイクロダイセクションによる塩類細胞の採取

DASPEI、DASPMI および Mitobright green を淡水および海水の飼育水に溶解し、メダカを遊泳させ、麻酔後直ちに第2鰓弓を採取した。採取された鰓組織は、ティッシュ・テック O.C.T. コ

ンパウンドに数回馴染ませた後、直ちに液体窒素を用いて包埋した。凍結切片にした組織はスライドガラスに貼りつけ蛍光顕微鏡にて観察を行った。最も染色が良好だった染色法により塩類細胞を可視化し、ZEISS PALM MicroBeam レーザーマイクロダイセクションシステムにより塩類細胞および対照群として上皮細胞を採取した。淡水で飼育した鰻を淡水型塩類細胞の採取に用いた。また、50%海水に1日馴致した後、100%海水で2週間以上馴致したメダカ鰻を海水型塩類細胞採取に用いた。

(2) 単一細胞レベルにおける遺伝子発現比較解析

採取された淡水型塩類細胞、淡水鰻上皮細胞、海水型塩類細胞および海水鰻上皮細胞を3サンプルずつ用意し、70%EtOH固した後、クロンテック SMART-Seq v4 を用いてライブラリー調整を行った。各ライブラリーは、次世代シーケンス解析を行い、遺伝子プロファイルを得た。

(3) 塩類細胞特異的機能分化に関わる遺伝子のスクリーニング

各鰻上皮細胞より塩類細胞で発現が有意に高い遺伝子および、淡水型塩類細胞よりも海水型塩類細胞で発現が有意に高くかつ海水鰻上皮細胞より海水型塩類細胞で発現が高い遺伝子を遺伝子プロファイルの解析から抽出した。抽出された遺伝子は、Ensembl ゲノムデータベースおよび NBRP medaka の cDNA ライブラリーから *in silico* クローニングを行った。全ての候補遺伝子および候補遺伝子の近似遺伝子も含め定量 PCR プライマーを作製し、淡水および海水馴致メダカの鰻サンプルを用いた定量 PCR による発現解析を行った。さらに、脳、鰻、腎臓、消化管および肝臓を対象に、定量 PCR による組織別発現解析を行った。この解析から、鰻での発現が高いかつ海水馴致メダカの鰻で発現が高い遺伝子を選別し、特異的プライマーを用いクローニングを行い、部分配列を決定した。より正確な定量 PCR での発現を確認するため、淡水から海水移行後、3時間、6時間、12時間、1日、3日、7日、14日の経時的発現解析による発現変動を明らかにした。さらに、脳、鰻、腎臓、消化管、肝臓、脾臓、心臓、眼、筋肉、皮膚、精巣および卵巣の12組織を対象に、より詳細な定量 PCR による組織別発現解析を行った。塩類細胞特異的機能分化に関わると期待できる遺伝子は、*in situ* ハイブリダイゼーションにより組織学的観察を行った。

4. 研究成果

塩類細胞には、主にタイプ1-4が存在する。淡水型塩類細胞としてタイプ2および3が発現するが、ニホンメダカの鰻ではタイプ3が90%以上発現し、主なイオン調節を担う。一方の海水環境ではタイプ4である海水型塩類細胞が発現する。本研究では、タイプ3およびタイプ4に着目し、両タイプの塩類細胞の遺伝子プロファイルを基に比較解析を行う。非固定式の生体染色を検討した。生体染色試薬3種における比較の結果 Mitobright green による染色が最も良好であり、非固定組織の凍結切片後もシグナルを得られることが分かった。これにより、レーザーマイクロダイセクションを用いて対象とする細胞のみをマークおよび採取することが可能となった。よって、より生体に近い状態を保つことで、RNA 発現プロファイルを単一細胞レベルで解析できる方法を確認した。次世代シーケンス解析の結果、24,303 コンティグを得た。各鰻上皮細胞より塩類細胞で発現が有意に高い遺伝子として81遺伝子が候補遺伝子となった。次に、淡水型塩類細胞よりも海水型塩類細胞で発現が有意に高くかつ海水鰻上皮細胞より海水型塩類細胞で発現が高い遺伝子138遺伝子が候補遺伝子として絞られた。計219遺伝子を対象に、5組織における組織別発現解析および淡水および海水馴致した鰻における定量 PCR の結果、20遺伝子に絞られた。20遺伝子を対象に、より詳細な遺伝子発現解析を行った結果、新規として同定された遺伝子を「p62」と命名した。p62遺伝子は、鰻で特異的に発現量が多く、海水移行後3時間で発現量が有意に上昇しており、海水適応における鰻の重要な機能を担うと期待できた。転写因子 SOX ファミリーの1種は、海水移行後14日目で鰻での発現量が有意に上昇し、脳および鰻での発現が顕著に高かったことから、長期的な海水適応に重要な機能を担うと期待できた。PTPN ファミリーの1種、プロラクチン受容体の1種、YME1 様遺伝子、カドヘリンファミリーの1種および転写因子 FOXG ファミリーの1種は海水移行後に発現上昇が認められたことから海水適応における鰻での役割があることが示唆された。新規遺伝子は p62 は、鰻上皮での発現が組織学的解析から観られたことから海水型塩類細胞の機能的分化誘導に関わる可能性があるため、その他の遺伝子を含めて解析を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyanishi Hiroshi, Uchida Katsuhisa	4. 巻 6
2. 論文標題 Establishment of a Simplified System to Evaluate Salinity Preference and Validation of Behavioral Salinity Selection in the Japanese Medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fishes	6. 最初と最後の頁 18 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/fishes6020018	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 Okamura Yo, Miyanishi Hiroshi, Kinoshita Masato, Kono Tomoya, Sakai Masahiro, Hikima Jun-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 A defective interleukin-17 receptor A1 causes weight loss and intestinal metabolism-related gene downregulation in Japanese medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12099 ~ 12099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91534-3	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 Kaneko Toyoji, Suzuki Rintaro, Watanabe Soichi, Miyanishi Hiroshi, Matsuzawa Shun, Furihata Mitsuru, Ishida Noriko	4. 巻 85
2. 論文標題 Past seawater experience enhances subsequent growth and seawater acclimability in a later life stage in rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 925 ~ 930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-019-01351-x	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 Okamura Yo, Morimoto Natsuki, Ikeda Daisuke, Mizusawa Nanami, Watabe Shugo, Miyanishi Hiroshi, Saeki Yuichi, Takeyama Haruko, Aoki Takashi, Kinoshita Masato, Kono Tomoya, Sakai Masahiro, Hikima Jun-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Interleukin-17A/F1 Deficiency Reduces Antimicrobial Gene Expression and Contributes to Microbiome Alterations in Intestines of Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.00425	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 Byun Jun-Hwan, Hyeon Ji-Yeon, Kim Eun-Su, Kim Byeong-Hoon, Miyanishi Hiroshi, Kagawa Hirohiko, Takeuchi Yuki, Kim Se-Jae, Takemura Akihiro, Hur Sung-Pyo	4. 巻 8
2. 論文標題 Gene expression patterns of novel visual and non-visual opsin families in immature and mature Japanese eel males	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e8326 ~ e8326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.8326	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 該当する

[学会発表] 計9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 谷口雄真・宮西弘
2. 発表標題 単一細胞レベルトランスクリプトーム解析による魚類の鰓塩類細胞分化因子の探索
3. 学会等名 トランスポーター研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今野紀文、富樫彩音、宮西弘、中町智哉、松田恒平
2. 発表標題 メダカの高浸透圧処理によるカルシウム活性化クロライドチャンネルAnoctamin1の発現と局在
3. 学会等名 日本比較内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野拓海, 宮西弘, 鎌田優功, 井尻成保, 足立伸次
2. 発表標題 ニホンウナギの血嚢体および脳における光周性因子の遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡村洋, 宮西 弘, 木下政人, 河野智哉, 酒井正博, 引間順一
2. 発表標題 メダカにおけるインターロイキン17受容体A1遺伝子を介した腸内細菌叢制御機構の解明
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Miyanishi
2. 発表標題 Past seawater experience enhances seawater adaptability and subsequent growth in euryhaline fish
3. 学会等名 The 74th Annual meeting of the Korean association of biological sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮西 弘
2. 発表標題 魚類のin vivoコンディショナルノックダウンを用いた塩類細胞分化機構の解明
3. 学会等名 第11 回トランスポーター研究会九州部会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮西 弘
2. 発表標題 魚類の浸透圧調節機構の理解から繋げる応用と展望
3. 学会等名 三学会合同宮崎例会 (日本動物学会九州支部会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮西 弘
2. 発表標題 メダカとその近縁種をモデルとした塩分体積機構：鰹塩類細胞分化に着目して
3. 学会等名 第67回 日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮西弘、石田玲音、工樂樹洋、高木互、兵藤晋、内田勝久
2. 発表標題 板鰹類トラザメにおける孵化腺および孵化酵素の同定
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------