

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16178

研究課題名（和文）円口類ヌタウナギの体液調節機構：適応戦略を決定する分子基盤の解明に向けて

研究課題名（英文）Molecular basis of the hagfish osmoregulatory strategy

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・助教

研究者番号：70801827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物は進化の過程で、体内の水とイオンのバランスを保つ能力（体液調節能力）を獲得し、様々な環境に進出してきた。しかし、この能力がどのような過程を経て獲得されたのかはわかっていない。本研究では、現生脊椎動物で唯一「体液調節をしない」生物であるヌタウナギに着目し、我々「調節型」の生物と何が違うのか、分子レベルで検証した。その結果、ヌタウナギの体液調節関連遺伝子レパートリーは他の脊椎動物と大差ないが、特に塩分の輸送に関する遺伝子がOFFになっていることを見出した。つまり、問題は遺伝子のレパートリーではなくその発現調節様式であり、ヌタウナギは二次的に体液調節能力を失ったことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、我々の体液調節能力の起源が従来考えられていたよりも古いことを示唆する。このように、ヌタウナギは脊椎動物の進化を考える上で鍵を握る生物であり、近年注目を集めている。しかし現生種の大半が深海性のため捕獲・飼育が難しく、研究はきわめて遅れている。今回は、例外的に浅海に分布する種をモデルとし、同種が容易に捕獲できる島根県の地の利を生かし、分子レベルで大規模かつ網羅的な解析を行うことにより、ヌタウナギの生理学研究を大きく押し進めることができた。得られたデータは公開データベースに登録したため、今後、国内外の研究者に活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Vertebrates possess a remarkable ability to maintain body fluid balance. However, the origine and evolution of osmo- and iono-regulatory machinaries remain poorly understood. In the present study, we focused on hagfishes, which are characterized by omo- and iono-conforming nature. Combining in vivo salinity transfer experiment and RNA-Seq analysis, we explored the molecular mechanisms underlying the unique body fluid homeostasis of hagfishes. For most of the known vertebrate osmoregulatory genes, their counterparts were found in the hagfish genome; however, some of these hagfish genes, including the genes encoding conventional salt transporters, are silenced. Therefore, the unique body fluid composition of hagfishes is most likely attributable to the distinct regulation, rather than the repertoire, of osmoregulatory genes. This consequently suggests that the ability to maintain body fluid balance was secondarily lost in the hagfish lineage.

研究分野：比較生理学、比較内分泌学

キーワード：円口類 ヌタウナギ 体液調節 内分泌系

1. 研究開始当初の背景

生命活動とは、突き詰めれば、様々な分子(タンパク質、アミノ酸や核酸など)による化学反応の連鎖で成り立っている。こうした化学反応の場である体内環境の安定性は、生命活動の安定性に直結する。脊椎動物は進化の過程で、体内環境を一定に保つ優れた能力を獲得した。中でも、体内の水とイオンのバランスを維持する能力、すなわち体液調節能力は、我々の祖先が海洋から汽水/淡水へ、そして陸上へと進出する上で大きなアドバンテージとなったと考えられる。

哺乳類から硬骨魚真骨類までの分類群は、体液イオン組成と浸透圧を海水の 1/3 程度に保つ「調節型」である。「調節型」生物では鰓や腎臓が体液調節を担い、内分泌系の制御のもと協調して働く。これに対して海産無脊椎動物は、体液組成が海水とほぼ等しい「順応型」であり、外環境変化がそのまま体内環境に反映される。外界との物質のやりとりを高度に制御する「調節型」のしくみはいつ、どのようにしてできたのだろうか? 謎を解く鍵を握るのは、現生脊椎動物の中でも特に原始的な特徴を残すとされる円口類のヌタウナギである。ヌタウナギは他の魚類と同様に鰓や腎臓をもつにも関わらず、現生脊椎動物では唯一、無脊椎動物と同じ「順応型」の体液調節戦略をとる。さらに興味深いことに、同じ円口類のヤツメウナギは「調節型」である。一体、何が両者の適応戦略の違いを生み出すのか? 最新の研究で、ヌタウナギが多くの遺伝子を二次的に失ったことが示唆されている。しかし、ヤツメウナギを含む他の魚類と比べ、ヌタウナギの生理学研究は極めて遅れている。これは主に、ゲノム配列情報が整備されていなかったこと、ならびに、現生種の多くが深海性であることが理由である。については近年ゲノム配列情報が公開されたことや*1、大規模遺伝子解析技術の普及により、急速に状況が改善されつつある。ヌタウナギを「順応型」たらしめる分子メカニズムを解明することは、我々の体液調節能力の起源に迫ることにつながる。

*1 研究開始時点ではヌタウナギ (inshore hagfish, *Eptatretus burgeri*) のドラフトゲノムが利用可能だったが、2024 年 1 月には同種およびクロヌタウナギ (brown hagfish, *Eptatretus atami*) の全ゲノムの解読が発表された。

2. 研究の目的

本研究は、2017-2018 年度の研究活動スタート支援(課題番号 17H06876)の延長線上にある。同課題では、ヌタウナギを異なる塩分環境に馴致し、鰓、腎臓および筋肉について RNA-Seq を実施し、網羅的な遺伝子発現プロファイルを取得した。本研究では、上記 RNA-Seq データの詳細解析ならびに筋中パラメータの新規測定により、各器官における物質輸送経路を推定し、それが「順応型」の体液調節戦略にどのように寄与するのかを解明することを目指した。また、これら器官を支配する内分泌系について情報を得ることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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 $n = 6$ 、5 および 6)、筋肉組織を採取した。

(2) 筋肉中パラメータ測定

組織をホモジナイズして得られた溶液について、浸透圧(蒸気圧法)、イオン濃度(Na^+ 、 Cl^- および K^+ ; 原子吸光法およびモル法)および遊離アミノ酸濃度(高速液体クロマトグラフィー)を測定した。並行して、別の組織片を用いて水分含有量を算出した(ドライオープンでの乾燥前後の重量を比較)。

(3) 遺伝子発現変動解析

以前の塩分環境移行実験(2018 年 7 月)で得られた鰓・腎臓および筋肉の RNA-Seq データ(各群 $n = 6$ 、計 36 個体 \times 3 組織)を詳細に解析した。Ensembl のヌタウナギ cDNA 配列情報(*Eburgeri_3.2*)をレファレンスとして転写産物レベルでのマッピング/リードカウントを行い、ここから遺伝子ごとの発現量を算出した。実験群間で発現変動が確認された遺伝子について、ゼブラフィッシュにおけるオルソログの ID (Ensembl gene ID) を取得し、GO エンリッチメント解析および KEGG パスウェイ解析に用いた。これら解析の結果と先行研究の知見に基づき、60 のヌタウナギ遺伝子を「注目すべき遺伝子 (genes of interest; GOIs)」として選定し、発現量と変動パターンを整理・可視化した。得られたデータから、各器官における物質輸送経路を推定した。

(4) バソトシン受容体の機能解析、発現部位の同定ならびにシンテニー解析

脳下垂体後葉から分泌されるバソトシン (VT) は、脊椎動物の代表的な体液調節ホルモンと

して知られ、複数の受容体を介して機能する。以前の課題（課題番号 17H06876）では、ヌタウナギで 2 種類の VT 受容体を同定した。本研究では、これら受容体の機能を検証すべく、哺乳類培養細胞系での *in vitro* 実験を実施した。また、全身の 14 組織における mRNA 量を qPCR で調べた。特に高い発現が確認された器官（脳と心臓）については、ISH で組織内局在を検証した。並行して、同じ円口類のカワヤツメの VT 受容体も調べた。これら円口類の VT 受容体と顎口類 VT 受容体との相同関係を検証すべく、分子系統解析とシンテニー解析を実施した。

4. 研究成果

(1) ヌタウナギの体液調節戦略の分子基盤：「順応型」と「調節型」の違い

イオン輸送について：「調節型」生物の鰓や腎臓における NaCl 輸送を担う分子群として、SLC12 ファミリー（特に NKCC1、NKCC2 および NCC）、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）、Na⁺/K⁺-ATPase（NKA）が挙げられる。「順応型」のヌタウナギのゲノム中にも、CFTR を除き、こうした NaCl 輸送分子群の一式が見いだされる。しかし、今回 RNA-Seq データを詳細に解析した結果、上記のうち特に重要な NKCC1、NKCC2 および NCC の発現量が、検証したヌタウナギの器官（鰓、腎臓および筋肉）のいずれにおいても極端に低いことが示された。つまり、ヌタウナギを「順応型」たらしめるのは機能分子のレパートリーではなく、それらの発現調節様式だと考えられる。このほか、酸塩基調節や二価イオンの輸送に関わる分子群についても解析した。詳細については成果論文^{*2}を参照されたい。

アミノ酸調節について：ヌタウナギが細胞内浸透圧調節のために遊離アミノ酸（free amino acids；FAAs）を用いることは 1970 年代から知られているが、その分子メカニズムは謎であった。本研究ではまず、これまで測定例がない一部の極性アミノ酸も含め、ヌタウナギの筋肉中の FAA 組成とその変動を網羅的に調べた。筋肉中の無機イオン類の濃度は外環境塩分濃にほぼ比例する。これに対し遊離アミノ酸の総量は、コントロール群（100%海水群）と比べ、低濃度海水（65% 海水）中では 40%に減少し、高濃度海水（150% 海水）中では 234%まで上昇した。RNA-Seq の結果から、こうした調節には主に SLC1A4、SLC6A6 および SLC7A8 といったアミノ酸輸送体が関わることを示唆された。GO 解析では、検証したすべての器官（鰓、腎臓および筋肉）において、アミノ酸輸送関連の GO term のエンリッチメントが検出された。実際に鰓と腎臓では、上記の分子群に加え、SLC6A18 や SLC7A9 といったアミノ酸輸送体の発現も確認された。特に、SLC6 ファミリー分子は高濃度海水群の鰓と腎臓で発現が上昇することから、それぞれ環境水または原尿中からのアミノ酸の取り込みに関与することが示唆される。こうした結果を総合すると、ヌタウナギは FAA を用いて単一細胞レベルで浸透圧調節を行う高度なしくみを備えており、鰓と腎臓でのアミノ酸取り込み機構がそれを補助するものと考えられる。

以上の成果は、「ヌタウナギの体液調節戦略は祖先的な形質である」という従来の見方に一石を投じる。基本的な体液調節関連分子のレパートリーが「順応型」のヌタウナギにも存在するという事実は、ヌタウナギが二次的に体液調節能力を失ったことを示唆する。同じ円口類のヤツメウナギが「調節型」であることも、この仮説を支持する。これまでヌタウナギの生理学研究はきわめて遅れており、分子レベルでの研究はほとんど行われていなかった。今回、前例のない大規模かつ網羅的な解析により、本種の生理学研究を大きく押し進めることができた。本研究で用いた RNA-Seq データは DDBJ に登録して公開した。今後、国内外でのヌタウナギ研究ならびに他の生物との比較進化的研究に貢献することが期待される。

以上の成果は国際学術論文^{*2}として発表したほか、国内学会でも発表した。また、2024 年 9 月に Baltimore（米国）で開催される国際学会での口頭発表を予定している。

^{*2}Yamaguchi et al., in press (doi.org/10.1152/ajpregu.00166.2023)

(2) ヌタウナギ VT の機能

脊椎動物の既知 VT 受容体は、V1 型受容体（V1Rs；V1aR と V1bR の 2 種類）と V2 型受容体（V2Rs；V2aR-V2dR の 4 種類）に大別される^{*2}。いずれも G タンパク質共型受容体で、V2aR は cAMP を、それ以外の受容体は Ca²⁺を情報伝達に用いる。本研究では、ヌタウナギは V1 型と V2 型受容体を 1 種類ずつ（それぞれ ebVTR1 と ebVTR2）、カワヤツメは V1 型受容体 3 種類（lcV1R1-R3）と V2 型受容体を 2 種類（lcV2R1 と lcV2R2）もつことを明らかにした。*in vitro* 機能解析実験の結果、ebVTR1、lcV1R1 ならびに lcV2R1 が Ca²⁺シグナリングタイプであることがわかった（その他の受容体については応答が見られなかった）。

上記円口類の VT 受容体は、それぞれ異なる組織分布パターンを示した。ヌタウナギの場合、ebVTR1 は脳や鰓を含む複数の器官で発現しており、これは総合的に見ると既知 V1aR と類似する。一方で、ebVTR2 は心臓^{*2}に限局し、ISH シグナル陽性細胞は心室および心房組織内に散在した。このような発現パターンは他に例がなく、ヌタウナギの VT が心機能の制御に重要であることを示唆する。ebVTR1 に関しては、特に高い発現が確認された脳について ISH を実施し、手綱核、視索前核、線条体、第三脳室壁および腺性下垂体（下垂体前葉）^{*3}に陽性シグナルが見られた。ヌタウナギの腺状下垂体は視床下部や神経性下垂体（下垂体後葉）と直接連絡していない

いため、他の顎口類のように視床下部-下垂体間で内分泌系の階層構造があるのか注目されてきた。先行研究では、ヌタウナギの視床下部ホルモンは拡散によって腺性下垂体に作用するという仮説が提唱されてきたが、上記 ebVTR1 の発現パターンはこれを支持する。

本研究では、円口類 VT 受容体と顎口類 VT 受容体との間で網羅的なシステニー解析を実施した。上述の通り、既知 VT 受容体は 6 種類あるが、いずれについても円口類 VT 受容体との明確なオルソロジーは確認できなかった。VT 受容体は共通の祖先分子から遺伝子重複により多様化したことがわかっているが、その道筋は未だ不明である。これについて、今回のシステニー解析の結果から、VT 受容体の進化に関して新たな仮説を提唱した。最新のヌタウナギゲノム研究では、円口類は 3 回の全ゲノム重複を経験したことが示唆された（「1. 研究開始当初の背景」の*1 を参照）。このうち最初の 1 回は現生脊椎動物の共通祖先で、2 回は円口類特異的に生じたとされる。このことは、「脊椎動物の VT 受容体の進化過程は従来考えられていたよりも複雑である」という本研究の結果を支持する。

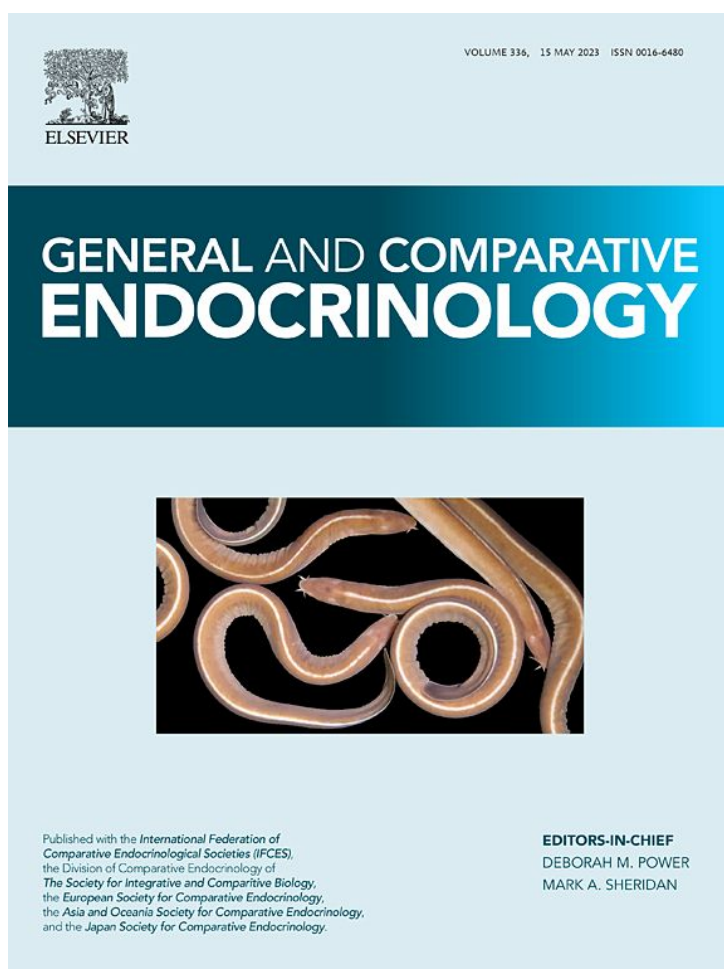
以上の成果をまとめた国際学術論文*4 は高く評価され、掲載巻の表紙に採用された（*General and Comparative Endocrinology*, Volume 336, 15 May 2023 ; 下図参照）。また、国際学会で 1 件、国内学会で 3 件の発表を行った。

*3VT 受容体サブタイプの名称（特に V2 型受容体）については統一見解が無いが、ここでは Hara et al., 2018 (doi.org/10.1038/s41559-018-0673-5) に従う。

*4ヌタウナギは一般的な心臓（全身性の心臓；systemic heart）の他に、accessory hearts と呼ばれる複数の補助ポンプ器官をもつ。ここで言及しているのは前者である。

*5ヌタウナギの脳部位と他の脊椎動物のそれとの相同性については、未だ議論が続いている。ここでは Wicht and Nieuwenhuys, 1998 (ISBN : 978-3-642-62127-7) の名称に従う。

*6Yamaguchi et al., 2023 (doi.org/10.1016/j.ygcen.2023.114257)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaguchi Yoko, Takagi Wataru, Kaiya Hiroyuki, Konno Norifumi, Yoshida Masa-aki, Kuraku Shigehiro, Hyodo Susumu	4. 巻 336
2. 論文標題 Phylogenetic and functional properties of hagfish neurohypophysial hormone receptors distinct from their jawed vertebrate counterparts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 114257 ~ 114257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2023.114257	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 Yamaguchi Yoko, Ikeba Kiriko, Yoshida Masa-aki, Takagi Wataru	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular basis of the unique osmoregulatory strategy in the inshore hagfish, <i>Eptatretus burgeri</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00166.2023	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yamaguchi Y, Takagi W, Kaiya H, Yoshida M
2. 発表標題 Identification and characterization of neurohypophysial hormone receptors in the hagfish, <i>Eptatretus burgeri</i>
3. 学会等名 6th Biennial North American Society for Comparative Endocrinology, Virtual Meeting on Zoom (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 陽子、池羽 希理子、高木 互
2. 発表標題 円口類スタウナギの鰾と腎臓の機能
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加嶋 広武、山口 陽子
2. 発表標題 ヌタウナギ(<i>Eptatretus burgeri</i>)の嗅覚受容体レパートリー
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 陽子、高木 互、海谷 啓之、今野 紀文、吉田 真明、工樂 樹洋
2. 発表標題 ヌタウナギの下垂体後葉ホルモン受容体の同定と解析
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 陽子
2. 発表標題 円口類ヌタウナギの下垂体後葉ホルモン受容体
3. 学会等名 第34回日本下垂体研究会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 陽子、高木 互、海谷 啓之、今野 紀文、吉田 真明、工樂 樹洋、兵藤 晋
2. 発表標題 円口類から俯瞰する後葉ホルモン受容体の進化
3. 学会等名 第33回バソプレシン・オキシトシン研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yamaguchi Y, Ikeba K, Yoshida M, Takagi W
2. 発表標題 Osmoregulatory mechanisms in the inshore hagfish, <i>Eptatretus burgeri</i> : Is it "ancestral"?
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Fish Endocrinology (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yoko Yamaguchi, Tatsuya Sakamoto	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 1174
3. 書名 Handbook of Hormones 2nd Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>島根大学 Research News 2023.04.14 (プレスリリース資料掲載) https://www.shimane-u.ac.jp/docs/2023041400057/</p>

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
---------	---------