

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06717

研究課題名(和文) 淡水魚がなぜ海で生きられるのか？浸透圧ストレス転写因子から探る広塩性獲得の仕組み

研究課題名(英文) A study on mechanism of euryhaline acquisition by osmotic stress transcription factor 1

研究代表者

今野 紀文 (Konno, Norifumi)

富山大学・学術研究部理学系・講師

研究者番号：50507051

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)：本研究では、メダカへの高浸透圧処理により発現が誘導されるOsmotic stress transcription factor 1(Ostf1)という転写因子の機能について調べた。メダカへの高浸透圧処理は多くの体組織でOstf1の発現を著しく増加させ、細胞に普遍的な反応を示した。またOstf1過剰発現メダカ細胞においてアクチン重合に関与するCDC42EP3発現が増加し、Ostf1-KOメダカにおいてCDC42EP3の発現は高浸透圧処理で増加しなかった。本研究から、Ostf1はCDC42EP3の上方調節を介して細胞骨格系を強化し、高浸透圧ストレスからの細胞保護に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、魚類の広塩性と狭塩性の違いに、Osmotic stress transcription factor 1(Ostf1)という転写因子の機能の差異が関係しているという仮説の検証を目的として実施した。その結果、広塩性魚のメダカの海水適応において、Ostf1がCDC42EP3の上方制御を介して細胞骨格系の強化に作用している可能性が示唆された。狭塩性魚のゼブラフィッシュにおける先行研究では、Ostf1が浸透圧変化に反応しないことが報告されていることから、Ostf1の発現制御領域の違いが広塩性と狭塩性の差異と関連している可能性が考えられる。今後はOstf1の発現制御機構について調査する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the function of a transcription factor called osmotic stress transcription factor 1 (Ostf1), whose expression is induced by hyperosmotic stress treatment of Japanese medaka. Hyperosmotic treatment of medaka significantly increased the expression of Ostf1 mRNA in most body tissues, suggesting a universal hyperosmotic response in the cells. In Ostf1-overexpressing medaka culture cells, CDC42EP3, which is involved in actin polymerization, was increased. On the other hand, in Ostf1-KO medaka, CDC42EP3 mRNA expression was not increased by hyperosmotic treatment. Our study suggests that Ostf1 strengthens the cytoskeletal system through upregulation of CDC42EP3 expression and may be involved in cytoprotection from hyperosmotic stress.

研究分野：動物生理学

キーワード：広塩性 浸透圧調節 浸透圧ストレス 転写因子 鰓 細胞骨格 メダカ

## 1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物は、陸に生きていようが海に生きていようが、体液の浸透圧をほぼ一定の範囲(約 300 mOsm: 海水の約 1/3 ~ 1/4)に保ち、体液の恒常性を維持している。特に、水の中に生きる魚類は、陸上動物の比ではないほどに直接、浸透圧ストレスを受けている。例えば、体液浸透圧よりも低張の淡水(0 ~ 1 mOsm)下では、体内外の浸透圧差によって水が体内に流入するとともに塩類が体外に流出し、逆に、体液浸透圧の3倍を超える海水(1000 mOsm)下では、脱水と過剰な塩分の流入にさらされる。実際に、コイやキンギョなどの淡水魚を海水に入れると、体液浸透圧が生理的な許容範囲を超えて上昇し、1時間も経たないうちに死に至り、アジやカツオなどの海水魚では体液浸透圧が低下し、淡水では生存できない。このように、淡水あるいは海水でのみ生きる魚は狭塩性魚と呼ばれている。

一方、サケやウナギのような「通し回遊魚」と呼ばれる魚は、その生活史の中で海と川を往来し、広範囲の塩分環境に適応できる。また淡水と海水が入り混じる河口域(汽水)に生息する魚(マハゼやボラ、ティラピアなど)の多くも両方の環境に適応できる。このように淡水と海水の両方の環境に適応できる魚を広塩性魚といい、これまで、多くの研究者により、「広塩性魚と狭塩性魚の違いを生む要因は何か?」「広塩性魚は、どのようにして体液の3倍以上にもなる塩分環境(海水)に順応しているのか?」という問いに対する研究が盛んに行われてきた。その結果、広塩性魚を淡水から海水へと移すと、鰓に存在する塩類細胞の中から海水型塩類細胞が分化して過剰な塩類の排出を行うことで体液の高浸透圧化を抑制していること、淡水産狭塩性魚(ゼブラフィッシュなど)には海水型塩類細胞が存在しない(分化しない)ことが明らかにされてきた。つまり、魚類の淡水から海水への順応には、少なくとも鰓に海水型塩類細胞が出現するか否かが、鍵であると言える。しかしながら、海水への接触によって、「どのようなシグナル分子が活性化して、海水型塩類細胞の分化や機能の変化を誘導するのか?」という問いに対する回答は未だ得られていない。

近年、淡水から海水へと移行させたティラピアの鰓で発現が増加する Osmotic stress transcription factor 1 (Ostf1) という転写因子が同定されたことに端を発し、申請者はティラピアと同じ淡水産広塩性魚であるメダカを実験動物に用いて、“Ostf1 が淡水から海水への浸透圧変化に対するトリガーとして働き、海水型塩類細胞の分化や機能を変化させる重要なシグナル分子である”と仮定して研究を進めている。これまでに、等張水(300 mOsm)から海水(1000 mOsm)へと移したメダカの鰓で急速かつ一過的に発現が増加する2種の Ostf1 遺伝子(Ostf1a と Ostf1b)を発見し、Ostf1b mRNA が海水移行2時間後の塩類細胞に局在すること、両 Ostf1 の発現が海水適応ホルモンのコルチゾールにより上方制御されることを明らかにしてきた。また、狭塩性魚のゼブラフィッシュには Ostf1 の相同遺伝子が存在するものの1/2海水処理でも、その発現が変化しないことがわかった。したがって、メダカ(広塩性魚)とゼブラフィッシュ(狭塩性魚)の鰓における Ostf1 遺伝子の発現の差異が、両種の高浸透圧に対する応答の違いに反映しているのではないだろうか?と仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、(1)メダカ Ostf1 遺伝子の発現を上方制御する因子を探るとともに、(2) Ostf1 遺伝子を過剰発現(Gain of function)および機能欠損(Loss of function)させたメダカを作出し、その表現型解析を通して、Ostf1 の機能について探ることを目的とした。この結果に基づいて、魚類の広塩性と狭塩性の違いに、Ostf1 がどのように関わるかについて考察する。

## 3. 研究の方法

### (1) メダカ Ostf1 遺伝子の発現を上方制御する因子の探索

メダカやティラピア、ウナギなどの広塩性魚の Ostf1 遺伝子は、外部環境の高浸透圧化によって著しく発現が誘導されるが、狭塩性魚であるゼブラフィッシュの Ostf1 は高浸透圧に反応しない。この発現様式の違いを生むのは、遺伝子発現のスイッチ、すなわち、転写調節領域(エンハンサーやサイレンサー、プロモーター)の差異である可能性が高い。そこで、まずメダカの Ostf1 遺伝子の5'上流領域をPCR増幅して単離し、レポーター遺伝子(ルシフェラーゼ or GFP)を搭載したベクターに挿入してレポーターベクターを作製する。これまでにメダカ胚から単離・株化された培養細胞(OLHdrR-e3細胞)に高浸透圧処理を施すと、鰓での結果と同様に、Ostf1 の発現が著しく誘導されることを見だしている。そこで、この細胞の特徴を利用して、作製したレポーターベクターを OLHdrR-e3 細胞に導入し、細胞に高浸透圧処理を施した際のレポーター遺伝子の発現あるいは活性を指標とすることで、高浸透圧刺激により Ostf1 発現を誘導する転写調節領域の特定を行う。

### (2) Ostf1 遺伝子を過剰発現(Gain of function)および機能欠損(Loss of function)させたメダカの作出

淡水飼育下のメダカの鰓には Ostf1 の発現は見られず、高浸透圧処理により海水型塩類細胞

で発現するという事実は、Ostf1 が海水型塩類細胞で何らかの機能を担っていることに疑う余地は無い。そこで、現在、ゲノム編集技術のTALEN法を用いて、Ostf1a および Ostf1b 遺伝子の第1エキソンにフレームシフト変異を導入したノックアウト(KO)メダカの作出を行っている。すでに、Ostf1a 遺伝子の第1エキソン内の13塩基が欠失して stop コドンが出現する KO 個体を得ており、Ostf1b-KO メダカの作製も進める。また、メダカ Elongation factor 1 遺伝子のプロモーターの下流にメダカ Ostf1b 遺伝子を連結させたトランスジェニックメダカ(Ostf1b 過剰発現メダカ)の作製も同時に進める。

### (3) Ostf1 過剰発現細胞および Ostf1-KO メダカを用いた Ostf1 の機能解析

個体での Ostf1 の機能解析に加えて、線維芽細胞由来のメダカ培養細胞に Ostf1b を過剰発現させたメダカ培養細胞の作出を行った。CMV プロモーターの下流に Ostf1b mRNA 配列をつなげた発現ベクターを作製し、メダカ培養細胞に導入し、薬剤選択により Ostf1b を安定発現させた培養細胞株を樹立した。正常細胞、高浸透圧処理を施した正常細胞、Ostf1b 過剰発現細胞で RNA-seq 解析を行い、Ostf1b の発現によって発現が増加する遺伝子を探索した。また、RNA-seq 解析から見つかった候補遺伝子の発現動態を、Ostf1b-KO メダカにおいて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) メダカ Ostf1 遺伝子の発現を上方制御する因子の探索

メダカの Ostf1 遺伝子の 5' 上流領域を PCR 増幅して単離し、EGFP 遺伝子を搭載した発現ベクターに挿入してレポーターベクターを作製した。トランスフェクション試薬を用いて、メダカ培養細胞に遺伝子導入を行ったが、細胞への導入効率が低く、薬剤選択による安定発現細胞株の樹立はできなかった。そこで、まず、高浸透圧処理により Ostf1 の発現を増加させるシグナル経路について、想定されるシグナル経路の阻害剤を用いて探索することを試みた。細胞内カルシウムキレーターである BAPTA-AM を用いて培養細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  をキレートした後に、高浸透圧処理を施した結果、対照群である高浸透圧処理群では Ostf1 の発現が顕著に増加したが、BAPTA-AM + 高浸透圧処理群では Ostf1 の発現は誘導されなかった。したがって、Ostf1 の発現は高浸透圧刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  上昇が Ostf1 発現のシグナル経路に存在することが示唆された。現在、SGK1 や p38MAPK の阻害剤を用いて、Ostf1 の発現制御に関わるシグナル調節機構について引き続き調査を進めている。

### (2) Ostf1 遺伝子を過剰発現 (Gain of function) および機能欠損 (Loss of function) させたメダカの作出

Ostf1 の機能を探るため、TALEN法を用いて Ostf1-KO メダカの作出を行った。その結果、Ostf1a 遺伝子の第1エキソンに13塩基の欠失を伴い直後に stop コドンが出現する Ostf1a-KO メダカと Ostf1b 遺伝子の第1エキソンに14塩基の欠失を伴い直後に stop コドンが出現する Ostf1b-KO メダカの作出に成功した。各 KO メダカの遺伝子型は制限酵素断片長多型解析により判別した。各変異個体 (F0) を野生型メダカと交配して F1 ヘテロ個体を得た後、F1 ヘテロ同士との交配により、F2 ホモ個体を得て、各 KO 個体の系統化に成功した。

一方、Ostf1b の過剰発現メダカの作出では、遺伝子導入個体からトランスジーンを検出することができなかった。これまでの研究において、両 Ostf1 遺伝子は高浸透圧処理によりメダカのほぼ全ての体組織で発現が増加することが解っており、Ostf1 は当初考えていた鰓に特異的な機能を果たしているのではなく、細胞に普遍的な機能を担っていることが考えられた。そこで、メダカ培養細胞において、Ostf1 の高浸透圧応答性を調べたところ、個体と同様に培養細胞においても高浸透圧処理により Ostf1 の発現増加が確認された。そこで、個体よりもシンプルな研究モデルと成り得る培養細胞において Ostf1 過剰発現モデルを作製することにした。実験の結果、通常培養下で正常細胞に比べて4倍程度 Ostf1b が高発現している Ostf1b 過剰発現細胞株の作製に成功した。

### (3) Ostf1 過剰発現細胞および Ostf1-KO メダカを用いた Ostf1 の機能解析

まず、通常培地下の正常細胞、Ostf1b 過剰発現細胞、高浸透圧処理を施した正常細胞の mRNA 発現動態を調べるため、RNA-seq 解析を行った。その結果、Ostf1b 過剰発現細胞と高浸透圧処理を施した正常細胞において、細胞骨格系の制御に関与することが知られている CDC42EP3 の発現が有意に増加していた。Ostf1b が CDC42EP3 の発現調節に関与している可能性を検証するため、淡水飼育した野生型メダカ、高浸透圧処理を施した野生型メダカ、高浸透圧処理を施した Ostf1b-KO メダカにおける鰓の CDC42EP3 mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により解析したところ、CDC42EP3 mRNA 発現量は高浸透圧処理により増加したが、Ostf1b-KO により高浸透圧応答性の CDC42EP3 発現は著しく抑制された。これらの結果から、Ostf1b は CDC42EP3 の転写因子として働くことが示唆された。また、Ostf1b-KO メダカは、24時間の2/3海水処理により全て斃死した。先行研究において、CDC42EP3 は細胞内のアクチン重合の促進に作用することが報告されており、メダカへの高浸透圧処理により鰓組織の重合アクチン量も有意に増加した。これらの知見から、Ostf1b が CDC42EP3 を介して細胞骨格系を制御し、高浸透圧ストレスに対する Osmoprotection に関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Watanabe K, Konno N, Nakamachi T, Matsuda K.	4. 巻 145
2. 論文標題 Intracerebroventricular administration of $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) enhances thigmotaxis and induces anxiety-like behavior in the goldfish <i>Carassius auratus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2021.170623.	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
1. 著者名 Tobari Y, Theofanopoulou C, Mori C, Sato Y, Marutani M, Fujioka S, Konno N, Suzuki K, Furutani A, Hakataya S, Yao CT, Yang EY, Tsai CR, Tang PC, Chen CF, Boeckx C, Jarvis ED, Okanoya K.	4. 巻 21(2)
2. 論文標題 Oxytocin variation and brain region-specific gene expression in a domesticated avian species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene, Brain, and Behavior	6. 最初と最後の頁 e12780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gbb.12780.	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
1. 著者名 Matsuda K, Yoshida D, Sachuriga, Watanabe K, Yokobori E, Konno N, Nakamachi T.	4. 巻 130
2. 論文標題 Effect of intracerebroventricular administration of two molecular forms of sulfated CCK octapeptide on anxiety-like behavior in the zebrafish <i>danio rerio</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2020.170330.	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 Konno N, Takano M, Miura K, Miyazato M, Nakamachi T, Matsuda K, Kaiya H.	4. 巻 299
2. 論文標題 Identification and signaling characterization of four urotensin II receptor subtypes in the western clawed frog, <i>Xenopus tropicalis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2020.113586.	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 Matsuda K, Watanabe K, Miyagawa Y, Maruyama K, Konno N, Nakamachi T.	4. 巻 156
2. 論文標題 Distribution of neuromedin U (NMU)-like immunoreactivity in the goldfish brain, and effect of intracerebroventricular administration of NMU on emotional behavior in goldfish.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2022.170846.	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 Konno N	4. 巻 65
2. 論文標題 Simultaneous activation of genes encoding urea cycle enzymes and gluconeogenic enzymes coincides with a corticosterone surge period before metamorphosis in <i>Xenopus laevis</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 6-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12833.	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 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今野紀文
2. 発表標題 水生から陸生への適応を可能にした体液調節システムー肺魚研究から紐解くー
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今野紀文
2. 発表標題 実験動物としての肺魚の魅力～脊椎動物の上陸作戦を紐解くKey fish～
3. 学会等名 2021年度日本動物学会関東支部公開講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 森生、今野紀文、砂田紗也加、海谷啓之
2. 発表標題 メダカにおけるモチリン受容体発現細胞の同定
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
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 メダカへ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Anoctamin 1 の発現と 局在
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富樫彩音、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 単離したメダカ鰓の組織培養における高浸透圧および CaCl <sub>2</sub> 処理による Anoctamin 1 の発現変化
3. 学会等名 2021年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富樫彩音、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカの鰓におけるイオン輸送体 とその調節因子の高浸透圧処理 による遺伝子発現プロファイル 個体と単離した鰓組織での比較
3. 学会等名 日本動物学会 第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富樫彩音、中町智哉、松田恒平、今野紀文
2. 発表標題 メダカの鰓に発現するカルシウム活性化クロライドチャンネル ANO1 の高浸透圧ストレスに対する発現応答
3. 学会等名 2022年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2022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