

機関番号：13201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770069

研究課題名 (和文)

ツメガエル前腎をモデルとした腎機能の解析: 単離ネフロンを用いた分子マッピング

研究課題名 (英文)

Analysis of renal function with isolated pronephros of *Xenopus* frog.

研究代表者

今野 紀文 (KONNO NORIFUMI)

富山大学・大学院理工学研究部・助教

研究者番号：50507051

研究成果の概要 (和文)：

脊椎動物の腎臓機能を調べるため、両生類の前腎ネフロンを単離し、そこに発現する遺伝子の同定と局在について調べた。前腎ネフロンに発現するNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseのプロモーターとGFP遺伝子を連結させた発現ベクターを作成し受精卵に導入することで、GFP蛍光を指標にして前腎ネフロンを新鮮なまま単理することが可能となった。またメダカ多発性嚢胞腎症モデルpc mutantを用いて病態腎に関わる遺伝子をサブトラクション法により探索した。その結果、pc mutantで発現量が著しく減少する2遺伝子 (バソトシンV2受容体とAQP8) を同定した。現在、前腎ネフロンに発現する遺伝子を網羅的に探索するとともに、病態腎に関わる遺伝子の機能解析を行っている。

研究成果の概要 (英文)：

To understand integrative renal functions in vertebrates, we explored and characterized genes expressing in pronephros of amphibian tadpole and mesonephros of teleost. We constructed the GFP expression vector linked 5'-upstream promoter of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, marker protein of renal tubule, and succeeded in isolating a living pronephric tubule by using transgenic technique. Furthermore, we explored genes associated with polycystic kidney disease (PKD) by a PCR-based subtractive hybridization method using pc mutant, a PKD model of medaka. As a result, we identified 2 genes (vasotocin type-2 receptor and aquaporin-8) reduced markedly in the kidney of pc mutant. Currently, we explore genes expressing in pronephros by global analysis and then characterize 2 genes found as candidate gene associated with teleost PKD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：比較内分泌学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：ツメガエル、発生、腎臓、体液調節、比較生理学

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓は、主として老廃物の排泄と体内の水や電解質の恒常性維持という2つの機能を担う生存に不可欠な臓器である。しかし、腎機能が一旦失われると水分と種々の毒性物質が蓄積し尿毒症や高カリウム血症、尿崩症という深刻な病気を引き起こす。一旦、悪化した腎臓機能を改善させる治療法は未だ存在しない。腎臓研究を難しくしている要因として、腎臓は多くの機能と20種類以上の細胞からなる複雑な構造を持つことが挙げられる。種々の機能はそのままに構造を単純化できたなら、より腎臓機能の普遍的メカニズムに迫ることができるのではないだろうか。また、顕微鏡下で腎臓がどのように形成され多様な機能を獲得するのかというプロセスが解かれれば、不全臓器の改善・再生する手立てが考えられないだろうか。

## 2. 研究の目的

本研究では、腎臓構造が単純で、かつ機能的である両生類の前腎に着目し、「単離した前腎ネフロン」を用いて、輸送体やホルモン受容体の分子解剖を行い、そこで働く分子群を直接同定・マッピングすることで、水や電解質を動かす原動力の全体像やホルモンによる腎臓機能の調節を明らかにする。また、病態腎における腎臓機能の変化を調べる為、メダカ病態腎モデルを用いた分子生物学的解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 前腎ネフロンの単離

前腎ネフロンは、幼生の体腔に1対存在し、実体顕微鏡下で容易に認識できる。当初、固定した幼生個体から前腎ネフロンを単離することを考えていたが、前腎からの遺伝子の単離にはより新鮮な状態の組織が求められるため、個体が生存した状態で前腎を単離する方法を新たに考案した。前腎に特異的に発現する遺伝子 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase) の5'プロモーター配列とGFP遺伝子を連結させたGFP発現コンストラクトを作成し、受精卵に導入することで前腎ネフロンを可視化させたトランスジェニックガエルを作製した。

### (2) 分子群の網羅的クローニング

採取した組織サンプルからmRNAを抽出し、各ネフロン分節に発現する様々なmRNA情報を含んだcDNAライブラリーを作成する。cDNAライブラリーから網羅的にクローニングすることで、輸送体、ホルモン受容体、転写因子など、目的組織に発現する多種類の分子群

を同定することが可能となる。また、病態腎における腎臓機能の解析では、正常胚の前腎と異常胚の前腎で発現する遺伝子の単離も同時に進める。顕微鏡観察下でも前腎形態の異常や腎疾患の指標である浮腫などが観察されており、病態前腎においてどのような遺伝子が働いているのかを調べる。具体的には、正常前腎と異常前腎で発現するmRNAの量差を差し引きして濃縮シクローニングを行う手法(サブトラクション法)を用いて、2群間で多量に発現している、あるいは減少している遺伝子を突きとめる。

## 4. 研究成果

(1) 前腎ネフロンを新鮮な状態のまま単離するため、前腎に特異的に発現する遺伝子 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase) の5'プロモーター配列とGFP遺伝子を連結させたGFP発現コンストラクトを作成し、受精卵に遺伝子導入することでトランスジェニックガエルを作成した。その結果、幼生期の前腎ネフロンにGFP蛍光が検出され、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseの免疫染色により、GFP蛍光が当該蛋白質由来であることが示された(図1)。GFP蛍光を目印にして微細解剖を行うことで容易に前腎ネフロンを単離することに成功した。

現在、単離した前腎ネフロン由来のcDNAライブラリーを作成し、そこに発現する遺伝子の網羅的解析に取り組んでいる。

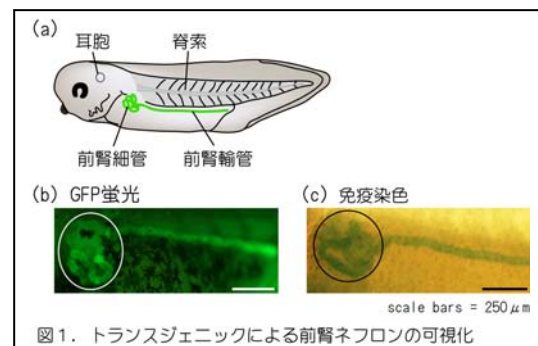


図1. トランスジェニックによる前腎ネフロンの可視化

(2) メダカ病態腎モデルを用いて病態腎発症メカニズムについて解析した。ヒトの多発性嚢胞腎症のメダカモデルと考えられるpc mutantと正常メダカの腎臓との間で発現量に差のある遺伝子をサブトラクション法により解析し、pc mutantで発現量が著しく減少する2遺伝子(バソトシンV2受容体とAQP8)を同定した。メダカV2受容体の腎臓での局在を免疫組織化学により調べたところ、遠位尿細管後部分節の基底側細胞膜に局在しており、嚢胞腎発症メダカではその発現が低かった。また、AQP8をノックアウトしたマウスでは、精巢の肥大が生じることが報告されていることがか

ら、pc mutantでのAQP8の消失が嚢胞を伴った腎臓の肥大と関連していることが考えられる。現在、両遺伝子と嚢胞腎発症との関連性について精査している。

#### 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4件)

① **Konno, N.**, Kurosawa, M., Kaiya, H., Miyazato, M., Matsuda, K., Uchiyama, M. Molecular cloning and characterization of V2-type receptor in two ray-finned fish, gray bichir, *Polypterus senegalus* and medaka, *Oryzias latipes*. Peptides, 31:1273-1279, 2010.

② Maejima, S., **Konno, N.**, Matsuda, K., Uchiyama, M. Central angiotensin II stimulates cutaneous water intake behavior via angiotensin II type-1 receptor pathway in the Japanese tree frog, *Hyla japonica*. Hormones and Behavior, 58: 457-464. 2010.

③ Uchiyama, M., Kumano, T., **Konno, N.**, Yoshizawa, H., Matsuda, K. Ontogeny of ENaC expression in the gills and the kidneys of the Japanese black salamander (*Hynobius nigrescens* Stejneger). Journal of Experimental Zoology B Mol Dev Evol, 316: 135-145, 2011

④ Maruyama, K., Kaiya, H., Miyazato, M., **Konno, N.**, Wakasugi, T., Uchiyama, M., Shioda, S., Murakami, N., Matsuda, K. Isolation and characterization of two cDNAs encoding the neuromedin U receptor from goldfish brain. Journal of Neuroendocrinology, 23: 282-291, 2011.

[学会発表] (計12件)

#### ① **OKonno N**

Vasotocin/V2-type receptor/aquaporin axis exists in African lungfish kidney, but is functional only in terrestrial condition. The Joint Mini-Symposium between the University of Toyama and the University of Rouen-Recent Updates on Neuropeptide Research- 2010年4月1日(木), 富山大学

#### ② **○今野紀文**, 他5名

硬骨魚類における V2 型バソトシン受容体の探

索とその機能について

第81回日本動物学会 2010年9月23日(木) ~25日(土) 東京大学教養部

#### ③ **○前嶋 翔**, **今野紀文**, 他2名

アマガエルにおいて、脱水処理、AngII及びAVTは脳内c-fos発現を活性化する  
第81回日本動物学会 2010年9月23日(木) ~25日(土) 東京大学教養部

#### ④ **○小宮山牧子**, **今野紀文**, 他4名

岩礁性両棲魚ヨダレカケの窒素代謝と尿素ならびにアンモニア輸送体  
第81回日本動物学会 2010年9月23日(木) ~25日(土) 東京大学教養部

#### ⑤ **○松田恒平**, **今野紀文**, 他7名

トラフグのNPYオーソログ遺伝子の特徴付け並びに節食制御への関与  
第81回日本動物学会 2010年9月23日(木) ~25日(土) 東京大学教養部

#### ⑥ **○今野紀文**

バソトシン V2 型受容体の機能からみる脊椎動物の環境適応  
日本比較内分泌学会 2010年11月18日(木) ~20日(土) 静岡グランシップ

#### ⑦ **○横堀絵理**, **今野紀文**, 他3名

ゼブラフィッシュの摂食行動に及ぼす神経ペプチドYとオレキシンの影響  
日本比較内分泌学会 2010年11月18日(木) ~20日(土) 静岡グランシップ

#### ⑧ **今坂宏章**, **今野紀文**, 他9名

オクタデカニューロペプチド(ODN)はキンギョ下垂体のソマトラクチン分泌を刺激する  
日本比較内分泌学会 2010年11月18日(木) ~20日(土) 静岡グランシップ

#### ⑨ **○露谷孔明**, **今野紀文**, 他3名

心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)が無尾両生類の体液調節に与える影響  
日本比較内分泌学会 2010年11月18日(木) ~20日(土) 静岡グランシップ

#### ⑩ **○藤井優哉**, **今野紀文**, 他2名

ツメガエル幼生における尾部神経分泌系(CNSS)の探索  
日本比較内分泌学会 2010年11月18日(木) ~20日(土) 静岡グランシップ

#### ⑪ **○前嶋翔**, **今野紀文**, 他2名

ニホンアマガエルの脳内 c-fos 発現に及ぼす体  
液変動ならびに Ang II 及び AVT 投与の影響  
日本比較内分泌学会 2010 年 11 月 18 日(木)  
～20 日(土) 静岡グランシップ

⑫ ○東森生、今野紀文、他 3 名  
PACAP はキンギョ下垂体のソマトラクチン 2 分子  
種の遺伝子発現を制御する  
日本比較内分泌学会 2010 年 11 月 18 日(木)  
～20 日(土) 静岡グランシップ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今野 紀文 (KONNO NORIFUMI)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・  
助教

研究者番号 : 50507051