

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370029

研究課題名（和文） 海水魚は過剰な硫酸イオン・ホウ酸イオンをいかに排出し毒性から逃れているか

研究課題名（英文） Identification of transporters involved in excretion of toxic sulfate and borate by seawater fish

研究代表者

広瀬 茂久 (HIROSE SHIGEHISA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：10134199

研究成果の概要（和文）：海水中には硫酸イオンとホウ酸イオンが比較的多く含まれるので、これらのイオンの排泄系は海水魚にとって不可欠である。濃度が高くなると有毒なこれら陰イオンは腎臓から排泄されると推定されていたが、それを担う輸送体は不明だった。私たちは、海水適応したメフグの腎臓で誘導のかかるクローンを RT-PCR で網羅的に調べ、それらの発現部位を *In situ hybridization* によって細胞レベルで決定し、抗体染色で細胞膜の Apical に局在するかそれとも Basolateral 側かを明らかにし、最終的に活性を測定することにより、目的の輸送体を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Sulfate and borate are abundant anion in seawater (SW), and excretion of excess sulfate and borate from ingested SW is essential for marine fish to survive because they are toxic. Marine teleosts excrete sulfate and borate via the urine produced in the kidney. The transporters that secrete and concentrate sulfate and borate in the urine have not previously been identified. Here, we have identified and characterized candidates for the long-sought transporters by using euryhaline pufferfish mefugu.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			0
年度			0
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：動物生理化学

1. 研究開始当初の背景

私たちは、これまで水生生物の水環境適応機構の解明を目指して分子生理学的な研究を行ってきた。研究材料として私たちが注目したのは、(i) 淡水と海水の両方に適応できるウナギ、(ii) 中性と pH 3.5 という極

端な酸性に適応できる驚異の魚である恐山ウグイ、(iii) ゲノム配列が入手できかつ淡水と海水の両方に適応できる特殊なフグ (Mefugu)、及び (iv) モデル生物として重宝されているゼブラフィッシュである。淡水と海水 あるいは中性と酸性下で発現し

ている遺伝子群を丁寧に比較することにより、(1) 海水適応に重要な K^+ チャネルを同定した [JBC 274, 11376, 1999] のを皮切りに、(2) 酸性適応に不可欠な Na^+/H^+ exchanger (NHE3), Na^+/HCO_3^- cotransporter (NBC1) [AJP 284, R1199, 2003], (3) 水環境下でのアンモニアの排出を担うアンモニア輸送体 (Rh glycoprotein) [FASEB J 21, 1067, 2007, AJP 293, R1743, 2007, JBC 285, 2653, 2010], 及び (4) 幼生の発生初期段階で外界のイオン環境を直接モニターするコネキシン [PNAS 105, 4763, 2008] などの同定に成功し、それまで推測の域を出なかった調節機構に確固とした分子の基盤を与えてきた。これらのチャネルや輸送体を多量に含み、イオン輸送に特化した細胞 (Ionocytes) の発生分化を司る転写調節因子の同定にも成功した [Dev Biol 329, 116, 2009]。

硫酸輸送体とホウ酸輸送体の重要性: 海水には比較的多くの硫酸イオン (~20 mM) とホウ酸イオン (~0.4 mM; ゼブラフィッシュの半数致死量 LD_{50} の2倍に相当する濃度) が含まれており、これら毒性の高いイオンを効率よく排出する仕組みなしには海水中で生存することはできない。海水魚の腎臓中には特殊な硫酸輸送体とホウ酸輸送体が存在すると考えられているがその実体は不明である。そこで私たちは、海水と淡水の両方に適応できるメフグを用いて、海水に移したときに誘導のかかるクローンの中に上記輸送体の候補が含まれていると考え探索を続けた結果、硫酸輸送体の有力候補を同定することに成功し、本研究の基礎を築くことができた。

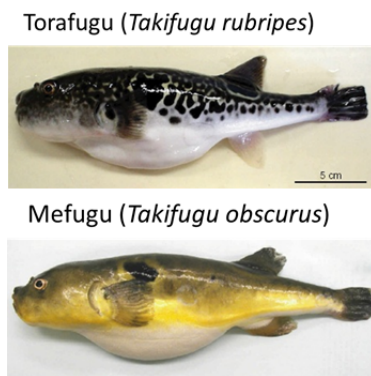


図1. フグ (上) とメフグ (下)

ホウ酸イオン輸送体: 同様のアプローチで、毒性がより高いホウ酸イオンの排泄に関わると推定されるクローン Slc4a11 及びその抗体も入手し、準備を整えていた。

2. 研究の目的

特殊機能を発達させた生物の研究によって

ブレイクスルーがもたらされることが多い。私たちは、淡水と海水の両方に適応できる特殊なフグ (メフグ) を実験生物として初めて記載した。このフグを用いて海水適応に欠くことのできない硫酸イオンとホウ酸イオンの排泄機構を明らかにする。海水には 過剰摂取すると毒性のある硫酸イオンとホウ酸イオンが多く含まれており、これらイオンの排泄機構の解明が待たれている。海水中で誘導のかかるクローンとして既に候補分子を得ているので、これらの発現部位や細胞内局在、さらには活性測定等により、目的の輸送体であることを証明する。

3. 研究の方法

研究材料としては、ゲノム情報が得られるフグの近縁種で淡水と海水の両方に適応できる広塩性のメフグを用いた。分子生物学的手法、抗体の作製、免疫組織化学、電気生理学的測定などはすべて通常の方法に従った。

4. 研究成果

(1) 硫酸イオン輸送体の同定、局在部位の決定、及び機能解析

メフグを淡水と海水に適応させ、両者の腎臓で発現に差のあるクローンの中から、Slc26a6A を有力候補として選び、抗体を作って局在部位を調べたところ、近位尿細管に多く発現していることが明らかになった (図2)。

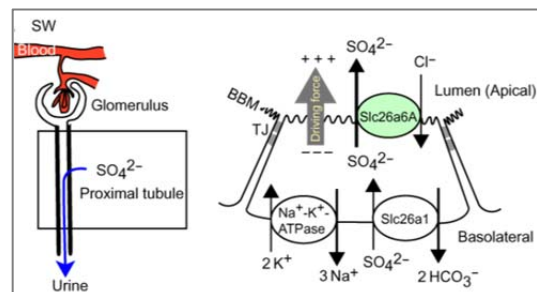


図2. 硫酸輸送体の局在部位と働き

電気生理学的な解析から、Slc26a6A が実際に硫酸イオンを輸送することも分かった [AJP 297, R1647, 2009]。このように私たちが同定した硫酸イオン輸送体は、これまでの研究によって想定されていた性質をすべて有することから、長い間探し求められていた過剰な硫酸イオンを排泄するための輸送体である可能性が極めて高く、Am. J. Physiol.の Editorial Focus 欄でも注目すべき研究として紹介された [AJP 297, R1645, 2009]。

(2) 硫酸イオン輸送体の海水による発現誘導機構の解明

メフグを淡水から海水に移すと硫酸輸送体

Slc26a6A の腎臓における発現が強く誘導される。この誘導が硫酸イオンによるものか否かを明らかにするために硫酸イオン濃度を変えた人工海水を用いて調べたところ、驚いたことに、硫酸イオン依存的ではないことが判明した。海水誘導に関係するこれまでの研究を精査すると、塩素イオンによる調節を受けている可能性が高くなった。

(3) ホウ酸イオン輸送体に対する抗体の作製と局在部位の決定

すでに私たちが同定しているホウ酸イオン輸送体の有力候補 Slc4a11 を遺伝子工学的に大腸菌で発現し、それを抗原として抗体を作製した。これらの抗体を用いて海水メフグの腎臓切片を染色したところ、ホウ酸イオン輸送体 Slc4a11 は腎の近位尿細管細胞の頭頂部 Apical に存在することが明らかになった (図 3)。この位置関係から Slc4a11 が長い間探し求められてきたホウ酸イオン排泄分子である可能性が極めて高くなった。

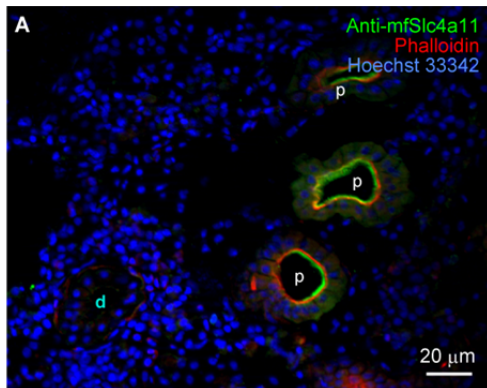


図 3. ホウ酸輸送体の蛍光抗体染色

(4) ホウ酸輸送体 Slc4a11 の活性と生理機能
ホウ酸輸送体 Slc4a11 の活性を詳細に検討するために、*Xenopus oocytes* の発現系を利用し、外液のイオン組成を変えて電気生理学的な測定を繰り返した。その結果、Slc4a11 はホウ酸輸送体であることが確かめられたが、当初の予想とは異なり、きわだった Na⁺ 依存性は見られず、むしろホウ酸チャネルであることが明らかになった。ホウ酸輸送系を欠く酵母に Slc4a11 を発現させ、ホウ酸の輸送活性を測定した結果からもこの事実は支持された。そこで Na⁺ 依存性の根拠となっていたヒトのホウ酸輸送体の活性と同一条件下で比較するために、ヒトのホウ酸輸送体 NaBC1 を入手し、*Xenopus oocytes* の発現系で同様の解析を試みたが、ヒトの NaBC1 活性すなわち Na⁺/borate cotransporter 活性が測れず、米国のグループによる前報 [Mol. Cell 16, 331, 2004] の再検討が必要になっている。

(5) Basolateral 膜上のホウ酸輸送体の同定
尿細管上皮細胞によるホウ酸排出には上述の Apical 膜に存在する輸送体 Slc4a11 の他に Basolateral 膜に存在する輸送体が必要である。後者に関しては、これまで全く不明だった。私たちはアクアポリンのサブファミリーがホウ酸を輸送する可能性があると考え、メフグの腎臓で発現するアクアポリンを PCR で探索し、候補分子として AQP3, AQP7, AQP8 を同定した。

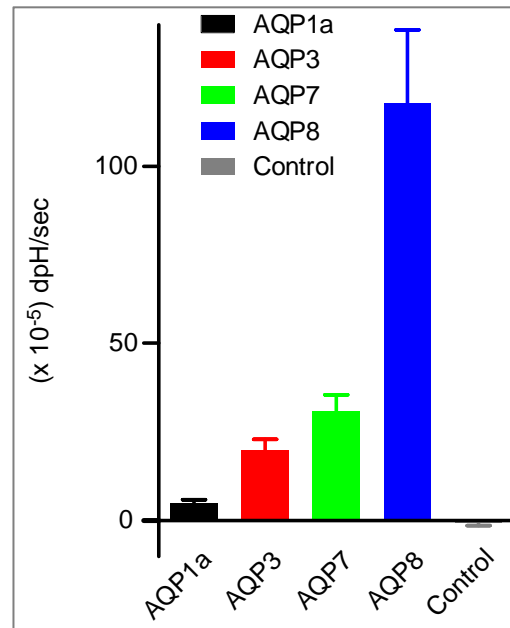


図 4. AQP のホウ酸輸送活性

(6) ホウ酸の排泄機構

ホウ酸輸送活性を有するアクアポリン AQP の同定とホウ酸輸送モデルの構築：私たちが注目しているホウ酸輸送体 Slc4a11 は、メフグ腎臓の尿細管上皮細胞の管腔側 (Apical) に存在し、起電性の B(OH)₄⁻ 輸送体として働き、過剰のホウ酸を排泄していると考えられる。これとペアで働く輸送体、すなわち腎尿細管上皮細胞の血管側 (Basolateral) で働くホウ酸輸送体の有力候補として、AQP3, 7, 8 を同定し、ホウ酸排出機構をほぼ説明できるようにした。特に、AQP8 は強いホウ酸輸送活性を有した。昆虫等に比べ哺乳動物が低濃度のホウ酸に対し比較的耐性であるのは、哺乳動物の場合は腎臓から排泄されるからだと考えられており、本研究を通してヒト等の生理学にも大きく貢献することができた。

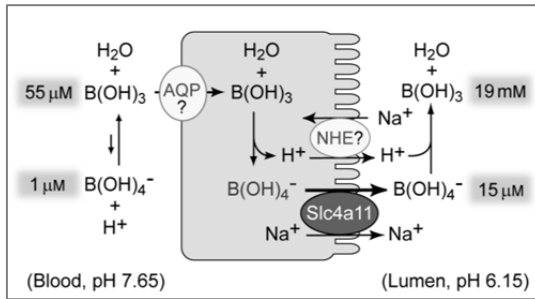


図5. ホウ酸の排泄モデル

(7) アンモニア輸送体 Rhcg1 の予想外の生理機能

毒性を逃れる意味では、魚類にとってはアンモニアの排泄も死活問題である。哺乳類ではアンモニアを尿素に変換し無毒化した上で腎臓から排泄するので問題ないが、窒素代謝の観点からすると、魚類は非常にユニークである。アミノ酸代謝等で生成するアンモニアを (i) 直接エラ経由で環境水中に排泄する硬骨魚類と (ii) 尿素に変換するがそれを体内に貯留し、浸透圧調節物質として利用しているサメ等の軟骨魚類がある。生きる化石としてよく話題になるシーラカンスは尿素派である。

長い間アンモニアは細胞膜を自然拡散により透過すると考えられてきたが、栄養源としてのアンモニアを欠乏させた培地で生育させた酵母や植物の研究からアンモニア輸送体が同定された。しばらく動物のものは見つからなかったが、わずかに15%程度のアミノ酸配列の相同性を手掛かりに、血液型物質として知られていた Rh 糖タンパク質が動物のアンモニア輸送体であることが明らかになり、状況は一変した。

魚類のエラからのアンモニアの排泄機構に興味を持っていた私たちは、フグを用いて Rh 糖タンパク質 4 種類をクローニングすることに成功し、それらのエラにおける局在部位を抗体染色によって決定した。その結果、エラの広い表面積を作り出しているラメラ構造を支える細胞群 (Pillar cell と Pavement cell) に Rh アンモニア輸送体が規則正しく配置され効率の良いアンモニア排出系を形成していることが明らかになった。この仕事は魚類生理学の長年の課題を解決したのものとして高く評価されたが、もう一つ興味深い事実があった。

ラメラの根元に点在する塩類細胞にもアンモニア輸送体の一種 Rhcg1 が高レベルで発現していたのである。半信半疑の結果だったが、本当ならば何かが起こりそうな予感がした。そこで、私たちはさらに、ゼブラフィッシュを用いて Rhcg1 をクローニングしフグと同じように調べた。結果は同じで塩類細胞が見事に染色された。しかも、ゼブラフィッシュ

の水槽の NaCl 濃度を変化させ、低イオン状態にすると誘導がかかることも分かった。淡水適応に必要な Na⁺ の取り込みに関わることを示唆する画期的な結果だった。有毒なアンモニアを排泄する反応と共役する形で体内のイオン環境を保持するために必要な Na⁺ イオンを取り込む戦略は見事といえよう。

さらに興味深いことに、サメ等の軟骨魚類の腎臓にもアンモニア輸送体の一種 Rhp2 が発現していることを見出したので、その構造、局在部位を決定した。

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 8 件)

- ① Chang MH, Plata C, Kurita Y, Kato A, Hirose S, Romero MF. Euryhaline pufferfish NBCe1 differs from nonmarine species NBCe1 physiology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302, C1083-C1095, 2012. 査読有り. doi: 10.1152/ajpcell.00233.2011.
- ② Islam Z, Kato A, Romero MF, Hirose S. Identification and apical membrane localization of an electrogenic Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX2a likely to be involved in renal Ca²⁺ excretion by seawater fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 301, R1427-R1439, 2011. 査読有り. doi: 10.1152/ajpregu.00165.2011
- ③ Kato A, Muro T, Kimura Y, Li S, Islam Z, Ogoshi M, Doi H, Hirose S. Differential expression of Na⁺-Cl⁻ cotransporter and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 in the distal nephrons of euryhaline and seawater pufferfishes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300, R284-R297, 2011. 査読有り. doi: 10.1152/ajpregu.00725.2009
- ④ Nawata CM, Hirose S, Nakada T, Wood CM, Kato A. Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure. *J Exp Biol.* 213, 3150-3160, 2010. 査読有り. doi: 10.1242/jeb.044719
- ⑤ Nakada T, Westhoff CM, Yamaguchi Y, Hyodo S, Li X, Muro T, Kato A, Nakamura N, Hirose S. Rhesus glycoprotein p2 (Rhp2) is a novel member of the Rh family of ammonia transporters highly expressed in shark kidney. *J Biol Chem.* 285, 2653-2664, 2010. 査読有り. doi: 10.1074/jbc.M109.052068
- ⑥ Kato A, Chang MH, Kurita Y, Nakada T, Ogoshi M, Nakazato T, Doi H, Hirose S, Romero MF. Identification of renal transporters involved in sulfate excretion in

marine teleost fish. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 297, R1647-R1659, 2009. 査読有り。doi: 10.1152/ajpregu.00228.2009

- ⑦ Li S, Kato A, Takabe S, Chen AP, Romero MF, Umezawa T, Nakada T, Hyodo S, Hirose S. Expression of a novel isoform of Na⁺/H⁺ exchanger 3 in the kidney and intestine of banded houndshark, *Triakis scyllium*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 304, R865-R876, 2013. 査読有り。doi: 10.1152/ajpregu.00417.2012
- ⑧ 広瀬茂久, 魚類のイオンホメオスタシス維持機構, **生化学** 84, 821-828, 2012. 査読有り。PMID: 23240535.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 茂久 (HIROSE SHIGEHISA)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
教授
研究者番号：10134199

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

加藤 明 (KATO AKIRA)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
助教
研究者番号：40311336