

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：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570062

研究課題名（和文）脊椎動物における尿素を利用する浸透圧調節の普遍性と多様性

研究課題名（英文）Universality and diversity of osmoregulation applying urea retention in vertebrates

研究代表者

内山 実（UCHIYAMA MINORU）

富山大学・大学院理工学研究部（理学）・教授

研究者番号：50095072

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の体液恒常性（体液量と体液の濃度の維持）は、動的な生理現象である。水陸両棲魚ヨダレカケと汽水棲カニクイガエルは、それぞれ特異的な環境に適応している。水電解質ホルモン濃度を含む体液成分変動、尿素合成酵素と尿素輸送体遺伝子発現について、環境変化による変化を解析した。陸上および海水環境への曝露後、両種の浸透圧調節には尿素代謝が重要であること、さらに尿素合成、窒素排出の関連遺伝子群を解析した。カニクイガエル幼生の海水適応も、尿素による浸透圧調節が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Body fluid homeostasis, i.e. volume and composition of body fluids, is a dynamic physiological phenomenon in vertebrates. The amphibious fish, *Andamia tetradactylus*, and the crab-eating frog, *Fejervarya cancrivora*, inhabit in rocky shores and estuary areas, respectively. In this study, hydromineral hormones and components in their body fluid, and gene expressions of urea synthetic enzymes and urea transporter were examined. During exposure to air and seawater environments, synthesis and accumulation of urea were increased in the fish and frogs. Thus, urea accumulation is important in the osmoregulation in both species. Tadpoles of the crab-eating frog may also be depending on this osmoregulation in salt water adaptation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：比較内分泌

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、窒素代謝の老廃物をアンモニア、尿素、尿酸のいずれかの形で排出する。脊椎動物の系統と主要な窒素排出物との関係が論じられてきたが、単純な対応関係は無くむしろ生息環境に関連する可能性がある。尿素は、軟骨魚類や硬骨魚類の一部、両生類と哺乳類において、主要な窒素排出物である。近年、尿素が細胞膜タンパクである尿素輸送体

によって、細胞を通過することで吸収や排出が行われていることが、分子レベルで明らかになってきた。特に脊椎動物全般において、尿素輸送体ファミリーがクローニングされ始めた。また、尿素の輸送に内分泌的調節が関わる可能性も示唆されていた。しかし、脊椎動物の浸透圧調節に関わる尿素の役割について、普遍的あるいは多様な生理機構については不明な点が残されていた。本研究は、

陸生あるいは海洋の特殊環境に生息する脊椎動物群が、環境適応する際に尿素を浸透圧調節物質として利用する機構について、尿素合成、尿素輸送、それらの内分泌的調節を総合的に明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

脊椎動物における窒素排出物の違いは、動物の系統発生と生息環境（水中、陸上）を反映すると考えられている。水生種はアンモニアを、陸生種は尿素や尿酸の形で排泄するというドグマである。しかしながら近年、硬骨魚を含む脊椎動物に共通して、尿素合成能と尿素輸送体の存在が報告されている。本研究は、尿素が単に老廃物としてではなく脊椎動物に共通した体液浸透圧調節物質として働く「鍵分子」であることを実証するため、多様な動物の環境適応における尿素合成能を調べると共に、浸透圧調節器官での尿素輸送機構とその内分泌制御について明らかにすることを目的とした。

(1) 岩礁性水陸両生魚の体液調節と窒素代謝産物の排出：

海洋の岩礁域に生息するヨダレカケ (*A. tetradactylus*) の腎臓ならびに鰓構造の微細構造観察と各種イオン輸送体ならびに窒素代謝産物膜輸送体遺伝子のクローニングと各膜輸送体タンパクの局在と分布を明らかにする。

(2) 河口棲両生類カニクイガエル (*F. cancrivora*) の成体と幼生における海水順化時の尿素合成と体内貯留：

①成体は陸と海水環境への順化による体液変動と尿素合成ならびに尿素輸送体遺伝子のクローニングと発現局在を明らかにする。
②幼生は発生に伴う尿素合成と尿素貯留と排出を調べ、海水順化における役割を明らかにする。

(3) 河口棲両生類カニクイガエルと陸生両生類オオヒキガエル (*Bufo marinus*) の環境塩度の嗜好性と体液浸透圧上昇時の尿素合成と体内貯留に関わるホルモンの影響：

体液変動環境に曝露して、行動観察による環境の嗜好性を明らかにする。また、尿素排泄と水電解質代謝ホルモンの関連性を調べる。

(4) 樹上棲爬虫類の乾燥順化と窒素代謝：グリーンアノール (*Anolis carolinensis*) を乾燥環境に曝露して、体液変動と窒素代謝産物の排出と尿素輸送体ならびに尿酸輸送体を明らかにする。

以上、様々な動物群で尿素合成、輸送、貯留機構を調べ比較することによって、尿素を利用した浸透圧調節の進化について考察する。

3. 研究の方法

(1) 生理学実験：各種実験動物を体液変動する環境（乾燥、希釈海水など）に曝露して、水電解質代謝関連ホルモン濃度ならびに体液成分濃度を測定する。

(2) 分子生物学実験：窒素代謝に関連する遺伝子ならびに窒素代謝産物輸送体のクローニングを行う。各遺伝子の体組織における発現局在を明らかにする。さらに上述の環境曝露後の発現変動を調べる。

(3) 免疫化学実験：窒素代謝産物輸送体の抗体を作成して免疫組織化学的手法により輸送体発現部位を特定して、細胞膜上にマッピングすることで細胞レベルでの輸送機構

の解析を行う。また、尿素の2次的能動輸送に関連する可能性のあるNa⁺輸送に関する輸送体についても調べる。

4. 研究成果

(1) 岩礁性水陸両生魚の体液調節と窒素代謝産物の排出：

① 岩礁域において、異なる生息環境に分布する Blennidae 目 3 種の鰓と腎臓の微細構造ならびにイオノフォアの分布と各種イオン輸送体を比較した。生息環境と各魚種の鰓や腎ネフロン構造に特徴的な種差が見られた。

② 水陸両生魚 *A. tetradactylus* の肝臓の尿素合成系酵素 (CPSIII と ARG) ならびに尿素輸送体 (UT) とアンモニア輸送体 3 種 (Rhbg, Rhcg1 と Rhcg2) のクローニングを行った。アンモニア輸送体の推定アミノ酸配列は、硬骨魚種の既知のアンモニア各輸送体と高い相同性を示した。UT は哺乳類の UT-A2 型に比較的高い相同性を示した。大気への曝露処理により、血中アンモニア濃度と排泄量は変化しなかったが、血中尿素濃度の上昇ならびに排泄量の増加がみられた。肝臓の尿素合成系酵素 mRNA が上昇し、UT 輸送体発現は腎臓で上昇した。尿素輸送体は鰓での発現が特に著しく、腎尿細管細胞にも発現していることを免疫組織化学的に証明した。したがって、岩礁性水陸両生魚の窒素代謝について、陸では腎臓機能が重要になることが分子レベルで初めて明らかになった。

(2) 河口棲両生類カニクイガエル (*F. cancrivora*) の成体と幼生における海水順化時の尿素合成と体内貯留：

①成体 カニクイガエル成体については、陸上と汽水 (60%海水) に曝露して、尿素を含む血液成分ならびに水・電解質代謝ホルモンの変動を RIA 法により測定した。両実験群は脱水と体液濃縮を示し、血漿浸透圧、Na⁺、Cl⁻、尿素の著しい増加が観察された。また、血漿アルギニンバソトシン (AVT)、アンギオテンシン (ANGII) ならびにアルドステロン (ALDO) 値は大きく変動して上昇傾向を示した。この結果は、陸生種と同様に体液浸透圧維持には尿素貯留が重要であることを示した。一方、陸生種で見られた汽水環境下で外部から水を積極的に取り入れる機構は、観察されなかった。尿素合成酵素 (CPSI と ARG)、尿素輸送体 (UT) ならびに水チャネル (AQP2 と AQP3) のクローニングと Realtime PCR による発現解析を行った。UT と AQP2, 3 は腎臓、膀胱膜、皮膚で発現が著しく、陸と海水環境における脱水処理により有意に増加した。本種の成体の尿素合成と貯留に関して、分子レベルで明らかになった。
②幼生が汽水環境 (80%海水) において、生存できることを確認した。個体発生に伴って後肢形成時期に尿素合成酵素が体組織で観察され、微量な尿素の排泄も行われた。変態時期には、アンモニアよりも尿素による排泄が顕著になった。幼生期 (肢芽形成期以降) にみられる高い塩類耐性能力に尿素貯留による体液調節が関わる可能性が示唆された。一方、初期発生時の耐塩性の生理機構は今後の課題である。

(3) 河口棲両生類カニクイガエルと陸生両生類オオヒキガエル (*Bufo marinus*) の環境塩度の嗜好性と体液浸透圧上昇時の尿素合成と体内貯留に関わるホルモンの影響：

河口棲両生類カニクイガエルと陸生両生類オオヒキガエル (*B. marinus*) について、複数の希釈海水環境と陸を設けた実験容器内で環境選択性を観察した。両種共に 20%海水以下の塩度と陸に長く留まることが観察された。AngII ならびに AVT の脳室内投与は水場での滞在時間を有意に増加させた。血中ならびに尿中尿素濃度の変化から、これらホルモンは、尿素貯留に機能することが示唆された。

(4) 樹上棲爬虫類の乾燥順化と窒素代謝：グリーンアノール (*Anolis carolinensis*) を乾燥環境に曝露して、体液変動と窒素代謝産物の排出を調べた。乾燥処理により、血中尿素、尿酸濃度は有意に増加した。特に摂水制限(絶水)時には尿酸の排泄量が増加、尿素排泄量は減少した。哺乳類では尿酸輸送体である推定される尿酸輸送体 (Galectin8 と GLUT9a, b) の組織発現を調べた。これらの尿酸輸送体は腎臓と消化管に加えて脂肪体での発現が顕著であった。爬虫類では乾燥環境下で、尿素的貯留による体液濃縮よりも排泄物による水分の喪失を防ぐための仕組みが優先的に働いていると考えられる。内分泌による調節機構は今後の課題である。

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 5 件)

- (1) Uchiyama, M., Maejima, S., Yoshie, S., Kubo, Y., Konno, N. and Joss, J.M.P. The epithelial sodium channel in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* (Osteichthyes: Dipnoi). *Proceedings Royal Society B Biological Science*, **279**, 4795-4802 (2012). doi: 10.1098/rspb.2012.1945
- (2) Uchiyama, M., Komiyama, M., Yoshizawa, H., Shimizu, N., Konno, N., and Matsuda, K. Structures and immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase, Na⁺/H⁺ exchanger 3 and vascular-type H⁺-ATPase in the gills of blennies (Teleostei: Blenniidae) inhabiting rocky intertidal areas. *Journal of Fish Biology*, **80**, 2236-2252 (2012). doi: 10.1111/j.1095-8694.2012.03277.x
- (3) Uchiyama, M., Kumano, T., Komiyama, M., Yoshizawa, H., and Matsuda, K. Immunohistological classification of ionocytes in the external gills of larval Japanese black salamander, *Hynobius nigrescens* Stejneger. *Journal of Morphology*, **272**, 10117-1024 (2011) doi: 10.1002/jmor.10977
- (4) Uchiyama, M., Kumano, T., Konno, N., Yoshizawa, H., and Matsuda, K. Ontogeny of ENaC expression in the gills and the kidneys of the Japanese black salamander (*Hynobius nigrescens* Stejneger), *Journal of Experimental Zoology, Molecular and Developmental Evolution*, **314B**, 135-145 (2011). doi: 10.1002/jez.b.21384

- (5) Maejima, S., Konno, N., Matsuda, K., and Uchiyama, M. Central angiotensin II stimulates cutaneous water intake behavior via an angiotensin II type-1 receptor pathway in the Japanese tree frog *Hyla japonica*, *Hormones and Behavior*, **58**, 457-464 (2010). doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.05.007

2.

[学会発表] (計 32 件)

2012 年

- (1) 内山実, 前嶋翔, 今野紀文, 吉江紀夫, 久保義弘, ジーンジョス. オーストラリア肺魚は機能的な上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) を発現している. 日本動物学会第 83 回大会.
- (2) 花立守, 加藤明, 松田恒平, 内山実, 今野紀文. メダカの腎臓における V2R と NCC を介したナトリウム調節. 日本動物学会第 83 回大会
- (3) 垣内祐貴, 杉浦駿, 丸山剛史, 野上智史, 今野紀文, 松田恒平, ナリーンプレヤ, チャイチップワニチャノン, 内山実. カニクイガエル幼生の発生に伴う汽水への順化と尿素合成. 日本動物学会中部支部大会.
- (4) 上田雪絵, 清水則雄, 今野紀文, 松田恒平, 内山実. 岩礁棲両生魚ヨダレカケ (*Andamia tetradactylus*) の環境変動時における体液酸塩基平衡. 日本動物学会中部支部大会
- (5) 丸山剛史, 内山実, 前嶋翔, N. Preyavichyapugdee, C. Wanichanon, 松田恒平, 今野紀文. 汽水棲カニクイガエルの乾燥と海水順化における尿素輸送体と水チャンネルの発現. 日本動物学会大会
- (6) 野上智史, 垣内祐貴, 今野紀文, 松田恒平, 内山実. 生息環境の異なる無尾両生類における環境浸透圧の受容と選択性 (行動観察). 日本動物学会中部支部大会
- (7) 内山実, 生息環境を異にする両生類の環境順化における体液変動とアルドステロン濃度. 日本比較内分泌学会大会

2011 年

- (1) M. Uchiyama. Urea and ammonia transports in the cane toad, *Bufo marinus* and the amphibious blenny, *Andamia tetradactylus*. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Nagoya, Japan. May 31.
- (2) M. Uchiyama. Molecular biology and immunocytochemistry of nitrogen metabolism and excretion in nonmammalian vertebrates. 34th Anatomy Association of Thailand Annual Conference, Krabi, Thailand. April 27-29.
- (3) M. Uchiyama, M. Komiyama, N. Konno, K. Matsuda, & H. Yoshizawa. Effect of environmental change on the expression of urea cycle enzymes and nitrogen transporters in the amphibious fish. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Nagoya, Japan. Jun 1.
- (4) S. Maejima, N. Konno, K. Matsuda, M. Uchiyama. Central administration of ang II

and vasotocin, and changes in body fluid stimulate c-fos expression in the treefrog brain. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Nagoya, Japan. Jun 1.

- (5) 今江春香, 海谷啓之, 松田恒平, 内山実, 今野紀文. アフリカ肺魚における神経葉ホルモン受容体のクローニングと夏眠での発現変化. 日本動物学会第 82 回大会.
- (6) 内山実 他 5 名. 岩礁性両生魚ヨダレカケの窒素代謝産物を利用した体液調節. 日本動物学会第 82 回大会.
- (7) 杉浦駿, 垣内祐貴, 前嶋翔, 吉澤英樹, 内山実. カニクイガエル幼生の海水適応における体液浸透圧調節. 日本動物学会第 82 回大会.
- (8) 内山実. 汽水棲カニクイガエルの血漿 AngII、aldo, AVT 濃度におよぼす乾燥と海水順化処理の影響. 日本比較内分泌学会第 36 回大会

2010 年

- (1) 内山実, 熊野智子, 吉澤英樹. クロサンショウウオ個体発生に伴う Na⁺ 輸送関連膜タンパクの発現. 日本動物学会大会第 81 回大会
- (2) 今野紀文, 黒澤真弓, 宮岸佳奈, 海谷浩之, 松田恒平, 内山実. 硬骨魚類における V2 型バソトシン受容体の検索とその機能について. 日本動物学会大会第 81 回大会
- (3) 前嶋翔, 今野紀文, 松田恒平, 内山実. 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. 日本動物学会第 81 回大会.
- (4) 小宮山牧子, 吉澤英樹, 清水則雄, 今野紀文, 松田恒平, 内山実. 岩礁生両生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. 日本動物学会大会第 81 回大会
- (5) 前嶋翔, 今野紀文, 松田恒平, 内山実. 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第 35 回大会.
- (6) 露谷孔明, 前嶋翔, 今野紀文, 松田恒平, 内山実. 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第 35 回大会.
- (7) 前嶋翔, 内山実. 体液調節ならびにバソトシン及びアンジオテンシン II 脳室内投与がニホンアマガエルの脳内 c-fos 発現におよぼす影響. 第 21 回バソプレシン研究会.

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.u-toyama.ac.jp/bio/bio2010/kyouzyusyokai2/uchiyama/uchiyama.ht>

m1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 実 (UCHIYAMA MINORU)
富山大学大学院理工学研究部(理学)・教授
研究者番号: 50095072

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

兵藤 晋 (HYODO SUSUMU)
東京大学大気海洋研究所・准教授
研究者番号: 40222244