

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850130

研究課題名(和文)新規海水適応遺伝子の探索および海水型塩類細胞分化誘導因子の同定

研究課題名(英文) Search for the key genes in SW Adaptation and identification of the ionocyte differentiation factors

研究代表者

宮西 弘 (MIYANISHI, Hiroshi)

慶應義塾大学・法学部(日吉)・助教

研究者番号：30726360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：海洋環境中での生存に必須な新たな浸透圧調節機構を明らかにするため、塩分排出型塩類細胞の分化誘導機構の解明と新規海水適応遺伝子の探索を行った。淡水および海水に馴致した鰓間におけるサブトラクション法および次世代シーケンサーによる解析から、鰓および表皮の被蓋細胞に発現し、海水移行で発現上昇する新規遺伝子を2つ同定した。新たな機能解析法として、*vivo*-モルフォリノを用いた*in vivo*コンディショナルノックダウン法を確立し、新規遺伝子は表皮における高浸透圧耐性因子であることを見出した。また、塩類細胞分化機構において、転写因子FOXI3が全タイプの塩類細胞に対する分化因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the differentiation pathway of ion secreting-type ionocytes and searched the novel gene related to seawater (SW) adaptation. According to an incorporated cDNA subtraction followed by the next generation sequencing, we found two remarkable genes. In adult fish and larvae, these gene was expressed only in the pavement cells of gill and skin, and the expression was increased rapidly after SW transfer. To achieve the gene knockdown in larval stage, we established an *in vivo* conditional knockdown system. The knockdown of novel gene resulted in an impaired maintenance of whole-body osmolality in SW-acclimated larvae. These findings suggest that the novel gene plays an important role in acute SW acclimation, involved in epithelial barrier in marine fish. In the study of ionocyte differentiation, we showed that *foxi3* transcription factor is essential for the differentiation of all types of ionocytes in medaka by histological and loss/gain-of-functional analyses.

研究分野：魚類生理学

 キーワード：メダカ 海水適応 *In vivo*ノックダウン法 サブトラクション法 次世代シーケンス解析 新規高浸透圧耐性遺伝子 塩類細胞分化機構 Forkhead転写因子

1. 研究開始当初の背景

淡水と海水という環境は、約 1000 mOsm もの浸透圧差がある。魚類の体液の浸透圧は淡水・海水中においても 300 mOsm 程度に保たれている。そのため、淡水中では水の流入と塩分の流出が生じ、海水中では脱水と塩分過多になる。魚類が淡水または海水環境で生きていくためには、 Na^+ や Cl^- を主とするイオンを生理的範囲内に調節し、恒常性を維持しなければならない(文献1)。魚類の浸透圧調節は体内環境の恒常性の維持に重要であり、その機構の解明は魚類の健全な育成を目指す上で資するところが大きい。

サケやウナギに代表される通し回遊魚は、一生のうちで淡水と海水の両方を経験する。また、テラピアやメダカは淡水および海水環境を行き来することができ、両環境で生存可能な広塩性魚である。広塩性魚の浸透圧調節は、低浸透圧環境である淡水中で不足する Na^+ や Cl^- を取り込み、逆に高浸透圧環境の海水中では過剰となる Na^+ や Cl^- を排出するという、両環境間で全く逆の浸透圧調節を行う点で非常に興味深い。このような広塩性魚の各環境中での生存に必須な浸透圧調節機構には共通性が認められる。海水や血液の約90%のイオン組成を占めるのが Na^+ および Cl^- であり、これらイオンを淡水中では取り込み、海水中では排出する重要な機能を担うのが鰓などに多数分布する塩類細胞である。しかし、塩類細胞が、どのような刺激または分子メカニズムによって分化誘導されるのかというのは未だ知見は乏しい。しかし近年、ゼブラフィッシュならびにメダカにおいてゲノム情報が整備され、遺伝子ノックダウンなどの分子生物学的手法の確立に伴い、淡水魚であるゼブラフィッシュにおいて、イオン取り込み型塩類細胞の分化シグナリングの一端が明らかにされつつある(文献2)。しかし、海水型塩類細胞の分化機構において、浸透圧刺激を受けてから、どのような分子群が働き海水型塩類細胞への分化を促すのかについての研究は未だ分かっていない。

2. 研究の目的

本課題では、海水型塩類細胞への分化誘導因子を同定し、その分子機構を明らかにすることに加え、未だ同定されていない海水適応に関わる新規遺伝子を同定し、海水適応機構の新たな側面を見出すことを目的とした。魚類の海水型塩類細胞モデルと、海水環境に生息する魚類・爬虫類・鳥類の塩類排出器官における、細胞レベルの分子モデルは共通であるため、分化誘導シグナリングが、これら海洋生物に共通したシグナリングになると期待でき、これを明らかにすることで、海棲動物における浸透圧調節機構の統合的な理解に向けた基礎基盤を構築することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝学的・分子生物学的アプローチを行うため、実験魚としてメダカ *Oryzias latipes* を用いた。メダカは、淡水および海水に適応可能な広塩性魚であり、先行研究により淡水型および海水型塩類細胞のタイプの同定もされている。さらに、ゲノム情報、ノックダウン等の機能解析法が確立している点で最適なモデル魚である。

(1) 発生段階における浸透圧調節能の変化および塩類細胞の発現変動動態：機能解析は主に胚および仔魚段階で行うため、本課題の端緒として、受精卵を淡水および海水中で発生させ、体液浸透圧を経時的に測定した。塩類細胞は、全タイプの塩類細胞に高発現する Na^+/K^+ -ATPase (NKA) 抗体を用いた免疫染色により可視化し、面積辺りの塩類細胞数の変化を発生段階における経時変化を測定した。各タイプの塩類細胞に発現するイオン輸送体を同定し、定量 PCR により淡水および海水に馴致した胚における発現変化を調べた。

(2) 転写因子 Forkhead box I (foxi) ファミリーの同定：メダカゲノムデータベースおよびナショナルバイオリソースのメダカ cDNA ライブラリーデータを利用し、foxi ファミリーを同定した。mRNA の全長および foxi3 のゲノム情報が不十分であったため、RACE 法によりメダカ鰓 cDNA から mRNA の全長配列を決定し、メダカ DNA を用いゲノム配列を同定した。

(3) Foxi の発現動態および発現部位の同定：発生段階における発現を定量 PCR により経時的に調べた。成魚の脳、眼、鰓、心臓、消化管、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉、皮膚、精巣および卵巣組織における発現を定量 PCR により調べた。発現部位の同定では、foxi のホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) および塩類細胞に発現する NKA、CFTR 型 Cl^- チャネル、NKCC/NCC (T4) 抗体を用いた多重染色で塩類細胞との共局在を調べた。また、塩類細胞に発現が認められた foxi3 に対する抗体を作製し、foxi3 の細胞内局在を組織学的に解析した。

(4) Foxi3 過剰発現およびノックダウンによる機能解析：foxi3 の全長 mRNA を合成し、1 細胞期のメダカ卵にマイクロインジェクションにより導入し、過剰発現を行った。約 100 pl をインジェクションし、胚辺り 10 pg および 50 pg の投与量で濃度依存的に解析を行った。対照群には、PB 溶液をインジェクションし、滅菌処理した淡水、90%海水中 (26 °C) で飼育し、方法(3)と同様な免疫染色により観察を行った。foxi3 に対するアンチセンスオリゴ (gripNA および *vivo*-モルフォリノ) を作製しノックダウンを行い、淡水、90%海水および平衡塩類溶液 (BSS) 中で飼育し、上記免疫染色による塩類細胞数の測定と、体液浸透圧の測定を行った。

(5) 新規海水適応因子の探索：淡水および海水に1日馴致したメダカ鰓を用い、サブトラクション法により海水中で高発現する遺伝子を次世代シーケンサー（GS junior）により解析を行った。得られたサブトラクション由来のフラグメントは GENETYX のローカルプラストを用い、相同性検索を行った。アノテーションが付かなかった新規遺伝子に対しては、Pfam データベースを利用し、ドメイン検索を行った。選定した約150遺伝子に対して、淡水および海水馴致した鰓における発現の差異を簡易的な定量PCRによりスクリーニングを行った。

(6) 新規海水適応遺伝子の発現部位および発現動態：新規遺伝子の機能部位の検討を行った。成魚を淡水から70%海水に移行し、新規遺伝子の鰓における発現変化を経時的に定量PCRで調べた。方法(3)と同様に新規遺伝子の組織別発現解析を行った。発生段階と仔魚における淡水および海水移行による発現変化を定量PCRにより明らかにした。新規遺伝子の WISH および NKA 抗体および T4 抗体による免疫染色との多重染色により、仔魚における発現部位を同定した。

(7) *In vivo* コンディショナルノックダウン法の確立と新規遺伝子の機能解析：着目した新規遺伝子に対する *vivo*-モルフォリノを複製し、ノックダウン効率の評価を行った。*vivo*-モルフォリノは、新規遺伝子の第2エクソンとイントロンを跨ぐように設計し、成熟 mRNA へのスプライシング阻害によるノックダウンを行い、RT-PCR でノックダウンの有無を評価した。条件検討を重ね、約10匹の仔魚を1mlの淡水中で飼育し、生存率の評価から飼育水に *vivo*-モルフォリノを0.75 μ M の濃度となるように設定した。淡水中で3時間ノックダウンを行った仔魚サンプルに対して、成熟 mRNA のみを検出するプライマーを設計し、成熟 mRNA の減少率を定量PCRにより測定し、ノックダウン効率の評価を行った。淡水中で6時間、さらに淡水および70%海水中で18時間ノックダウンを行った。新規遺伝子ノックダウンによる海水適応能への影響は、体液浸透圧を測定することで評価を行った。さらに、表皮における水透過性への影響を調べるため海水中で発現するアクアポリン(AQP)の0、1、3、4、8、9、10bについて定量PCRでノックダウン群と対照群で比較を行った。

4. 研究成果

(1) 発生段階における塩類細胞は、淡水群、海水群共に、受精後1.5日目から卵黄嚢上に発現が認められた。さらに、発生が進むとともに塩類細胞は増加し、受精後4日目では胚体の体表上にも塩類細胞が見られた。受精後4日目以降、塩類細胞は卵黄嚢と胚体の境界上に数多く存在した。卵黄嚢上皮上の塩類細胞の大きさは卵黄嚢が吸収されるまで大きな変化はなかった。一方で、受精後6日目か

らは卵黄嚢と胚体の境界付近の塩類細胞が急激に数を増やし、卵黄が吸収された後も、背側よりも腹側の体表に塩類細胞が数多く見られた。また、受精後7日目以降は鰓の付近に細かな塩類細胞の集団が見られ、鰓の塩類細胞の分化が観察された。胚の体液浸透圧は、淡水群では大きな変動はなかったが、海水群では受精後2日目まで体液浸透圧は上昇した後、塩類細胞が現れる受精後2日目からは、発生とともに体液浸透圧は減少した。発生段階におけるメダカ塩類細胞に発現する各イオン輸送体の mRNA 発現変化は、ほぼ塩類細胞の発現パターンと同じ傾向が見られた。よって、塩類細胞の発現とともに、発生段階における浸透圧調節能が発達することが強く示唆され、受精後2日目から海水中での塩分排出が可能となることとなった。

(2) 遺伝子データベースから *foxi1*、2 および 3 を1種同定した。各遺伝子は Forkhead box ドメインを高度に保存していた。*Foxi3* においては、全長 mRNA 配列中に一つのイントロンが存在することが分かった。

(3) 塩類細胞の分化誘導因子と考えられる *foxi3* の基礎的知見を広塩性魚のメダカを用いて蓄積した。メダカ *foxi1* および 2 は、成魚における鰓では発現が見られなかった。しかし、*foxi3* は、組織別発現解析から鰓にのみ発現することが分かった。組織学的解析から、分かっている淡水型および海水型塩類細胞の全てで発現した。さらに、*foxi3* の免疫染色による観察から、*foxi3* は全塩類細胞の核に発現した、よって、塩類細胞分化シグナリングにおける重要な転写因子として働くことが示唆された。

(4) *Foxi3* の過剰発現解析の結果、*foxi3* mRNA の濃度依存に塩類細胞は増加した。増加は淡水群、海水群ともに見られ、過剰発現により未処理群では発現が少ない胚体でも多くの塩類細胞の発現が見られた。一方、1細胞期からの *foxi3* ノックダウンでは、淡水、海水および BSS 中においても受精後（ノックダウン後2日）で90%以上の胚が死亡した。この結果から、死因として、*foxi3* は発生そのものに重要な因子であり、発生そのものが停止するか、塩類細胞の消失による浸透圧調節能の低下による影響によるものであるかが考えられた。*GripNA-GFP* を用いインジェクション効率を確認したところ、90%の効率であり、*foxi3* ノックダウンにより、ほぼ全ての胚が死亡すると考えられた。よって、塩類細胞数の計測による塩類細胞への影響の評価は困難であった。そこで、塩類細胞が発現する受精後2日目から *vivo*-モルフォリノによるノックダウンを行った結果、塩類細胞は対照群と比べ減少し、海水中での体液浸透圧も上昇した。よって、*foxi3* は全ての塩類細胞の分化に関わる重要な転写因子であることが強く示唆され、*foxi3* のさらなる下流シグナリングによって各タイプの塩類細胞

への分化が起きることが考えられた。現在、作製した foxi3 抗体を用いた ChIP-seq 解析による下流因子の同定を進めている。

(5) サブトラクション法と次世代シーケンスによる解析から、海水移行した鰓で高発現する遺伝子を多く得ることができた。しかし、調べた遺伝子の 75% は偽陽性のものであることが分かった。よって、サブトラクション法による解析は、比較する一方が高発現する遺伝子を得ることができるが、その効率の向上は今後の検討課題である。

(6) サブトラクション法と次世代シーケンスによって、海水中で高発現する遺伝子の中から、2 つの遺伝子に注目した。この 2 つの遺伝子は多種間における遺伝子とのアノテーションがつかない新規遺伝子である。この 2 つの新規遺伝子は、組織別発現から鰓および皮膚に高発現する。さらに、淡水から海水移行後 3 時間以内に発現が急激に上昇し、移行後 2 日後には発現が淡水レベルに戻る、一過性の発現上昇を示した。組織学的解析から、これら新規遺伝子は、鰓および皮膚の被蓋細胞に発現し、同様に上皮に発現する塩類細胞には発現が見られなかった。このような短期海水適応に関わる上皮性の因子はこれまでに例がなく、新たな海水適応機構の重要な対象であると言える。

(7) 2 つの新規遺伝子の内、1 つに着目した。この新規遺伝子は、孵化前には発現が認められず、孵化後に発現が急激に上昇することが分かった。従来の 1 細胞期におけるノックダウン法では、最大でも孵化前後の受精後 7 日目までしか効果は得られない。そのため、この新規遺伝子のノックダウンによる機能解析が困難であるため、孵化後の仔魚でもノックダウン可能な *in vivo* コンディショナルノックダウン法を確立した。その評価の結果、ノックダウン後 3 時間にはノックダウン効果が認められ、成熟 mRNA は 75% 減少した。この方法による、新規遺伝子のノックダウンの結果、淡水群では体液浸透圧に変化はないが、70% 海水群では新規遺伝子ノックダウン群の体液浸透圧は有意に上昇した。海水中で発現する AQP に対してはノックダウン群と対照群で変化は認められなかった。これらの結果から、この新規遺伝子は、短期の海水移行による高浸透圧耐性を上昇させるバリアー機能を有する新規因子であると考えられる。この遺伝子を epithelial salinity tolerance-enhancing factor (eSTEF) と命名した。今後は、eSTEF の被蓋細胞における機能の詳細を明らかにするために、AQP 以外の水透過性およびイオン透過性に関わる細胞間接着分子への影響と、細胞内代謝および細胞骨格への影響を中心に、作用機序の解明を継続する。

<引用文献>

文献 1) Marshall WS and Grosell M, In "The Physiology of Fishes" Ed by DH

Evans, JB Claiborne, pp 177-230, 2006.
文献 2) Chang WJ and Hwang PP, Birth Defects Res C Embryo Today. 93: 205-214, 2011.

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)

宮西 弘、高屋敷 早紀、金子 豊二、広塩性魚における *in vivo* コンディショナルノックダウンを用いた塩類細胞分化機構の解明、月刊海洋、査読無、49 号、2017、202-207
御輿 真穂、宮西 弘、兵藤 晋、総論：海洋生物の適応戦略 - 新規技術・現象からの新展開 -、月刊海洋、査読無、49 号、2017、183-186

Hiroshi Miyanishi, Mayu Inokuchi, Shigenori Nobata, Toyiji Kaneko, Past seawater experience enhances seawater adaptability in medaka, *Oryzias latipes*, Zoological Letters, 2016, Vol. 2, No. 12. 査読有

Jyunpei Shinji, Hiroshi Miyanishi, Hiroki Gotoh, Toyiji Kaneko, Appendage regeneration after autotomy is mediated by BABOON in the crayfish *Procambarus fallax f. virginalis*. Journal of Crustacean Biology. 2016, 36: 649-657. 査読有

Kohei Hosono, Yukiko Kikuchi, Hiroshi Miyanishi, Towako Hiraki-Kajiyama, Akio Takeuchi, Kiyoshi Nakasone, Sayaka Maehiro, Kataaki Okubo, Teleocortin: A novel member of the corticotropin-releasing hormone family in teleost fish. Endocrinology, 2015, 156: 2949-2957. 査読有

[学会発表](計 6 件)

Hiroshi Miyanishi, Taro Watanabe, Susumu Hyodo, Toyoji Kaneko, Identification of a novel epithelial factor enhancing salinity tolerance in Japanese medaka, The 22nd International Congress of Zoology, 2016 年 11 月 14~19 日、「沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)」

宮西 弘、高屋敷 早紀、金子 豊二、広塩性魚における *in vivo* コンディショナルノックダウンを用いた塩類細胞分化機構の解明、東京大学大気海洋研究所共同利用集會、2016 年 9 月 15~16 日、「東京大学大気海洋研究所(千葉県・柏市)」

Soichi Watanabe, Saki Takayashiki, Hiroshi Miyanishi, Toyoji Kaneko, Maintaining mechanisms for hyper-osmoregulatory ionocytes in gills of Mazambique tilapia, 12th International Congress on the Biology of Fish, 2016 年 6

月 12~15 日, 「テキサス(アメリカ合衆国)」
宮西 弘、前田 祥太郎、金子(大谷)
律子、金子 豊二、塩類細胞における
Na⁺/K⁺-ATPase アイソフォームの同定、日本
水産学会春季大会、2015 年 3 月 27~31 日、
「東京海洋大学(東京都・品川区)」

井ノ口 繭、中村 政裕、宮西 弘、益田 玲
爾、金子 豊二、環境水の浸透圧変化に伴う
スズキ鰓塩類細胞の分布変化、日本水産学会
春季大会、2015 年 3 月 27~31 日、「東京海洋
大学(東京都・品川区)」

進士 淳平、宮西 弘、後藤 寛貴、金子 豊
二、淡水性ザリガニ *Procambarus fallax f.*
virginalis の自切後の胸脚の正常な再生はア
クチピン受容体 baboon を介する、日本水産
学会春季大会、2015 年 3 月 27~31 日、「東京
海洋大学(東京都・品川区)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
記載なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮西 弘 (MIYANISHI, Hiroshi)

慶應義塾大学・法学部(日吉)・助教

研究者番号: 30726360