

論文内容の要旨

論文題目 Functional analyses of the natriuretic peptide family in fishes
(魚類におけるナトリウム利尿ペプチドファミリーの機能解析)

氏名 宮西 弘

【目的】

ナトリウム利尿ペプチド(NP)ファミリーは、魚類から哺乳類に至る脊椎動物を通じて体液・循環調節に重要な役割を担うホルモンである。NPファミリーは硬骨魚類条鰭類で最も多様化しており、ANP、BNP、VNPとCNP1-4の7種類が同定されている。ANP、BNPおよびVNPは主に心臓で産生され循環する心臓型NPであり、CNP1-4は主に脳で発現する。しかし、CNP3は心臓型NPの祖先型分子であり、心臓でも発現している。魚類におけるNPファミリーの研究は浸透圧調節作用を中心に行われており、特にANPについては生理学的知見が多く得られている。ウナギを淡水から海水に移行すると、ANPが一過性に血中に放出され、飲水抑制、腸からのNa⁺吸収の阻害により、血漿Na⁺濃度の過剰な上昇を抑制して海水適応を促進することがわかっている。しかし、魚類においてANP以外のNP作用に関する知見は乏しく、近年同定されたBNP、CNP2, 3, 4については全く調べられていない。特にBNPは全ての脊椎動物に共通するNPであり、重要な役割をしていることが予想される。そこで、魚類におけるNPの体液調節、循環調節における役割を個体レベルの生理学的手法と遺伝子工学的手法の両面から明らかにすることを本研究の目的とした。

【結果】

1)ウナギにおけるNPファミリーの浸透圧調節作用の解析

生理学実験の手法が確立しているウナギを用いて、本種で同定されている6種のNPの浸透圧調節作用を明らかにした。その結果、BNP、VNPはANP同様に飲水を抑制し、血漿Na⁺濃度を減少させるホルモンであることがわかった。興味深いことに、CNP3は他のCNPと異なり、海水ウナギで心臓型NPと同様に飲水抑制・血漿Na⁺濃度減少作用があることが新たにわかった。これらの結果から、BNP、VNP、CNP3はANPと同様に海水適応において重要なホルモンである可能性が考えられる。

2)メダカ胚における心臓型NPの機能解析

NPファミリーの機能の全容を明らかにするためには、生体内に「NPがない」状態(loss-of-function)をつくることが重要で、そのためにはNP遺伝子のノックダウンは非常に有効である。しかし、ウナギでは卵の採取・飼育をふくめ、ノックダウン実験は不可能である。メダカはゲノム情報と遺伝子操作技術双方が確立しており、成魚および胚において、淡水・海水両方に適応する塩分

耐性に優れた広塩性魚である。今までに調べられたメダカを含むダツ目では ANP と VNP は同定されておらず、メダカも唯一の心臓ホルモンである BNP と CNP1, 2, 3, 4 しか持たない。したがって、心臓型 NP の機能を調べる上で利点があると考えた。先行研究によりメダカでは NP 受容体が 3 種同定されており、CNP1、CNP2、CNP4 は OLGC1 に特異的に結合し、CNP3 は OLGC2 に BNP は OLGC7 に結合することがわかっている。OLGC2 および OLGC7 はともに哺乳類における心臓型 NP の受容体である NPR-A のホモログである。よって、ウナギを用いた NP 投与実験の結果も含めて考えると、メダカでは BNP および CNP3 が NPR-A タイプの受容体を介して、心臓型 NP として働いていると考えられるため、BNP と CNP3 の 2 種に絞って解析を行った。

2-1) 心臓型 NP の発生段階における発現動態

遺伝子ノックダウン実験は胚を用いるため、まず発生段階における NP ファミリーの発現動態を調べる必要があった。リアルタイム PCR により、BNP、CNP3 および各受容体の初期胚における発現変化を淡水群および海水群で調べ、さらに、受精 5 日胚の心房および心室を摘出し、各組織における NP および受容体遺伝子の発現を RT-PCR により調べた。その結果、BNP は淡水群・海水群ともに心室の形成が開始される受精 48 時間で発現が急激に上昇し、その後一定の高い発現を示し、心房よりも心室で強く発現が確認された。CNP3 は淡水群・海水群ともに心臓原基の形成が開始される受精 35 時間で発現が一時的に上昇し、心房・心室それぞれで発現が確認できた。OLGC2 および OLGC7 の発現は NP よりも早く、発生初期から発現が確認された。CNP3 受容体である OLGC2 は心室よりも心房で強く発現し、BNP 受容体の OLGC7 は心房、心室でともに強く発現が確認された。さらにホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) により、BNP は心室のみに強いシグナルが見られ、OLGC7 は尾動脈でシグナルが見られた。CNP3 および OLGC2 は ISH では一部の静脈にシグナルが見られた。

2-2) 心臓型 NP 遺伝子ノックダウンによる心臓形成への作用

gripNA を用いて NP ノックダウンにより心臓型 NP の機能解析を行った。BNP および CNP3 のアンチセンスオリゴをマイクロインジェクションにより受精卵の細胞質へ注入し、NP 遺伝子をノックダウンした後、淡水および海水へ直接移行して観察を行った。アンチセンスオリゴの配列は翻訳領域中にあるイントロンとエクソンを含むように設計しているため、RT-PCR で成熟 mRNA へのスプライシングの障害の有無によりノックダウンの効率を確認すると共に特異的な抗体を用いた免疫組織化学でも確認した。その結果、ノックダウンの効率は約 50% 程度であった。BNP 遺伝子のみをノックダウンしても、特異的なフェノタイプは確認されなかった。BNP は

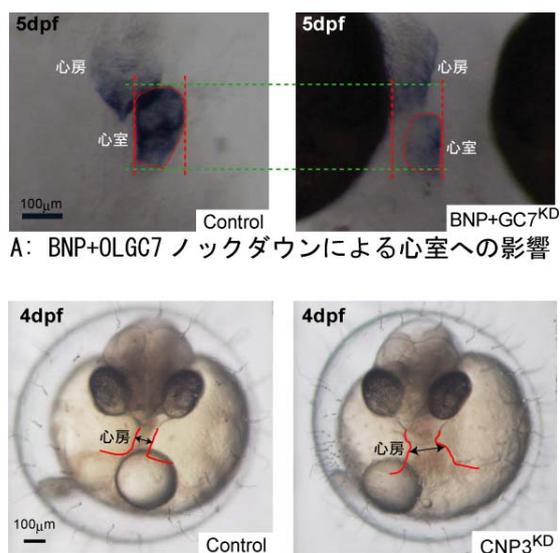


図 1 心臓型 NP ノックダウンにおける心臓形成への影響

発現が高く、ノックダウンが十分ではない可能性が考えられたため、その受容体 *OLGC7* とのダブルノックダウンを行ったところ、心室が縮小し正常に心室形成が行われなかったことがわかった(図1-A)。心房の幅および心室の面積を測定したところ、心房への影響はないが、心室はアンチセンスの濃度依存的に縮小した。一方、*CNP3* は心室への影響は見られないが、心房の拡張がみられた(図1-B)。さらに、心肥大に関与するアンギオテンシノゲン(*AGT*)およびエンドセリン1(*EDN1*)の関与を調べたところ、心房の肥大を顕著に引き起こす *CNP3* 遺伝子ノックダウン群で *AGT* 遺伝子の発現が有意に上昇し、*EDN1* 遺伝子も同様に上昇傾向がみられた。ゆえに、*CNP3* 遺伝子ノックダウンにおける心房の肥大はレニン-アンギオテンシン系を介する可能性が示唆された。しかし、*BNP/OLGC* ノックダウン群では、対照群と比べて差は見られなかった。以上の結果から、心室で強く発現し、心室形成が始まる発生段階で発現が上昇する *BNP* は受容体 *OLGC7* を介して心室形成に関わり、心臓形成が始まる発生段階で発現が上昇する *CNP3* は心房で強く発現する受容体 *OLGC2* を介して心房形成に関わることが強く示唆された。哺乳類では *ANP* が心房ホルモンとして確立されており、*ANP* を消失したメダカでは、心臓型 NP の祖先分子である *CNP3* がその役割も担うようになったと考えられる。

3) 心臓型 NP の初期胚における浸透圧調節作用の解析

心臓型 NP の主要な作用である浸透圧調節へのノックダウンの影響を調べるために、胚全体の浸透圧(細胞内液+細胞外液)を測定した。その結果、*BNP/OLGC7* および *CNP3* ノックダウン行くと、淡水群では影響はないが、海水群では浸透圧が有意に上昇した(図2)。そこで、心臓型 NP が胚の浸透圧調節にどのように関与するかを調べた。まず塩類細胞における *NaCl* 排出への影響を調べたが、心臓型 NP 遺伝子のノックダウンは塩分排出に必須なイオン輸送体(Na^+ , K^+ -ATPase, Na^+ , K^+ , 2Cl^- 共輸送体, CFTR 型 Cl^- チャネル)の発現には影響しなかった。次に飲水を行わない胚の水の獲得には代謝水が重要で、さらに代謝により得られる ATP はイオン輸送体の活性に関わるため、異なる基質代謝系の主な酵素(ホスホフルクトキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、グルタミン酸脱水素酵素、アシル CoA 脱水素酵素、クエン酸シンターゼ)遺伝子の発現を調べたが、ノックダウンの影響はみられなかった。

そこで、血流の速度と浸透圧の相関を調べたところ、ノックダウン群では血液の流速と浸透圧に強い相関が見られた。さらに、心筋に特異的な ATP 阻害剤である 2,3-butanedione monoxime を用いて血流を遅くすると、海水群の正常胚の浸透圧が有意に上昇した。以上の結果より、正常な浸透圧の維持には正常な血流が必須であり、心臓型 NP ノックダウンによる浸透圧の上昇は、血液循環の抑制が要因であることが示唆された。つまり、心臓型 NP ノックダウンによる心臓形成異常により血流が阻害され、卵黄囊膜にある塩類細胞からのイオン排出効率が低下すると共に卵黄の代謝

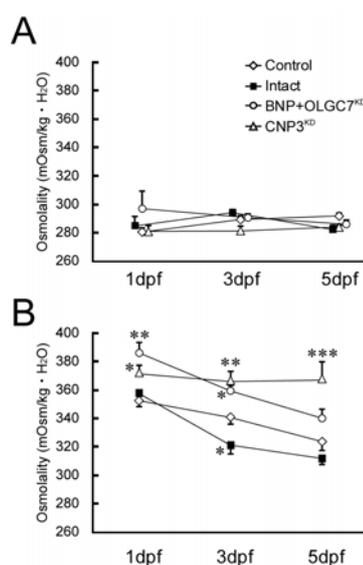


図2 心臓型 NP ノックダウンの胚浸透圧への影響。A,淡水群; B,海水群

による水の産生が減少することで胚の浸透圧が上昇すると考えられる。

図2にみられるように、CNP3 ノックダウン群でのみ発生が進んでも胚の浸透圧が低下しない。そこで胚の水分含有量を調べたところ、CNP3 ノックダウン群は顕著な脱水が認められた。そこで、胚の水透過性に重要である aquaporin(AQP)をゲノムデータベースから同定し、その発現を調べたところ、海水メダカ初期胚では AQP1, 3, 4, 8, 9, 10b が発現していた。さらに、CNP3 ノックダウン群ではこのうち AQP3, 4, 9 の発現が有意に上昇していたが、対照群や BNP/OLGC7 ノックダウン群では上昇が見られなかった。つまり、水透過性が CNP3 ノックダウン群では上昇するため脱水が亢進し、浸透圧上昇を促進していると考えられる。このように、NP は循環調節により浸透圧調節に関わるだけでなく、輸送体遺伝子(水チャネル)の発現も調節していることがわかった。

【まとめ】

本研究における第1の発見は、心臓型 NP の祖先分子である CNP3 がウナギで ANP, BNP, VNP と同様の浸透圧調節作用を持ち、ANP と VNP が消失したメダカでは BNP と異なる心臓型 NP の受容体に作用して ANP の役割を担っていることが明らかになった点である。CNP3 の ANP 機能を示す例として、メダカ BNP は心室形成に重要であるが、CNP3 は心房形成に重要なホルモンである。第2の発見は、BNP と CNP3 は初期胚において循環系を維持することにより海水適応に重要な役割を果たすと共に、水チャネルによる水透過性の調節を通して体を脱水から守っていることが示唆された。ウナギにおける NP 投与実験と合わせて考えると、心臓型 NP は魚類において循環調節および浸透圧調節に深く関わることにより、広い塩分耐性(広塩性)に重要なホルモンであることが明らかになった。