

論文審査の結果の要旨

氏名 宮 西 弘

- ・ 本論文の基本構成は、Abstract, General Introduction、Chapter 1～3、および General Discussion の 6 部からなる。本論文の特色および新規性は、(1) 魚類で多様化しているナトリウム利尿ペプチドファミリー (ANP, BNP, VNP, CNP1～4) の全ての分子を用いて浸透圧調節作用をウナギを用いて比較検討した結果、心臓で産生され循環ホルモンとして機能している ANP, BNP, VNP、およびこれら心臓ホルモンの直接の祖先分子である CNP3 が浸透圧調節作用が強いことを初めて明らかにしたこと、(2) 心臓ホルモンとして BNP しかもたないメダカを用いて、BNP および CNP3 遺伝子を魚類で初めてノックダウンしたところ、心臓の形成に異常が見られることを脊椎動物で初めて見つけたこと、および(3) BNP および CNP3 遺伝子をノックダウンされた胚を海水中で飼育すると対照群と比較して体液浸透圧が上昇するが、その原因が心臓形成の不全による循環障害により塩類細胞による塩分排出と代謝水の産生が十分でないこと、および水チャネルの発現が抑制されないため脱水が起こることによることを明らかにしたことにある。

浸透圧調節などのホメオスタシスをともなう調節には、ホルモンが重要な役割を果している。鰓の呼吸上皮(単層)を介して環境水と体液が接している魚類では、陸上動物よりもさらに環境の影響を受けやすい。ウナギやメダカのような広塩性魚とよばれる魚種は、水やイオンの調節が逆転する淡水と海水双方によく適応できる。この広塩性魚のもつ素晴らしい能力に内分泌系が関与していることは疑いないが、まだ主要なホルモンは十分に解明されていない。申請者が属する研究室で、心房性ナトリウム利尿ペプチド(Atrial Natriuretic Peptide, ANP)をウナギに投与すると、強力に海水適応を促進することが報告された。その後、魚類では哺乳類と比較してナトリウム利尿ペプチドが多様化していることが明らかになった。そこで、申請者は多様化したナトリウム利尿ペプチドファミリーの作用を決定するため、遺伝子工学の手法を用いてそれぞれの遺伝子をノックダウンしてその影響を調べることにした。

まず Chapter 1 において、ウナギに多様化したホルモンを投与して、飲水、血漿ナトリウム濃度(血漿浸透圧変化のマーカー)およびヘマトクリット(血液量変化のマーカー)に対する作用を比較した。その結果、ANP だけではなく、心臓ホルモンである BNP や VNP も同様に海水環境への適応促進作用をもつことがわかった。心臓ホルモンである ANP, BNP, VNP は同一染色体上に存在するが、より起源が古い CNP3 も同一染色体上にあるため、これら心臓型 NP は CNP3 から縦列重複により発生したと考えられている。興味あることに、CNP3 も他の CNP とは異なり、弱いウナギにおいて浸透圧調節作用をもつことを明らかにした。

Chapter1 において心臓ホルモンのみが浸透圧調節作用を示したため、Chapter2

では心臓ホルモンとしてBNPしか持たないメダカでBNPとその祖先分子であるCNP3遺伝子のノックダウンを試みた。しかし、ノックダウンの効率が50%程度であったため、心臓における発現量が少ないCNP3ではノックダウンによって心房が肥大して循環が抑制されたが、BNP遺伝子は心臓で大量に発現しているため、単独のノックダウンでは表現型に異常が見られなかった。そこでBNPの受容体も同時にノックダウンしたところ、心室の発達が抑制された。マウスでANPやBNPをノックアウトしても心臓の発生に明らかな影響が見られないことから、魚類を用いることにより心臓型ナトリウム利尿ペプチドが心臓形成に重要であることが明らかにされた。

Chapter 3では、ノックダウンによる浸透圧調節への影響を調べるため、発生段階にある胚の体液浸透圧を測定した。その結果、淡水中で発生させた胚では対照群と差がなかったが、海水中で発生させた胚では対照群と比較して体液浸透圧が高かった。その原因を明らかにするため、(1)塩分の排出に関与している塩類細胞のイオン輸送体の関与、(2)代謝水の産生に関与する代謝酵素の関与、(3)心臓の形成異常による血液循環不全の関与、を調べたところ、(3)が主要な原因であることがわかった。さらに、CNP3ノックダウン胚では対照群と比較すると高い体液浸透圧が発生後期でも持続するが、その原因は海水で発生させた胚で水チャネルであるアクアポリン3、4、9の発現が減少しないためであることがわかった。このように、BNPやCNP3遺伝子をノックダウンすることによりこれらの遺伝子が魚類の海水適応に重要な役割をもつことを初めて明らかにした。

なお、本論文の実験は全て論文提出者本人が行い分析したものであり、本論文の全ての研究において論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。