

論文の内容の要旨

Urea-based body fluid regulation in cartilaginous fish: studies on the physiological mechanisms and regulation by environmental and endocrine factors

(軟骨魚類における尿素を用いた体液調節機構とその制御に関する研究)

山口 陽子

38億年前に生命が誕生して以来、水は生物の生存にとって最も重要な要因の一つである。海水から淡水、陸上にいたるまで、地球上の様々な環境に適応するために、脊椎動物は優れた体液調節機構を発達させてきた。硬骨魚類から我々ヒトに至るまで、多くの脊椎動物は体液のイオン組成および浸透圧を海水の約1/3に維持している。これは体内の恒常性を維持する優れた仕組みであるが、海生の種においては高浸透圧環境による脱水の危機をもたらす。硬骨魚真骨類は、大量の海水を飲んで水分を補給し、過剰な塩分を鰓から排出することで対処する。これに対して、海生の軟骨魚類は全く異なる戦略をとる。彼らは体液中のイオン組成を海水の約半分に保つ一方で、浸透圧調節物質として大量の窒素化合物を蓄積している。その結果、体液浸透圧は海水よりわずかに高張に保たれており、海水中でも脱水されることなく体内に水分を保持できる。海生軟骨魚類においては、尿素が主要な浸透圧調節物質であり、体液浸透圧の1/3から1/2を占める。そのため、体内の尿素濃度を制御することは、軟骨魚類が海洋環境に適応する上で、生理学的に最も重要な機構だと言える。しかしながら硬骨魚類と比較して軟骨魚類の研究は極めて遅れており、体液調節機構に関する知見も断片的なものに留まっている。私は博士課程において軟骨魚類の尿素制御機構の全体像を明らかにすることを目的とし、尿素を合成および保持するシステム、さらにそれらの調節に関して研究を行った。

第一章では、腎臓での尿素再吸収系を対象とした。尿素は鰓から漏出するほか、腎臓から尿として環境中に排出されるが、損失を最小限に抑えるため、軟骨魚類は特殊な仕組み

を発達させてきた。脊椎動物の腎臓では、尿素を含む血漿成分はいったん糸球体で濾過された後、尿細管で必要に応じて再吸収される。哺乳類の腎臓を構成する腎単位（ネフロン）はヘンレのループを含む 2 回ループ構造であるが、海生軟骨魚類のネフロンは特殊な 4 回ループ構造をとり、濾過された尿素の 90%以上を再吸収して体内に戻ることが知られている。ドチザメでは、この 4 回ループネフロンの最終分節である集合細管のみに尿素特異的な輸送体(UT)が局在し、尿素再吸収部位と予測されているが、その仕組みは不明である。そこで、ドチザメを異なる塩分環境に移行することで人為的に体内尿素濃度を変動させ、その際の UT の動態を解析した。ドチザメを低濃度または高濃度海水に移行すると、体内尿素濃度は外環境にあわせて低下および上昇した。しかし、腎臓の UT mRNA 量には実験群間で変化は見られなかった。一方、UT の染色性には明らかな差異が認められた。そこで蛍光抗体と共焦点顕微鏡を用いて UT のシグナルを半定量的に解析すると、低濃度海水中ではシグナルが減少し、特に管腔膜上のシグナルがほぼ消失した。これに対して、高濃度海水中では管腔膜上のシグナルは上昇傾向にあった。UT シグナルの変動が生理的に調節されているのか否かを確かめるため、ドチザメを一旦低濃度海水に馴致させてから通常海水に戻す実験を行ったところ、戻し群では管腔膜上の UT シグナルはコントロール群と同じレベルまで回復し、UT のシグナル強度は血中の尿素濃度と高い相関を示した。これらの結果から、ドチザメの腎臓では、集合細管の管腔膜における UT 存在量が外環境浸透圧に依存して変化し、尿素再吸収量を調節していることが示唆された。このことは、集合細管が尿素再吸収の場であることを強く支持する。哺乳類の腎臓では、神経葉ホルモンのバソプレシンが水と尿素の再吸収に関わる。そこでバソトシン（バソプレシンのホモログ）の血中濃度を測定したところ、管腔膜上の UT シグナル量と相関が見られた。すなわち、哺乳類と同様、ドチザメでも UT の局在変化に神経葉ホルモンが関与する可能性が示された。

第二章では、第一章で使用したドチザメ個体で尿素合成系の変動を解析した。尿素は窒素代謝の最終産物としてオルニチン尿素回路(OUC)でアンモニアから合成される。哺乳類では肝臓が主要な尿素産生部位であるが、魚類では近年、肝臓以外の組織でも OUC の存在が示されている。魚類 OUC の律速酵素であるカルバミルリン酸合成酵素(CPS) III について mRNA の組織分布を調べたところ、肝臓と筋肉で高い発現が見られた。CPSIII の酵素活性でも筋肉は高い値を示し、個体あたりの組織重量を考慮すると、尿素産生能は肝臓の 3.6~17.3 倍と推定された。筋肉の CPSIII mRNA は低濃度海水中で減少し、血中尿素濃度の変化と一致した。しかし、減少した mRNA 量は戻し移行実験でも回復しなかった。これらの結果は CPSIII の酵素活性でも同様であった。上記の戻し移行実験では、血中尿素濃度はコントロール群の 60%程度までしか回復していない。これは実験中ドチザメを絶食させていたことと、通常海水に戻してから馴致期間が短いことが原因と考えた。そこで、ドチザメに餌を与えながら長期の戻し移行実験を行い、再度 CPSIII mRNA と酵素活性を測定したが、やはりコントロールの水準には回復しなかった。一方で、筋肉と肝臓の両方で、OUC にアンモニアを取り込むグルタミン合成酵素(GS)の活性が上昇し、尿素合成が促進されているこ

とが示唆された。以上の結果から、ドチザメでは筋肉が主要な尿素産生部位であり、海水濃度変化に伴って尿素産生量が調節されることがわかった。肝臓については、尿素合成量の基礎レベルを維持するのが主要な役割なのかもしれない。さらに本研究では、ドチザメの鰓にも CPSIII mRNA の発現が確認された。先行研究から、軟骨魚類の鰓は尿素に加えてアンモニアの透過性も低いことが知られており、その理由として鰓での尿素産生の可能性が議論されてきた。すなわち、鰓に存在する OUC がアンモニアをトラップして尿素に変換し、体内に戻すという仮説であり、今回の結果はこれを証明した。鰓の CPSIII mRNA 量は筋肉や肝臓と比較すると少ないため、鰓は体内尿素量の変動には直接関与しないと考えられるが、限られた窒素源を有効に活用して、体内尿素濃度を維持するために重要な役割を果たすことが示唆される。

第三章では、特に腎臓での尿素再吸収系の調節因子としてバソトシンに着目し、その受容体を同定し、発現部位を調べた。脊椎動物の神経葉ホルモンはバソプレシン属とオキシトシン属に大別され、複数の異なる G タンパク質共役型受容体を介して機能する。現在までに 3 種類のバソプレシン受容体 (V1aR、V1bR、V2R) と 1 種類のオキシトシン受容体 (OTR) が知られており、それぞれ血管での昇圧効果や肝臓での糖新生、下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモンの分泌促進、腎臓での水・尿素再吸収の促進、子宮収縮や乳汁射出などに関わる。このうち V1aR、V1bR および OTR が細胞内の PLC/PKC 経路とカップルして細胞内 Ca 濃度を上昇させるのに対して、V2R は AC/PKA 経路を介して細胞内 cAMP 濃度を上昇させる。これら 4 種類の受容体は両生類にも存在するほか、硬骨魚類でも V1bR を除く 3 種類の受容体を確認されている。中でも V2R は哺乳類の腎臓で水と尿素の再吸収を制御することから、軟骨魚類に存在するかどうか注目される。しかし、現在に至るまで軟骨魚類の受容体に関しては一切報告がない。そこで、軟骨魚類で唯一ゲノムデータが公開されているゾウギンザメを研究モデルとして神経葉ホルモン受容体のクローニングを行ったところ、V1aR、V1bR および OTR に加え、新規の受容体を発見した。この受容体は V2R に高い配列相同性を示すものの、細胞内情報伝達には V2R が用いる cAMP ではなく、V1aR や V1bR と同様に Ca²⁺を用いる。相同な受容体は条鰭類のメダカとクマノミからも同定され、やはり細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させた。またゲノムデータベース検索から、新規受容体が他の真骨魚類、両生類、鳥類、哺乳類にも存在することを見出した。分子系統解析とシクニ解析の結果、新規受容体が既知 4 種類の神経葉ホルモン受容体とは独立した群を形成することがわかり、私はこれを V1cR と命名した。V1cR はさらに、魚類特異的な type-1 (V1cR1) と、主に四肢動物に存在する type-2 (V1cR2) に分けられた。ゾウギンザメは機能的な V1cR1 のほかに、偽遺伝子化した V1cR2 遺伝子を有する。同様にゼブラフィッシュなどでも type-1 と type-2 の両方の遺伝子が見つかることから、V1cR 遺伝子が進化の初期に重複したことがわかった。哺乳類ではオポッサムに偽遺伝子化した V1cR2 遺伝子が存在し、その他の種では存在を確認できないことから、V1cR は哺乳類では機能を喪失していると考えられる。V1cR はゾウギンザメとメダカの腎臓で発現が見られ、腎機能制御に関わる可能性

がある。また、ゾウギンザメの下垂体では、四肢動物で ACTH 分泌に関わる V1bR に加えて V1aR も発現していた。V1aR が下垂体で発現する例はこれまでに報告がなく、バソトシンが下垂体において未知の重要な機能を担う可能性がある。ゾウギンザメゲノムからは既知 V2R に相同な受容体は発見できなかったが、以上の結果から、神経葉ホルモンが軟骨魚類の体液調節に直接的または間接的に関与する可能性が示唆された。

本研究により、軟骨魚類の体内では、肝臓、筋肉、腎臓、鰓といった多くの器官が尿素の合成や保持に関わり、それらが複雑に連携して働くことで、環境に応じて体内尿素濃度を高度に調節していることが明らかとなった。