

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Regulation of drinking behavior in the amphibious mudskipper

(両生魚トビハゼにおける飲水制御機構の行動生理学的研究)

氏名 片山 侑駿

生物にとって、体内環境を一定に保つことは、生命維持に必要不可欠である。現存するほとんどの脊椎動物の体液浸透圧は海水の約1/3であり、乾燥した陸上や浸透圧の高い海水中では脱水にさらされるため、飲水によって水を積極的に取り込むことが必要不可欠である。特に、陸生四肢動物においては、この飲水行動を発現させるために渇きという感覚が重要であることが知られている。四肢動物の「渇き」は、水を探して移動したのちに飲むという行動を動機づける情動と定義され、二つのメカニズムに大別される。一つには、脱水にともなう体液浸透圧の上昇や血中アンジオテンシンII (AngII) の増加が終板器官などの前脳の脳室周囲器官によって感知され、渇きが惹起される。これらの血液由来の情報によっておこる渇きは、体内の全身的な脱水 (general dehydration) に由来することから、general thirstと呼ばれる。一方、口腔や咽頭の乾燥などによっても渇きがおこるが、これは末梢の局所的な感覚 (local sensation) に由来することから、local thirstと呼ばれる。このように、渇きは全身性の血液由来の情報と局所的な神経性の情報が前脳の中枢において統合されることで制御される。では、陸生適応に重要となる渇きは、四肢動物の系統においてのみ獲得

されたのであろうか。水生の魚類では常に口腔内に水があり、索水行動なしに嚥下反射のみで飲水できるため、渇きは必要でないと考えられてきた。実際、ウナギでは AngII などの飲水調節ホルモンが延髄の嚥下中枢に直接作用し、飲水を制御することが示唆されており、魚類の飲水行動に関わる前脳領域は発見されていない。

しかしながら、陸上への進出は四肢動物の系統特有のものではなく、条鰭類の系統においても進化的に何度か起こっている。トビハゼは陸上生活に適応した真骨類の一種で、塩分変化の激しい潮間帯に生息する両生魚である。トビハゼは、水中よりも陸上に長く滞在するため、飲水に際して水場への移動が必要であり、四肢動物と同様に水場への移動を動機付ける渇きのメカニズムを持つのではないかと考えられる。そこで私は、トビハゼの飲水制御機構を明らかにし、水生魚類および哺乳類での知見と比較することにより、脊椎動物の陸生化にともなう飲水行動制御機構の進化を明らかにすることを目的として博士課程の研究を行った。

### 【第1章-1：AngIIによるトビハゼ飲水行動の促進】

AngII は、これまで研究されたほぼ全ての海産魚と四肢動物において飲水促進作用が認められており、脊椎動物に共通する強力な飲水促進ホルモンである。そこで AngII をトビハゼの脳室内に投与したところ、水陸選択行動における水中滞在時間が増加するとともに、飲水量が増加した。先行研究から、哺乳類で AngII の受容に関わる終板器官に相当する領域がトビハゼの前脳においても特定されている。よって、トビハゼの AngII は、水生魚類の標的器官として知られる延髄最後野に加えて、終板器官様領域にも作用し、飲水行動を惹起する可能性を考えた。しかし、トビハゼ脳から AngII の 1 型受容体をクローニングし、*in situ* hybridization を行ったところ、延髄最後野を含む多くの部位でシグナルが観察されたものの、終板器官様領域では検出されなかった。さらに、トビハゼ脳室内に AngII を投与した後、神経活動のマーカーとなる c-Fos の免疫組織化学染色を行ったところ、延髄最後野では神経活動の上昇が見られたが、前脳の終板器官様領域では認められなかった。これらのことから、哺乳類とは異なり、トビハゼ脳の AngII 受容部位は嚥下中枢である延髄最後野が中心であり、AngII の直接作用は嚥下を促進することだと考えられた。

### 【第1章-2：ナトリウム利尿ペプチドによるトビハゼ飲水行動の抑制】

哺乳類において、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は脳室周囲器官を介して前脳に作用し、AngII と拮抗的に「渇き」を抑制する。そこで、ANP および B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) を脳室内投与したところ、BNP は飲水行動を変化させなかった

が、ANP は弱いながらも飲水行動を抑制した。また、ANP を AngII と同時に投与したところ、AngII による飲水量の増加は拮抗的に抑えられた。さらに ANP と AngII を脳室内に同時投与した後、延髄最後野において c-Fos の免疫組織化学染色を行ったところ、AngII による神経活動の上昇を抑えることもわかった。すなわち、ANP も AngII と同様に延髄最後野に作用して飲水を制御することが示唆された。これらの結果は水生魚類であるウナギでの知見と一致しており、常に水中にいるかどうかに関わらず、真骨類における AngII や ANP の脳内作用部位は、嚥下中枢の延髄最後野である。第 1 章の第 1 節と合わせ、トビハゼの飲水制御機構において AngII や ANP の前脳脳室周囲器官に対する直接作用が見つからなかったことから、general thirst の機構は存在しないことが示唆された。

### 【第 2 章：口腔内に存在する水が水陸選択行動に与える影響の行動学的解析】

General thirst の機構が見つからなかったにもかかわらず、なぜ AngII は水中への移動を惹起したのだろうか。トビハゼは陸上でも常に口の中に水を保持することが知られており、陸上での嚥下にとまらう口腔内の水の減少が水中への移動を惹起したのではないかと考えた。AngII を脳室内投与し、水槽内の水を完全に排水した後も飲水量の増加が確認できたことから、トビハゼは口腔内に保持した水を AngII の作用で飲むことがわかった。さらに、鰓蓋に穴を開ける処理を行うこと、または口腔・鰓腔内に吸湿用のゲルを挿入することにより、口腔内の水の減少を人為的に再現した。その結果、トビハゼの水中への移動が有意に促進された。造影剤により口腔内の水の挙動を可視化したところ、口腔内に水がないときには、直ちに水場へ移動して口に水を含む様子も観察された。以上の結果から、陸上滞在時に血中 AngII 濃度が増加すると、延髄を介して嚥下を促進することで口腔内の水がなくなり、この刺激が求心性の神経によって知覚されることで、トビハゼは水中へ移動して口腔内に水を含む行動（吸水行動）を起こすことが示唆された。この口腔の乾燥による水中への移動は、哺乳類の local thirst のように、局所的な神経性の情報に依拠した制御であると考えられる。

### 【第 3 章：吸水行動ならびに塩分欲求の制御機構】

第 2 章により、口腔内に未知の受容器が存在して水の存在を感知することが示唆された。トビハゼを塩分選択水槽に置くと、淡水を避けるなど特定の環境塩分を好むことがわかっており、口腔内の受容器がこの嗜好性に関与する可能性も考えられる。そこで、淡水、1/3 海水、2/3 海水、海水の 4 種類の水を自由に口に含めるような水槽を用意し、トビハゼの塩分選択行動を定量化する実験系を確立した。AngII の脳室内投与により塩

分嗜好性は高まる一方で、ANP の脳室内投与は塩分嗜好性に有意な変化を示さなかったものの、吸水回数が増加した。これらの作用機序ならびに行動変化の生理学的意義についてはさらなる解析が必要だが、口腔内の未知の受容器が、塩分嗜好性に関わるイオンなどの受容や、local thirst に関わる水の受容に重要な役割を担うことが示唆された。

### 【総合考察：脊椎動物における渇きの進化】

本論文では、トビハゼの飲水行動制御機構を調べ、1) AngII や ANP が延髄を介して嚥下反射を調節すること、2) 陸上で嚥下が起こることにより口腔内の水が減少し、その結果として生じる口腔の乾燥が水中への移動を惹起すること、3) 口腔内の未知の受容器が口腔内の乾燥や浸透圧情報を受容することが示唆された。以上の結果から、AngII や ANP が前脳に直接作用することによる general thirst の機構は真骨類には存在せず、四肢動物の進化の過程で獲得されたものであると考えられた。一方、口腔の乾燥が渇きを惹起する local thirst の機構が四肢動物とトビハゼという異なる系統に存在することが明らかになった。この local thirst の生理学的意義として、脱水が起こる前の予防的な飲水行動の制御に関わるものが、哺乳類において示されている。この現象は「予期的な渇き」と呼ばれており、体液恒常性の維持に補助的に関わるが、ホルモンなど体内環境の変化に起因する general thirst よりも迅速に環境変化に対応できるという点で、生物の環境適応に極めて重要である。また、水生魚類のウナギにおいても、口腔内で塩化物イオン濃度の上昇を求心性の迷走神経によって感知すると即座に飲水が起こるが、これは海水による脱水を「予期」した飲水といえる。水生魚類の飲水は、飲水に際しての移動、ひいては前脳を介する動機づけを必ずしも必要としないことから、前述の定義上「渇き」が存在するかは未だ明らかでないが、口腔内で乾燥やイオン強度の変化を感知するメカニズムは水生から陸生までの脊椎動物に広く保存されており、脊椎動物が生息域を拡大するにあたって重要な役割を果たしてきたのであろう。