

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成28年度博士課程進学

今関到

指導教員 兵藤晋

論文題目

Studies on the kidney function in environmental adaptation of euryhaline bull shark, *Carcharhinus leucas*

(広塩性軟骨魚オオメジロザメの環境適応における腎機能の研究)

軟骨魚類は、現生の脊椎動物顎口類のなかで最も早く分岐した分類群であり、約1200種が確認されている。サメやエイを含む板鰓類とギンザメを含む全頭類に分けられ、板鰓類の95%および全ての全頭類が海生種である。海洋生態系の頂点捕食者として重要な動物群である一方で、乱獲や環境変化による個体数の減少は著しく、30%以上の板鰓類が絶滅危惧種あるいは準絶滅危惧種に指定されていることから、軟骨魚類の生理・生態の理解は喫緊の課題である。軟骨魚類は、海という高浸透圧環境に適応するためのメカニズムもユニークであり、体内に高濃度の尿素を蓄積することで体液浸透圧を海水よりわずかに高く保ち、脱水から免れている。このことは、飲水と鰓からの塩の排出により海水の約1/3の体液浸透圧を保つ海生真骨魚類とは大きく異なる。尿素による体液調節を行うため、軟骨魚類の体液調節器官は独自の進化を遂げてきた。たとえば海生種の腎臓は4回のループを含む複雑なネフロン構造を持つことが知られ、これにより尿の生成過程で90%以上もの尿素を再吸収する。

前述の通り、ほとんどの軟骨魚類は海生種であるが、板鰓類の約5%の種は淡水域にも生息することが知られている。オオメジロザメ (*Carcharhinus leucas*) はサメ類の中でほぼ唯一の広塩性種であり、その生活史の中で海水域と淡水域を行き来すると考えられている。オオメジロザメは海水中では他の海生種と同様に尿素を利用した体液調節を行う一方で、淡水に進入しても高濃度のイオンと尿素を保持するため、その体液浸透圧は600 mOsm以上であり、これは真骨魚の約2倍という高い値である。淡水環境のみに生息するポタモトリゴン属の淡水エイが尿素を持たず、真骨魚と同様の体液組成を持つことから、オオメジロザメをはじめとする広塩性板鰓類の体液組

成が、いかに特殊であるかがわかる。淡水環境下では体内外の大きな浸透圧差により、水の流入と塩や尿素の喪失が問題となるが、どのような仕組みにより淡水環境に適応できるのか、そのメカニズムはほとんどわかっていない。広塩性のメカニズムの解明は、軟骨魚類の体液調節機構の理解とともに、板鰓類の生息環境の拡大という観点からも重要である。

淡水環境では浸透圧差により体内に水が流入するが、これを排出できる唯一の器官が腎臓である。軟骨魚の腎臓は、海水中では過剰なイオンの排出と尿素の保持に関わるが、淡水中ではイオンや尿素を保持しながら大量の水を排出しなければならない。すなわち、淡水環境への移行により機能が大きく変化すると考えた。そこで腎臓に注目し、第一章ではオオメジロザメを淡水移行させたときに発現が変化する遺伝子を網羅的に探索し、特に 3 つの分子に注目して広塩性のメカニズムの解析を行った。第二章では、西表島の浦内川で捕獲調査と河川環境調査を行い、第一章で見出したメカニズムが実際の河川環境でもはたらいっているかどうかを確かめた。

第一章第一節 オオメジロザメの広塩性に寄与する遺伝子の網羅的探索と機能解析 1 ; Na⁺-Cl⁻ 共輸送体は本種の淡水適応に重要な分子である

美ら海水族館で実施した淡水移行実験の結果、オオメジロザメが淡水中でも高濃度の NaCl と尿素を保持し続けることが確認された。アトランティックスティングレイ (*Hypanus sabina*) における先行研究で測定された糸球体濾過量と尿量を参考に、今回のオオメジロザメのネフロンにおける再吸収量を計算した結果、淡水移行により NaCl の再吸収量が少なくとも 1.5 倍に増加したことが示唆された。理化学研究所と共同で行った RNA-sequencing により、淡水への移行により発現が増加した遺伝子を 138 種類見出した。それらの中から、物質輸送に重要な膜輸送体である溶質輸送体 (slc) ファミリーに注目したところ、Na⁺-Cl⁻ 共輸送体 (slc12a3, NCC) の発現が淡水個体の腎臓で大きく上昇することを見出した。NCC の発現は、淡水個体のネフロンの遠位尿細管後部 (LDT) と集合細管 (CT) に検出され、海水個体ではその発現は非常に低かった。NCC は LDT を構成する細胞の頂端膜に局在し、NaCl 輸送の駆動力を生み出す Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) の発現が同一細胞に認められたことから、淡水環境への移行により NCC が特に LDT において NaCl の再吸収を行うようになることがわかった。一方で、移行に伴う NCC と NKA の発現上昇は、尿素再吸収の場と考えられている CT においても観察された。現在提唱されているモデルでは、尿素再吸収の第一段階として NaCl の再吸収が必要と考えられており、CT における NCC と NKA の発現上昇は、NaCl の保持だけでなく、尿素の保持にとっても重要だと考えている。このような NCC をはじめとする発現量ならびに発現領域の変化は、狭塩性種であるドチザメ (*Triakis scyllium*) を希釈海水に移行させた時には見出されず、NCC は LDT 終端部という限られた領域に弱い発現が認め

られるだけであった。以上の結果から、オオメジロザメ腎ネフロン LDT と CT は、淡水環境への移行により NaCl ならびに尿素の再吸収を亢進し、オオメジロザメの広塩性に重要な役割を果たすことが示唆された。そして、このメカニズムにおいて NCC が鍵となる分子であることが明らかとなった。

第一章第二節 オオメジロザメの広塩性に寄与する遺伝子の網羅的探索と機能解析 2 ; 淡水移行個体の腎臓における上皮性 Na⁺チャネル mRNA の発現

哺乳類の腎ネフロンにおいて、NCC は遠位部において上皮性 Na⁺チャネル (ENaC) とともに発現することが知られている。RNA-sequencing の結果からは、発現が上昇した遺伝子の中に ENaC は存在しなかったが、定量 PCR による解析では淡水移行により発現が有意に上昇することがわかった。ENaC は α , β , γ という 3 つのサブユニットから構成されており、Na⁺輸送活性を有する ENaC α は海水個体では CT の前半部にのみ発現し、LDT での発現は極めて弱かった。淡水移行により ENaC α は LDT 全体に強く発現し、CT の後半にも発現するようになった。輸送活性の調節に関わる ENaC β と ENaC γ の発現も LDT で検出され、淡水移行による発現量の変化は見られなかったものの、CT の前半部でも発現するようになった。以上の結果から、ENaC もオオメジロザメの淡水適応に重要な分子であることが示唆された。

第一章第三節 オオメジロザメの広塩性に寄与する遺伝子の網羅的探索と機能解析 3 ; 海水環境におけるオオメジロザメの腎臓遠位尿細管後部における排出機能

ここまでの結果から、腎ネフロン LDT と CT がオオメジロザメの淡水環境での生存に重要な分節であることが示唆された。一方で、海水環境における LDT の役割は不明であった。RNA-sequencing では淡水移行により発現が低下する遺伝子が 75 種類見出されており、Slc ファミリー遺伝子も 3 種類存在した。このうち Slc4a11 mRNA が海水個体の LDT 全体に強く発現し、淡水個体では NCC と入れ替わるように発現が消失した。アフリカツメガエル卵母細胞に slc4a11 遺伝子を発現させて機能解析を行った結果、ホウ酸輸送活性を持つことが示された。NaCl 再吸収分節としてオオメジロザメの淡水適応に重要な役割を果たす LDT は、海水中ではホウ酸などの不要物質の排出を担い、環境変化に伴う LDT の機能切替が本種の広塩性能力に重要であることが示唆された。

第二章 西表島浦内川に生息するオオメジロザメのフィールド調査

第一章において、オオメジロザメの広塩性能力には腎臓の LDT と CT という領域における NCC や ENaC、Slc4a11 の発現制御が重要であることがわかった。このような現象が実際の河川に生息する個体でも起こっているのかを明らかにするために、沖縄県西表島の浦内川に遡上する野生個体の捕獲調査と遺伝子発現量の解析を行った。2014 年 5 月から 2015 年 9 月、2016 年 6 月から 8 月、2017 年と 2018 年の 6 月の各月 1 回、河口から 4 km, 7 km, 8 km の 3 ヶ所で刺し網調査を行った。生後間もない個体の新規加入は 6 月からみられ、水温の低下する 10 月以降捕獲されなかった。浦内川では、河口から 8 km 上流まで川底に海水が入り込む塩水楔が発生し、川底まで完全な淡水だった時には捕獲されなかった。使用した刺し網は、塩水楔が存在する川底から 2 メートル立ち上がる仕掛であるため、川底にサメがいたと仮定したところ、浦内川のオオメジロザメは汽水環境ではあるものの、血漿よりも低浸透圧な環境に生息することが確認された。第一章で解析した遺伝子を含む 11 種類の遺伝子発現量を調べた結果、NCC の発現量が海水群と淡水群の中間の値となる等、汽水環境に生息することが遺伝子発現からも示唆された。

本研究により、オオメジロザメの広塩性を可能にするメカニズムとして、腎ネフロン LDT と CT の機能切替・亢進が示唆され、その鍵となる分子として NCC や ENaC、Slc4a11 などが示された。浦内川においては、低浸透圧環境に生息するものの、完全な淡水環境を好むわけではないことも示唆され、このことはオオメジロザメの体液組成を考えれば納得がいくものである。オオメジロザメは広塩性という特異な能力を持つことから多くの研究者の注目を集めてきたが、飼育実験の困難さから広塩性のメカニズムは不明であった。本研究では、飼育実験個体を用いるラボワークと、実際の河川でのフィールドワークの両面から研究を進めたことで、広塩性のメカニズムの解明に進展をもたらしただけでなく、本種の生息環境の理解にもつながり、軟骨魚類の環境適応の理解に対して大きく貢献するものである。