

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Studies on the kidney function in cartilaginous fish by mapping of  
membrane transporting proteins

(膜輸送タンパク質のマッピングによる軟骨魚類腎機能に関する研究)

氏名 長谷川 久美

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。生物を取り巻く環境は様々であり、塩濃度の全く異なる海洋や河川、陸上、さらには極地や砂漠、深海などの極限的な環境にも生物は存在する。そして、多様な生物がそれぞれの生息環境に応じた調節を行っている。その適応戦略は多岐にわたっており、同じ環境に生息していても、異なる戦略をもつこともある。

海洋は高浸透圧・高塩分環境であり、海棲生物は様々な戦略でこの問題を克服している。例えば、体液浸透圧を海水の3分の1程度に保つ海棲真骨魚類は、飲水により脱水を克服し、過剰な塩分は鰓から排出している。一方、海棲無脊椎動物や円口類のヌタウナギでは、血漿の塩濃度と浸透圧は海水とほぼ等しく、環境に順応するという戦略をとる。これらに対して、海棲の軟骨魚類は、「調節」と「順応」の両方を併せ持つような戦略をとっている。すなわち、NaCl や二価イオンなどは海水よりも低く保っており、体内に過剰となるこれらのイオンを積極的に排出する。一方で、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もわずかに高く保ち、海水中でも脱水から免れる。このような体液調節は、多くの体液調節器官が協調的に働くことにより可能となる。なかでも重要だと考えられているのが、尿素の再吸収と二価イオンの排出を担う腎臓で

ある。脊椎動物の腎臓では、糸球体で血漿成分が濾過された後、濾液が尿細管を通過する間に有用成分が再吸収され、不要物質が濃縮される。一部の不要物質は、尿細管で濾液中に分泌することによっても排出される。これらの機構は軟骨魚類でも同様であるが、軟骨魚類のネフロン構造は他の脊椎動物と比べて極めて複雑な構造をしている。軟骨魚類のネフロンは4回のループ構造を持ち、サイナス領域とバンドル領域を往復する。バンドル領域では、5本の尿細管分節が不透性の膜である鞘に包まれている。約50年前にこの構造が見出されて以降、**microperfusion** や **micropuncture** といった解析が試みられてきたものの、その構造の複雑さが原因となり、機能の詳細は不明であった。近年、膜輸送タンパク質の構造と機能が明らかとなるにともない、膜輸送タンパク質をマッピングすることが、上皮細胞の機能を解明するための強力な手法となってきた。そこで、膜輸送タンパク質をネフロン上にマッピングすることにより、軟骨魚類腎臓の機能解明を目指した。そのためのモデル生物として、軟骨魚類で唯一ゲノム情報が整備されているゾウギンザメを用いた。第一章では硫酸イオンの分泌に、第二章では尿素の再吸収に着目して研究を進め、最終的にはこれらの情報を統合することで、軟骨魚類腎臓における尿生成の全体像を明らかにすることを目指した。

### 【1. 近位細尿管における硫酸イオン分泌】

海水には高濃度の  $Mg^{2+}$  と  $SO_4^{2-}$  が含まれており、体内に過剰となるこれらのイオンを、腎臓から積極的に排出している。軟骨魚類の尿中に高濃度の  $Mg^{2+}$  と  $SO_4^{2-}$  が含まれることはこれまでも報告されていたが、今回、ゾウギンザメの孵化直前の胚において膀胱様の構造物を見出し、その内液（尿）には血漿の200倍以上というきわめて高濃度の  $Mg^{2+}$  と  $SO_4^{2-}$  が含まれていることを発見した。

哺乳類などで  $SO_4^{2-}$  輸送体として知られる **Slc26** ファミリーの遺伝子を全て同定し、そのなかでも親魚と胚の腎臓に強く発現していた **Slc26a1** と **Slc26a6** の mRNA をクローニングした。**Slc26a1** と **Slc26a6** の mRNA は、親魚と胚の腎臓において、第2ループを形成する近位細尿管 II (PII 分節) に共局在していた。また、特異的抗体を作製して免疫組織化学を行った結果、**Slc26a1** は側基底膜、**Slc26a6** は頂端膜に存在することがわかった。

アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて、RI 標識  $SO_4^{2-}$  の取り込み実験ならびに電気生理学的解析を行った結果、**Slc26a1** は電気的中性な  $SO_4^{2-}$  輸送体、**Slc26a6** は起電性の  $SO_4^{2-}/Cl^-$  交換輸送体であることがわかった。以上のことから、膜電位ならびに原尿中の  $Cl^-$  が、**Slc26a6** による  $SO_4^{2-}$  交換分泌の駆動力となることが示唆された。PII 分節には  $Na^+/K^+-ATPase$  (NKA) が強く発現しており、NKA が作り出す膜電位が駆動力となる。また、NKA と  $Na^+-K^+-Cl^-$  共輸送体の発現から、ゾウギンザメネフロンの第3ループを形成する遠位細尿管前部 (EDT) と第4ループを形成する遠位細尿管後部 (LDT) の後半が、 $NaCl$  の再吸収分節だと考えられている。PII 分節より前の分節では  $NaCl$  の

積極的な吸収は行われていないことから、PII 分節に流入する濾液中の  $\text{Cl}^-$  濃度は高いと考えられ、PII 分節が *Slc26a6* を駆動して  $\text{SO}_4^{2-}$  分泌を行う場として適していることが明らかとなった。

## 【2. バンドル領域に存在する水再吸収分節の同定】

軟骨魚類にとって尿素は重要な浸透圧物質であり、腎臓の糸球体で濾過される尿素的の90%以上を再吸収して体内に戻している。これまでの研究から、促進型の尿素輸送体 (UT) が最終分節である集合細管に局在しており、集合細管において尿素が再吸収されることが示唆されている。しかしながら、尿中の尿素濃度は体液よりも低く、促進型 UT により原尿からどのようにして濃度勾配に逆らった再吸収を行うことができるのか、そのメカニズムは不明であった。そのため、 $\text{Na}^+$ -尿素共輸送体や  $\text{Na}^+$ /尿素交換輸送体を想定するモデルも示されたが、そのような尿素輸送体の報告はない。UT が発現する集合細管はバンドル領域に存在し、第1ループや第3ループとともに不透性の膜 (靴) に包まれている。したがって、靴内の分節から水を再吸収し、靴内に低尿素環境を作り出すことができれば、濃度勾配により尿素を再吸収できると考えた。そこで、この考えを検証するため、水の輸送に関わるアキアポリン (AQP) に着目した。

ゾウギンザメのゲノムデータベースから 11 種類の AQP 様遺伝子を同定し、そのうちの 5 種類が腎臓に強く発現することを見出した。特に、AQP4 が靴内の複数の尿細管分節に強く発現することがわかったため、全長のクローニングを行った。特異的抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、AQP4 は靴内の複数の尿細管分節の側基底膜に局在することがわかった。さらにアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた機能解析から、AQP4 が水を透過させる機能的な水チャネルであることが明らかとなった。連続切片に AQP4 の免疫組織化学染色を施し、陽性分節の立体構築を行ったところ、AQP4 を強く発現する分節は、腎小体から伸びる Neck 分節および Neck 分節から続く近位細尿管 I (第1ループ) であることがわかった。また、弱い陽性反応が集合細管にも見出された。

今回の結果とこれまでの報告をあわせ、以下のとおり尿素再吸収モデルを提唱した。靴内では、まず、第3ループの EDT において能動的に  $\text{NaCl}$  を再吸収する。このことにより靴内の浸透圧が上昇し、水輸送のための駆動力を形成する。その浸透圧差に従い、第1ループにおいて AQP4 を介して水が再吸収され、靴内に低尿素環境が作られる。一方、EDT で  $\text{NaCl}$  が再吸収されて希釈された濾液は、サイナス領域の LDT に流れ込む。LDT では、前半部に AQP3 が、後半には NKA と  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  共輸送体が発現しており、前半部と後半部は対向流系を形成している。LDT で濃縮と希釈が進み、尿素が高濃度に濃縮された濾液が集合細管に流れ込むと、靴内との尿素濃度勾配に従って尿素が UT を介して再吸収される。集合細管には UT とともに AQP4 も局在しており、濾液中の尿素が再吸収されて浸透圧が低下することにより、水が再吸収される。この水の再吸収が、さらなる尿素の再吸収を促進する。同じ分節で尿素と水を再吸収するという

現象は、哺乳類の集合管でも認められる。哺乳類の集合管では水の再吸収を促進するために尿素を再吸収するが、尿素と水を同時に再吸収することで再吸収効率を高めるといふ点では、哺乳類の集合管と軟骨魚類の集合細管は相同であると考えられる。鞘にはリンパ管様の **Central vessel (CV)** の存在が報告されており、鞘内外の物質の移動は CV を介して起こると考えられている。第 1 ループならびに集合細管での水再吸収により、鞘内の静水圧が上昇し、鞘内で再吸収された尿素は CV を介して静脈血へと流れ込む。このように、原尿から血液に直接尿素を戻すのではなく、鞘内という微小な低尿素環境を介することで、高濃度の尿素を含む血液へと、促進型 UT により尿素を再吸収することが可能となる。

本論文では、 $\text{SO}_4^{2-}$  分泌が PII 分節で行われていること、尿素の再吸収に関わる鞘内の水再吸収分節が第 1 ループと集合細管であることを明らかにした。これらの結果をもとに尿素再吸収モデルを提唱し、さらには総合考察において軟骨魚類ネフロンでの尿生成の全体像を議論した。腎臓は、尿素による浸透圧調節という、軟骨魚類の体液調節戦略の中心を担う重要な器官であり、本研究の成果は軟骨魚類の海洋環境への適応機構とその進化を理解するうえで重要な知見である。