

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻  
平成 21 年度博士課程進学  
角村佳吾  
指導教員 兵藤晋

### 論文題目

A molecular mechanism for urea reabsorption in the cartilaginous fish kidney

(軟骨魚類腎臓における尿素再吸収の分子機構)

軟骨魚類 (Chondrichthyes) は約 1200 種を含む脊椎動物のグループであり、サメ・エイを含む板鰓類 (Elasmobranchii) とギンザメで構成される全頭類 (Holocephali) に分けられる。その最古の化石は約 4 億年前の古生代シルル紀の地層から出土しており、現生の脊椎動物顎口類では最も初期に地球上に現れた動物群である。同じ海洋環境に生息する真骨魚類とは多くの点で異なり、生理学のみならず進化学、発生学など多方面で興味深い研究対象として用いられている。

軟骨魚類は尿素を利用するユニークな方法で体液浸透圧調節を行い、海洋環境に適応している。軟骨魚類の体液は海水の約半分の濃度の NaCl を含む一方、尿素を高濃度 (300-400 mM) に含んでおり、体液浸透圧は海水の浸透圧よりもわずかに高く保たれている。これにより軟骨魚類は海洋という高塩分環境中에서도脱水状態に陥ることがない。この、本来老廃物である尿素を浸透圧物質として利用し、水を保持するというシステムは、軟骨魚類に限ったものではない。この尿素浸透圧性と呼ばれるしくみはシーラカンスや、哺乳類に至る四肢動物にも受け継がれており、進化的にも重要であることを示している。

軟骨魚類は体内に高濃度の尿素を保持するため、腎臓では尿素を 95% 以上の高い効率で再吸収している。この特殊な機能ゆえに軟骨魚類の腎臓は高度に発達しており、その形態構造は脊椎動物で最も複雑である。これまでに板鰓類のドチザメ (*Triakis scyllium*) において、尿素輸送体 (UT) とよばれるタンパク質が、4 回のループを持つ板鰓類ネフロン

終分節である集合細管に発現し、尿素再吸収に関わることが示唆されているものの、尿素を再吸収する分子機構は全くわかっていなかった。

そこで本研究では、軟骨魚類の腎臓における尿素再吸収機構を分子レベルで解明することを目的とした。そのために、軟骨魚類で唯一ゲノムプロジェクトが進行し、公開されている全頭類のゾウギンザメ (*Callorhinchus milii*) に注目した。尿素輸送の本体である UT、ならびに尿素再吸収の駆動力として NaCl と水の輸送に関わる輸送分子群を遺伝子クローニングにより同定し、ネフロン内での局在を明らかにすることから、尿素再吸収モデルを提唱した。これは、ネフロンを地図に見立て、そこに膜輸送体分子の局在部位を「マッピング」することにより、水やイオン、尿素などの物質の輸送システムを統合的に考察しようという試みである。

## 第一章 全頭類ゾウギンザメ (*Callorhinchus milii*) の腎臓に存在する複数の尿素輸送体タンパク質

ゾウギンザメのゲノムデータベースを検索したところ、3 種類の UT 遺伝子 (UT-1、UT-2、UT-3) と考えられるフラグメントを同定した。それぞれの全長配列をクローニングしたところ、UT-1 と UT-2 にはそれぞれ 2 種類のスプライスバリエント (UT-1a、UT-1b、UT-2a、UT-2b) が存在した。スプライスバリエントを含む 5 種類のゾウギンザメ UT はいずれも腎臓で強く発現していた。これらの分子が本当に尿素輸送体であることは、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞を用いる尿素透過実験により検証した。ゾウギンザメ UT の cRNA をインジェクションした卵母細胞では <sup>14</sup>C 標識尿素の取り込み量が約 12-16 倍に上昇し、UT の阻害剤として知られるフロレチン添加により尿素取り込みは有意に抑制された。このことにより、今回同定した 5 種類の分子はいずれも機能的な尿素輸送体であることが示された。分子系統解析により、UT-1 は板鰓類 UT と相同な分子であったのに対し、UT-2 は UT-1 との共通祖先分子から遺伝子重複によって生じた軟骨魚類特有のパラログであることがわかった。さらに UT-3 はこれまで知られていない新規の UT であることが示唆された。板鰓類にも UT-2 と UT-3 が存在するのかどうかはまだ明らかではないが、複数の UT が腎臓に存在することは、軟骨魚類の腎臓が尿素再吸収に重要であることを反映したものだと考えている。

## 第二章 全頭類ゾウギンザメ腎臓の形態学および分子生物学的解析：遠位尿細管における対向流様立体構造と 2 つの希積分節の存在

尿素再吸収において UT は直接的かつ中心的な役割を果たすものの、尿素の濃度勾配に従って濃度の高い方から低い方へと輸送する促進的輸送体である。したがって、尿素輸送の

ためには駆動力となる尿素の濃度勾配、すなわち尿素を濃縮することが必要である。この濃度勾配を形成するしくみとして、NaCl と水の再吸収を考えた。そこで第二章では、まずゾウギンザメ腎臓におけるネフロン構造を、連続切片によるネフロン再構築から明らかにした。次に、NaCl の再吸収に関わる  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  (NKA)、 $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{Cl}^-$  共輸送体アイソフォーム 2 (NKCC2) を同定し、*in situ* ハイブリダイゼーションにより NKA および NKCC2 の mRNA 局在を調べた。

ゾウギンザメの腎臓は多数の小葉に分かれ、各小葉には特徴的な 2 つの領域 (バンドルゾーンとサイナスゾーン) が存在した。腎小体から始まるネフロン尿細管はこの 2 つの領域を行き来しながら 4 回のループ構造を形成し、最終的には集合管へと接続した。サイナスでは尿細管の間隙を静脈血が流れるが、バンドルでは単一ネフロンに由来する 5 本の尿細管が一層の不透性の細胞鞘 (Peritubular sheath) に包まれ、対向流構造を形成する。透過型電子顕微鏡観察により、バンドルの中心付近には Central vessel (CV) と呼ばれる特殊な盲管の存在を確認した。これらの特徴は、これまで調べられてきた板鰓類のネフロンと一致した。一方で、サイナスゾーンに位置する第 2 ループと第 4 ループは、ゾウギンザメで特徴的な立体配置を示した。第 4 ループに相当する遠位尿細管後節 (Late distal tubule, LDT) では、ループの前半と後半の 2 本の管が密に接しており、対向流構造を形成していた。さらに、第 2 ループに相当する近位尿細管は、LDT を包み込むように大きな回旋状構造を形成していた。

第一章で同定した UT の分布を調べたところ、UT-1 と UT-2 は最終分節である集合細管に局在し、ゾウギンザメでも集合細管が尿素再吸収の場であることがわかった。NKA と NKCC2 は遠位尿細管前節 (Early distal tubule, EDT) で強い共発現が見られ、哺乳類腎臓のヘンレループの太い上行脚と同様に、原尿から NaCl の再吸収を行うものと考えられた。NKA は LDT 全体に渡って強く発現していたのに対し、NKCC2 は LDT では後半のみに局在していた。すなわち、ゾウギンザメの腎臓では EDT および LDT 後半という非連続な 2 つの部位で NaCl を再吸収し、原尿の希釈を行うことが示唆された。一方で、LDT 前半部では NKA は存在するものの、NaCl の再吸収以外の機能に関わることがわかった。LDT の前半部と後半部が対向流構造をとること、LDT は近位尿細管により包み込まれる構造をとるといった解剖学的特徴から、各ネフロンの LDT を隔離して微小環境を維持することが、LDT の機能にとって重要であることが示唆された。

第三章 ゾウギンザメ (*Callorhinchus milii*) 腎臓において遠位尿細管後節 (LDT) の前半部で発現するアクアポリン 3 の 2 つのパラログ

尿素を濃縮するためには、NaCl を再吸収して原尿を希釈するとともに、水を再吸収する

ことが必要である。そこで、生体内で水分子を輸送するチャネルタンパク質であるアクアポリン (AQP) に注目した。現在哺乳類では 13 種類のアクアポリン (AQP0-12) が報告されており、そのうち少なくとも 7 種類が腎臓に発現し、水の再吸収に関わることが知られている。

ゾウギンザメのゲノムデータベースを検索したところ、少なくとも 6 つのアクアポリンアイソフォーム (AQP1、AQP3-1、AQP3-2、AQP4、AQP7、AQP9) の存在が確認され、そのうち AQP1、AQP3-1、AQP3-2、AQP4 は腎臓で発現が見られた。AQP3-1 および AQP3-2 に関しては全長配列を決定し、分子系統解析の結果から AQP3-1、AQP3-2 は軟骨魚類特有のパラログであることが分かった。次に *in situ* ハイブリダイゼーションによりそれらの mRNA 局在を調べたところ、AQP3-1、AQP3-2 とともに、LDT の前半部にのみ局在していた。LDT は形態的にさらなる分節構造はみられず、これまで板鰓類のネフロンにおいて単一の分節として扱われてきた。今回ゾウギンザメにおいても、LDT の前半部と後半部が密接して対向流構造を形成することがわかったものの、形態的には前半部と後半部に違いは認められなかった。しかしながら、分子マッピングの結果、前半部は AQP を発現して水の再吸収に関わり、後半部は NKCC2 により NaCl の再吸収を行うというように、機能的に異なる分節であることが初めて明らかとなった。

以上の結果をもとに、ゾウギンザメネフロンにおける尿素再吸収の分子モデルを予想した。①第 3 ループの EDT は希積分節であり、NKA および NKCC2 により NaCl が再吸収されて原尿が希釈される。②続く LDT 前半では、浸透圧の低くなった原尿 (管腔側) から静脈血 (漿膜側) へと AQP3 を介して水分子が移動する。この結果、原尿中の尿素が濃縮され、同時に NaCl 濃度も上昇する。③LDT 後半では、再び NKA と NKCC2 により NaCl 再吸収が行われ、原尿の NaCl 濃度が低下する。ここでの NaCl 再吸収は、LDT 周囲の浸透圧を上昇させるため、LDT 前半での水再吸収の効率を高める。④集合細管には尿素濃度が高くなった原尿が流れ込み、主に UT-1 を介して尿素が原尿から再吸収される。集合細管と CV は対向流構造を形成していることから、再吸収された尿素は対向流交換系により CV 内へと取り込まれ、最終的に尿素は CV を通って静脈血へと戻される。

軟骨魚類の腎臓は極めて複雑な構造を示し、哺乳類の腎臓で従来用いられてきたネフロンの単離や電気生理学などの古典的手法を用いることは難しく、これまで機能解明が全く進まなかった。本研究では、ネフロン上への分子マッピングというアプローチを提案し、膜輸送体の局在から各分節の機能を明らかにした。これまで未知であった軟骨魚類腎臓での尿素再吸収の分子メカニズム解明への大きな手がかりが得られ、本研究は軟骨魚類の海洋環境への適応のしくみの理解に対して大きく貢献するものである。