

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 角村 佳吾

---

本論文のジェネラルイントロダクションでは軟骨魚類の生理学、特に体液調節のしくみと海洋環境への適応について、本研究の背景、目的と必要性、具体的な研究内容が記述されている。軟骨魚類は体内に高濃度の尿素を蓄積することで、体内の浸透圧を環境の海水よりもわずかに高く維持し、海洋という高い塩分・浸透圧環境でも脱水されることなく適応できる。環境中には尿素が存在しないため、体内に尿素を蓄積するためには特別な仕組みが必要である。たとえば、腎臓では原尿として濾過されてしまう尿素のほぼ全てを再吸収して体内に戻す。このことは体内の尿素濃度を決定する重要な要因であるが、ネフロン構造の複雑さゆえに、その仕組みはほとんどわかっていない。論文提出者は、軟骨魚類で唯一ゲノム情報が公開されている全頭類のゾウギンザメ (*Callorhinchus milii*) に注目し、分子形態学的手法を駆使して尿素再吸収メカニズム解明に向けて研究を進めた。その結果は、3章からなる本文にまとめられている。

第1章では、尿素輸送の本体である尿素輸送体 (UT) を同定した。ゾウギンザメのゲノムデータベースから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、スプライスバリエントを含めて5種類のゾウギンザメUTをクローニングし、いずれも腎臓で強く発現していることを見出した。アフリカツメガエル卵母細胞を用いる尿素透過実験により、同定した5種類の分子がいずれも機能的な尿素輸送体であることを証明した。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を示した。一方で、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。

UTは濃度勾配に従って尿素を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、論文提出者はNaClと水の再吸収を考え、第2章ではNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA)、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup>共輸送体 (NKCC2) を同定し、その局在を調べた。まずゾウギンザメ腎臓におけるネフロン構造を、連続切片を用いる再構築により明らかにした。バンドルゾーンとサイナスゾーンの存在、4回のループ構造を持つネフロン、バンドルゾーン内では単一ネフロンに由来する5本の尿細管が不透性の細胞鞘に包まれ、その中心にはCentral vessel (CV)が存在することなど、板鰓類ネフロンと共通する点が多かったが、第2ループと第4ループが特徴的な立体配置を示すことを見出した。第4ループの遠位尿細管後節 (LDT) では、ループの前半と後半の管が密接し、対向流様の構造を形成する。さらに、第2ループの近位尿細管は、LDTを包み込む大きな回旋状構造を形成していた。

UT-1 と UT-2 は最終分節である集合細管に局在し、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 (EDT) で強い共発現が見られ、原尿から NaCl の再吸収を行うものと考えられた。その発現は LDT にも見られたが、NKCC2 は後半のみで発現していた。すなわち、EDT および LDT 後半という非連続な 2 つの部位で NaCl を再吸収する。

LDT 前半部の機能に注目し、第 3 章では水の輸送に関わるアクアポリン (AQP) を調べた。ゾウギンザメは少なくとも 6 つのアクアポリンを持ち、そのうち AQP3-1 と AQP3-2 が LDT の前半部に局在していた。LDT は形態的には単一の分節として扱われてきたが、分子マッピングにより前半部は 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から成ることが初めて明らかとなった。

ジェネラルディスカッションでは、以上の結果をもとに尿素再吸収の分子モデルを提唱している。①第3ループのEDTにおけるNaClの再吸収 (原尿の希釈) ②LDT前半での水再吸収 (尿素の濃縮とNaCl濃度の上昇) ③LDT後半でのNaCl再吸収 (LDT周囲の浸透圧上昇によりLDT前半での水再吸収促進) ④集合細管からCVへの対向流交換による尿素再吸収、という一連のステップからなる明解なモデルであり、複雑な腎臓での尿素再吸収機構を分子レベルで示した初めての結果である。

以上の通り、本論文は軟骨魚類の腎臓の機能解明に向けて大きな進展をもたらし、学術上寄与するところが多い。全ての研究において、論文提出者が主体となって実験と解析を行ったものであり、よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。