

論文の内容の要旨

Osmoregulation in the developing embryos of oviparous cartilaginous fishes

(卵生軟骨魚類の発育段階における浸透圧調節機構に関する研究)

氏名 高木 亙

板鰓類（サメ、エイ類）及び全頭類（ギンザメ類）から構成される現生の海産軟骨魚類は、体内に高濃度の尿素を保持し、体液浸透圧を海水よりもわずかに高張に保つことで脱水から免れ、環境に適応する。このような浸透圧調節様式は尿素浸透圧性（Ureosmotic）と呼ばれ、体液中の尿素濃度は、主に肝臓の尿素回路（OUC）を介した生合成、腎臓での尿素再吸収、さらに鰓上皮の低い尿素透過性など、様々な器官の協調によって維持される。しかし、これらの器官が未発達な発生初期の胚が、どのような仕組みで高塩分・高浸透圧な海水環境に適応しているのかは不明であった。軟骨魚類は、卵生から胎生までの多様な繁殖様式を持つことでも知られ、このうち胎生種の胚は、受精後約半年から1年という長い期間をかけて子宮内で発生する。子宮内の環境は母親の体液とほぼ同じ組成であることが報告されており、胎生種の胚が体液調節に費やすエネルギーは少ないと考えられる。一方、卵生種の胚は受精後数日以内に海水中へ生み出され、胎生種と同様に長い期間をかけて発生し、孵化に至る。そこで私は、卵生種の胚は胎生種とは異なり、海水に適応する何らかの仕組みを備えているのではないかと考えた。本研究では発生期間に卵生種の胚がおかれている環境、さらには発生中の胚が環境に適

応する機構について明らかにすることを目的とした。研究対象には、オーストラリアに生息し、軟骨魚類で唯一ゲノム情報が公開されている卵生全頭類のゾウギンザメ (*Callorhinchus milii*) と、日本近海に生息する卵生の板鰓類トラザメ (*Scyliorhinus torazame*) の2種を用いた。

【1. 全頭類ゾウギンザメの親魚における尿素合成器官】

近年、肝臓以外に筋肉や消化管が尿素合成を行い、体液中の尿素濃度の維持に貢献することが数種の板鰓類で報告されている。ゾウギンザメの属する全頭類は、板鰓類と同様に尿素を用いた浸透圧調節を行うが、親魚における尿素合成器官さえも同定されていない。そこでまず、ゾウギンザメ親魚のOUC酵素群（グルタミン合成酵素 (GS)、カルバミルリン酸合成酵素 (CPSIII)、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC)、アルギナーゼ (ARG))の遺伝子配列を決定した。回路の律速酵素であるCPSIIIをはじめ、すべてのOUC酵素の高い発現は肝臓で確認された。各酵素の活性も肝臓で高く、板鰓類と同様に肝臓が主要な尿素合成器官であると考えられた。

一方、肝臓以外の器官（骨格筋や腎臓）でも比較的高い遺伝子発現と活性が認められた。腎臓では近位尿細管の特定の分節にGSとOTCのmRNAが発現しており、同じ細胞にアンモニア輸送体であるRhp2のmRNAも共局在していたことから、血液あるいは原尿からアンモニアを取り込み、尿素に変換して体内に戻す可能性が示唆された。また、体重に占める割合を考慮すると、筋肉全体では肝臓よりも高い総活性値を示しており、全頭類ゾウギンザメにおいても、肝臓以外の器官が尿素合成に貢献していることが示唆された。

【2-1. ゾウギンザメ胚の尿素を用いた浸透圧調節：卵黄囊上皮の果たす役割】

卵生種の胚は孵化までの間、卵殻の中で発生する。ゾウギンザメの卵殻内液の塩化物イオン、浸透圧は発生を通して海水とほぼ同じであり、卵殻のイオン透過性は非常に高いことがわかった。また、少なくとも発生ステージ31以後の胚では親魚と同程度の尿素を体内に保持しており、胚も尿素を用いた浸透圧調節を行うことが明らかになった。

そこで、第1章で同定したOUC酵素遺伝子群の発現を発生段階を追って調べた。発生ステージ33では、親魚と同様に遺伝子発現は肝臓で最も高かった。また、ステージ33から孵化にかけて肝重量は顕著に増加し、それに伴い肝臓全体での各酵素遺伝子発現量も顕著に上昇したことから、発生後期には親魚と同じく肝臓が主要な尿素合成器官であると考えられた。

一方で、より早い発生段階（ステージ28～32）では肝臓を含む胚体全体でのOUC酵素遺伝子発現量は低く、胚体外組織である卵黄囊上皮（YSM）でOUC酵素遺伝子群の高い発現が見られた。特にステージ31以前では、律速酵素であるCPSIIIの発現量は胚体よりもYSMで高く、全てのOUC酵素がYSMで活性を有することも確認した。これらの結果は、胚体の尿素合成器官が発達していない発生初期には、YSMが胚体に代わってその役割を担うことを示唆している。軟骨魚類のYSMは血管の発達した中内胚葉由来の内層（END）と、白く肥厚した外胚葉由来の外層（ECT）で構成されるが、CPSIIIのmRNAシグナルはEND全体に見られたことから、ENDが尿素合成に寄与することが明らかとなった。

YSMによって包まれる卵黄は、発生ステージ32以降徐々に胚体へと吸収され、ステージ35までに完全に吸収されてその役割を終える。YSMにおけるOUC酵素遺伝子群の発現はステージ31を境に減少し、一方で胚体における発現量はステージ32頃から顕著に増加したことから、発生の中期から後期にかけて、胚の主要な尿素合成器官はYSMから胚体、特に胚体の肝臓へと移行することが示唆された。

【2-2. トラザメ発生過程に伴う尿素合成器官の移行】

トラザメでは、ゾウギンザメよりも早いステージから体液中の尿素濃度を測定することができた。全ての発生段階において親魚の体液と同程度の尿素を保持し、発生の早い時期から尿素を用いる浸透圧調節を行うことが確かめられた。また、トラザメOUC酵素遺伝子の発現を調べたところ、発生初期にはYSMで全ての酵素遺伝子の高い発現が認められ、発生の進行に伴って胚体での発現が高まるという、ゾウギンザメと同様の変化を示した。さらに、YSMのEND層にはOUC酵素の高い遺伝子発現および活性が確認された一方で、海水と接するECT層にはほとんど検出されなかった。

肝芽が観察されるステージ23以降、発生の進行とともに肝臓の体積は指数関数的に上昇した。一方、胚体でのOUC酵素遺伝子の発現はステージ32まで低く、その後上昇する。したがって、肝臓が機能的な尿素器官としてはたらしはじめるのはステージ32以降であると考えられる。よって、2-2章では1) 胚体の尿素合成器官が機能的に未発達な時期にはYSMがその役割を担うこと、2) 発生の進行に伴う尿素合成器官の移行は、卵生軟骨魚類に共通の現象であることを見出した。

【3. トラザメ胚における尿素合成の内分泌制御：糖質コルチコイドの関与】

2章までで明らかにした、YSMや胚体での尿素合成能の変化や尿素合成部位の移行は、どのように制御されているのだろうか。胚体およびYSMを用いてRNAseq解析を行い、

ホルモン受容体に着目して網羅的探索を行った。その結果、胚体とYSMの両組織に糖質コルチコイド受容体 (GR) 遺伝子が発現することを見出した。糖質コルチコイド(GC)は真骨魚類における重要な海水適応ホルモンであり、哺乳類では尿素合成を制御することが知られている。そこで、軟骨魚類においてもGCがGRを介して尿素合成量を調節し、浸透圧調節に寄与しているのではないかと考えた。

まず、ゾウギンザメとトラザメのGRおよび鉱質コルチコイド受容体 (MR) 遺伝子のコード領域配列を決定し、培養細胞系を用いた*in vitro*レポーターアッセイにおいて、GCによる受容体活性への影響を解析した。リガンドには、軟骨魚類の血中に最も豊富に存在する1- α ヒドロキシコルチコステロン (1- α OHB) の他、コルチコステロンなど複数のステロイドを用いた。その結果、コルチコステロンが1- α OHBよりもゾウギンザメ・トラザメGRの転写調節活性を強く亢進した。一方で、トラザメMRは1- α OHBとコルチコステロンの両方に対して同等の応答を示した。血液中には1- α OHBがコルチコステロンの10倍以上の濃度で存在すると報告されているが、今回の結果は軟骨魚類の生体内において、1- α OHBではなくコルチコステロンなどがGRを介して作用する一方で、1- α OHBはMRのリガンドである可能性を示唆している。

そこで、GRの転写調節活性を亢進したコルチコステロンを用いて、トラザメ胚をGCに曝露する*in vivo*実験を行った。GC曝露群 (コルチコステロン: 10^{-6} M) では対照群と比べてEND層におけるARG遺伝子の発現量が有意に増加し、GRのアンタゴニストとして知られるRU486と共曝露により上昇は抑えられた。また、GC曝露は胚体でのGS遺伝子の発現を上昇させる一方で、END層でのGS発現は抑制した。以上の結果は、トラザメの発生過程において、OUC酵素遺伝子の発現がGRを介したGCの作用によって制御されることを示唆している。

本論文では、1) 卵生軟骨魚類が生活史を通して尿素を利用する浸透圧調節を行うこと、2) 発育段階の初期にはYSMが尿素合成を行う重要な浸透圧調節器官であること、3) GCがその発現制御に関わることを見出した。真骨類や海産無脊椎動物においても胚体外組織は発生初期の環境適応に重要であることが知られてきており、本研究の成果は軟骨魚類の生活史における環境適応機構の理解にとどまらず、水生生物の適応進化を理解する上でもきわめて重要な知見である。