

肺魚 ENaC 遺伝子の夏眠による発現変化とアルドステロンとの相関 — 肺魚の体液調節から脊椎動物の陸生適応機構の進化を探る —

今野 紀文¹, Jean Joss², 内山 実¹

¹富山大学大学院理工学研究部, ²マクワリー大学理学部

概要 副腎皮質ホルモンのアルドステロンは、腎臓の上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)の発現を促進させて体内に塩分を取り込むことで、浸透圧作用によって水を体内に留めるとともに血圧の維持においても重要な役割を果たしている。このアルドステロン-上皮性Naチャンネル(ENaC)によるNa調節機構は、これまで両生類以上の四肢動物には存在しているが、水生生活を営む魚類では見つかっていなかったため、この機構は脊椎動物の陸上進出という進化的イベントにおいて重要な役割を果たしたと考えられている。しかしながら、我々ヒトを含む四肢動物が、進化の過程で一体いつ、どのような環境下でこの塩分調節に必須のシステムを獲得してきたのかは解っていない。肺魚類は、系統学的に我々四肢動物に最も近縁な硬骨魚類であり、乾季になると夏眠と呼ばれる乾燥への適応行動をとることが知られている。そこで、本研究では、肺魚の陸生化とも言える夏眠行動に着目し、肺魚においてアルドステロン-ENaC システムの存在を探索するとともに、肺魚の夏眠におけるこのシステムの役割について調べた。

アフリカ肺魚(*Protopterus annectens*)の鰓や腎臓のcDNAを用いて、アルドステロン受容体(MR)とENaCの相同遺伝子を探索した結果、肺魚のMR遺伝子に加えて、魚類で初めてENaC α -, β -, γ -サブユニットの各遺伝子配列を決定することに成功した。また、肺魚に加えて、ヒト、アフリカツメガエル、キンギョの血中アルドステロン濃度をEIA法により測定した。キンギョの血中には測定可能なレベルのアルドステロンが検出されなかったのに対して、肺魚ではヒトの約1/2程度のアルドステロン(3.8 ng/dl)が存在することが示された。夏眠における腎臓のENaC遺伝子の発現変化をリアルタイムPCR法により解析した結果、ENaC遺伝子の発現は夏眠期間に伴って有意に減少した。また、血中アルドステロンレベルも夏眠によって同様に減少した。この結果は我々の予想に反したが、肺魚のアルドステロン-ENaCシステムは夏眠下でよりも低Na環境である淡水飼育下において活性化していることが新たに示唆された。本研究によって、肺魚類は四肢動物と同様のアルドステロン-ENaCシステムによるNa調節機構を有していることが明らかとなった。

1. 研究目的

陸上生活を営む四肢動物(両生類~哺乳類)において、副腎皮質ホルモンのアルドステロンは、腎臓の上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)の発現を促進させて体内に塩分を取り込むことで、浸透圧作用によって水を体内に留めるとともに血圧の維持においても重要な役割を果たしている(Barbry and Hofman, 1997)(図1)。その一方で、アルドステロン-ENaCシステムの破綻は、アルドステロン欠損症や、ENaC遺伝子の異常が原因で高血圧を発症するリドル症候群を引き起こすことが知られている(Wamock, 2001;

Schild *et al.*, 2004)。これまで、アルドステロン-ENaCシステムは水中生活を営む魚類には存在しないと考えられてきた。なぜなら、魚類は外部環境から容易に水を得ることができ、また水からの浮力によって陸上動物のような高い血圧を維持する必要がないからである。さらに、現在、ゲノム配列が解読されている数種の真骨魚類にはENaC遺伝子が存在しないことが解っている。では、我々ヒトを含む四肢動物は、生物の進化の中で一体いつ、どのような状況でこの塩分調節に必須のシステムを獲得してきたのだろうか(Colombo *et al.*, 2006)。

肺魚類は、約 4 億年前のデボン紀に地球上に出現し、「生きた化石」と呼ばれる硬骨魚類である。肺魚類は、系統学的に多くの硬骨魚類が属する条鰭系統ではなく、我々四肢動物へとつながる肉鰭系統に位置しており、最も両生類に近縁な魚種であることがわかっている。また、肺魚類は通常河川などの淡水中に生息しているが、水が干上がる乾季になると土の中で“夏眠”し、水の無い数ヶ月間を生き抜くことができる(図 2)。この乾燥に対する適応行動は太古の肉鰭類が水中生活から陸上生活へと移行するための第一段階であったのかもしれない。我々は、肺魚の陸生適応ともいえるこの現象に注目し、肺魚類に上述したアルドステロン-ENaC システムが存在して、陸上への適応時(夏眠)に機能しているのではないかと考えた。さらに、肺魚のアルドステロン-ENaC システムの存在やそ

の体液調節を明らかにすることで、脊椎動物、特に我々四肢動物への進化を解明する手がかりを得ることができる。

本研究では、肺魚においてアルドステロン-ENaC システムの存在を調べるとともに、肺魚の淡水-陸生適応時におけるアルドステロン-ENaC システムの役割について調べた。

2. 研究方法

2.1 ミネラルコルチコイド受容体(MR)と ENaC 遺伝子の同定

実験に用いたアフリカ肺魚(*Protopterus annectens*)は、福井県の熱帯魚販売業者から購入し、研究室で室温 25°C の淡水下で飼育した。アルドステロン受容体であるミ

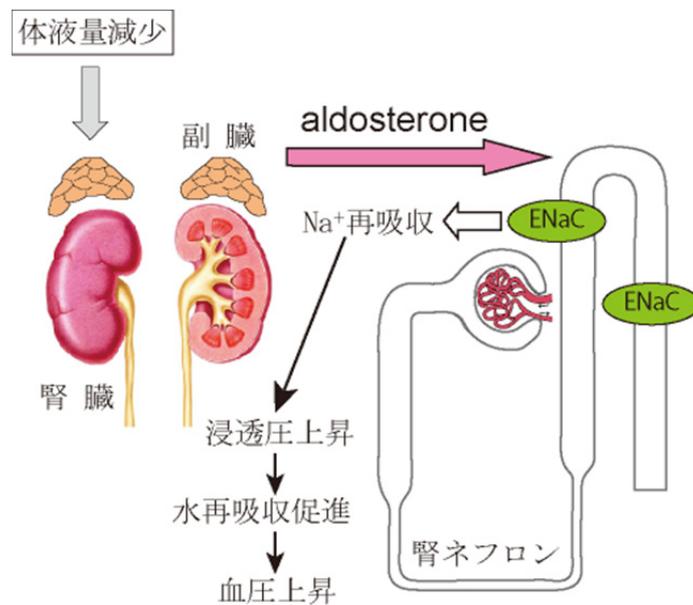


図 1. 哺乳類の腎臓におけるアルドステロン-ENaC システムの概略

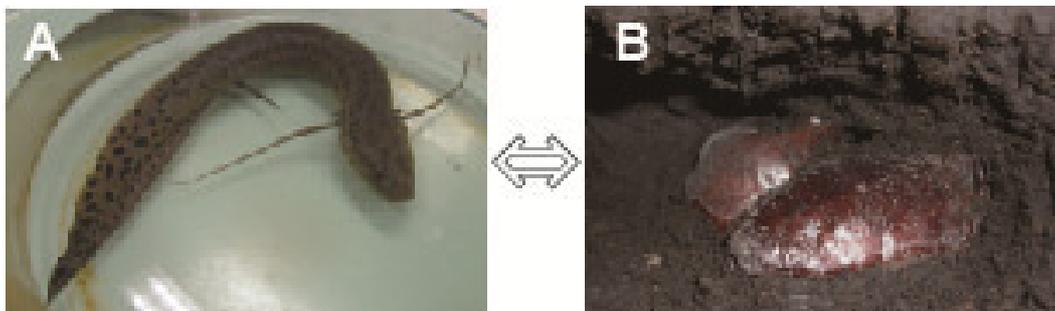


図 2. 淡水飼育下の肺魚(A)と 3 ヶ月間夏眠させた肺魚(B)。肺魚は水の無い乾燥した土の中で時には数年間も夏眠することができる。

ネラルコルチコイド受容体(MR)および上皮性 Na チャネル(ENaC)各サブユニット(α , β , γ)の遺伝子配列を同定するため、上記肺魚の鰓、腎臓、直腸から RNA 抽出試薬(RNAiso, TaKaRa Bio, Japan)を用いて total RNA を抽出した。それらの RNA を鋳型に逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、様々な動物群で既に同定されている MR および ENaC 各サブユニットのアミノ酸配列をもとに作成した縮重プライマーを用いて肺魚の各目的遺伝子断片を PCR により増幅した。増幅断片は pT7Blue T-Vector に挿入し、大腸菌 XL1-Blue に導入した。大腸菌は LB プレート培地にて培養し、White-Blue selection により目的遺伝子断片が導入された大腸菌コロニーをスクリーニングした。大腸菌から抽出したプラスミドはシークエンスアナライザー(ABI PRISM 3100, Applied Biosystems)により遺伝子配列を決定した。各遺伝子の完全長 cDNA 配列を得るため、5'Race および 3'Race 法を行い、完全長配列を取得した。決定した cDNA 配列は BLAST 法により、各配列がコードするタンパク質を推定し、それぞれ肺魚の MR および ENaC 各サブユニットの相同遺伝子であることを確認した。また、同定した各遺伝子の分子系統学的位置を知るため、既知の配列情報を含めた分子系統樹を近隣結合法により作成した。

2. 2 夏眠処理と体液成分の解析

肺魚への夏眠(Estivation: EST)処理は次のように行った。淡水下で飼育していた肺魚を泥状の黒土が入った容器に移し、徐々に水を干上がらせることで人工的に夏眠を誘導した。処理群は個体を黒土容器に移して 2 週間、1 ヶ月、2 ヶ月の 3 群を設けた。各夏眠処理後、個体の体重を測定し、処理前の体重と比較した。また、心臓穿刺によって血液を採取し、血漿浸透圧、血漿 Na^+ 、 Cl^- 、グルコース、尿素の各濃度を測定した。血漿浸透圧は氷点降下法オスモメーター(Osmostat, Kyoto Daiichi Kagaku, Japan)を用いて、血漿 Na^+ 、 Cl^- 、グルコース濃度はラジオメーター(Radiometer Inc., Japan)を用いて測定した。また、血漿尿素濃度は尿素窒素測定キット(Wako Pure Chemical, Japan)を用いて測定した。*Protopterus annectens* の血中アルドステロンの測定には、Aldosterone EIA Kit (Cayman Chemical Company, USA)を用いた。比較対象として、ヒト、アフリカツメガエル、キンギョの血中アルドステロンレベルも測定した。

2. 3 遺伝子発現解析

同定した MR および ENaC 各サブユニットの遺伝子が、肺魚のどのような体組織に発現しているのかを調べるため、肺魚から脳、下垂体、眼、鰓、肺、心臓、肝臓、脾臓、胆嚢、前腸、後腸、直腸、腎臓、精巣、筋肉を摘出し、2. 1 で示した方法によって各組織の cDNA を作成した。肺魚の MR および ENaC 各サブユニット遺伝子配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、各遺伝子増幅産物は 2% アガロースゲル電気泳動法により分離して、可視化した。

また、夏眠処理による ENaC α サブユニット遺伝子の発現変化を解析するため、腎臓における当該遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により定量した。

3. 研究結果と考察

3. 1 ミネラルコルチコイド受容体(MR)と ENaC 遺伝子の同定

アフリカ肺魚の鰓および腎臓の cDNA から肺魚の MR と ENaC 各サブユニットの相同遺伝子を同定することに成功した。MR cDNA は、979 アミノ酸をコードしており、調べた全ての体組織にユビキタスに発現した。ENaC α 、 β 、 γ 各サブユニットの cDNAs は、それぞれ 652 アミノ酸(α)、652 アミノ酸(β)、653 アミノ酸(γ)をコードしており、分子系統解析の結果、3つの肺魚 ENaC タンパク質はそれぞれ既知の各サブユニットのクラスターに位置することが示された(図3)。脊椎動物において、MR 遺伝子の存在は、肉鰭系統だけでなく条鰭類の真骨魚においても確認されている(Kassahn *et al.*, 2011)。その一方で、MR のリガンドであるアルドステロンが真骨魚類に存在するという報告は無く、アルドステロンによって発現調節される ENaC の存在もまた魚類において見つかったはいなかった。結果に示すように、本研究によって、アフリカ肺魚から ENaC の3つのサブユニットをコードする遺伝子を同定することに成功した。また、条鰭系統の複数のモデル魚種において、ゲノム中に ENaC 遺伝子が存在するか否かを探索したが、いずれの魚種においても ENaC 遺伝子は存在しなかった。さらに、最近、ゲノム配列が解読されたシーラカンス(肉鰭類総鰭亜綱)においても同様に ENaC 遺伝子を探索した結果、断片的ではあるが、ENaC 遺伝子と相同性の高い配列がシーラカンスのゲノム中に確認された。これらの結果は、

ENaC 遺伝子が肉鰭系統の動物群に存在し、条鰭系統の魚類では失われたか、もともと存在しなかったかのどちらかであることが考えられた。

また、肺魚の様々な体組織における ENaC 各サブユニットの遺伝子発現を RT-PCR により解析したところ、 α サブユニットの発現は主に鰓、腎臓、直腸で、 β および γ サブユニットの発現は脳、眼、鰓、前腸、直腸、腎臓、精巣で検出された(図 4)。 α サブユニットは、細胞内へと Na^+ を通すポア(孔)を形成する重要なサブユニットであり、その発

現組織は主要な浸透圧調節器官である鰓、腎臓、直腸に発現することが明らかとなった。

3. 2 夏眠処理による体液成分の変化

ENaC 遺伝子の発現に夏眠がどのように影響しているのかを調べるため、まず、肺魚に夏眠処理を施し、2 週間、1 ヶ月、2 ヶ月後にサンプリングを行って、体重および体液成分の変化について調べた(表 1)。その結果、夏眠処理によって、血漿 Na^+ 濃度はやや減少する傾向が見られた。また、血漿グルコース濃度は夏眠により有意に低下し、血

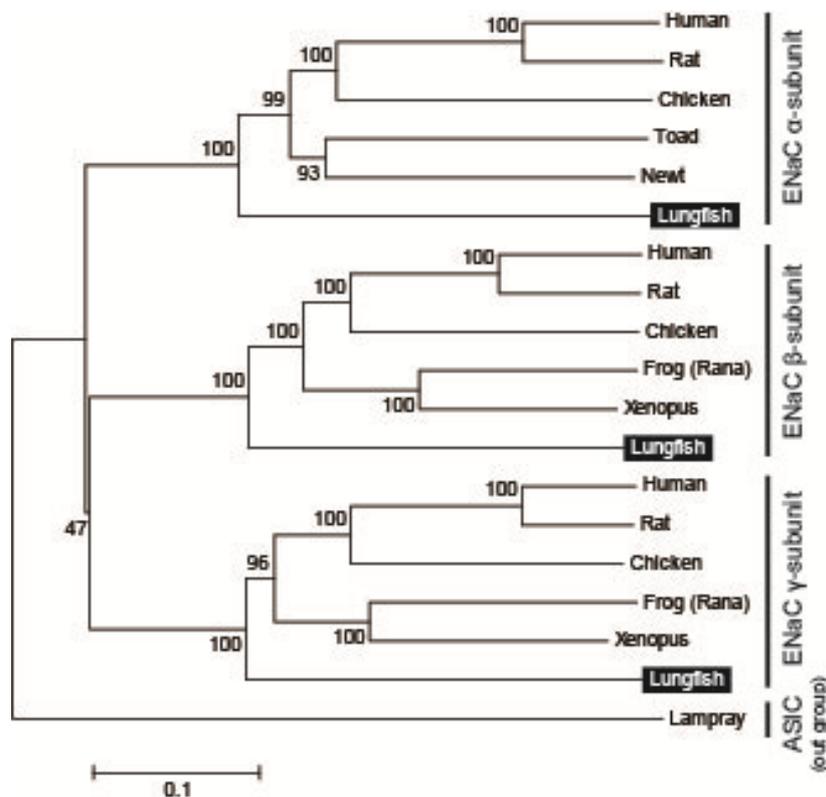


図 3. 同定した肺魚 ENaC 各サブユニットの分子系統学的位置(NJ 法)

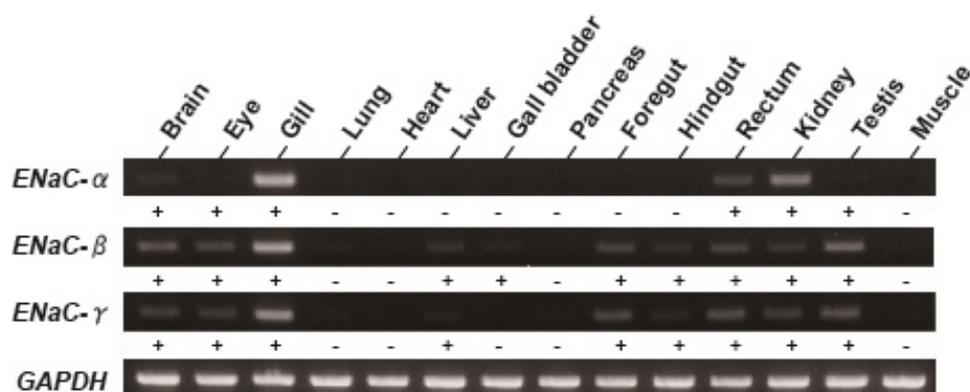


図 4. *Pannectens* の体組織における ENaC 遺伝子の発現

表 1. 夏眠による体液成分の変化

Plasma parameters	FW	EST(2W)	EST(4W)	EST(8W)
Osmolality (mOsm)	223.4±5.9	216.4±4.9	222.8±3.1	246.2±9.2
Sodium (mmol/L)	101.3±1.3	98.2±2.6	94.4±1.9**	96.0±1.7*
Chloride (mmol/L)	85.8±1.9	75.6±1.4	78.0±2.3	87.5±2.6
Glucose (mmol/L)	5.5±0.6	3.9±0.2	1.8±0.2**	1.4±0.1**
Urea (mmol/L)	5.2±0.6	13.3±4.7	33.9±11.5*	36.4±3.0*

Means (n=5) ±SE. *P<0.05, **P<0.01 (ANOVA)

漿尿素濃度は逆に増加して、有意ではないが夏眠 2 ヶ月個体の血漿浸透圧を押し上げる結果となった。肺魚の夏眠行動は、高温や乾燥に応答して起こる休眠の一例であり、夏眠中は生体内の多くの活動が停止し、代謝が最小限に抑えられることが知られている(Frick *et al.*, 2008)。本研究において、夏眠の継続は、血漿グルコースの低下を引き起こした。これは夏眠による絶食状態を表すと同時に、糖代謝の低下を示唆しているかもしれない。また、血漿尿素濃度は夏眠によって顕著に増加した。淡水飼育下の肺魚は通常、窒素代謝産物としてアンモニアを排泄しているが、夏眠状態になるとアンモニアの毒性を軽減するために尿素を合成することが知られている(Janssen and Cohen, 1968; Chew *et al.*, 2004)。これらの結果は、肺魚の夏眠による生理学的な適応応答のひとつを表している。一方で、血漿の主な電解質成分である Na⁺や Cl⁻の濃度に大きな変化は見られず、夏眠 1 ヶ月および 2 ヶ月の群では減少傾向が見られた。肺魚の夏眠初期では体表から大量の粘液が分泌され、これは周囲の泥を固化させるのに利用される。粘液成分の主成分は水やムチンなどの糖タンパク質に加えて、電解質も含まれるため、本実験で見られた血漿 NaCl の減少傾向はこの大量の粘液分泌によって失われた可能性が考えられる。

3. 3 肺魚と他の動物の血中アルドステロンレベルの比較

肺魚の血中アルドステロン濃度は Reinking によって報告(1983)があるが、その信頼性については懐疑的とされてきた。そこで、本研究において、改めて肺魚の血中にアルドステロンが存在するか否かを検証するため、淡水飼育下にある肺魚の末梢血を採血し、EIA 法により血中アルド

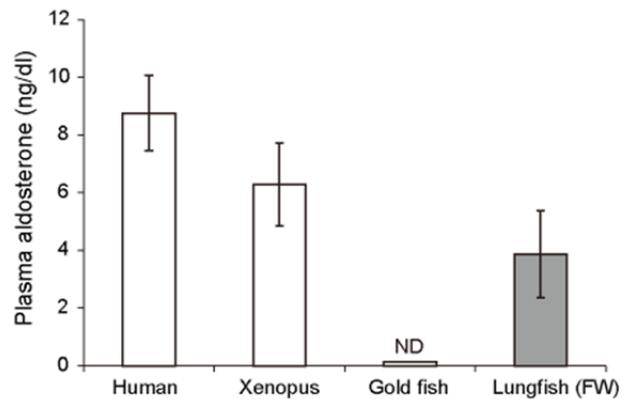


図 5. 肺魚と他の動物の血中アルドステロンレベルの比較

ステロンレベルを測定した。また、比較対象として、ヒトとアフリカツメガエル、キンギョ(条鰭類真骨魚)の血中アルドステロンレベルも同様に調べた。その結果、肺魚の血中アルドステロンレベルはヒトやアフリカツメガエルに比べて低いものの、確かに存在していることが示された(図 5)。一方で、肺魚類や四肢動物とは系統が異なる条鰭類真骨魚のキンギョの血中アルドステロンレベルは検出限界値以下(ND)であった。この結果は、アルドステロンが肺魚を含む肉鰭系統の動物群には存在するが、条鰭系統の魚種には存在しないという仮説を支持するものである。

3. 4 夏眠処理による ENaC 遺伝子の発現変化と血中アルドステロンレベルの変化

腎臓における ENaC α サブユニットの発現変化についてリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、ENaC mRNA の発現は、夏眠の経過とともに低下した(図 6A)。また、ENaC 発現の促進に作用するアルドステロンの血中

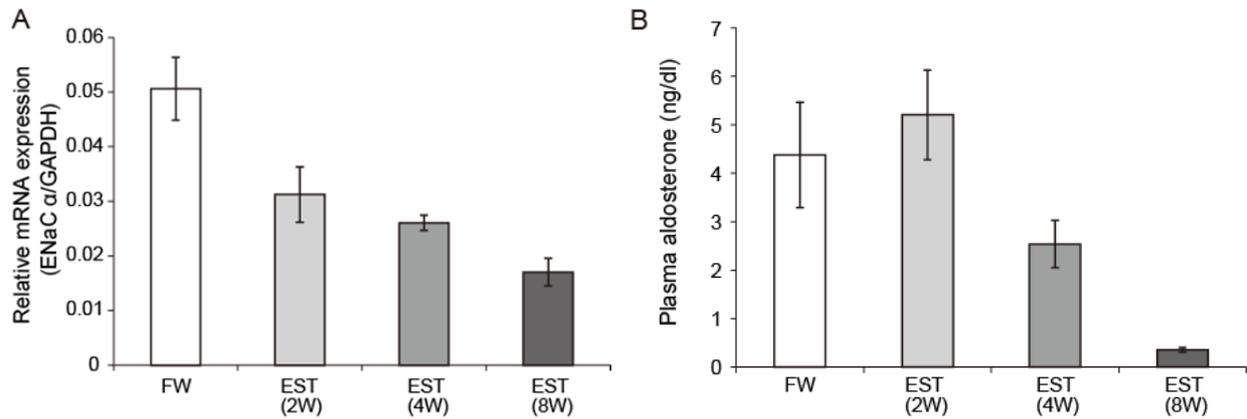


図 6. 腎臓における ENaC α サブユニット遺伝子の夏眠による発現変化(A)と血漿アルドステロン濃度の変化(B)

レベルは、ENaC 発現の変化と同様に、夏眠の経過とともに低下した(図 6B)。

当初、我々は、肺魚の陸生適応とも言える夏眠状態において、ENaC 発現やアルドステロンレベルが増加すると予想していた。しかしながら、本研究では逆に減少する結果となった。その要因として、肺魚の夏眠行動はあくまで休眠であり、単純に陸上への適応行動と考えることはできないという事である。夏眠や冬眠を含む休眠では様々な代謝系が著しく低下することが知られており、アルドステロン産生を担うステロイド合成系もまた低下していると考えられた。実際、夏眠によって、心拍数や呼吸数の低下が起こり、酸素消費量も低下しており、エネルギー消費を伴う多くの代謝系・合成系の活性が低下している。したがって、夏眠によるステロイド合成系の低下がアルドステロン産生を減少させ、さらに ENaC 発現の減少を引き起こした可能性が考えられる。Na⁺は生体に必須の電解質であるが、夏眠下では尿の排泄が伴わないため、Na⁺の体外への流出も少ない。その一方で、体液浸透圧よりも低張な環境に棲む淡水魚では逆に Na⁺が体外に失われるため、鰓から積極的に Na⁺を体内へと取り込むとともに、腎臓で Na⁺を再吸収して、尿中に排泄される Na⁺を最小限に留めている。これは、淡水飼育下の肺魚の鰓や直腸、腎臓に ENaC 発現が見られたこと、またその ENaC 発現レベルが夏眠下よりも淡水飼育下で高かったこととも合致する。したがって、肺魚類において、ENaC とその発現を調節するアルドステロンは淡水下で Na⁺の保持に機能していると考えられる。この結果は、当初我々が考えていた仮説とは異なったが、アルドステロンや ENaC が他の一般的な条鰭系統の真骨

魚類には存在しないことから、肉鰭系統の肺魚類はこれら真骨魚類とは異なる Na⁺調節機構を獲得していることが新たに明らかとなった。

4. 結論

本研究によって、肺魚類は四肢動物と同様のアルドステロン-ENaC システムによる Na⁺ 調節機構を有していることが明らかとなった。また、ENaC 遺伝子やその発現調節に作用するアルドステロンが条鰭系統やそれより原始的な軟骨魚類、無顎類には存在しないことから、我々ヒトを含む四肢動物の Na 調節機構の原型は、約 4 億年前に地球上に出現した肺魚類に遡ることが示唆された(図 7)。

5. 今後の課題

本研究において、我々は、アルドステロン-ENaC システムが肺魚類に存在し、このシステムが肉鰭類への進化の過程で獲得されたことを明らかにした。我々は、以前の研究で肺魚の夏眠時に腎臓での水再吸収機構が活性化していることを見出し(Konno *et al.*, 2010)、肺魚の夏眠行動が陸上環境適応と同様の生理的反応を示すのではないかと仮定していた。しかしながら、肺魚の夏眠において、アルドステロン-ENaC システムはダウンレギュレーションしており、ステロイド合成系だけでなく、エネルギー代謝に関わる種々の代謝系も低下していることが考えられた。したがって、肺魚の夏眠は、単純に陸上適応の一形態として捉えることはできず、あくまで乾燥環境に対する休眠行動であることが示唆された。この結果を受けて、今後は、両生類の幼生(水棲)から成体(陸生)への変化(変態)に

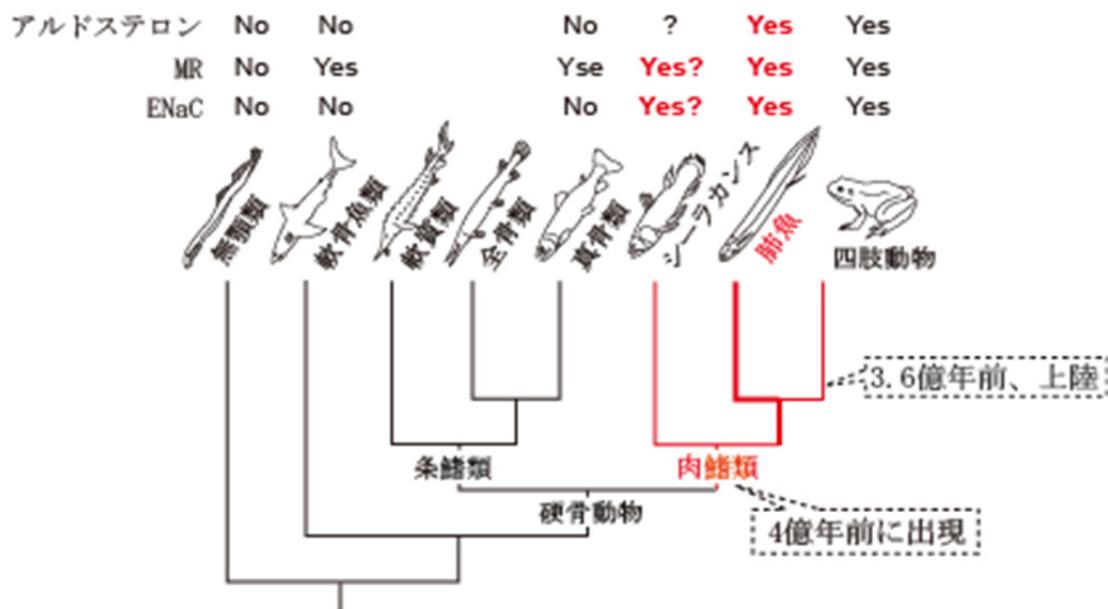


図7. 脊椎動物の系統進化におけるアルドステロン、MR、ENaCの存在

においてアルドステロン-ENaC システムの生理学的意義を明らかにしていくことが必要であると考えている。

文献

Barbry, P. and Hofman, P. (1997) Molecular biology of Na⁺ absorption. *Am. J. Physiol.*, 273, G571-585.

Chew, S. F., Chan, N. K., Loong, A. M., Hiong, K. C., Tam, W. L. and Ip, Y. K. (2004) Nitrogen metabolism in the African lungfish (*Protopterus dolloi*) aestivating in a mucus cocoon on land. *J. Exp. Biol.*, 207, 777-786.

Colombo, L., Dalla Valle, L., Fiore, C., Armanini, D. and Belvedere, P. (2006) Aldosterone and the conquest of land. *J. Endocrinol. Invest.*, 29, 373-379.

Frick, N. T., Bystriansky, J. S., Ip, Y. K., Chew, S. F. and Ballantyne, J. S. (2008) Lipid, ketone body and oxidative metabolism in the African lungfish, *Protopterus dolloi* following 60 days of fasting and aestivation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 151, 93-101.

Janssens, P. A. and Cohen, P.P. (1968) Nitrogen metabolism in the African lungfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24,

879-886.

Kassahn, K. S., Ragan, M. A. and Funder, J. W. (2011) Mineralocorticoid receptors: evolutionary and pathophysiological considerations. *Endocrinology*, 152, 1883-1890.

Konno, N., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Matsuda, M. and Uchiyama, M. (2010) Vasotocin/V2-type receptor/aquaporin axis exists in African lungfish kidney but is functional only in terrestrial condition. *Endocrinology*, 151, 1089-1096.

Reinking, L. N., (1983) Aldosterone response to renin, angiotensin, ACTH, hemorrhage and sodium depletion in a freshwater teleost, *Catostomus macrocheilus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, 74, 873-880.

Schild, L. (2004) The epithelial sodium channel: from molecule to disease. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 151, 93-107.

Warnock, DG. (2001) Liddle syndrome: genetics and mechanisms of Na⁺ channel defects. *Am. J. Med. Sci.* 322, 302-307.

Analysis of Aldosterone-ENaC Pathway in Lungfish: Evolutionary Insight to the Conquest of Land of Vertebrates

Norifumi Konno¹, Jean Joss², Minoru Uchiyama¹

¹Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama

²Department of Science, Macquarie University

Summary

In tetrapod, adrenal cortical hormone, aldosterone, plays a major role in the renal Na homeostasis by regulating expression and activity of an epithelial sodium channel (ENaC). It is thought that the aldosterone-ENaC system evolved with the emergence of the tetrapods, because the presence of both aldosterone and ENaC has not thus far been demonstrated in fishes. Lungfish, an archaic group of fish belonging to the class of lobe-finned fish (Sarcopterygii), are recognized as the closest living relatives of terrestrial tetrapods among fishes. They overcome the dry season by estivating in subterranean mud cocoons for several months without water. In this study, we explored genes of ENaC and mineralocorticoid receptor in African lungfish, *Protopterus annectens*, and investigated effects of estivation on renal ENaC expression and plasma aldosterone level. We successfully cloned ENaC and MR from the lungfish. Phylogenetic analysis showed that cloned three subunits (α , β , γ) of ENaC belong to each subunit group of tetrapods. Gene expression of ENaC α -subunit was detected in the gill, kidney and rectum, which are known as osmoregulatory organs. Functional plasma aldosterone concentration was detected in the lungfish kept in freshwater (FW), but not in gold fish. Unexpectedly, artificial estivation (EST) for 8 weeks decreased plasma aldosterone and renal ENaC expression.

Our results indicate that lungfish already possess the Na regulating mechanism mediated by aldosterone and ENaC in the kidney, but the system is likely functional in aquatic environment than in the terrestrial estivating condition. This suggests that lungfish conducts a different Na regulation from teleost fish of ray-finned fish lineage.