

助成番号 0622

フグ科魚類を用いた好塩性遺伝子群の探索

安東 宏徳

九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門

概要 【背景と目的】 魚類の浸透圧調節は、鰓や腎臓などの浸透圧調節器官における水と塩の排出と吸収により行われる。これまでの研究から、浸透圧調節には上皮細胞の膜を介したイオン輸送機構とその内分泌系による調節が重要であると考えられているが、その分子の実体はまだ明らかではない。本研究では、浸透圧調節の新たな分子生理学的メカニズムを明らかにするために、フグ科魚類を用いて浸透圧調節に関わる新規の遺伝子群を同定することを目指した。フグ科魚類には塩分耐性が異なる様々な種が存在し、またフグゲノムが活用できるため、浸透圧調節能を遺伝子機能の点から研究するのに非常に有用なモデル生物である。

【方法】 フグ科魚類の浸透圧適応能を明らかにするため、トラフグを含む4種のフグ科魚類を用いて浸透圧刺激実験を行った。それらの魚の脳、下垂体、鰓、腎臓、血液を採取し、塩濃度の変化に応じた細胞機能の変化を解析した。細胞機能として、血漿中の浸透圧と Na^+ および Cl^- の濃度、鰓と腎臓の Na^+ 、 K^+ -ATPaseの活性、さらに視床下部の神経葉ホルモン、バソトシン(VT)とイソトシン(IT)の遺伝子発現量を測定した。これらの結果を基に、新規の遺伝子の探索に用いる試料として、淡水に移行したトラフグの腎臓と視床下部を選定し、Gene Fishing法により新規浸透圧調節関連遺伝子を探索した。

【結果と考察】 トラフグを海水から低塩分環境に移行した結果、血漿中の浸透圧と Na^+ および Cl^- の濃度が低下し、腎臓の Na^+ 、 K^+ -ATPaseの活性が上昇した。血液浸透圧の低下に伴って、尿細管でのイオンの吸収が活発になったことが分かる。また、視床下部でVTとITの遺伝子発現が高まり、尿量が増大して多量の低張尿が作られたと考えられる。次に、淡水移行したトラフグの腎臓と視床下部を用いて、Gene Fishing法により浸透圧刺激によって発現量が変化する遺伝子をスクリーニングした。その結果、腎臓から3種類、視床下部から2種類のcDNA断片を得た。視床下部から得られたcDNA(ACP9-HとACP14-H)は共に、新規のmRNAの3'側領域をコードしたものであった。淡水移行に伴う発現量の変化をリアルタイムPCR法で解析した結果、ACP9-Hは移行後1日目でmRNA量が約1.7倍上昇し、2日目で半減した。また、ACP14-Hは移行後2日目では移行前に対してmRNA量が約半減した。ACP14-Hは、海水環境下で機能する好塩性遺伝子の一つと考えられる。

1. 背景と研究目的

地球上の生命は海で誕生したと考えられている。最初の生命の誕生以来、生物は海水の塩分環境の中でその生命活動を維持し、子孫を残してきた。海水の塩分環境に対する適応機能は長い進化の中で確立されてきたもので、塩と生物の関わりの中でも最も古いものの一つであろう。魚類は浸透圧調節機能を発達させて、様々な塩環境の中で成育している。成育する水域は、海水、汽水、淡水に分けられ、そこに棲む魚類は、それぞれ海水魚、汽水魚、淡水魚と呼ばれる。多くの魚類は海水または淡水のどちらかにしか適応できない狭塩性魚類であるが、魚類の中には海水と淡水の間を行き来して広い塩濃度に適応できる広塩性魚類が存在する。

魚類の浸透圧調節は、鰓や腎臓などの浸透圧調節器官における水と塩の排出と吸収により行われる。これまでに主にサケやウナギなどの広塩性魚類を用いて浸透圧調節機構の研究が行われ、鰓や腎臓の上皮細胞におけるイオン輸送のモデルが提示されている¹⁾。また、イオン輸送能は体内の様々なホルモンによって調節されることも分かっている。体外の塩分環境の変化を化学情報として鰓や腎臓に伝達してイオン輸送能を調節するホルモンとして、視床下部の神経ペプチドであるバソトシン(VT)とイソトシン(IT)、下垂体から分泌されるプロラクチンや成長ホルモン、副腎皮質ホルモンであるコルチゾル、肝臓で作られるインスリン様成長因子Iなどが知られている。これまでの研究から、浸透圧調節には上皮細胞の膜を介したイオン輸送機構とその内分泌系

による調節が重要であると考えられているが、その分子的实际はまだ明らかではない。本研究の目的は、魚類の浸透圧調節に働く分子群の構造と機能を解明し、広塩性と狭塩性の違いを作る分子生理学的メカニズムを明らかにすることである。特に、これまでに知られていない新たな浸透圧調節機構を見出すために、浸透圧調節に関わる新規の分子群を同定することを目指した。

本研究の材料としてフグ科魚類を用いた。フグ科魚類には塩分耐性が異なる様々な種が存在する。中でも海水魚のトラフグと汽水魚のミドリフグはゲノムプロジェクトが進行し、それらのゲノム配列が公開されている。したがって、フグ科魚類は浸透圧調節能を遺伝子機能の点から研究するのに非常に有用なモデル生物である。そこで本研究では、トラフグ、ミドリフグを含むフグ科魚類を材料とし、フグゲノムを活用して新規の浸透圧調節関連遺伝子の探索を試みた。

研究の進め方として、まずフグ科魚類の浸透圧適応能を明らかにするため、塩分耐性が異なると考えられるトラフグ(海水魚)、ミドリフグ(汽水魚)、クサフグ(海水魚)、メコンフグ(淡水魚)の4種を用いて、異なる塩濃度に暴露して浸透圧刺激実験を行った。それらの魚の脳、下垂体、鰓、腎臓、血液を採取し、塩濃度の変化に応じた細胞機能の変化を解析した。細胞機能として、血漿中の浸透圧と Na^+ および Cl^- の濃度を測定して浸透圧適応能を調べると共に、鰓と腎臓においてイオン輸送の主たる役割を担う Na^+ 、 K^+ -ATPase の活性を測定した。脳においては、浸透圧調節に重要な働きを持つと考えられる視床下部に焦点を絞り、浸透圧刺激に対する視床下部ニューロンの反応をモニターする分子マーカーとして VT と IT を選び、それらの遺伝子をクローニングして発現の変動を解析した。これらの結果を基に、新規の

遺伝子の探索に用いる試料として、淡水に移行したトラフグの視床下部と腎臓を選定し、改良型のディファレンシャルディスプレイ法(DD法)である Gene Fishing 法(Seegene, Inc.)を用いて、浸透圧刺激によって発現レベルが変化する遺伝子を探索した。視床下部からは、低塩分濃度刺激に伴って発現が変化する2種類の新規遺伝子を同定した。

2. 研究方法

2.1 フグ科魚類の浸透圧適応能の解明

2.1.1 浸透圧刺激実験

2.1.1.1 実験材料

浸透圧適応能を調べるフグ科魚類として、トラフグ(*Takifugu rubripes*)、ミドリフグ(*Tetraodon nigroviridis*)、クサフグ(*Takifugu niphobles*)、メコンフグ(*Tetraodon turgidus*)を用いた(Fig. 1)。それぞれの魚の体長は、トラフグ 9.74 ± 0.06 cm、ミドリフグ 2.75 ± 0.04 cm、クサフグ 12.61 ± 0.18 cm、メコンフグ 5.67 ± 0.08 cm であった。

2.1.1.2 浸透圧移行条件と試料の採取

浸透圧刺激として、トラフグとクサフグは海水から33%海水、10%海水、淡水へ移行させた。ミドリフグは、33%海水から海水、10%海水、淡水へ移行させた。メコンフグは、淡水から海水、33%海水、10%海水へ移行させた。

各実験において、移行後3日間の生存率を調べると共に、移行前、移行後1日目、2日目、3日目に試料の採取を行った。ただし、供試個体数が少なかったミドリフグは3日目のみ、メコンフグは移行前、1日目、3日目のみで試料を採取した。採取した試料は、血液、脳、下垂体、鰓、腎臓である。ミドリフグは個体が小さいため血液を採取できなかった。血液は、5,000回転、10分、4°Cで遠心した後、血漿を分離し、

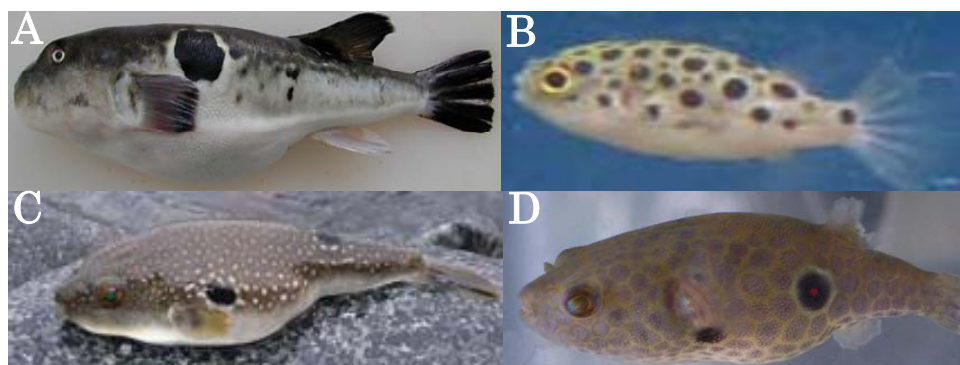


Fig. 1 Four Tetraodontidae species used in the present study. (A) Tiger puffer, (B) Green puffer, (C) Grass puffer, (D) *Tetraodon turgidus*

-30°Cで保存した。脳はRNAlater (Ambion) に浸して-30°Cに保存した。下垂体、鰓、腎臓は液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。鰓と腎臓の一部は、 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性を測定するため、ホモジナイズ用バッファーに浸して-30°Cで保存した。

2. 1. 2 浸透圧適応能の解析

2. 1. 2. 1 血漿中の浸透圧、 Na^+ および Cl^- の濃度の測定

血漿中の浸透圧の測定は蒸気圧浸透圧法により、VAPRO オスモメーター 5520 型 (WESCOR) を用いて行った。また、血漿中の Na^+ 濃度の測定は原子吸光法により、Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer Z-5300 (Hitachi) を用いて行った。血漿中の Cl^- 濃度の測定には、デジタルクロライドメーター (BUCHLER) を用いて行った。

2. 1. 2. 2 鰓と腎臓における Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性の測定

鰓と腎臓をホモジナイズした後、遠心分離(3,000 回転, 5 分間, 4°C)し、上澄み液中の Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性を Folmar and Dickhoff (1979)²⁾ に基づいて測定した。

2. 2 フグ科魚類の VT 遺伝子、IT 遺伝子の同定と発現変動

2. 2. 1 トラフグ、ミドリフグ、クサフグの VT 遺伝子、IT 遺伝子の同定

トラフグ VT/IT 遺伝子座 (U90880) の配列を用いて、ミドリフグのゲノムデータベース (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetranew/>) を BLAST 検索し、ミドリフグの VT/IT 遺伝子座の配列を決定した。次にクサフグの VT 遺伝子と IT 遺伝子の配列を決定するため、トラフグとミドリフグの間で保存されている配列をプライマーとして用い、クサフグゲノム DNA より VT 遺伝子と IT 遺伝子を PCR 法により増幅し、塩基配列を決定した。

2. 2. 2 浸透圧刺激に伴う VT 遺伝子、IT 遺伝子の発現変動

浸透圧刺激実験で採取したトラフグの脳より視床下部領域を切り出し、トータル RNA を抽出した。トラフグの VT 遺伝子および IT 遺伝子の配列を基に、両遺伝子の mRNA 量を測定できる微量定量系をリアルタイム PCR 法により確立した。その系を用いて、視床下部のトータル RNA に含まれる VT および IT の mRNA 量を測定した。

2. 3 新規浸透圧調節関連遺伝子の同定

2. 3. 1 GeneFishing 法による新規浸透圧調節関連遺伝子の探索

海水から淡水に移行したトラフグの腎臓と視床下部の試料(移行前, 1 日目, 2 日目)からトータル RNA を抽出し、GeneFishing™ DEG Premix Kit を用いて低浸透圧刺激に応じて発現レベルが変化する遺伝子の探索を行った。

2. 3. 2 新規浸透圧調節関連遺伝子の同定

GeneFishing 法により発現量が変化することが示された cDNA 断片をアガロースゲルから切り出し、StrataClone™ PCR Cloning Kit を用いてベクターにクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定し、その配列を用いてトラフグのゲノムデータベース (<http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html>) を BLAST 検索し、その cDNA 配列を含む遺伝子を同定した。さらに、その遺伝子の mRNA 量を測定する系をリアルタイム PCR 法により確立し、海水から淡水への移行に伴う発現レベルの変化を解析した。

3. 研究結果

3. 1 フグ科魚類の浸透圧適応能の解明

3. 1. 1 生存率

海水で飼育したトラフグおよびクサフグを低塩分環境に移行した結果、淡水に移行したトラフグ 19 個体の内、2 個体が 2 時間で死亡した (Fig. 2)。他の塩分濃度では 3 日間すべての個体が生存した。クサフグはどの塩分濃度でもすべての個体が生存した。33%海水で飼育したミドリフグは、どの塩分濃度でもすべての個体が生存した。淡水で飼育したメコンフグは、海水に移行したすべての個体が 3 時間で死亡した。他の塩分環境ではすべての個体が生存した。

3. 1. 2 トラフグにおける浸透圧適応能

低塩分環境への移行に伴った血漿中の浸透圧と Na^+ および Cl^- の濃度を測定した結果、塩濃度が低くなるにつれて、浸透圧、 Na^+ および Cl^- の濃度は低下した (Fig. 3, Cl^- の濃度も Na^+ と同様に低下した)。しかし、低下の割合は移行後 1 日から 3 日にかけて小さくなり、浸透圧と Na^+ および Cl^- の濃度は成育可能なレベルに維持されていた。

それらの個体の鰓と腎臓の Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性を測定した結果、鰓では塩分濃度に応じた変化は見られなかったが、腎臓では移行後 1 日から 2 日にかけて低塩分になるほど活性が上昇した (Fig. 4)。

3. 1. 3 ミドリフグにおける浸透圧適応能

33%海水で飼育したミドリフグを淡水、10%海水、海水に移行させ、3 日目に鰓と腎臓を採取し、 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性を測定した (Fig. 5)。その結果、鰓では海水に移行したものは淡水に移行したものより活性が高かった。一方、腎臓では

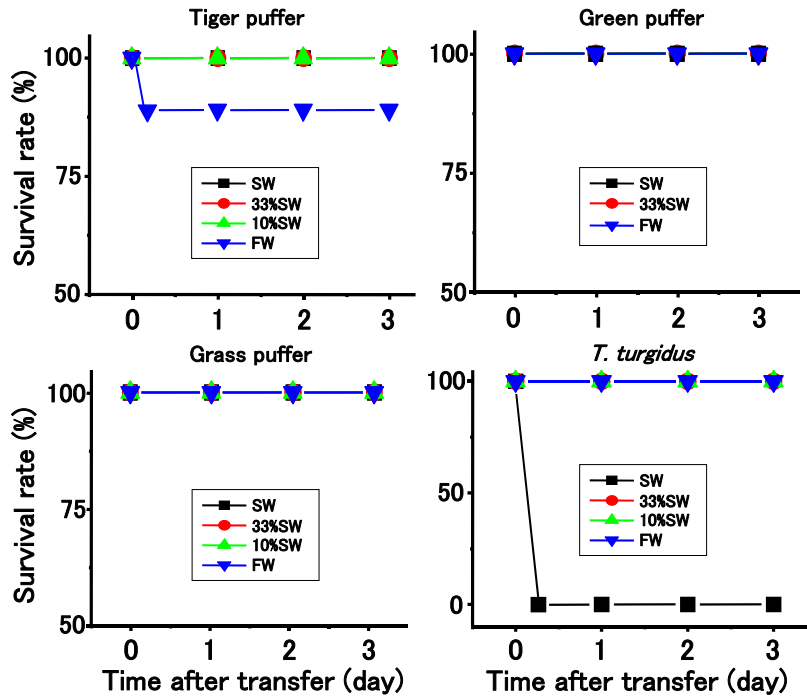


Fig. 2 Survival rates of the Tetraodontidae species after transfer to different osmotic conditions. SW, seawater; FW, fresh water.

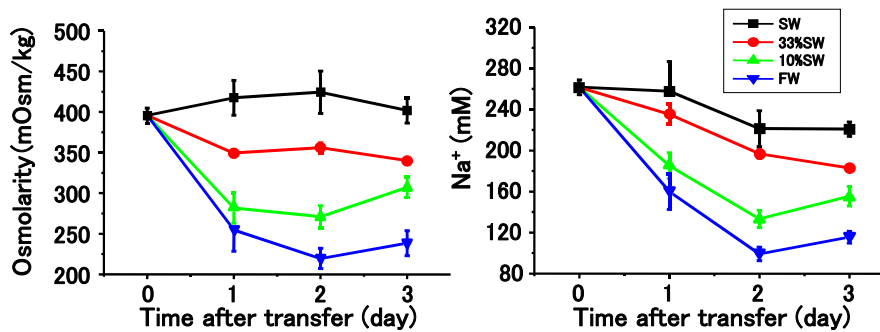


Fig. 3 Plasma osmolarity and Na⁺ concentration in tiger puffer transferred from seawater (SW) to hypotonic conditions. FW, fresh water.

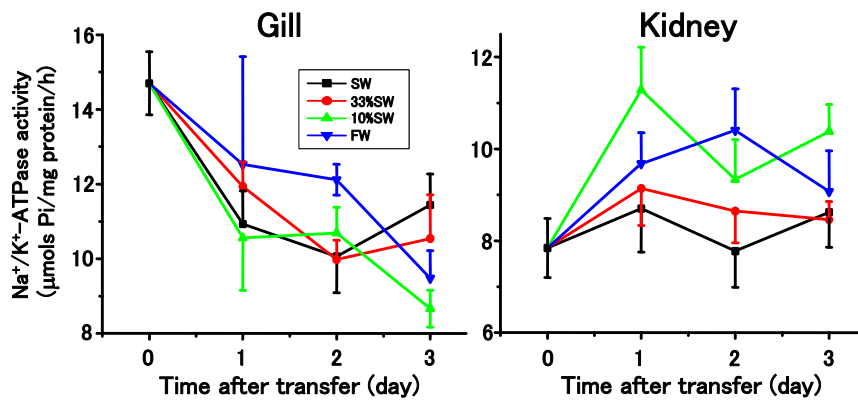


Fig. 4 Na⁺, K⁺-ATPase activity of gill and kidney in tiger puffer transferred from seawater (SW) to hypotonic conditions. FW, fresh water.

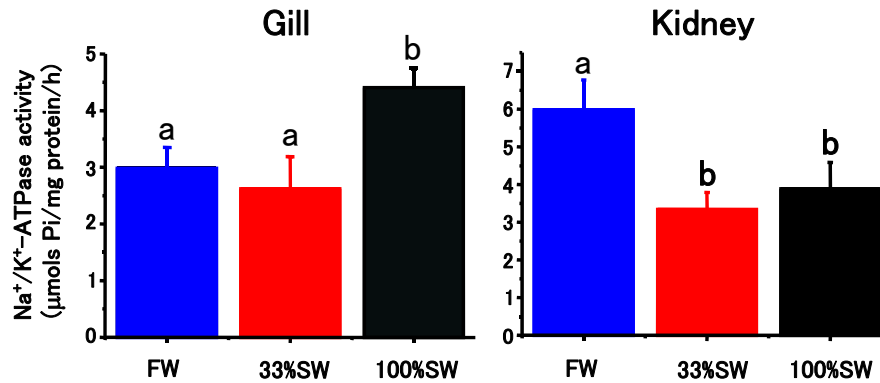


Fig. 5 Na⁺, K⁺-ATPase activity of gill and kidney in green puffer transferred from 33% seawater (SW) to different osmotic conditions. FW, fresh water. a, b, Values with different characters are significantly different ($p < 0.05$).

逆に淡水に移行したもののほうが海水に移行したものより活性が高かった。

3. 1. 4 メコフグにおける浸透圧適応能

淡水で飼育したメコフグを高塩分環境へ移行した時の血漿中の浸透圧と Na⁺および Cl⁻の濃度の変化を測定した結果、塩濃度が高くなるにつれて、浸透圧、Na⁺および Cl⁻の濃度は増加した (Fig. 6, Cl⁻の濃度も Na⁺と同様に増加した)。特に、海水に移行した個体では、血漿中の浸透圧と Na⁺および Cl⁻の濃度は成育可能な範囲を超えるレベルまで急激に上昇した。33%海水では、3 日間では成育可能なレベルに納まっていた。

それらの個体の鰓と腎臓の Na⁺, K⁺-ATPase 活性を測定した結果、鰓では塩分濃度に応じて活性が低下する傾向が見られ、腎臓では逆に上昇する傾向が見られた (Fig. 7)。

3. 2 フグ科魚類の VT 遺伝子、IT 遺伝子の同定と発現変動

3. 2. 1 トラフグ、ミドリフグ、クサフグの VT 遺伝子、IT 遺伝子の構造

トラフグの VT/IT 遺伝子座 (85 kbp) の配列を基に、ミドリフグの VT/IT 遺伝子座 (72 kbp) の配列を決定した結果、VT 遺伝子と IT 遺伝子を含む 16 個の遺伝子のうち 15 個の遺伝子の位置と方向が保存されていた。また、クサフグの VT 遺伝子 (4.5 kbp) と IT 遺伝子 (3 kbp) の配列を決定した結果、トラフグ、ミドリフグと共に、VT 遺伝子は 3 エキソン 2 イントロンから成り、IT 遺伝子は 4 エキソン 3 イントロンから成っていた。塩基配列を 3 種の間で比較すると、トラフグとクサフグではエキソン領域だけでなく、5' 上流域やイントロン領域でも 90% 以上の相同性があることが分かった。トラフグとミドリフグでは非コード領域の相同性は 60% 程度である。フグ科魚類

3 種の VT 遺伝子、IT 遺伝子の構造比較についての結果を論文としてまとめ、General and Comparative Endocrinology 誌に投稿した³⁾。

3. 2. 2 浸透圧刺激に伴う VT 遺伝子、IT 遺伝子の発現変動

VT および IT の mRNA のリアルタイム PCR 定量系を確立し、トラフグの浸透圧刺激に伴う遺伝子の発現レベルの変動を解析した。その結果、VT 遺伝子、IT 遺伝子共に、淡水移行後 1 日目で発現が上昇する傾向が見られた (Fig. 8)。

3. 3 新規浸透圧調節関連遺伝子の同定

3. 3. 1 GeneFishing 法による新規浸透圧調節関連遺伝子の探索

トラフグの浸透圧刺激実験の結果から、低浸透圧刺激に対する適応反応として、淡水に移行した魚において腎臓の Na⁺, K⁺-ATPase 活性が高まることと視床下部で VT および IT 遺伝子の発現が高まること分かった。そこで、浸透圧調節に関わる新規の遺伝子を探索する試料として、移行前、淡水移行 1 日目、2 日目の腎臓と視床下部を用いることにした。GeneFishing™ DEG Premix Kit を用いて、淡水移行後の時間に伴って発現レベルが変化する遺伝子を探索した。本研究では、20 種類の任意プライマー (Annealing Control Primer, ACP) を用いた。その結果、腎臓において 3 種類の cDNA 断片、ACP1-K, ACP2-K, ACP18-K が得られた (Fig. 9)。ACP1-K は淡水移行に伴って発現レベルが低下し、ACP2-K は 1 日目に上昇した。ACP18-K は 2 日目に上昇した。一方、視床下部からも 2 種類の cDNA 断片、ACP9-H と ACP14-H が得られた。ACP9-H は淡水移行後 1 日目から 2 日目にかけて発現レベルが低下し、ACP14-H は移行に伴って発現レベルが低下した。

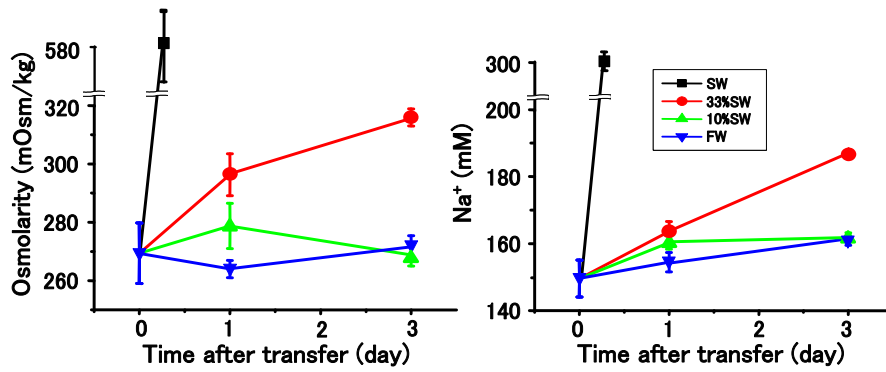


Fig. 6 Plasma osmolarity and Na^+ concentration in *Tetraodon turgidus* transferred from fresh water (FW) to hyperosmotic conditions. SW, seawater.

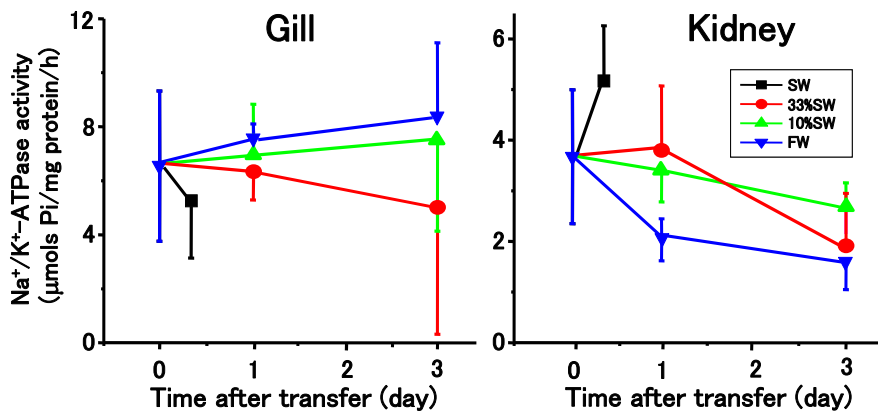


Fig. 7 Na^+ , K^+ -ATPase activity of gill and kidney in *Tetraodon turgidus* transferred from fresh water (FW) to hyperosmotic conditions. SW, seawater.

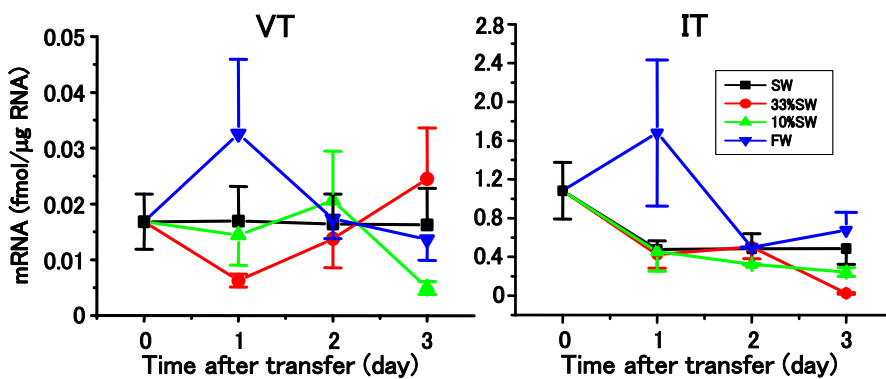


Fig. 8 VT and IT mRNA levels in the hypothalamus of tiger puffer transferred from seawater (SW) to hyposmotic conditions. FW, fresh water.

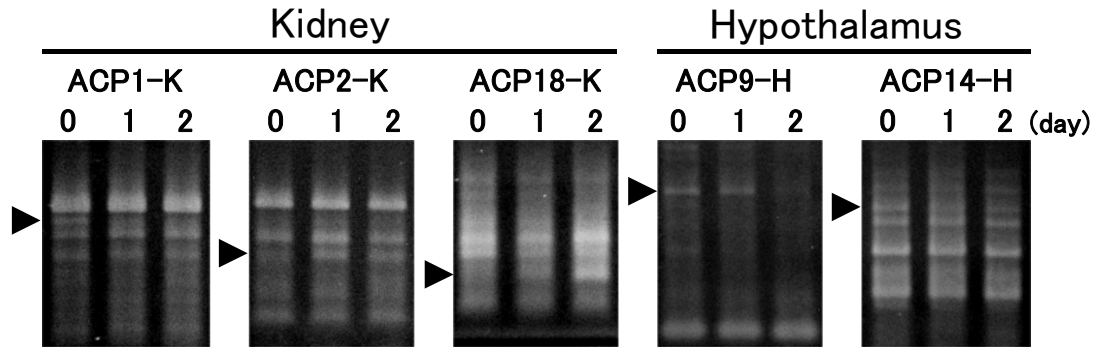


Fig. 9 Differentially expressed genes in the kidney and hypothalamus of tiger puffer transferred from seawater to fresh water.

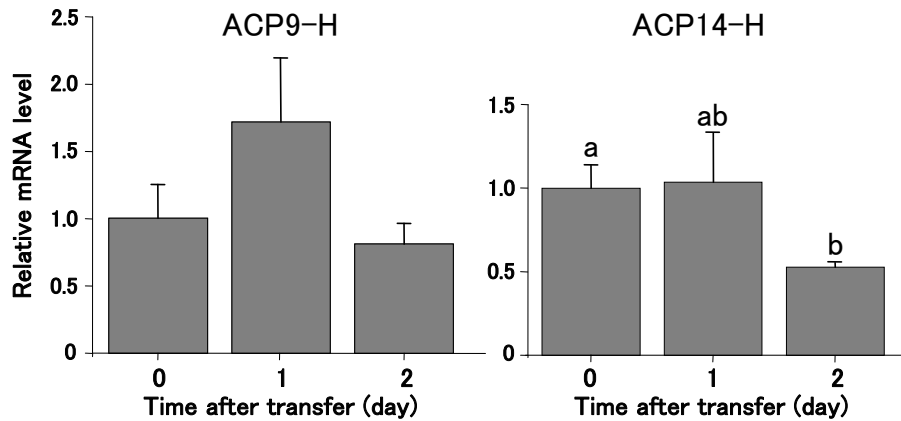


Fig. 10 Changes in the levels of ACP9-H and ACP14-H mRNAs in the hypothalamus of tiger puffer transferred from seawater to fresh water.

3. 3. 2 新規浸透圧調節関連遺伝子の同定

GeneFishing 法によって得られた cDNA 断片のうち、視床下部から得られた ACP9-H と ACP14-H をクローニングし、それらの塩基配列を決定した。ACP9-H は 661 塩基の cDNA を含んでおり、任意プライマー配列からポリ A テイルまでの mRNA の 3' 側の領域をコードしていた。得られた配列について遺伝子データベース上で相同性検索したが、有意な相同性を持つ遺伝子はなく、新規の遺伝子と考えられた。この新規遺伝子の mRNA のリアルタイム PCR 定量系を確立し、淡水移行に伴った mRNA の変化を解析した結果、移行後 1 日目で mRNA 量が約 1.7 倍上昇し、2 日目で半減した (Fig. 10)。

また、ACP14-H は 763 塩基の cDNA を含み、ACP9-H と同様に新規遺伝子の mRNA の 3' 側の領域をコードしたものであることが分かった。さらに、リアルタイム PCR 法によって

淡水移行に伴った mRNA の変化を解析した結果、移行後 2 日目では移行前に対して mRNA 量が約半減した (Fig. 10)。

4. 考 察

4. 1 フグ科魚類の浸透圧適応能

本研究では、まず始めにトラフグを含む 4 種のフグを用いて浸透圧適応能を調べた。当初はトラフグとミドリフグの 2 種を用いる計画であったが、ミドリフグは体サイズが小さいものしか手に入らず生理学的解析に向かないことから、塩分耐性が異なると考えられるクサフグとメコンフグも用いることにした。クサフグは海水フグであるが、産卵時には浜に集まり産卵する。また、河川に遡上することも知られている。一方、メコンフグはメコン川に成育する淡水フグであるが、その生活史はよく分かっておらず、海水適応という点で興味深い魚種である。

トラフグを海水から低塩分環境に移行すると血漿中の浸透圧と Na^+ および Cl^- の濃度が低下した。しかし、低下の度合いは移行後 1 日目より弱くなり、血液中にイオンを取り込む働きが亢進したことが分かる。鰓と腎臓の Na^+ , K^+ -ATPase の活性を調べてみると腎臓で活性が上昇しており、尿細管でのイオンの吸収が活発になったことを示している。また、視床下部で VT と IT の遺伝子発現が上昇したが、これは尿量の増大と関連している。淡水移行した魚の膀胱には尿が溜まっていたが、VT の働きにより糸球体での尿の濾過量が増えて多量の低張尿が作られていたと考えられる。これまでに、サケ科魚類などで VT が低浸透圧適応に働くことが示されているが⁴⁾、IT の機能はよく分かっていない。本研究結果は IT も低浸透圧適応に働くことを示唆するもので、興味深い結果である。一方、鰓では Na^+ , K^+ -ATPase の活性の活性は変化せず、低浸透圧環境におけるイオンの取り込みには鰓は重要でないと考えられる。トラフグを低浸透圧環境に晒した時に鰓の塩類細胞に形態学的な変化が起きないことが報告されている⁵⁾。

クサフグとミドリフグでは淡水に移行したものでも死亡せず、トラフグより低塩分耐性が優れていると考えられる。ミドリフグの Na^+ , K^+ -ATPase 活性を調べてみると、腎臓では淡水環境で活性が上昇し、鰓では海水環境で活性が上昇した。このことは、ミドリフグでは低浸透圧と高浸透圧の両方において Na^+ , K^+ -ATPase の活性が変化し、低浸透圧環境では腎臓でイオンの吸収が亢進し、高浸透圧環境では鰓の塩類細胞においてイオンの排出が活発に行われたことを示している。

淡水フグのメコンフグは海水には適応できず、血漿中の浸透圧と Na^+ および Cl^- の濃度は急激に上昇して3時間で死亡した。イオン排出に重要と考えられる鰓では Na^+ , K^+ -ATPase 活性は塩濃度が高くなるにつれて減少する傾向が見られ、ミドリフグにおける変化と反対であった。腎臓では逆に活性が上昇する傾向が見られ、高浸透圧環境におけるイオン排出に腎臓が働く可能性が示された。メコンフグにおけるイオン排出のメカニズムは不明であるが、広塩性と狭塩性の違いを決める重要な分子生理学的メカニズムであると考えられる。

本研究結果から、フグ科魚類 4 種の浸透圧適応能は大きく異なることが分かった。その分子生理学的メカニズムも異なっていると考えられる。しかし、フグ科魚類は遺伝的近縁であり、特にトラフグ属の遺伝子配列は 90% 以上の相同性を持つと考えられる^{3, 6)}。浸透圧適応能の異なる魚種を用い

た解析にフグゲノムを有効に活用できるため、フグ科魚類は浸透圧調節の分子メカニズムの解明に非常に有用なモデル生物である。

4. 2 GeneFishing 法による浸透圧調節関連遺伝子の網羅的探索

浸透圧調節に関わる遺伝子を網羅的に探索する方法として GeneFishing 法を用いた。GeneFishing 法は偽陽性産物の増幅を抑えるように改良された DD 法であり、従来の DD 法に比べると、手間がかからず短時間で効率的に発現量の変化する遺伝子を同定できる。本研究では、20 種類の任意プライマーを用いたが一つのプライマーで 3-7 種類の PCR 産物が得られることから、全体では 100 個以上の遺伝子について発現量を解析したと考えられる。解析できる遺伝子の数としてはマイクロアレイに及ばないものの感度や再現性の点ではマイクロアレイより優れている。本法は網羅的に発現量の異なる遺伝子を効率的にスクリーニングするのに有効な方法である。

4. 3 トラフグの新規浸透圧調節関連遺伝子、ACP9-H と ACP14-H

低浸透圧刺激により発現の変化する新規の遺伝子として、トラフグの視床下部より ACP9-H と ACP14-H を同定した。共に、遺伝子産物の機能の解明には今後の解析が必要であるが、ACP9-H は淡水移行後 1 日目に発現量が上昇しており、VT や IT のように低浸透圧刺激に応じて視床下部のニューロンで起こる機能変化に関わる遺伝子と考えられる。一方、ACP14-H は移行に伴って発現量が低下する遺伝子であり、海水環境下での視床下部ニューロンの機能に関わるものと考えられる。本研究課題名の“好塩性遺伝子 *halophilic gene*”のカテゴリーとして、高塩分環境で促進的な機能をする遺伝子と低塩分環境下で抑制的な機能をする遺伝子が考えられるが、ACP14-H はその前者に相当すると考えられる。

5. 今後の課題

今後の課題として、まず本研究で得られた ACP9-H と ACP14-H の全遺伝子構造の決定と機能の解明が挙げられる。その際には VT ニューロンおよび IT ニューロンとの関連性に注目して解析する必要がある。浸透圧調節関連遺伝子のさらなる探索として、腎臓から得られた cDNA 断片の遺伝子の同定、下垂体や鰓の解析が挙げられる。また、GeneFishing 法によるスクリーニングにおいて、任意プライマーの数を増やしたり、移行時間に伴った変化だけでなく、一

定時間後の塩分濃度に伴った変化を検討することも可能である。トラフグを用いて浸透圧刺激に応じて発現量が変化する遺伝子をより多く同定し、その発現や機能を汽水フグや淡水フグにおいて解析することによって、好塩性の遺伝子機構を明らかにしていく必要がある。また、その知見は水産有用魚種の好塩性の人為的な制御に応用できる。例えば、病原菌や赤潮などにより被害を受ける海水魚の陸上淡水養殖に応用すれば、その安定的生産を可能にすることができるであろう。

文献

- 1) McCormick, S.D., Hormonal control of gill Na^+ , K^+ -ATPase and chloride cell function. In "Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation" (C.M. Wood and T.J. Shuttleworth, eds), Academic Press, New York, 1995, pp. 285-315.
- 2) Folmar, L.C. and Dickhoff, W.W., 1979. Plasma thyroxine and gill Na^+ , K^+ -ATPase changes during seawater acclimation of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Comp. Biochem. Physiol. 63A, 329-332.
- 3) Motohashi, E., Hamabata, T. and Ando, H., Structure of neurohypophysial hormone genes and changes in the levels of expression during spawning season in grass puffer (*Takifugu niphobles*). Gen. Comp. Endocrinol. (submitted).
- 4) Urano, A., Kubokawa, K., and Hiraoka, S., Expression of the vasotocin and isotocin gene family in fish. In "Fish Physiology, Molecular Aspects of Hormonal Regulation in Fish" (N. Sherwood and C.L. Hew, eds), Academic Press, San Diego, 1994, pp. 101-132.
- 5) Lee, K.M., Kaneko, T. and Aida, K., 2005. Low-salinity tolerance of juvenile fugu *Takifugu rubripes*. Fish. Sci. 71, 1324-1331.
- 6) Kato, A., Doi, H., Nakada, T., Sakai, H. and Hirose, S., 2005. *Takifugu obscurus* is a euryhaline fugu species very close to *Takifugu rubripes* and suitable for studying osmoregulation. BMC. Physiology. 5, 18.

No. 0622

Identification of Novel Halophilic Genes in Pufferfish

Hironori Ando

Department of Animal and Marine Bioresource Science, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University.

Summary

Teleost fish maintain a similar salt content of their body fluids, approximately one-third of seawater (SW), despite of their external environments. Although strategies for maintaining body fluid homeostasis are different depending on their habitats, fundamental to osmoregulation is transport of water and ion in the gill and kidney. Furthermore, various hormones mediate osmotic signals from environment to these organs to regulate osmoregulatory capability. One of these hormones is neurohypophysial hormones, vasotocin (VT) and isotocin (IT) secreted from the hypothalamus. The aim of this study is to identify novel genes involved in ionic and osmotic regulation in pufferfish. Puffers include euryhaline and stenohaline species and are a useful model animal for studying the molecular mechanism of salinity tolerance by exploiting the fugu genome resources.

Four Tetraodontidae species, tiger puffer, grass puffer, green puffer, and *Tetraodon turgidus*, were transferred to four different osmotic conditions (SW, 33%SW, 10%SW, and fresh water (FW)). Their osmolality, $[Na^+]$ and $[Cl^-]$ of the blood and activities of Na^+ , K^+ -ATPase in the gill and kidney were assayed. These puffers showed different salinity tolerance depending on their habitats. In the tiger puffer transferred to FW, the renal Na^+ , K^+ -ATPase activity was increased concomitantly with the decrease of blood osmolality, $[Na^+]$ and $[Cl^-]$. Additionally, the amounts of VT and IT mRNAs in the hypothalamus were increased one day after transfer. Therefore, the kidney and hypothalamus of the FW-transferred tiger puffer were used in the screening of novel osmoregulatory genes.

The GeneFishing technology (Seegene, Inc.), which is an improved differential display method, was applied to identify novel genes. Three and two differentially expressed cDNAs were obtained from the kidney and hypothalamus, respectively. Two hypothalamic cDNAs (ACP9-H and ACP14-H) were cloned and their nucleotide sequences were determined. These two cDNAs encode 3' part of unknown mRNAs. Their expression profiles after transfer to FW were determined by real-time PCR. ACP9-H mRNA levels increased on day 1 and declined to half on day 2. ACP14-H mRNA levels decreased in response to salinity challenge, thus being a candidate of novel halophilic gene. Further identification of differentially expressed genes in tiger puffer and successive studies on their functions in puffers will provide valuable information on the molecular mechanism of salinity tolerance.