

## 平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(S))研究状況報告書

ふりがな		ひろせ しげひさ				
研究代表者氏名		広瀬 茂久			所属研究機関・部局・職	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
研究課題名	和文	塩類細胞の分子解剖と分化誘導機構(サブトラクションクローニングの活用と一般細胞生物学への貢献)				
	英文	Molecular characterization of chloride cells and their mechanism of differentiation				
研究経費	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位:千円	20,100	17,200	17,200	17,200	15,500	87,200
研究組織(研究代表者及び研究分担者)						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担(研究実施計画に対する分担事項)			
広瀬 茂久	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授	分子生理学	塩類細胞の分子構築の解明及び統括			
竹井 祥郎	東京大学・海洋研究所・教授	比較生理学	Kチャンネルとそのトポロジー類似体の機能解析及び塩類細胞の起源(H15まで)			
加藤 明	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助手	細胞生物学	塩類細胞の分化と機能—恐山ウグイ及び広塩性フグの活用			
星島 一幸	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助手	分子遺伝学	塩類細胞の分化誘導機構—ゼブラフィッシュ変異体と遺伝学の活用(H15年度から)			
当初の研究目的(交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)						
<p>本研究の中心となる塩類細胞は水棲生物の存在基盤となっている重要な細胞である。別名Mitochondria-rich cell ないしは Ionocyteとも言われるように、ミトコンドリアに富み、多数の<math>\text{Na}^+</math>,<math>\text{K}^+</math>-ATPaseを有する。この特質に着目し、(i) 細胞の生存に必須な<math>\text{Na}^+</math>,<math>\text{K}^+</math>-ATPaseの働きを助けるチャンネルで古くから存在が予想されながら実体が不明であったKチャンネルの有力候補と(ii) そのトポロジー類似体を同定することに成功した。さらに、(iii) pH 3.5の湖に生息する恐山ウグイの解析から、酸性適応にも塩類細胞が中心的役割を果たしていること及び塩類細胞の分化誘導機構の解明につながる手掛かりを得たので、これらを発展させ、新分野の開拓につなげる。</p>			<p>具体的には、以下の研究を行い、塩類細胞のイオン輸送を中心とする働きを分子レベルで説明できるようにするとともに、塩類細胞の特性を生かして見つけることの出来た新規分子を一般細胞生物学の理解に役立てる。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 塩類細胞の分子解剖と体液の恒常性維持機構の解明</li> <li>2. Kチャンネルとそのトポロジー類似体の細胞生物学</li> <li>3. 塩類細胞の分化誘導機構の解明</li> </ol>			

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

### 1. 塩類細胞の分子解剖と体液の恒常性維持機構の解明

サブトラクション クローニングを活用し、主として酸性型塩類細胞と淡水型塩類細胞を特徴付ける分子の同定を試み以下の成果を得た。

(1) 恐山ウグイの酸性適応機構の解明：青森県下北半島の恐山湖（pH 3.5）にすむウグイを酸性に適応させたときにエラの塩類細胞に強く発現してくる分子群の構造・機能解析から、酸性適応機構を分子レベルで説明できるようにした（下図）。 $H^+$ を排出し交換に  $Na^+$ を取り込む NHE ( $Na^+/H^+$  exchanger) が中心的役割を果たしており、それを補佐する形で、 $Na^+/HCO_3^-$  共輸送体 (NBC) が重碳酸イオンを血中に送り込むことにより体液の酸性化を防いでいること、さらにはグルタミン代謝系をも活性化し、アンモニアと重碳酸イオンを生成し酸性に抗しているという驚くべき仕組みを解明した (Am. J. Physiol. 2003)。

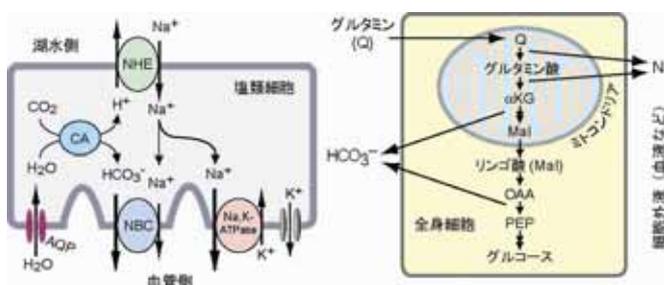


図 1. 塩類細胞のイオン輸送系(左)と代謝系(右)を駆使した恐山ウグイの酸耐性機構

(2) 淡水型塩類細胞の機能とその分子基盤：淡水型塩類細胞の機能は分子レベルではほとんど分かっていない。私たちは恐山ウグイの解析から、淡水型塩類細胞の主要機能すなわち淡水から塩を吸収するという難しい仕事を成し遂げていると推定される分子集合体(Transport metabolon)の有力候補を同定することに成功した (Comp. Biochem. Physiol. 2003)。より確かなものにするために、ゲノム解析が終了しているフグの同族で淡水でも生息できる種(→6頁、図)を用いて、同様の解析を進めつつある。

### 2. 塩類細胞の研究から派生した細胞生物学一般への貢献

塩類細胞に多量に発現するがゆえに同定に成功し、かつ細胞生物学上興味深い以下の分子の構造・機能・発現制御機構などを明らかにした。

(1) K チャネルとそのトポロジー類似体の細胞生物学：海水型塩類細胞の研究から派生した  $Na^+,K^+$ -ATPase 共役型 K チャネルが常に  $Na^+,K^+$ -ATPase と同じ部位に配置される仕組みを解明した(論文準備中)。またそのトポロジー類似体(MARCH-II)の存在も明らかにし、それらが細胞内トラフィッキングの新規制御因子であることを明らかにした (Mol. Biol. Cell 2004, in revision)。

(2) ミトコンドリア融合・分裂因子：塩類細胞にはミトコンドリアがぎっしり詰まっている。これらのミトコンドリアは融合と分裂を繰り返すことにより均一性を保っていると考えられる。候補となる融合因子や分裂因子の cDNA が拾えてきたので、研究競争にも配慮し、とりあえず哺乳類の系での解析結果を論文にし (BBRC 2003)、現在残りの新規クローンの解析を進めている。

### 3. 塩類細胞の分化誘導機構

(1) RBCC タンパク質：転写調節因子様のドメイン構造を有する RING-finger B-box coiled coil (RBCC) タンパク質を同定し、エラでのみ特異的に発現し、塩類細胞を中心とする上皮細胞の核内に多く存在することを明らかにした (Eur. J. Biochem. 2002)。

(2) Zebrafish 遺伝学の活用：ゲノム情報と遺伝学的解析が可能な Zebrafish を用いて、塩類細胞特異的に発現している遺伝子を同定し、有望な結果を得つつある(次節参照)。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

## 1. 恐山ウグイの耐酸性機構

(1) 特殊機能を発達させた生物に学ぶ: 本州の北端に位置する恐山に pH 3.5 の湖がある。生物が棲むには極めて厳しい環境であるがウグイが生きている。この世界に類を見ない魚では酸性型塩類細胞が発達しており、それが耐酸性の要となっていることを明らかにし、かつ酸性適応に重要な分子群の同定にも成功した。この仕事をまとめた論文 (Am. J. Physiol. 2003) はインターネットのアクセス数でトップ 10 に入った。また話題の研究として同誌の“In focus”欄でも取り上げられた (AJP 285, R1269, 2003)。



(2) 恐山から脳へ: 上記塩類細胞の解析から見つかった分子群及びそれらのホモログは、細胞生物学や生理学一般の理解にも多いに役立っている。例えば、脳脊髄液はいかにつくられるかという重要課題解決の糸口が得られつつある。脳の保護と機能維持に欠かせない脳脊髄液の主要成分の一つで、pH 維持に欠かせない重炭酸イオンが脈絡叢から脳室内にいかん輸送されるか不明であるが、上記恐山ウグイの研究にヒントを得て、有力候補となる輸送体の同定に成功している。

(3) そして世界の河川へ: 世界の河川には多くの魚が生息している。見慣れた光景なので不思議に思う人は少ないが、なぜあれだけ浸透圧差の大きい淡水中で生きていけるのかは不明である。NaCl のロスをも最小限にするための腎再吸収系の仕組みを分子レベルで説明できるようにした (PNAS, 2002) のにひき続き、エラの塩類細胞による積極的な NaCl の吸収機構についても、恐山ウグイの知見に基づき仮説を提唱した (Comp. Biochem. Physiol. 2003)。恐山ウグイの場合は淡水プラス酸性という二重苦を負っているために、NaCl の漏出が起こり易い。これを補うために恐山ウグイでは NaCl の吸収系が発達しており、通常の淡水魚の解析からは手掛りが得にくかつ

た NaCl 吸収問題の解決につながる分子 (NHE) の同定に成功した。これまで有力視されてきた ENaC (epithelial sodium channel) が魚のゲノム上に見い出されないことも、私たちの説を支持する。

## 2. 淡水に適応できるフグの発見

(1) ゲノム情報の活用: 淡水と海水の両方に適応できる広塩性フグが韓国にいるらしいという情報をインターネット検索で入手した。下関水族館経由で輸入し調べてみると、うわさどおり広塩性であった。ゲノム解析が終了しているトラフグの仲間で、遺伝子もイントロンを含め 99% 同じであることが分かった。塩類細胞を中心とする浸透圧適応機構の解明になくはならないモデル動物になるものと期待される。(→ 6 頁、図)

(2) マイクロアレイの活用: トラフグのアレイフィルターがゲノムプロジェクトを担当した MRC から市販されている。エラや腎臓や腸の cDNA を 5000 種以上含むフィルターと上記広塩性フグ由来の mRNA を組み合わせると、淡水適応や海水適応に重要な遺伝子をこれまでとは比較にならないほど簡便かつ迅速に見つけ、構造を決めることができるようになる。

## 3. 塩類細胞特異的プロモータとChIP分析

(1) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase のサブタイプの決定: 塩類細胞で多量に発現する遺伝子とその転写調節因子が同定できれば、塩類細胞の分化誘導機構の解明につながる。そこで、ゲノムが読まれており *In situ* hybridization 法も確立しているゼブラフィッシュの稚魚を用いて、塩類細胞の Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase のサブタイプを決定したところ、9 種類ある α サブユニットのうち 1 種類が塩類細胞で多量に発現していることが明らかになった。あとは、この遺伝子の発現調節に関わる転写因子が同定できれば、最近注目を集めているクロマチン免疫沈降法 (ChIP, 研究計画参照) の応用が可能となり、飛躍的な進展が期待できる。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

## (1) 学術誌等

1. 広瀬茂久,金子豊二 (2003) 恐山ウグイの酸性適応機構, *エネルギー・資源* **24**,221-225.
2. 広瀬茂久,大八木 昭,金子豊二 (2004) pH 3.5 の湖にすむ魚の秘密, *現代化学* 5月号,28-33.
3. Miyamoto, K., Nakamura, N., Kashiwagi, M., Honda, S., Kato, A., Hasegawa, S., Takei, Y., and Hirose, S. (2002) RING finger, B-box, and coiled-coil (RBCC) protein expression in branchial epithelial cells of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 6152-6161.
4. Miyazaki, H., Kaneko, T., Uchida, S., Sasaki, S., Takei, Y. (2002) Kidney-specific chloride channel, OmClC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 15782-15787.
5. Takei, Y., Hirose, S. (2002) The natriuretic peptide system in eels: a key endocrine system for euryhalinity? *Am. J. Physiol.* **282**, R940-R951.
6. Hirata, T., Kaneko, T., Ono, T., Nakazato, T., Furukawa, N., Hasegawa, S., Wakabayashi, S., Shigekawa, M., Chang, M. H., Romero, M., and Hirose, S. (2003) Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *Am. J. Physiol.* **284**, R1199-R1212.
7. Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., and Takei, Y. (2003) Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **136B**, 593-620.
8. Honda, S. and Hirose, S. (2003) Stage-specific enhanced expression of mitochondrial fusion and fission factors during spermatogenesis in rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 424-432.
9. Suzuki, Y., Yasuoka, Y., Shimohama, T., Nishikitani, M., Nakamura, N., Hirose, S., and Kawahara, K. (2003) Expression of the K<sup>+</sup> channel Kir7.1 in the developing rat kidney: role in K<sup>+</sup> excretion. *Kidney Int.* **63**, 969-975.
10. Inoue, K., Naruse, K., Yamagami, S., Mitani, H., Suzuki, N., Takei, Y. (2003) Four functionally distinct C-type natriuretic peptides found in fish reveal evolutionary history of the natriuretic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 10079-10084.
11. Yuge, S., Inoue, K., Hyodo, S., Takei, Y. (2003) A novel guanylin family (guanylin, uroguanylin, and renoguanylin) in eels: possible osmoregulatory hormones in intestine and kidney. *J. Biol. Chem.* **278**, 22726-22733.
12. Goering, L. M., Hoshijima, K., Hug, B., Bisgrove, B., Kispert, A., Grunwald, D. J. (2003) An interacting network of T-box genes directs gene expression and fate in the zebrafish mesoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 9410-9415.
13. Mistry, A. C., Kato, A., Tran, Y., Honda, S., Takei, Y., and Hirose, S. (2004) FHL5, a novel actin fiber-binding protein, is highly expressed in gill pillar cells and responds to wall tension in eels. *Am. J. Physiol.* **285**, in revision.
14. Nakamura, N., Fukuda, H., Kato, A., and Hirose, S. (2004) MARCH-II is a syntaxin-6-binding protein involved in the endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell* **15**, in revision.

他関連論文 8 編

## (2) 国際会議等

6th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Mt Buller, Australia, 2003.

International Symposium on Function of Marine Organisms, Tokyo, 2003.

他 7 件