

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	硬骨魚類の陸上適応に関する遺伝的基盤の解析
Title(English)	
著者(和文)	木村優希
Author(English)	Yuki Kimura
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12663号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:二階堂 雅人,本郷 裕一,増田 真二,立花 和則,加藤 明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12663号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

硬骨魚類の陸上適応に関する遺伝的基盤の解析

東京工業大学 生命理工学院

木村 優希

指導教員

二階堂雅人 准教授

目次

序論	1
研究対象となる生物種の系統関係	3
第Ⅰ部 陸上・高 CO ₂ 環境下におけるポリプテルスのエラの繊毛の可塑的な消失	4
1 要旨	4
2 背景	5
3 材料と手法	7
3.1 研究材料と飼育環境	7
3.2 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察	8
3.3 免疫染色	8
3.4 HE 染色	9
3.5 RNA-seq 解析	10
3.6 エラの換水運動と水流の観察	10
4 結果	11
4.1 エラ表面における繊毛の存在	11
4.2 エラの鰓弁間の形態的变化	12
4.3 セロトニン陽性細胞と繊毛細胞の局在比較	12
4.4 エラの繊毛の運動性と水流	14
4.5 繊毛細胞の運動性以外の機能の検討	17
5 考察	20
5.1 エラにおける繊毛の起源	20
5.2 繊毛の機能	21
5.3 環境に応じたエラの可塑性	22
5.4 高二酸化炭素環境と陸上適応	23
6 結論	25

第II部	水陸両生魚・ポリプテルスの陸上環境における恒常性維持機構	26
1	要旨	26
2	背景	28
3	材料と手法	31
3.1	ポリプテルスの陸上飼育	31
3.2	血漿の成分分析	31
3.3	筋組織中の尿素測定	31
3.4	飼育水中の成分分析	32
3.5	RNA 抽出と RNA-seq	32
3.6	蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	33
3.7	グルタミン合成酵素遺伝子の分子系統解析	34
4	結果	35
4.1	陸上環境における体液の恒常性維持	35
4.2	血中の老廃物とその排泄	37
4.3	尿素回路に関連する遺伝子発現	39
5	考察	43
5.1	陸上環境における体内ナトリウム維持機構	43
5.2	ポリプテルス腎臓における ENaC 局在	43
5.3	血中ナトリウム濃度および浸透圧の進化	44
5.4	陸上環境におけるアンモニア、尿素調節機構	46
5.5	グルタミン合成酵素と尿素回路	47
6	結論	50

第III部	古代魚で保存されたケラチン遺伝子クラスタと陸上環境適応の関連	51
1	要旨	51
2	背景	53
3	材料と手法	57
3.1	ケラチン遺伝子配列とそのゲノム上での位置	57
3.2	分子系統解析	59
3.3	選択圧解析	59
4	結果	60
4.1	ハイギョにおいて拡大したケラチン遺伝子クラスタ	60
4.2	肉鰭類のケラチン遺伝子の系統関係	61
4.3	選択圧解析	63
4.4	ハゼと陸棲ハゼのケラチン遺伝子の系統関係	65
5	考察	67
5.1	ハイギョ特異的に重複したケラチン遺伝子	67
5.2	ハゼにおける陸上適応とケラチン遺伝子の関連性	68
6	結論	70
	総論	71
	参考文献	73
	謝辞	84
	報文目録	86
	補足	87

序論

陸上脊椎動物は今から約 3 億 8 千万年前に陸上に生息範囲を広げていった (Clack, 2012)。魚類は誕生以来 1 億年以上もの間、水中で一生を過ごしていたが、肺呼吸の獲得によって陸上への進出が可能になった。陸上適応に際して困難となるのが体を取り巻く水が利用できなくなるという点である。

陸上環境ではエラを通じて水と物質の交換ができなくなる。呼吸に必須となる酸素の取り込みや二酸化炭素の排泄などのガス交換は主にエラで行われる。こうしたエラ呼吸は陸上環境では機能しないため、四肢動物は主に肺呼吸に頼っている。陸上では体表面から水が蒸発によって失われていく上に、エラで行われていた呼吸や浸透圧の調節、老廃物の排泄を別の器官で補償しなければならない。しかしそうした変化がどの進化史上どの段階で起きたのかは化石などから得られる情報が限定的であるために多くは明らかにされていない。本博士論文では魚が両生類へと進化する段階で、陸上環境にどのように適応したかを現生の生物を用いて遺伝子、生理、形態と様々な観点から明らかにした。

第 I 部ではポリプテルスという水陸両生の“古代魚”のエラ (内鰓) で発見した繊毛について、陸上や高 CO₂ 環境において可塑的に出現・消失する現象を明らかにした。今回走査型電子顕微鏡観察によって初めてポリプテルスのエラ表面に繊毛があることを確認した。この繊毛はエラの表面に水流を作り出す動繊毛であった。また、その繊毛は陸上環境、および高 CO₂ 環境下で消失し、水中で飼育することで再び出現することが明らかになった。初期の四肢動物が直面したであろう水中と陸上の間の環境においてこうした可塑性が適応的な役割を果たしていた可能性について議論する。

第 II 部ではポリプテルスの陸上環境における恒常性維持機構について着目する。水中ではエラによって浸透圧の維持やアンモニアの排泄が行われているが、陸上環境ではそれが困難となる。血中のナトリウム濃度、浸透圧を計測すると水中・陸上間では有意な変化は見られなかった。また、血中アンモニア濃度は陸上環境下で維持されている一方、尿素の濃度は有意に増加していた。RNA-seq 解析から、陸上環境下の個体の腎臓においてナトリウムの再吸収およびアンモニアの排泄が促進されて

いる可能性が示唆された。こうしたエラの機能の別器官への転移は四肢動物の陸上進出に重要な役割を果たしたと考えられる。

第III部ではケラチンという表皮の乾燥耐性に関わる細胞骨格に着目した。陸上脊椎動物のケラチン遺伝子はゲノム上でクラスタを形成しているが、真骨魚類にはクラスタは存在しないことが知られていた。本研究では陸上進出前の魚、真骨魚類特異的に起きた全ゲノム重複以前の条鰭類およびハイギョにおいてケラチン遺伝子クラスタが存在していることを明らかにした。また、水陸両生魚であるポリプテルス類やハイギョ類ではケラチン遺伝子の重複が確認され、純化選択の緩みが観測された。こうした両生類以前のケラチン遺伝子の重複は四肢動物のものとは独立に起きたものであったが、陸上での表皮のバリア機構に関連しているのではないかと推察される。

研究対象となる生物種の系統関係

本研究に関連する生物の系統関係を以下の図 0.1 に示す。

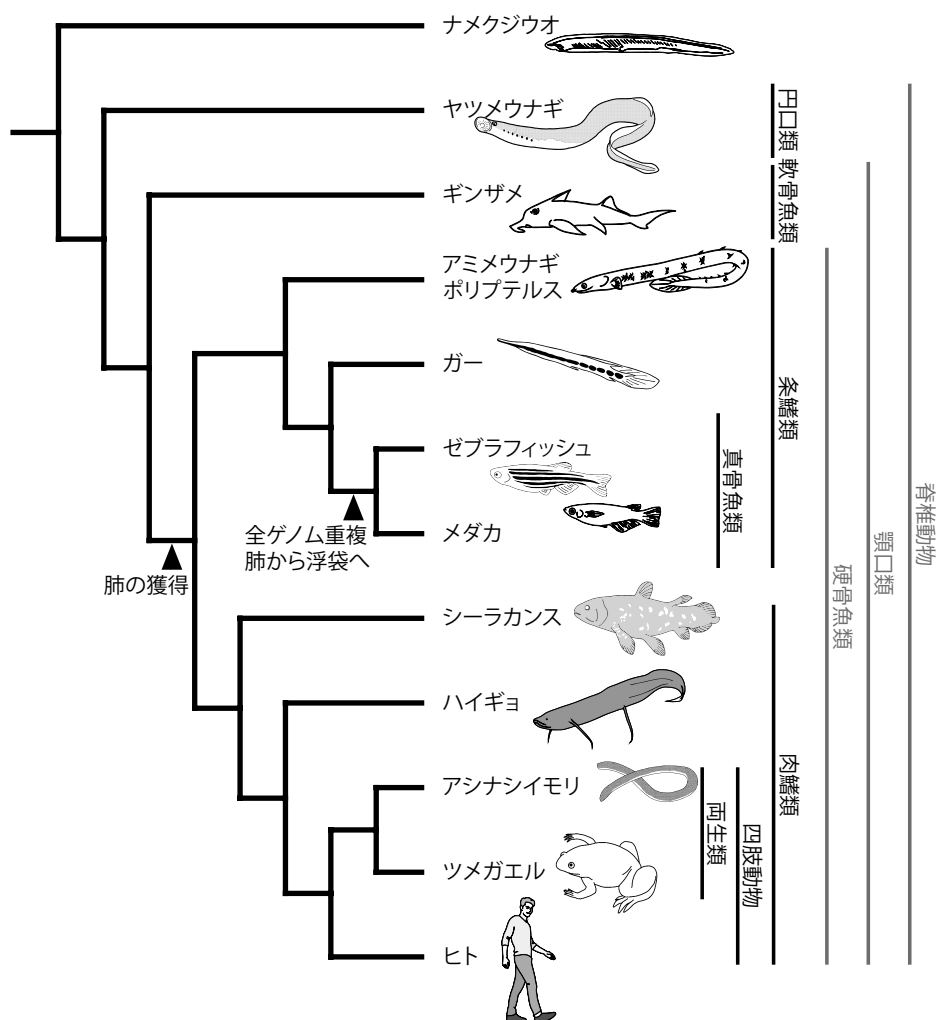


図 0.1: 本学位論文の研究対象に含まれる生物の系統関係。

第 I 部

陸上・高 CO₂ 環境下における

ポリプテルスのエラの繊毛の可塑的な消失

Kimura, Y., Nakamuta, N. and Nikaido, M. (2023).

Plastic loss of motile cilia in the gills of *Polypterus* in response to high CO₂ or terrestrial environments

Ecology and Evolution, 13 (4), e9964.

1 要旨

魚類は主にエラで呼吸を行うが、このエラは脊椎動物が水中から陸上へと進化的に移行する段階で徐々に変化していった。初期の四肢動物の化石記録から魚が水中で用いる「内鰓」の存在が示されているものの、化石記録からでは限られたデータしか得られない。本研究では初期の硬骨魚類の祖先的な特徴を有するポリプテルス (*Polypterus senegalus*) のエラを調査した。走査型電子顕微鏡により、ポリプテルスのエラ表面には繊毛が存在することが明らかになり、RNA-seq 解析と光学顕微鏡下での観察により、動繊毛であることを示した。動繊毛がエラ表面に流れを作り出し、効率的な呼吸や表面からの微粒子の除去などに関わっている可能性がある。この繊毛は陸上環境と高 CO₂ 環境において消失し、水中環境に戻すと出現した。ポリプテルスのエラの可塑性は浅い湿地などの変動する環境でも生存に有利にはたらくと考えられる。硬骨魚類の祖先はエラにこのような可塑性を持っていた可能性があり、これが脊椎動物の水中から陸上への移行の原動力のひとつである可能性がある。

2 背景

魚類は呼吸にエラを利用している。脊椎動物が水中から陸上へと進化する過程で、呼吸器系の生理学的・形態学的なリモデリングと並行して、エラの退化が徐々に進行した。現存する羊膜類(哺乳類、爬虫類、鳥類)はエラを完全に失い、呼吸は肺に依存している。両生類においても幼生期には存在していた内鰓が、成体への変態時に縮退してしまうものもある。陸上適応の初期段階までさかのぼると、アカントステガや同様の古生代の四肢動物成体の化石記録から、肺魚のそれに似た内鰓の存在が示唆されている (Coates and Clack, 1991; Schoch and Witzmann, 2011; Clack, 2012)。このことは、水中と陸上を行き来する初期の四肢動物の呼吸器系において、内鰓がまだ機能していたことを示唆している。陸上環境ではエラの鰓弁が重力によって潰れ、また乾燥の影響のために、一般にエラは水中でのみ機能すると考えられている (Sayer, 2005)。したがって、水から陸への環境変化に対応したエラの退化は興味深い現象である。現存する真骨魚類の中には、鰓の構造を変化させることによる陸上環境への適応が独立に何度も生じている (例えば、トビハゼ (Low et al., 1988)、マングローブキリフィッシュ (*Kryptolebias marmoratus*) (Ong et al., 2007))。特にマングローブキリフィッシュでは、陸上環境に順応する過程で鰓弁の可塑的な構造変化が観察されている (Ong et al., 2007; Turko et al., 2012)。

初期の硬骨魚類の呼吸の進化を理解する上で、ポリプテルス科(ポリプテルス、アミメウナギ)はモデル生物として重要な系統に位置している。ポリプテルスは現生の条鰭類の中で最も条鰭類と肉鰭類の共通祖先に近い魚であり、初期の硬骨魚類の特徴をいくつか残していることで知られる。特に肺呼吸をすることと、‘spiracle’ と呼ばれる頭頂部にある空気を吸うための穴があることから、初期の四肢動物の陸上適応形質に近いことが指摘されている (Graham et al., 2014; Tatsumi et al., 2016)。ただポリプテルスの陸上適応は四肢動物の陸上適応とは独立に起こったと指摘する研究もある (Ord and Cooke, 2016; Damsgaard et al., 2020)。しかし近年のゲノム、トランスクリプトーム、組織学的な解析から、少なくとも肺についてはポリプテルスと肉鰭類(四肢動物)の共通祖先で一度だけ生じたも

のではないかと考えられている (Tatsumi et al., 2016; Bi et al., 2021; Cupello et al., 2022)。

ポリプテルスは陸上で飼育可能であることが知られており、Standen らは陸上環境で 8 ヶ月間の飼育に成功している (Standen et al., 2014)。また、Turko らは陸場飼育したポリプテルスのエラの鰓弁間が細胞で満たされる変化を発見し、鰓弓のサイズが減少することを示した (Turko et al., 2019)。陸上飼育前後のポリプテルスのエラを調べることは、水と陸を行き来する初期の四肢動物のエラに起きたことを理解する上で重要な手がかりになると考えられる。これら 2 つの先行研究ではマクロな形態学的な視点から解析がなされているが、遺伝子発現の変化やミクロな形態の変化などについては明らかではない。

陸上への適応に加え、水中の酸素濃度、二酸化炭素濃度によってもエラの形態は変化することが知られている (Turko et al., 2012; Wright and Turko, 2016; Phuong et al., 2017)。二酸化炭素は水への溶解度が大きいいため、魚は一般的に二酸化炭素をエラを通じて水中へと排泄する (Rahn, 1966)。しかし、この二酸化炭素の受動輸送は水のない陸上環境や、体内の二酸化炭素濃度よりも高い水中では機能しない。特に体外の二酸化炭素濃度のほうが高い場合、体内への二酸化炭素の流入が起きる可能性がある。Babiker はポリプテルスを高二酸化炭素環境で飼育し、その行動を調べたところ、肺呼吸の回数が増加に加えエラ呼吸が抑制されることを明らかにした (Babiker, 1984)。この結果は肺呼吸可能なポリプテルスが体外の環境に応じてエラと肺を使い分けていることを示唆している。また、Ultsch は脊椎動物の陸上への進出において高二酸化炭素環境が関係していた仮説を提唱している (Ultsch, 1987, 1996)。ポリプテルスの高二酸化炭素環境下におけるエラの変化を明らかにすることは脊椎動物の陸上適応を理解する上でも重要である。

本研究では初期の硬骨魚類の陸上移行期におけるエラの陸上での変化を明らかにすることを目的とした。具体的には、形態学的な比較、免疫染色、トランスクリプトームによって陸上環境、高二酸化炭素環境でポリプテルスのエラがどう変化するのかどうかを明らかにした (Kimura et al., 2023)。

3 材料と手法

3.1 研究材料と飼育環境

使用したポリプテルス・セネガルス (*Polypterus senegalus*) は民間業者から入手した。また、購入後一ヶ月以上は水中で飼育した。

ポリプテルス陸上飼育のために (Standen et al., 2014) を参考に飼育設備を作成した。ポリプテルスの環境水は 24 時間循環・濾過されており、水量の合計は約 600 L である。水温は $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ を維持し、12:12 の明暗サイクル下で飼育した。実験的な陸上環境は水槽の水面上に 25 cm × 35 cm の 1 mm の穴が空いたカゴを作成した (図 1.1)。また、体表の乾燥を防ぐために霧発生装置を設置し、1 mm 程度の水深で維持した。

高二酸化炭素環境は、先行研究 (Babiker, 1984) に従ってポリプテルスのエラの換水が停止するまで常温の二酸化炭素ガスを水中に添加し続けた。実験水槽中の遊離炭酸濃度は 100 mg/L 以上に保つ



図 1.1: 陸上環境で飼育中のポリプテルス・セネガルス。写真撮影のためにミストは消している。

た (pH 5.08–5.85)。対照の水槽の遊離炭酸濃度は 8.8 mg/L (pH 6.89–7.11) であった。遊離炭酸濃度は先行研究 (Sharma, 1998) の方法に従って測定した。両水槽のサイズは 35 cm × 35 cm × 20 cm であり、水中フィルター (リオプラスフィルターセット 2, カミハタ) を用いて常時攪拌し、濾過と二酸化炭素濃度の均一化を行った。

上記の環境で少なくとも一ヶ月以上飼育し、一部の個体についてはその後通常的水中へと戻して一ヶ月間飼育した。

3.2 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

陸上環境におけるエラ表面の微細構造を観察するために SEM による観察を行った。ポリプテルスを水中、陸上環境で飼育したあと、断頭によって安楽死させ、解剖した。エラのサンプルは 0.7xPBS で洗浄後、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、粘液を取り除くために 8N HCl で 60°C で 30 分処理した。エタノール系列で脱水し、t-ブチルアルコールを用いて凍結乾燥器 (ES-2030, 日立製作所) で乾燥させた。試料をオスミウムコーティングし、SEM (JSM-7001F、日本電子) で観察した。

SEM 画像中の繊毛の長さは、Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いて全長が測定できる代表的な繊毛を 5 つ選び、平均と不偏分散を計算した。

3.3 免疫染色

エラにおける繊毛および味蕾の存在を確かめるために免疫染色を行った。エラ全体を解剖後、4% PFA で固定した。その後、0.5% Triton x-100 (v/v) 中で 15 分室温で静置した。0.7x PBS で洗浄後、10% ヤギ血清および 1% ウシ血清アルブミンで 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体として抗 α チューブリン (Acetyl K40、ウサギモノクローナル、abcam、ab179484、1:2000)、抗カルレチニン (マウスモノクローナル、swant、6B3、1:2000)、抗セロトニン (マウスモノクローナル、GeneTex、GTX31099、1:1000) を用い、繊毛と味蕾をそれぞれ標識した。各条件で 3 個体以上を確認した。

二次抗体として、抗ウサギ IgG (H + L) Alexa Fluor™ 594 (ロバ ポリクローナル、Invitrogen、AB141637、1:2000)、および抗マウス IgG (γ 1) Alexa Fluor™ 488 (ヤギ ポリクローナル、Invitrogen、AB2535764、1:2000) を用いた。PBS で洗浄後、抗チューブリンの一次抗体を加え、室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体も同じ手順で反応させた。同じ手順でカルレチニンも染色した。蛍光の退色を防ぐために、マウント剤 (VECTASHIELD with DAPI, Vector Laboratories) を加えた。画像は蛍光顕微鏡 (Axioplan2, Carl ZEISS) で撮影した。撮影後、Photoshop を使用してレベルを補正し、色を修正した。

3.4 HE 染色

陸上環境において、ポリプテルスの鰓弁間が細胞で満たされることが知られている (Turko et al., 2019)。本研究においても陸上順応の指標としてその鰓弁間の細胞の変化を観察し、また高二酸化炭素環境下における変化についても観察を行った。エラの標本は Bouin 固定液で固定した。その後、エタノールで脱水し、キシレンで置換、パラフィンで包埋した。その後ミクロトームで厚さ 5 μ m の矢状切片を作成した。切片はヘマトキシリンとエオジンで染色した。

陸上環境と高二酸化炭素環境における鰓弁間細胞塊 (Inter-lamellar cell mass; ILCM) の高さの変化を定量化するために、コントロール環境、陸上環境、高二酸化炭素環境の個体の ILCM の高さを ImageJ で測定した。個体あたり 2 枚の鰓弁を選び、1 枚の鰓弁あたり 3 個の ILCM を無作為に選んだ。このようにして、各環境の 3 個体からそれぞれ 6 個の ILCM を測定した。最後に、各個体のデータの平均を算出し、試験に用いた。ILCM の高さの変化を検定するために、scipy version 1.12.0 を用いて Dunnett の検定で比較を行った。

3.5 RNA-seq 解析

水中と陸上環境におけるエラの遺伝子発現の違いを調べるため、RNA-seq 解析を行った。水中と陸上環境で飼育した 3 個体のエラ全体から、TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.) を用いて RNA を抽出した。抽出された RNA は、マクロジェン・ジャパン株式会社において、TruSeq stranded mRNA Library Prep Kit を用いてライブラリ調整が行われ、NovaSeq 6000 で塩基配列を決定した。生配列データのクオリティコントロールは、fastp (Chen et al., 2018) を ‘-g, -q 20, -w 16’ のオプションで実行した。次に、STAR version 2.7.3a (Dobin et al., 2013) を用いて、リードデータを *Polypterus senegalus* のリファレンスゲノム (Bchr.013 (Bi et al., 2021)) にマッピングした。マップされたリードを featureCounts (Liao et al., 2014) でカウントした。発現変動遺伝子 (DEGs) は、iDEGES/edgeR-edgeR の組み合わせで TCC (Sun et al., 2013) を用いて検出した。Over-Representation Analysis (ORA) は、WebGestalt (Liao et al., 2019) を用いて実施した。

3.6 エラの換水運動と水流の観察

陸上環境と水中環境でのエラの換気行動の違いを見るために、ポリプテルスの頭部の動きを記録した。この実験における陸上環境として、湿らせた不織布を用いた。記録にはデジタルカメラ (X100V、富士フイルム) を用いた。

エラ表面の水流を可視化するために、摘出したエラの表面にポリプテルスの血球を滴下した。血球は断頭時に採取した。*Polypterus palmas* の赤血球の大きさは $160\ \mu\text{m}^2$ であることが知られている (Hardie and Hebert, 2003)。本研究で用いた *P. senegalus* の赤血球の長径は約 $20\ \mu\text{m}$ であった。血球を滴下する前に、エラ自体からの出血がないことを確認した。血球の動きは顕微鏡 (Axioplan2, Carl ZEISS および SZX7-TR2-APO-C OLYMPUS) を用いて記録した。動画はそれぞれ 10 倍速と 4 倍速で編集した。

4 結果

4.1 エラ表面における繊毛の存在

SEM、および抗アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫染色によって、水中飼育したポリプテルスのエラの一次鰓弁の表面上に繊毛が束状に分布していることが示された (図 1.2A–C, 1.3A)。繊毛の平均長は $3.93\ \mu\text{m}$ であり、不偏分散は 0.16 であった。繊毛の束は点状に分布していた。

この繊毛の環境の影響を確かめるためにポリプテルスを陸上、および高二酸化炭素環境下で一ヶ月以上飼育した。また今回、陸上環境下におけるエラの動きの抑制が確認された (補足 1)。エラの動きの抑制は先行研究と同様に、高二酸化炭素環境下でも観察された (Babiker, 1984)。SEM および免疫染色の観察により、これら両方の環境で飼育したポリプテルスのエラでは繊毛が消失していることが明らかになった (図 1.2D–F, 1.3B 左列)。その後、陸上、高二酸化炭素環境で 1 ヶ月間飼育したポリ

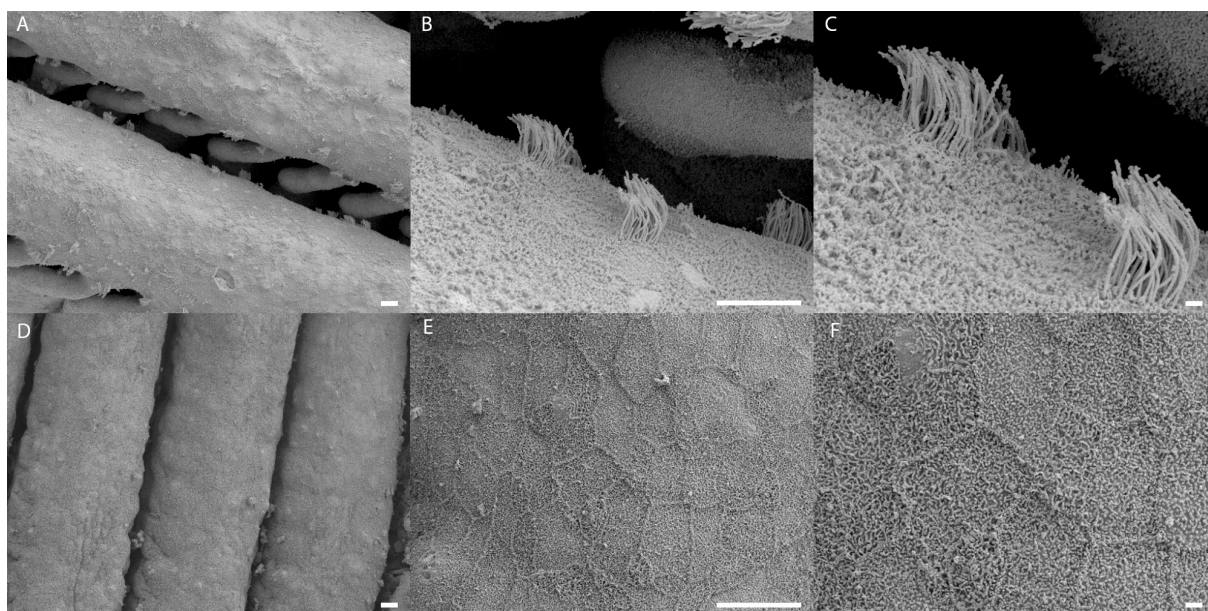


図 1.2: ポリプテルス・セネガルのエラ表面の SEM 画像。水中飼育 (A–C) および陸上飼育 (D–F) のポリプテルスのエラ表面。水中飼育個体の一次鰓弁には繊毛が存在するが、陸上には存在しない。スケールバー: A, B, D, E = $10\ \mu\text{m}$ 、C, F = $1\ \mu\text{m}$ 。

プテルス個体を元の水環境に戻し、さらに1ヶ月間飼育した。その結果、免疫染色観察から、エラの繊毛が回復していることが明らかになった(図 1.3B 右列)。

4.2 エラの鰓弁間の形態的变化

陸上と高二酸化炭素環境の両方で飼育したポリプテルスについて、エラの鰓弁の間にある ILCM の長さについて計測を行った。これまでの研究で、陸上飼育したポリプテルスの ILCM は肥大化することが示されている (Turko et al., 2019)。本研究において、先行研究と同様に ILCM の肥大化が確認され(図 1.4B)、高二酸化炭素環境で飼育した個体でも、統計的に有意な ILCM の肥大化が観察された(図 1.4C-D)。

また、水中環境と陸上環境の両方のエラについて RNA-seq 解析を行った。有意に発現量が増加した遺伝子について調べたところ、1,473 個の遺伝子が同定された。WebGestalt (Liao et al., 2019) を用いた Over Representation Analysis (ORA) の結果、局在化の制御 (regulation of localization) や組織発生 (tissue development) と、形態の発生に関与する遺伝子がエンリッチされていた(図 1.5)。

4.3 セロトニン陽性細胞と繊毛細胞の局在比較

魚類のエラにはセロトニン含有神経上皮細胞 (neuroepithelial cells: NECs) と呼ばれる細胞が存在し、水中や血中の酸素濃度の検知に関与していると言われている (Porteus et al., 2012)。今回発見された繊毛細胞は陸上や高二酸化炭素環境といった通常の水中とは酸素濃度が異なる環境下で消失することが示された。そこで、エラに存在する繊毛細胞が NECs と同一の細胞である可能性を検証するために、繊毛 (α チューブリン) とセロトニン (5-HT) の二重免疫染色を行った。水中環境で飼育した個体において、繊毛細胞と NECs の局在は一致しないことが明らかになり、両者は異なる細胞であることが示された(図 1.6A)。また、陸上環境においても繊毛細胞の消失に伴って NECs が消失するという現象は見られなかった(図 1.6B)。

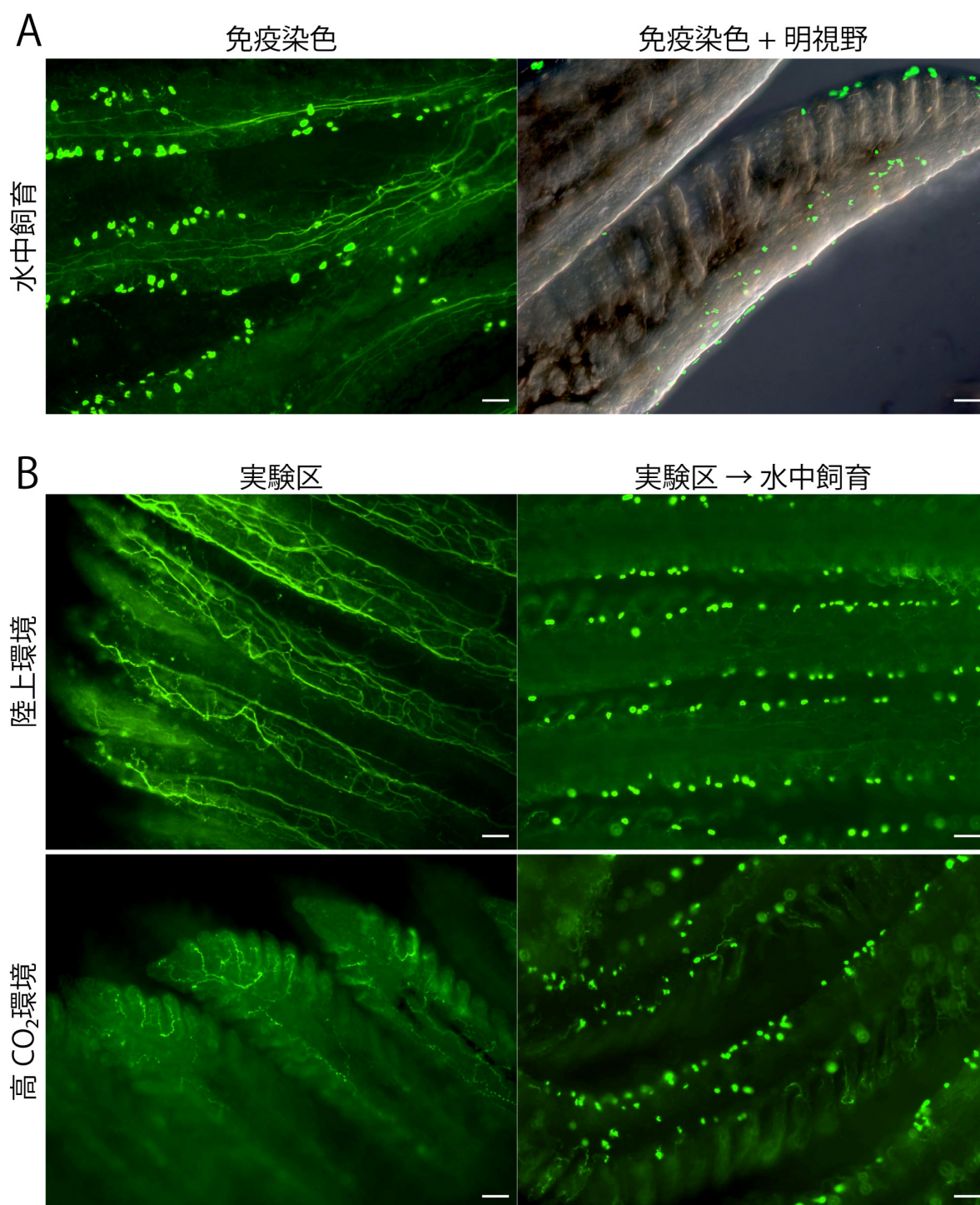


図 1.3: 抗アセチル化チューブリン抗体で免疫染色したポリプテルスのエラ。A: 水中飼育個体。繊毛の束が点状に見えるほか、軸索が繊維状に染色されている。左は蛍光のみ、右は蛍光に明視野の画像を重ね合わせた。B: 陸上 (上段)、高二酸化炭素 (下段) 環境で飼育した個体。各環境で飼育した個体のエラでは繊毛が失われている。右列は実験区からそれぞれ水中環境へと戻して飼育した個体のエラで、繊毛が存在している。スケールバー: 50 μm 。

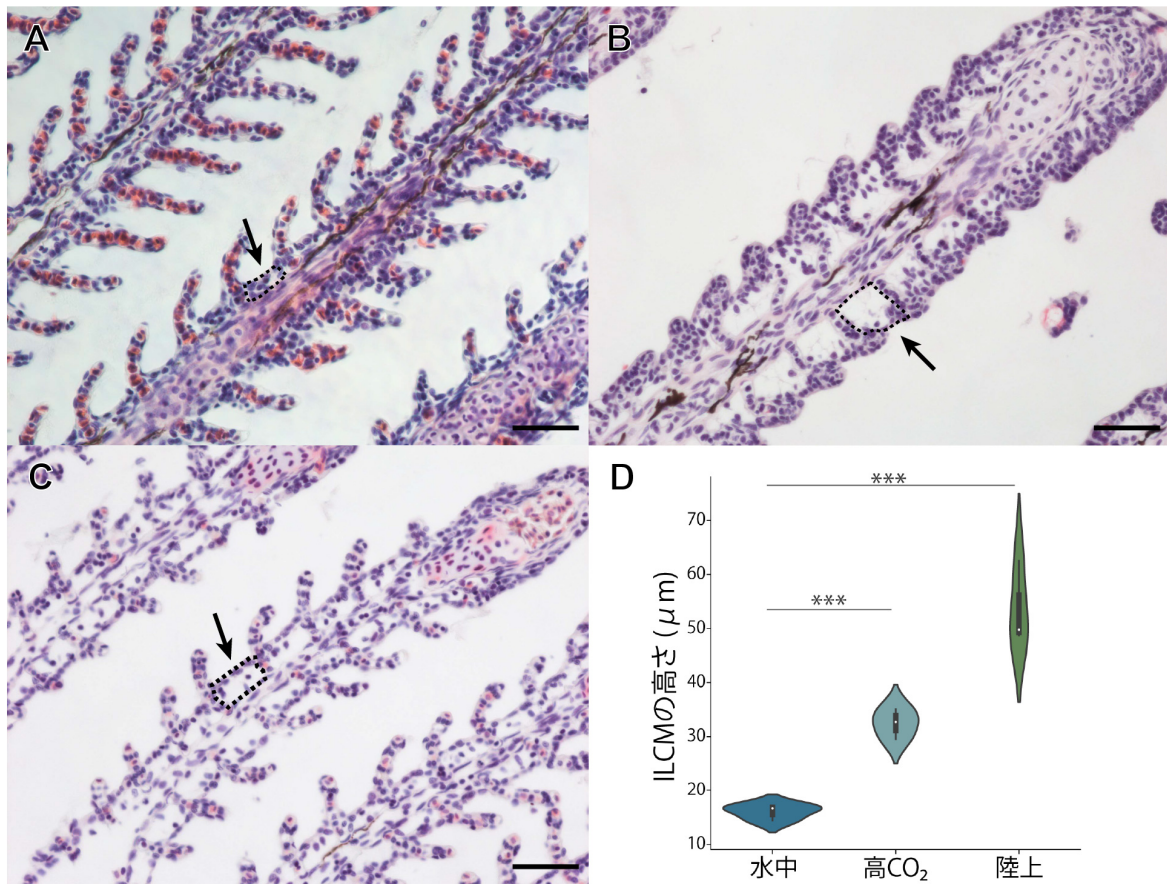


図 1.4: ポリプテルスのエラにおける ILCM の変化。A: 水中環境、B: 陸上環境、C: 高二酸化炭素環境におけるエラの鰓弁の光学顕微鏡写真。陸上環境、高二酸化炭素環境下では水中環境と比較して、鰓弁間の細胞塊 (ILCM) が肥大化した (点線部分と黒矢印)。スケールバー: 50 μm 。D: 水中 (藍色)、高二酸化炭素環境 (青色)、陸上環境 (緑色) における ILCM の高さ。Dunnnett-test によって検定された。***: $p < 0.05$ 。

4.4 エラの繊毛の運動性と水流

繊毛細胞には様々なタイプが存在し、大きく動繊毛と不動繊毛 2 つのタイプに分類できる。これまで様々なタイプの繊毛細胞が様々な場所 (気道や嗅上皮など) で確認されている (Choksi et al., 2014)。また、両生類の外鰓 (幼生期に存在する外部に飛び出たエラ) にも動繊毛が存在し、水流を作り出していることが知られている (Ichikawa and Toyoizumi, 2020)。しかし、今回見つかった内鰓における

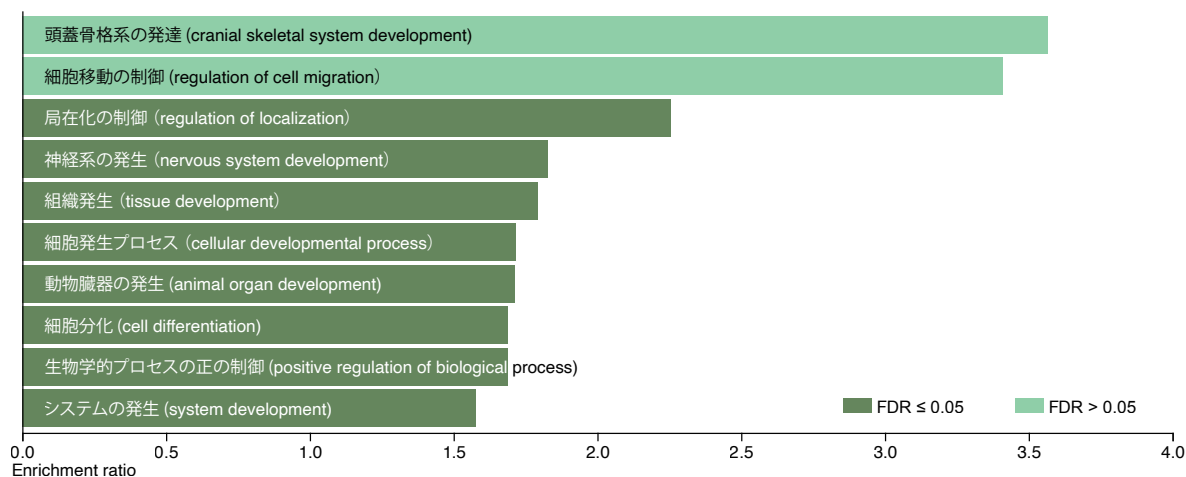


図 1.5: 陸上環境で発現が増加した遺伝子の ORA の結果。Biological process に関する Enrichment ratio が高い順に上から並べている。薄緑: FDR > 0.05、緑: FDR ≤ 0.05。

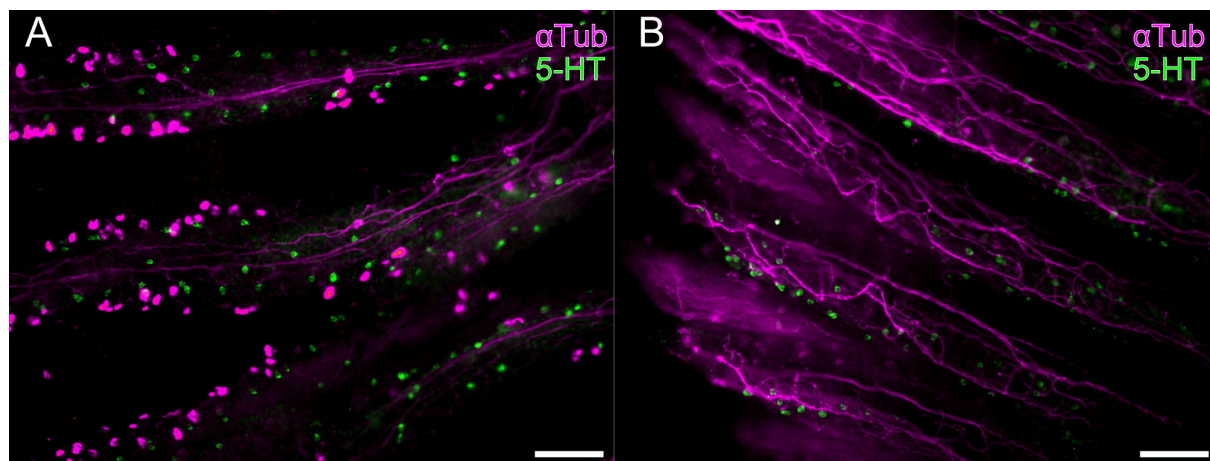


図 1.6: ポリプテルスのエラにおける α チューブリン (マゼンタ) とセロトニン (黄緑) の免疫染色画像。A: 水中環境飼育個体。繊毛細胞とセロトニン (5-HT) 陽性細胞は存在しているが、共局在はしていない。B: 陸上環境飼育個体。繊毛細胞のみ失われている。スケールバー: 100 μ m。

繊毛の機能は不明である。

陸上環境において繊毛細胞が消失するという特性に着目し、RNA-seq で陸上環境で発現量が減少した遺伝子に着目した。その結果、868 個の発現変動遺伝子が得られた。それらの遺伝子に対して ORA を実施したところ、1. 軸索ダイニン複合体の形成、2. 軸索形成、3. 繊毛運動、4. 繊毛形成に関する遺伝子がエンリッチされていることが明らかになった (図 1.7A)。

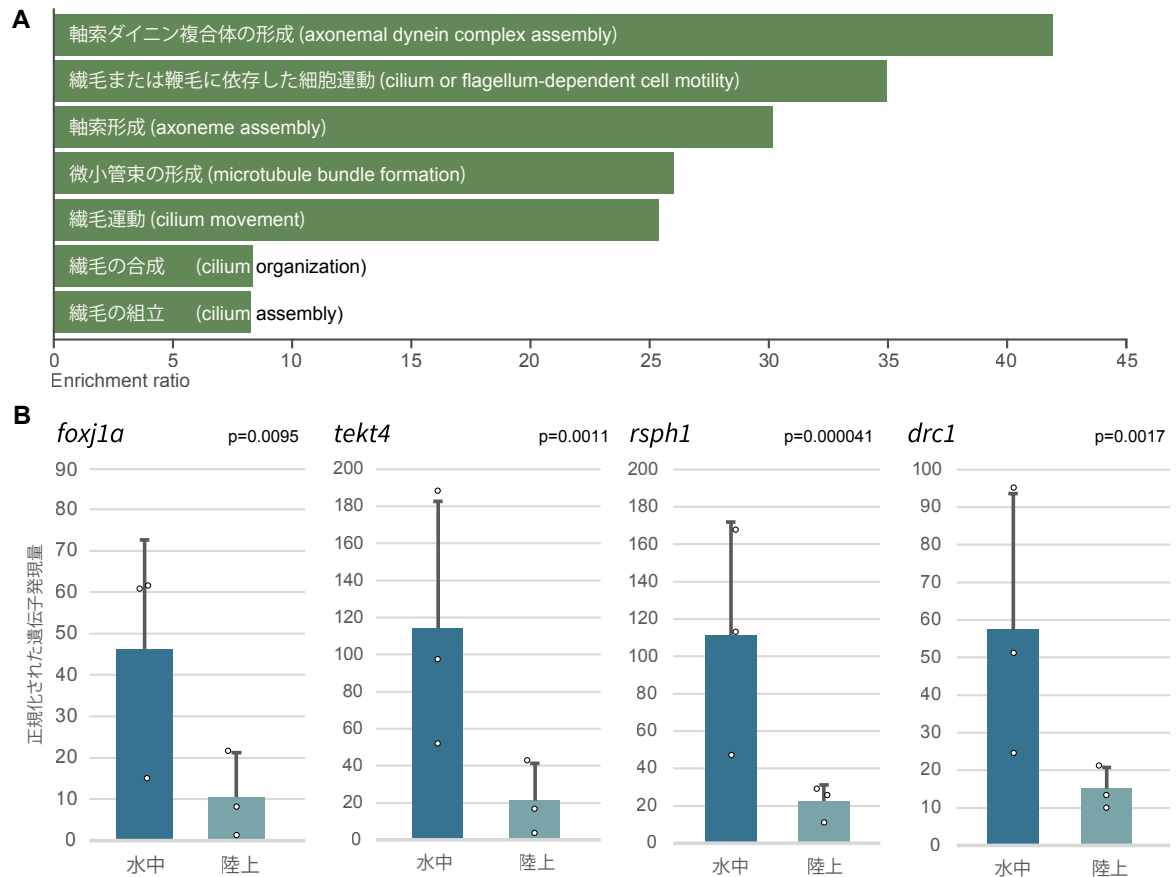


図 1.7: 陸上環境で発現が減少した遺伝子についての A: Biological process に関する ORA の結果。Enrichment ratio が高い順に上から並べている。FDR ≤ 0.05 。B: 繊毛運動に関連した遺伝子の正規化された発現量。エラーバーは標準偏差、グラフ中の点は個々の個体の発現量を示している。右肩の数値は TCC によって算出された p 値。

これらの遺伝子群について個々に調べていくと、繊毛運動に関与する主要な遺伝子のひとつである *foxj1a* が含まれていた (図 1.7B)。*foxj1a* は *foxj1* (Forkhead box protein J1) のホモログである (Aamar and Dawid, 2008; Hellman et al., 2010)。*foxj1* によってコードされるタンパク質は運動繊毛のマスターレギュレーターである (Yu et al., 2008)。そこで、*foxj1* によってレギュレートされることが知られているいくつかの遺伝子 (Mukherjee et al., 2019) について発現量を見たところ、それらの発現量も有意に減少していた (図 1.7B)。これらの結果は、*foxj1*、および繊毛運動に関連するその下流の遺伝子が陸上環境でダウンレギュレートされていることを示している。

ポリプテルスのエラの繊毛が動繊毛であるならば、エラの表面で水流を作っている可能性が考えられる。そこでエラ表面での水流を観察した。水流の可視化にはポリプテルスの血球を用いた。切り出したエラについて観察を行ったところ、繊毛が存在する二次鰓弁の根本において、一次鰓弁の根元から先端の方向での血球の動きが観察された(補足2前半)。また、エラ全体の観察においても一次鰓弁の根元から先端に向けた水流が観察された(補足2後半)。これらのことから、ポリプテルスのエラに存在する繊毛は運動性であり、一方向への水流を作り出していることが明らかになった。

4.5 繊毛細胞の運動性以外の機能の検討

エラに存在する繊毛細胞が、運動性以外の機能を有するかどうかについても検討した。ヤツメウナギ(系統関係については図0.1を参照)の味蕾には繊毛が、真骨魚類や哺乳類の味蕾には微繊毛が存在する(Baatrup, 1983; Barreiro-Iglesias et al., 2008)。しかし、これまでポリプテルスの味蕾について繊毛や微繊毛の有無についての報告はない。これまで報告されてきた魚よりも祖先的であるポリプテルスのエラの繊毛が、ヤツメウナギと同じく味蕾の繊毛である可能性が考えられる。そこで、ポリプテルスのエラにある繊毛細胞が味蕾であるかどうかを確かめるために、免疫染色を行った。味蕾を区別するために、味蕾を含む化学感覚マーカーとして使用されている抗カルレチニン抗体(Barreiro-Iglesias et al., 2008)を用いて免疫染色を行った。その結果、ポリプテルスの鰓弓に典型的な味蕾様構造を示すカルレチニン陽性細胞の蛍光が観察されたが、繊毛は存在しなかった(図1.8A)。また、鰓弁に存在する繊毛細胞についてもカルレチニン陽性細胞は確認されなかった(図1.8B)。このことから、ポリプテルスのエラに存在する繊毛細胞は味蕾とは異なることが示唆された。

哺乳類の気道上皮に見られる繊毛細胞は自然免疫に関連していることが知られている(Shah et al., 2009; Freund et al., 2018)。気道上皮に見られるいくつかの味覚受容体(*tas1rs*, *tas2rs*)はグラム陰性菌が分泌する物質に反応し、運動性繊毛の拍動を制御することにより粘膜繊毛クリアランスを引き起こすのに必須であることが知られている(Lee et al., 2012)。そこで、ポリプテルスのエラの繊毛が自

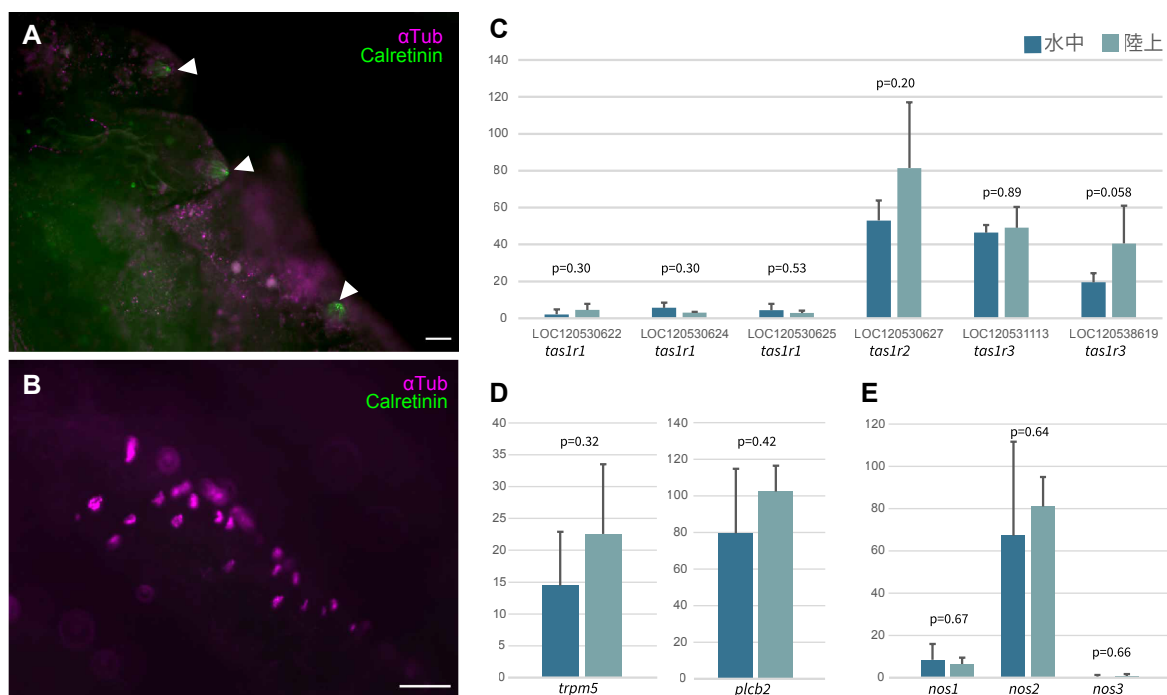


図 1.8: 水中および陸上環境下におけるエラの味覚受容体関連自然免疫遺伝子の発現。A,B: 水中で飼育したエラを抗カルレチニン抗体 (黄緑) と抗アセチル化 α チューブリン抗体 (マゼンタ) で蛍光免疫染色した顕微鏡写真。A: 鰓弓には味蕾 (矢印) が存在するが、繊毛細胞はない。また味蕾の先端に繊毛は見られなかった。B: 鰓弁における繊毛細胞の存在と味蕾の欠如。重複した蛍光は観察されなかった。スケールバー: 50 μ m。C: *tas1r*、D: およびそれらのシグナル伝達カスケード、E: *nos* (一酸化窒素合成酵素) の正規化された遺伝子発現量。正規化と検定には TCC を使用した (方法を参照)。これらの遺伝子の発現量に水中、陸上間で有意差は認められなかった。

然免疫に関連している可能性を確かめるために、それらに関連する遺伝子の発現量を比較した。

RNA-seq に基づく発現量を比較したところ、水中と陸上で *tas1r* の発現量に有意な変化は見られなかった (図 1.8C)。また、*tas2r* の発現量は RNA-seq では検出困難であるほど低かった。そこで *tas1r* と *tas2r* のカスケードの下流にある *trpm5* と *plcb2* に着目した (Ahmad and Dalziel, 2020; Tuzim and Korolczuk, 2021)。これらの遺伝子はエラで発現していたが、水中と陸上の中で発現量に有意な差は見られなかった (図 1.8D)。

次に一酸化窒素合成酵素 (NOS) の 3 つの遺伝子に着目した。哺乳類において、一酸化窒素は気

道上皮における繊毛の拍動を制御している (Li et al., 2000)。*nos* 遺伝子は四肢動物においては *nos1*, *nos2*, *nos3* の 3 つのホモログが存在する。魚類においてもポリプテルスをはじめとした全ゲノム重複以前の魚類においては 3 つのホモログを有している (Donald et al., 2015)(全ゲノム重複の系統樹上の位置は図 0.1 を参照)。ポリプテルスのエラにおける 3 つの *nos* 遺伝子の発現量を比較したところ、水中と陸上では有意な差は見られなかった (図 1.8E)。

これらのデータから、ポリプテルスのエラの繊毛は、哺乳類の気道上皮における *tas1r/tas2r* に関連した自然免疫の機能を持っているのではなく、単純に運動機能のみを有していると考えられる。エラ表面に水流を作り出すことにより、効率的な物質交換 (酸素や二酸化炭素、アンモニアや塩類など) に寄与している可能性が考えられる。

繊毛の機能に加えて、陸上環境における繊毛の消失が損傷の結果であるかどうかの可能性を調べた。1,473 遺伝子を含む発現量が増加した遺伝子を調べたところ、傷害 (例えば炎症) に関連する遺伝子はエンリッチされていなかった (図 1.5)。

5 考察

5.1 エラにおける繊毛の起源

本研究において、ポリプテルスの内鰓に繊毛が存在することを示した (図 1.2, 1.3)。これは、条鰭類 (Actinopterygii) の内鰓に繊毛が存在するという初の報告である。ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) やメダカ (*Oryzias latipes*) などの真骨魚類でエラの SEM 画像がいくつか報告されている (Leguen, 2018; Messerli et al., 2020) が、繊毛の存在は報告されていない。陸上に適応しており、エラに空気呼吸に特化した器官を持つウォーキングキャットフィッシュ (Clariidae) やマングローブキリフィッシュ (*K. marmoratus*) においても繊毛は報告されていない (Ong et al., 2007; Maina, 2018)。さらに、サメ (軟骨魚類) のエラにおいても繊毛は報告されていない (Bullard et al., 2001)。

一方で、4 億 7,000 万年前に硬骨魚類の共通祖先から分岐した (Wang et al., 2021) 肉鰭類のオーストラリアハイギョ (*Neoceratodus forsteri*) の胚期の内鰓には繊毛があることが報告されている (Kemp, 1996)。このことから、内鰓に存在する繊毛は硬骨魚類の共通祖先において獲得され、条鰭類と肉鰭類が分岐したあとも保持されたが、ポリプテルスの分岐以降の条鰭類においては失われた、という説が有力であると考えられる。

ただ、ポリプテルスのエラの繊毛の長さとその分布はハイギョのものとは異なっている (Kemp, 1996)。ポリプテルスの繊毛はハイギョと比べ明らかに短く、点状に分布している (図 1.2)。一方でハイギョの繊毛は長く、また帯状に分布している (Kemp, 1996)。ポリプテルスとハイギョのエラで観察される繊毛の形態学的な違いは、繊毛の役割が条鰭類と肉鰭類が分岐したあとで多様化したことを示唆している。

5.2 絨毛の機能

本研究において、免疫染色の結果からポリプテルスの内鰓に見つかった絨毛細胞は味蕾や NECs ではないということが示された (図 1.6, 1.8)。加えて、トランスクリプトーム解析によって、哺乳類の気道上皮にあるような自然免疫に関連した機能はないということが示唆された (図 1.8)。

オーストラリアハイギョの内鰓に存在する絨毛は胚期にしか存在しないが、水流を作り出すことで知られている (Kemp, 1996)。これらの絨毛は換水やエラ表面に存在する微生物などの微粒子を効率的に除去するのに役立っているのではないかと考えられている (Kemp, 1996)。本研究においても、ポリプテルスの内鰓に存在する絨毛は、運動性であることが示された (図 1.7, 補足 2)。

この絨毛の適応上の意義については、ポリプテルスがエラ呼吸と肺呼吸の両方を使うことと関係していると考えられる。ポリプテルスは肺呼吸後にエラ呼吸の頻度が下がることが知られている (Magid, 1966)。エラ呼吸は肺呼吸と比べて酸素の消費量が大きいため、肺呼吸後しばらくはエネルギーを節約するためにエラ呼吸を抑制している可能性がある。しかしエラ呼吸は酸素の取り込み以外にも二酸化炭素やアンモニアの排泄、無機塩類の取り込みなどの役割を担っているため、エラ呼吸の抑制はこれらの機能の低下に繋がる (Ultsch, 1996)。絨毛が作り出す水の流れは、エラ呼吸時に生じる水流と同じく鰓弁の根元側から先端側の方向へと生じている (補足 2)。エラの換水機能が低下している間、エラに存在する絨毛が水流を作り出し、物質の輸送や表面の微粒子の除去に寄与している可能性が考えられる。このようにエラの絨毛と肺呼吸の相互関係を考慮すると、進化の過程で同時に獲得されたと推測できる。肺呼吸の獲得は硬骨魚類の共通祖先で起こったと考えられており (Tatsumi et al., 2016; Bi et al., 2021)、本研究で提唱した絨毛の獲得時期と一致する。

5.3 環境に応じたエラの可塑性

本研究において、ポリプテルスのエラにある繊毛が、陸上環境において消失することを発見した (図 1.2, 1.4)。また、陸上環境においてエラ呼吸が抑制されることも発見した (補足 2)。このことは陸上環境ではエラが本来の物質交換器官として機能していないことを示唆している。繊毛が水流を作り出すことで物質の交換や微粒子の除去を効率化していると仮定すると、水が存在しない陸上環境下において繊毛が消失するのは理にかなっている。繊毛の消失は繊毛運動のためのエネルギーの節約や、繊毛の維持のためのコスト削減に寄与している可能性が考えられる。これまでの研究において、陸上環境におけるポリプテルスの鰓弓の体積が減少していることが示されており、陸上ではエラへの投資を減らしていると議論されている (Turko et al., 2019)。

また本研究では、陸上環境で消失した繊毛が再び水中に戻すことで回復することを示した (図 1.3B)。RNA-seq 解析では炎症に関連した遺伝子はエンリッチされていなかったため、乾燥などによる損傷で繊毛が消失した可能性については低いと考えられる (図 1.5)。この可塑性は、ポリプテルスやおそらくその祖先が度々直面する、十分な水が使えない浅瀬の川や沼地への適応の結果として獲得されたのかもしれない。

陸上環境と同様に、高二酸化炭素環境下でもエラ呼吸が抑制され、繊毛が消失することが確認された (図 1.3B)。高二酸化炭素環境におけるエラ呼吸抑制の適応的意義については、二酸化炭素の逆流の防止であると考えられる。通常、環境水中のほうが体内よりも二酸化炭素濃度が低いため、魚はエラを通じて受動輸送で二酸化炭素を環境水中に排泄する。しかし、環境水中のほうが二酸化炭素濃度が高い場合、エラのような透過性の高い組織に環境水が多量に触れると、体内への二酸化炭素の流入が生じる可能性がある。肺呼吸が可能であるポリプテルスは必ずしもエラを通じて酸素を得る必要がないため、エラ呼吸を抑制し、体外からの二酸化炭素の流入を防いでいるのではないかと考えられる。

水中の二酸化炭素濃度は、温暖で比較的浅く、植物が生い茂る環境で一時的に上昇する傾向がある。

デボン紀の空気呼吸をする魚類は、こうした二酸化炭素濃度が変動する環境に生息していたのではないかと考えられている (Ultsch, 1996)。そして、ポリプテルスも同様の環境に生息している (Magid, 1967)。ポリプテルスはエラ呼吸を抑制し、必要時に肺呼吸に切り替えることで高二酸化炭素環境でも生存していけるのではないかと推測される。そのような環境で、水とエラとの接触を減らすために、エラ呼吸の頻度を下げ、運動性繊毛の数が減少するのではないかと考えられる。

二次鰓弁同士の間には存在する ILCM の肥大化が、陸上、高二酸化炭素環境において観察された (図 1.4)。先行研究においても、陸上環境で ILCM が肥大化することが示されている (Turko et al., 2019)。RNA-seq 解析からも、組織発生に関連した遺伝子の発現量が増加したことが示されており (図 1.5)、ILCM の肥大化という現象と一貫した結果である。ILCM の肥大化や縮小といった現象は、陸上環境下におけるマングローブキリフィッシュなどの真骨魚類においても見られる (Ong et al., 2007)。また、ILCM の肥大化は空気と接するエラの表面積を減少させ、乾燥を防ぐのに適応的であると考えられている (Turko et al., 2019)。

5.4 高二酸化炭素環境と陸上適応

先行研究において、高二酸化炭素環境と陸上適応の関連性が議論されてきた。二酸化炭素は水への溶解度が高いため、一般的にエラから排泄される。一方、空気呼吸をする魚は酸素を多く含む空気を取り込むため、エラを使った呼吸の頻度が低くなる。そのため、空気呼吸をする魚の血液は、他の魚に比べて高い P_{CO_2} を示す (Ultsch, 1996; Bayley et al., 2019)。実際、一部の空気呼吸が必要な魚では、血液の酸塩基状態は有羊膜類で見られるものと類似することで知られている (Ultsch, 1996; Bayley et al., 2019)。また、低酸素となるような環境では二酸化炭素濃度も高いことを示す研究に基づき、脊椎動物の進化の過程で陸上適応する前に、空気呼吸魚は高 P_{CO_2} 、 $[HCO_3^-]$ 血液に移行した可能性が提唱されている (Ultsch, 1996)。

高二酸化炭素環境と陸上環境の両方においてエラ呼吸が抑制され、さらに ILCM の肥大化、繊毛

の消失が引き起こされることが明らかになった (図 1.9)。この結果と先行研究の仮説 (Ultsch, 1996; Bayley et al., 2019) に基づいて、高二酸化炭素環境への適応形質は、陸上適応に先立って獲得されたものであるという仮説を提唱する。すなわち、高二酸化炭素環境で獲得された適応的形質のいくつかは陸上環境でも適応的であったため、四肢動物の祖先は陸上適応のためにそれらを転用できた可能性がある。例えば、エラ呼吸の抑制と ILCM の肥大化は、乾燥防止の点で陸上環境に適応的であった。繊毛の消失も、陸上環境での無駄なエネルギー消費を抑えるという点で適応的であった。また、これらのエラの変化というものが可塑的であったために水中から陸上という大きく異なる環境への適応を、着実に可能にしていったと考えられる。

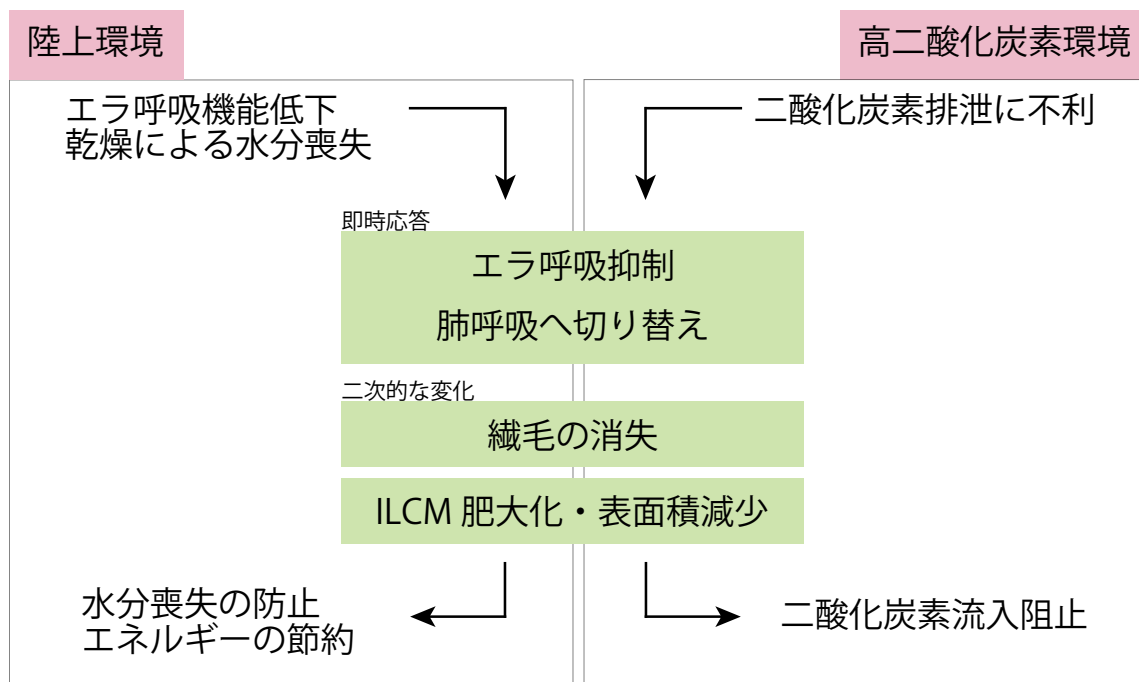


図 1.9: 本研究で明らかになった二環境における変化のまとめ。陸上環境、高二酸化炭素環境ともにエラ呼吸抑制、繊毛の消失、ILCM の肥大化といった共通した変化が見られた。これらはそれぞれの環境において適応的な変化であると考えられる。

6 結論

本研究では、SEM、免疫染色観察と RNA-seq 解析により、ポリプテルスのエラの表面に運動性繊毛が存在し、エラの表面に水の流れを作ることによって効率的な呼吸と物質交換を行っている可能性を明らかにした。これらの運動性繊毛は、陸上や高二氧化碳環境といった環境変化に応じて、可塑的に消失することが観察された。デボン紀の魚類では、そうした特徴が高二氧化碳環境下で進化し、その後、初期の四肢動物が陸上環境に適応する過程で転用した可能性がある。本研究で明らかになったポリプテルスの特徴は、脊椎動物への陸上適応に重要な洞察を与えるものである。

第 II 部

水陸両生魚・ポリプテルスの陸上環境における 恒常性維持機構

1 要旨

魚類が陸上へと適応するためには、恒常性維持機能が重要となる。特に、周りに水が絶えずあったために可能であった浸透圧調節と老廃物の排泄の方法を陸上で変えなければならない。淡水魚では主にエラから塩類を取り込んだり、アンモニアを排泄したりしているのに対し、陸上四肢動物では腎臓や肝臓などの別の臓器がその機能の中枢を担う。陸上に適応するに当たって、エラの機能を別の器官で補償することが考えられるが、進化上どの段階でそれが起きたのか、どのように起きるのかといった遺伝的なメカニズムはほとんど不明である。本研究では肺呼吸とエラ呼吸の両方が可能である水陸両生魚、ポリプテルスに着目し、陸上飼育による生理・遺伝子発現の変化などを通じてどのように陸上に適応しているかを明らかにする。

まず、陸上環境において浸透圧の変化が生じるかどうかを確かめたところ、陸上環境においてもナトリウム濃度および浸透圧は維持されていることが明らかになった。腎臓の RNA-seq から浸透圧調節に関わる遺伝子を探索したところ、ENaC という上皮性ナトリウムチャネルの発現量が有意に増加していた。エラから吸収できなくなった分、腎臓でナトリウムの再吸収を促進することで恒常性を維持していると考えられる。また、血漿中のアンモニア、尿素の濃度を測定したところ、アンモニアでは有意な変化が見られなかったが、尿素の濃度は陸上環境で有意に増加していた。筋組織の尿素を測定したところ、有意な変化は認められなかった。次にエラ、腎臓、肝臓の RNA-seq 解析結果から、尿素の代謝に関わる遺伝子を網羅的に解析した。アンモニアを最初に解毒する酵素であるグルタ

ミン合成酵素の遺伝子がポリプテルス類で5つに重複していた。また、尿素への合成を触媒するアルギナーゼは肝臓、エラにおいて有意に発現量が増加していた。尿素回路の遺伝子が一律に発現量が増加したという結果ではなかったが、尿素への変換がある程度は促進されていることが示唆された。また、腎臓においてアンモニアトランスポータの発現量が有意に増加していた。このことは多くのアンモニアは腎臓を通じて尿から外部へと排泄されているのではないかということを示唆している。

これらの結果から、ポリプテルスは陸上環境においても水中環境と同じく恒常性を維持する能力を有しており、エラが使えない分、主に腎臓がその機能を補償しているのではないかと考えられる。この結果は陸上へと適応し始めた初期の陸上脊椎動物の生理を理解する上で重要な洞察をもたらすものである。

2 背景

魚が陸上に適応する際、適応途上の形質に関連して、これまでは化石などに基づく形態学的な研究から陸上適応の進化が研究されてきた。しかし化石から得られる形態的な情報は限定的であり、特に化石に残らないような体の内部、生理や代謝についてはこれまでほとんど明らかにされていない。

魚類の陸上適応に関して、陸上移行の際に解決しなければならない重要な課題がいくつか提唱されてきた。例えば「陸上で体にかかる重力の問題」「浸透圧の維持」「ガス交換」「CO₂ 保持」「老廃物排泄」などが挙げられている (Evans et al., 2005; Brauner and Rombough, 2012)。中でも浸透圧の維持や老廃物排泄は長期間陸上で生存するために重要な課題である。淡水魚では主にエラにおいて浸透圧調節や老廃物排泄が行われるが、陸上動物にエラは存在しないため代替手段が必要である。

淡水魚では体内のほうが環境水よりも浸透圧が高いため、体外から水が流入し、体内から塩類が流出してしまう。そこでエラや腸 (食餌) から能動的に無機塩類を摂取する必要がある。加えて、体内に流入した水を排泄するために腎臓で薄い多量の尿を作り出しているが、腎臓の構造は哺乳類よりも単純である (Koc, 2006)。対して陸上四肢動物ではエラが存在しないため、摂取は食餌にのみ依存している。陸上では水の利用が制限されることに加え、エラからの塩類摂取ができないため、特に哺乳類や鳥類では腎臓で積極的に塩類の再吸収を行い、体液の浸透圧を維持している (Braun and Dantzer, 2011)。陸上四肢動物における浸透圧調節に関しては腎臓の上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) が再吸収において中心的な役割を果たしている (Büsst, 2013; Hanukoglu and Hanukoglu, 2016)。ENaC は3つのサブユニット、 α (または δ)、 β 、 γ からなるヘテロ三量体で、それぞれ *scnn1a* (または *scnn1d*)、*scnn1b*、*scnn1g* 遺伝子によってコードされている (Hanukoglu and Hanukoglu, 2016)。哺乳類、両生類においては ENaC は遠位尿細管において発現している (Kellenberger and Schild, 2002; Konno et al., 2007; Pearce et al., 2022)。ENaC は脊椎動物の共通祖先において獲得され、陸上四肢動物ではそのサブユニットが保存されている。一方で条鰭類ではポリプテルス分岐以降の魚では ENaC サブユニッ

トが失われたことが知られているが (Wichmann and Althaus, 2020; Wang et al., 2022)、ポリプテルスの腎臓における ENaC の発現場所は明らかではない。また、 Na^+/K^+ -ATPase が基底部に多く発現しており、細胞内ナトリウムを細胞外に出すことで浸透圧を能動的に調節している (Marshall, 2002; Beyenbach, 2004; Clausen et al., 2017; Wichmann and Althaus, 2020)。

一般的に体内の老廃物としてアンモニアが生成される。アンモニアは毒性が高いため体内に蓄積することはできない。しかし水に可溶という特性があるため、魚類は基本的にエラからアンモニアを排泄している。尿素も排泄されるが、少量である (Campbell and Anderson, 1991)。ニジマスにおいてはエラから排泄されるアンモニアの量は尿中に排泄されるアンモニアの約 60-100 倍であると言われている (McDONALD and Wood, 1981)。アンモニアの排泄には輸送体である Rh family B glycoprotein (*rhbg*)、Rh family C glycoprotein (*rhcg*)、Sodium-hydrogen exchanger 3 (NHE3, *slc9a3*) が関与していると言われている (Weiner and Verlander, 2011; Harris et al., 2023)。対して陸上哺乳類ではアンモニアを排泄し続けるための多量の水がないため、肝臓において毒性の低い尿素へと代謝してから尿へと排泄する。アンモニアから尿素への代謝は尿素回路によるものである。魚類ではアンモニアはグルタミン合成酵素 (GS) によってグルタミンを経由してからカルバモイルリン酸へと変換され、最終的に尿素へと代謝される (Anderson, 1995)。哺乳類ではグルタミンを経由せずに直接アンモニアからカルバモイルリン酸を合成する酵素を持つといった違いもある。魚と陸上四肢動物では老廃物排泄や浸透圧調節など恒常性維持機構において大きな違いが存在する。陸上移行期の水陸両生魚において、エラで行われてきた恒常性維持の機能が、陸上環境でどう補償されるのかということが本研究の問いである。

これまで、現生魚類の中で最も両生類に近いことから、ハイギョを用いた研究が行われてきた。ハイギョは肺を用いてガス交換を行うことで陸上において生存が可能である。またハイギョに特徴的な生態のひとつに、乾季になって水が干上がると繭を作り、乾眠 (夏眠) することで乾季を乗り切ることが知られている (Sturla et al., 2002)。ハイギョでは乾眠時においてアンモニアを尿素に変えて弱毒化

し、水を保持するために排泄せずに蓄積する (Loong et al., 2005)。組織内の尿素により体内の浸透圧が高まることで水分の貯蔵に寄与していると言われている (Wilkie et al., 2007)。しかしハイギョを用いた研究の欠点として、繭を作って乾眠してしまうため、代謝が著しく低下し (Zhang et al., 2023)、「乾眠のための変化」であるのか「陸上環境に適応するための変化」であるのかの区別ができないという問題点が存在する。

近年、ポリプテルスという水陸両生魚が陸上での長期飼育によってその個体で可塑的な変化が起こることが示されている (Standen et al., 2014; Turko et al., 2019; Kimura et al., 2023)。ポリプテルスは原始的な肺を持ち、spiracle を用いて呼吸する (Graham et al., 2014) など、デボン紀の頃の硬骨魚類の形質を残していると言われている。また、陸上で飼育をしても乾眠をしないため陸上での長期間飼育の影響を調べることに適している。本研究ではポリプテルスを陸上飼育し、恒常性の指標となる浸透圧やアンモニアなどの測定に加え、器官の遺伝子発現の変化から、陸上環境におけるポリプテルスの生存戦略を明らかにする。

3 材料と手法

3.1 ポリプテルスの陸上飼育

ポリプテルスの陸上飼育は Kimura et al. (2023) に従って 1 ヶ月以上の陸上飼育を行った (詳細は第 I 部を参照)。餌は人工飼料を与え、水中陸上環境で同タイミングで投与した。以下の成分分析を行う 12 時間以上前から餌を与えなかった。

3.2 血漿の成分分析

採血に先立ち、個体は氷で麻酔された。ポリプテルスの全血をヘパリンリチウムでコートしたチューブ (キャピジェクト II、テルモ) に採取し、3,500 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した。血漿はスクリーキャップ付きチューブに入れて -30°C で保存し、その後の分析に使用した。血漿の浸透圧は、蒸気圧法オズモメータ (5600、Wescor) を用いて測定した。Na 濃度は、偏光ゼーマン原子吸光度計 (ZA3000、日立ハイテク) を用いて測定した。

ポリプテルスの全血を EDTA-2K でコートしたチューブ (VACUETTE, Greiner Bio-One) に採取した。アンモニア測定用の全血は速やかに脱タンパク溶液と混合した。尿素測定用の全血を 5,000 × g、15 分間、室温で遠心分離し、上清を得た。アンモニアおよび尿素濃度は、測定キット (LabAssay Ammonia、富士フイルム和光純薬、および QuantiChrom Urea Assay Kit、BioAssay Systems) を用い、マイクロプレートリーダー (MPR-A100、AS ONE) を用いて測定した。

3.3 筋組織中の尿素測定

筋組織はポリプテルスの背側から採取した。この組織を飽和硫酸アンモニウム水に入れ、ホモジナイザー (Minilys, Bertin Technologies) を用いて、2 つの異なるサイズ (Φ 1.5 mm と Φ 2.7 mm) のジルコニアボールと共に 30 秒 × 2 回ホモジナイズした。チューブを 10,000 × g、15 分間、4°C で遠

心し、上清を別のチューブに移し、再度遠心して上清を得た。上清は4°Cで保存し、同日中に測定した。尿素濃度は上記と同じキットを用いて測定した。

3.4 飼育水中の成分分析

体外へと排泄するアンモニア、尿素の量を計測するために飼育水の水分分析を行った。各個体は1体ずつ市販の密閉容器 (22 cm × 16 cm) に入れ、水中飼育個体は 500 mL、陸上飼育個体は 100 mL の水を入れた。陸上飼育個体はエラ呼吸ができない水位まで紙ウエス (プロワイプ ソフトワイパー S200、大王製紙) を用いてかさ上げた。フンによる水質への影響を最低限に留めるため、30 分以内に速やかにフンを取り除いた。ポリプテルスを環境の変化に慣れさせるため、0 時間点を移動から 30 分後に設定した。0, 3, 6, 9 時間後、にそれぞれよく攪拌した後に 200 μ L 採水した。採水した水は計測まで 4°C で保管し、計測直前に室温に戻した。アンモニアおよび尿素濃度は、測定キット (LabAssay Ammonia、富士フイルム和光純薬、および QuantiChrom Urea Assay Kit、BioAssay Systems) を用い、マイクロプレートリーダー (MPR-A100、AS ONE) を用いて測定した。水中環境と陸上環境の水量の違いについては補正を行った。

3.5 RNA 抽出と RNA-seq

陸上で飼育したポリプテルス、および同じ飼育水で水中で飼育したポリプテルスの両方の個体について解剖を行い、エラ (水中陸上それぞれ 3 個体)、腎臓 (6 個体)、肝臓 (3 個体) について RNA 抽出を行った。抽出された RNA は、マクロジェン・ジャパン株式会社において、TruSeq stranded mRNA Library Prep Kit を用いてライブラリ調整が行われ、NovaSeq 6000 で塩基配列を決定した。エラのサンプルについては Kimura et al. (2023) でシーケンスしたものと同一である。生配列データの品質管理は fastp (Chen et al., 2018)、処理したリードデータは、STAR (Dobin et al., 2013) を用いて *Polypterus senegalus* (Bi et al., 2021) のゲノムにマッピングした。マップされたリードは featureCounts (Liao

et al., 2014) でカウントした。発現変動遺伝子は TCC (Sun et al., 2013) で iDEGES/edgeR-edgeR の組み合わせで計算した ($\alpha = .05$)。発現量は箱ひげ図で示し、四角は四分位範囲を、中央の線は中央値を、上下のひげはデータの範囲を示す。各点は実データであり、ひし形の点はその隣の点より外にある外れ値であることを示す。

3.6 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション

陸上飼育、水中飼育したポリプテルスの腎臓を 4% PFA で一晩固定した。20% スクローズで置換し、組織を包埋剤 (Tissue-Tek[®] O.C.T. Compound、サクラファインテックジャパン株式会社) で包埋した。クライオスタット (CM 1510, Leica microsystems) と薄切片用ブレード (High-profile Leica 818 disposable blades, Leica microsystems) を用いて包埋組織を 10 μm 幅に薄切し、スライドガラス (MAS-01, Matsunami Glass Ind.) に貼り付けた。切片と組織包埋ブロックは、使用するまで -80°C で保存した。

プローブとなる配列をポリプテルス (*P. senegalus*) の ENaC α (*scnn1a*, XM_039763828.1) に対して設計した。プライマーは Forward が ‘TCCAGGAACAGTGGGCATTC’、Reverse が ‘TCCAGGAACAGTGGGCATTC’ である。腎臓から抽出した mRNA を逆転写し、上記プライマーで PCR で増幅後、pGEM-T ベクター (Promega) を用いたクローニング、目的配列確認のためのシーケンスを行った。プラスミドを抽出し、制限酵素処理を行い、DIG RNA labelling mix (Roche) を使って DIG で標識されたプローブを作製した。

作製した凍結切片を、PBS、0.5% Triton-X100 で洗浄、処理を行ったあと、4% PFA を 10 分、0.3% H_2O_2 を 10 分、Proteinase K 処理を 5 分、4% PFA を 10 分、0.2% グリシンを 5 分、0.2N HCl 処理を 20 分行った。トリエタノールアミン HCl 溶液に 1 mL 無水酢酸を 5 分間かけて滴下し、アセチル化を行ったのち、 60°C で 5 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、0.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ になるように調整したプローブを加えて 60°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。5x SSC (Standard Saline

Citrate)、50% ホルムアミド/ 5x SSC で切片を洗浄し、Tris-NaCl-EDTA バッファー中の 2 μ g/ml RNase A (Sigma) で 37°C で 30 分間余剰プローブの分解処理をした。2x SSC と 0.2x SSC で洗浄後、Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector) を用いてブロッキングを行った。Anti-Digoxigenin-POD (Roche) を使って 4°C で一晩一次抗体処理したものを、TSA Plus Biotin kit (AKOYA BIOSCIENCES) を用いて増感し、Alexa Fluor™ 488-conjugated streptavidin (Thermo Fisher Scientific) で蛍光標識した。蛍光の退色を防ぐため、マウント剤 (VECTASHIELD with DAPI, Vector Laboratories) を加えた。画像は蛍光顕微鏡 (Axioplan2, Carl ZEISS) を用いて撮影した。撮影後、Photoshop を使用してレベルを補正し、色を修正した。

3.7 グルタミン合成酵素遺伝子の分子系統解析

グルタミン合成酵素の mRNA 配列は NCBI gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) を通じて入手した。MAFFT online ver. 7.520 (Katoh et al., 2019) を用いてデフォルトパラメータでアライメントした。明らかに短い配列は偽遺伝子と判定し、系統解析から取り除いた。系統樹は IQ-TREE ver. 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を使用し、TVMe+I+G4 モデルを使用した。このモデルは ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) によって決定された。系統樹の信頼性の評価のために、ultrafast bootstrap 1,000 回と SH-aLRT テスト (Guindon et al., 2010) 1,000 回を実施した。

4 結果

4.1 陸上環境における体液の恒常性維持

ポリプテルスにおいて、エラが使えない陸上環境下で、体液の恒常性維持が行われているかを確認した。ポリプテルスのエラの換水運動は、陸上環境では低下することが知られている (Kimura et al., 2023)。本実験は 1 ヶ月以上陸上環境で飼育を行った。水中と陸上で飼育したポリプテルスの血漿ナトリウム濃度と浸透圧を測定した。血漿ナトリウム濃度は、水中と陸上でそれぞれ 106 mM と 103 mM であった (表 2.1)。浸透圧はそれぞれ 207 mOsm/kg と 202 mOsm/kg であった (表 2.1)。*t* 検定の結果、水棲環境と陸上環境の間に有意差は認められず、陸上環境では恒常性が維持されていることが示唆された。

表 2.1: 水生または陸生環境で飼育されたポリプテルスの血漿値。
数値は平均値 ± SD、サンプル数 (N)。

	水中	陸上
血漿ナトリウム (mM)	106.3 ± 8.0 (5)	103.0 ± 3.5 (4)
血漿浸透圧 (mOsm/kg)	207.3 ± 4.7 (4)	201.5 ± 9.2 (3)

次に、腎臓 RNA-seq からナトリウム再吸収に寄与すると考えられる候補遺伝子の発現量を定量した。上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) と Na^+/K^+ -ATPase (NKA) は、腎臓におけるナトリウム再吸収を介して体液バランスと血圧調節に関与している (Büsst, 2013)。陸上で飼育されたポリプテルスの腎臓における ENaC (*scnn1a*, *scnn1b*, *scnn1g* からコードされる) の発現量は、水中で飼育された個体よりも有意に高かった (図 2.1)。NKA は α サブユニット (*atp1a* からコードされる) と β サブユニット (*atp1b* からコードされる) から構成される。 α サブユニットの発現量を比較すると、統計学

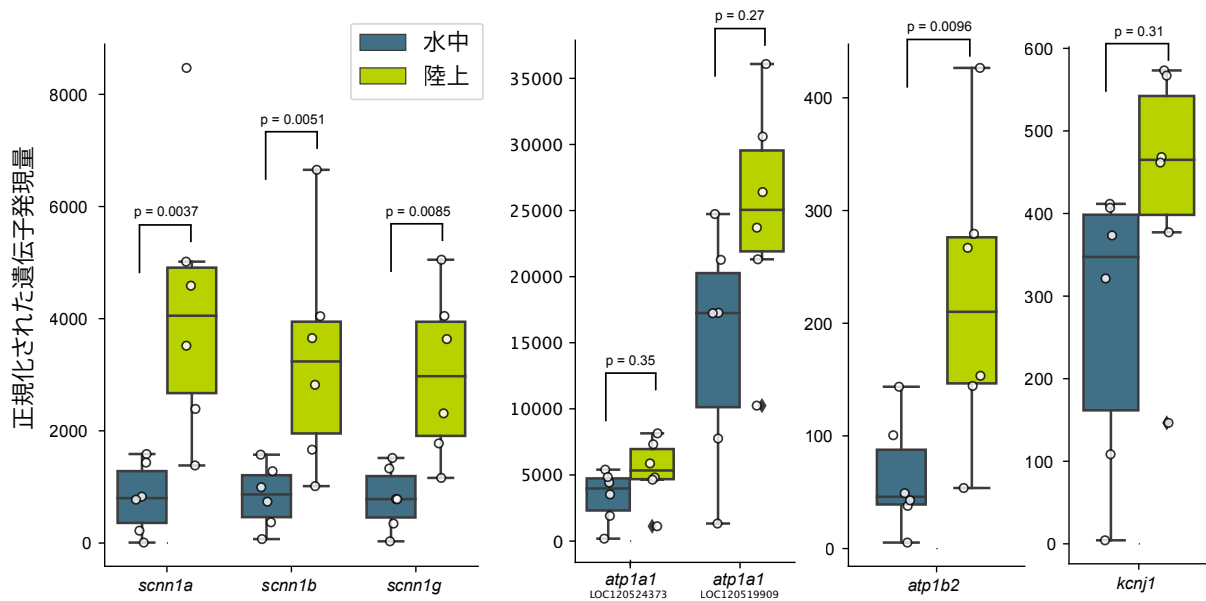


図 2.1: 水中および陸上環境におけるポリプテルスの腎臓のナトリウム再吸収に関わる遺伝子発現量。*scnn1a*、*scnn1b*、*scnn1g* (ENaC サブユニットをコードする)、*atp1a1*、*atp1b2* (NKA)、*kcnj1* (ROMK) の正規化された発現量を示す。箱ひげ図の見方については材料と手法の項を参照。遺伝子重複が見られた *atp1a1* については下部に NCBI gene の ID を示した。TCC による検定結果を上部に示した。

的に有意ではないものの、発現量の増加傾向が見られた (図 2.1)。 β サブユニットの発現レベルは有意に高かった。*atp1b2* の発現レベルは *atp1a1* よりも低かった。

腎臓においてはナトリウム吸収に加えてカリウム排泄が重要である。腎臓におけるカリウム排泄チャネルである ROMK (renal outer medullary potassium channel) がよく知られている。ROMK をコードする遺伝子である *kcnj1* について遺伝子発現量を調べたところ、陸上環境のほうが発現量が高い傾向が見られたが有意ではなかった。

条鰭類 (図 0.1) ではポリプテルス、アミメウナギを除いて ENaC を失っている (Wichmann and Althaus, 2020; Wang et al., 2022)。これまでポリプテルスにおいて腎臓における ENaC の局在を調べた例はない。そこで本研究では ENaC α に対する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて ENaC の局在を明らかにした (図 2.2)。

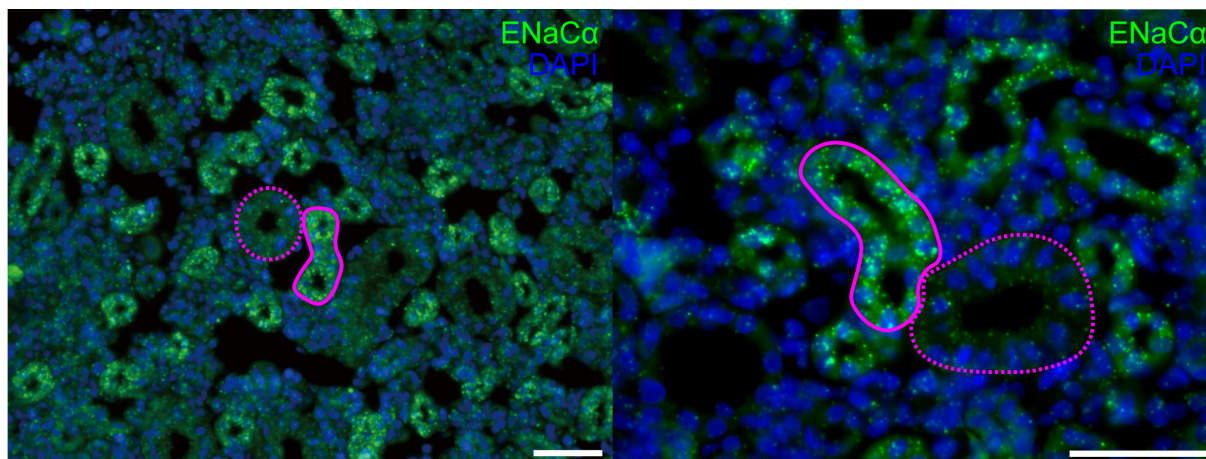


図 2.2: ポリプテルス腎臓における *scnn1a* (ENaC α mRNA) に対する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法による染色画像。代表的な遠位尿細管を実線で、近位尿細管を点線示す。遠位尿細管での *scnn1a* (ENaC α mRNA) の発現局在が確認された。スケールバー: 50 μ m。

一般的に両生類、哺乳類においては ENaC は遠位尿細管から集合管にかけて局在することが知られている (McCormick et al., 2005; Konno et al., 2007)。ポリプテルスにおける *scnn1a* (ENaC α mRNA) の発現局在を明らかにするために蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を実施した (図 2.2)。*scnn1a* mRNA の発現は主に遠位尿細管 (図中実線) に局在していた。

4.2 血中の老廃物とその排泄

エラから排泄されるアンモニアは、陸上環境では別の方法で排泄される可能性がある。両生類や哺乳類は、毒性が低く濃縮可能な尿素に変換するので、ポリプテルスにおいても陸上環境で同じように変換している可能性がある。本研究では、血漿中のアンモニア濃度と尿素濃度をそれぞれ水生環境と陸上環境で測定した。血漿中のアンモニア濃度は、水生環境では 270.1 mg/dL、陸上環境では 308.9 mg/dL であった (表 2.2)。両群間に *t* 検定による有意差は認められなかった。血漿尿素濃度は水生環境で 1.94 mg/dL、陸上環境で 3.95 mg/dL であり、陸上環境で有意に高かった (表 2.2)。

次に、生成された尿素が筋組織に蓄積しているかどうかを評価するため、筋組織中の尿素量を測定し

表 2.2: 水生または陸生環境で飼育されたポリプテルスの血漿および筋組織のアンモニア、尿素の値。数値は平均値 $\pm$ SD、サンプル数 (N)。*水中環境と有意に差があったもの ($p < 0.01$)

	水中	陸上
血漿アンモニア (mg/dL)	270.1 $\pm$ 93.5 (6)	308.92 $\pm$ 54.4 (4)
血漿尿素 (mg/dL)	1.9 $\pm$ 1.1 (6)	4.0 $\pm$ 0.8* (5)
筋組織尿素 (μ mol/g wet mass)	1.3 $\pm$ 0.2 (4)	1.2 $\pm$ 0.2 (4)

た。筋組織中の尿素濃度は、水生環境では 1.30 μ mol/g wet mass、陸上環境では 1.18 μ mol/g wet mass であった (表 2.2)。2 つの環境間で統計的に有意な差はなく、尿素は筋肉組織に蓄積しないことが示唆された。

腎臓の RNA-seq データから、アンモニアと尿素の排泄に関わる遺伝子の発現レベルを調べた。アンモニア輸送体である *rhbg* と *rhcg* の発現量は、水中環境に比べて陸上環境で飼育した個体で有意に増加していた (図 2.3A)。また、ナトリウムの再吸収に加えてアンモニアの輸送にも関与する NHE3 (*slc9a3* によってコードされる) も、有意ではないが陸上環境で増加傾向が見られた (図 2.3B)。ポリプテルスゲノム上では、2 つの尿素トランスポーター遺伝子 (*slc14a2*, urea transporter 2-like) が隣接して位置している。これらの尿素トランスポーター遺伝子は腎臓で発現していたが、発現量は *rhbg* などと比べると低かった。水生環境と陸上環境で発現量に有意差はなかった (図 2.3C)。エラにおいて、アンモニア輸送体の発現量は高かったものの、陸上環境で有意な変化は見られなかった (図 2.3D)。また、2 つのうち片方の尿素トランスポーター遺伝子の発現量は高かったが、もう 1 つの遺伝子の発現量は低かった。どちらの遺伝子も環境間で有意な差はなかった (図 2.3E)。

アンモニアと尿素の体外への排泄量を測るため、飼育水に含まれるアンモニアと尿素の濃度を測定

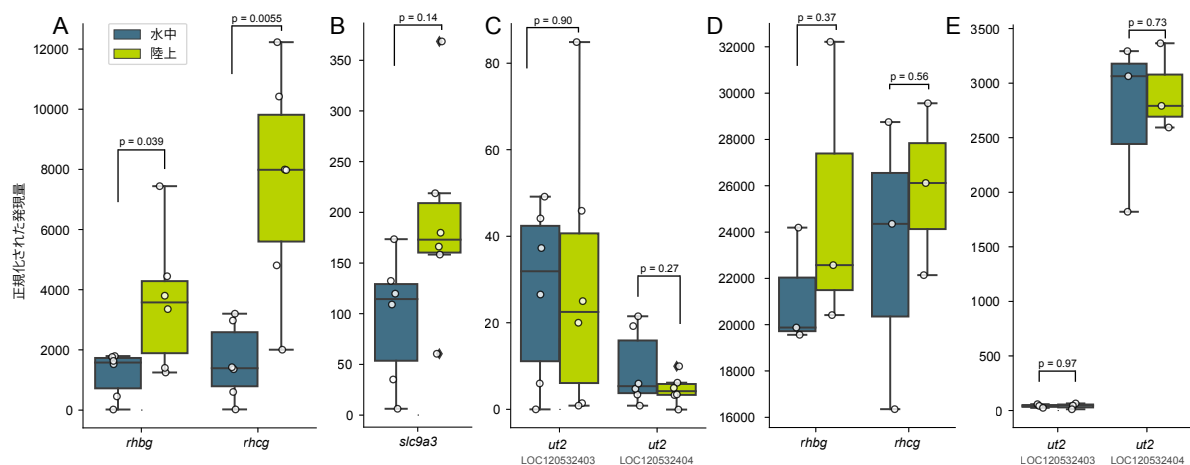


図 2.3: 水中および陸上環境におけるポリプテルスの腎臓 (A–C) およびエラ (D–E) のアンモニア排泄、尿素排泄に関わる遺伝子発現量。箱ひげ図の見方については材料と手法の項を参照。遺伝子重複が見られた *ut2* については下部に NCBI gene の ID を示した。腎臓のアンモニア輸送体 (*rhbg*, *rhcg*) については陸上で有意に発現量の増加が見られた。TCC による検定結果を上部に示した。

した (図 2.4)。尿素の排泄はアンモニアと比べ微量であり、増加の傾向は見られなかった。また、排泄量は陸上より水中のほうが多かった。一方、飼育水中のアンモニア量は水中と陸上で一貫して単調増加しており、陸上環境より水中環境において排泄量の増加が顕著であった。

4.3 尿素回路に関連する遺伝子発現

陸上で生活する両生類、哺乳類はアンモニアを肝臓で尿素へと変換してから排泄する。アンモニアから尿素への代謝は多段階であり、尿素回路と呼ばれる。魚類ではアンモニアから直接カルバモイルリン酸へ代謝する CPSI を持たないが、それ以降の代謝は哺乳類と同じと言われている (Anderson, 1995)(図 2.5A)。本研究ではアンモニアから尿素までの代謝経路に関わる酵素の遺伝子発現をエラ、腎臓、肝臓の RNA-seq から確かめた (図 2.5)。

この一連の代謝はアンモニアをグルタミンに代謝する酵素であるグルタミン合成酵素の反応から始まる。ポリプテルスにおいては、ゲノム上でグルタミン合成酵素遺伝子の遺伝子重複が起き、5 つに

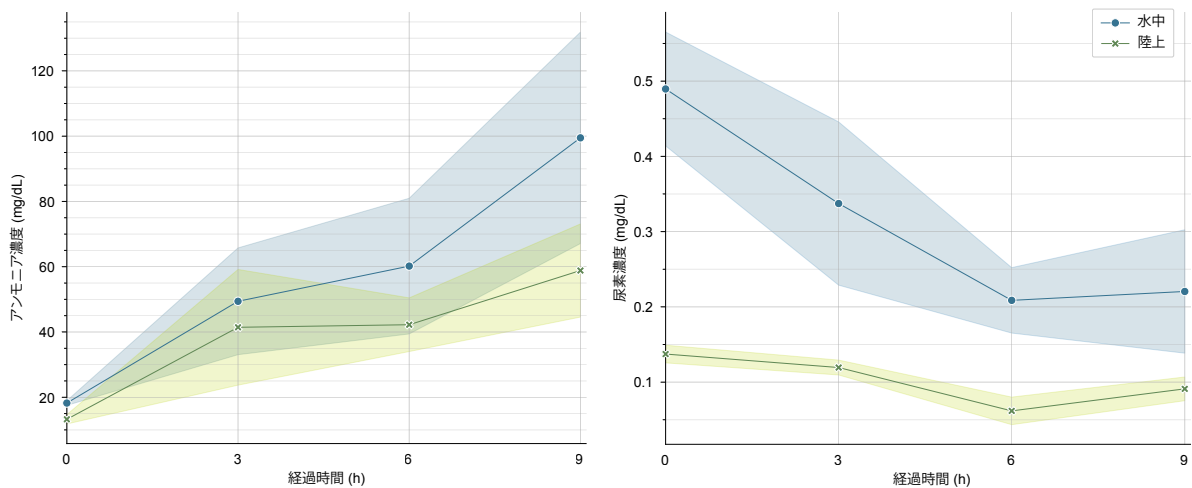


図 2.4: 水中および陸上環境における排泄物が含まれる飼育水中のアンモニア (左) および尿素 (右) の濃度。測定開始から 3 時間ごとに測定を行った。アンモニア、尿素共に陸上環境個体の方が排泄量が少なかった。またアンモニア排泄量は単調増加であるのに対し、尿素は一貫した傾向は見られなかった。各プロットの上下の帯は標準偏差を示す。

増えていた (図 2.6A)。そのグルタミン合成酵素遺伝子 (*gs*) のうち、*gs1* はどの器官においても発現量が高いが、*gs2*–*gs5* は各臓器によって発現量が異なり、特に肝臓では *gs3* と *gs5* の発現量が低かった。また、陸上飼育により発現量が低下したグルタミン合成酵素もいくつか見られたが、有意な低下は肝臓の *gs3* と *gs4* であった。

カルバモイルリン酸シンターゼ III (CPSIII)、オルニチントランスカルバモイラーゼ (OTC) をコードする遺伝子では有意な発現量の変化は見られなかった。シトルリンからアルギニノコハク酸へと代謝を触媒するアルギニノコハク酸シンターゼ (ASS) をコードする遺伝子は肝臓において有意に発現量の低下が見られた。また、アルギニノコハク酸からアルギニンとフマル酸へと代謝を触媒するアルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) をコードする遺伝子はエラにおいて有意に発現量が増加していた。

アルギニンからオルニチン、尿素へと代謝を触媒するアルギナーゼ (ARG1, ARG2) をコードする遺伝子はエラ、腎臓、肝臓で陸上環境において発現量が増加していた。特に *arg1* は肝臓で、*arg2* はエラにおいて有意に発現量が増加していた (図 2.5B–C)。

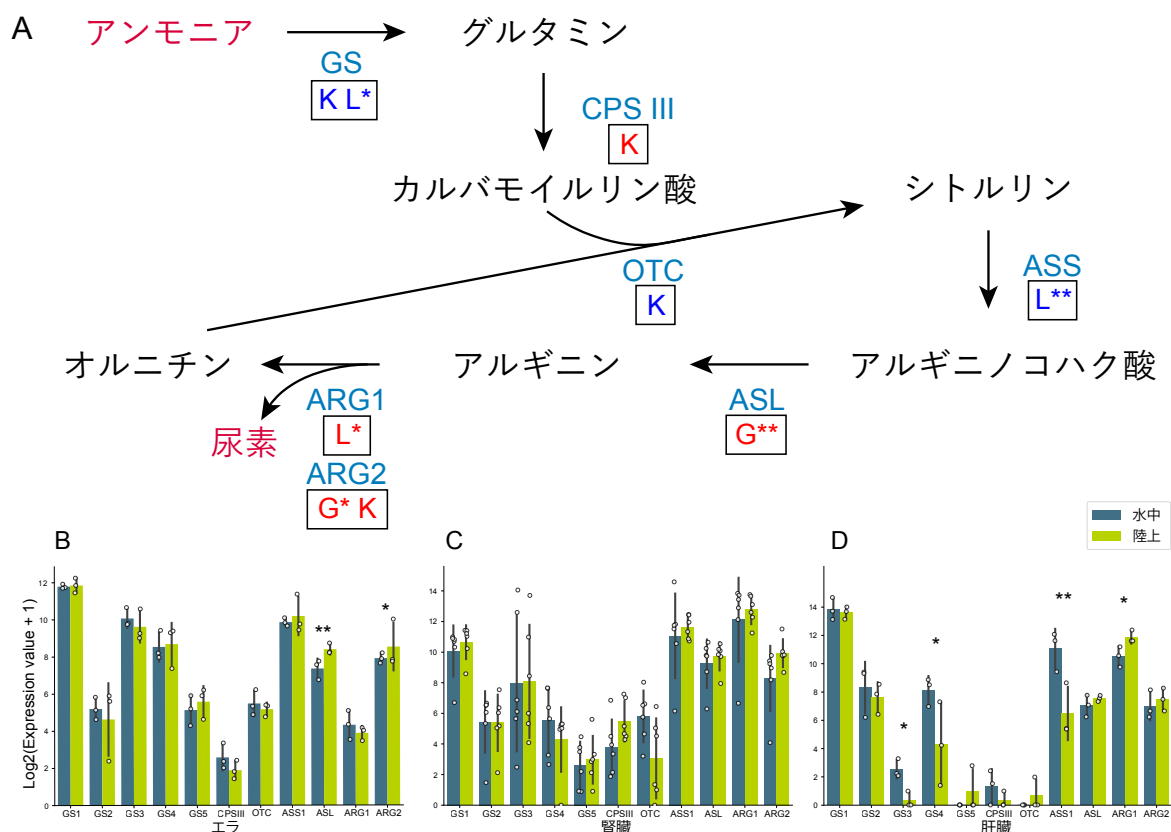


図 2.5: ポリプテルスにおける尿素回路とその関連酵素の RNA-seq 解析に基づく遺伝子の転写量。A: 尿素回路の概略図。矢印の下にその反応を触媒する酵素の名前を示している (GS: グルタミン合成酵素、CPS III: カルバモイルリン酸シンターゼ III、OTC: オルニチントランスカルバモイラーゼ、ASS: アルギニノコハク酸シンターゼ、ASL: アルギニノコハク酸リアーゼ、ARG1、ARG2: アルギナーゼ 1、アルギナーゼ 2)。各酵素名の下に枠内には水中環境と比べて陸上環境で発現量が 2 倍以上変化しているものを略号 (G: エラ、K: 腎臓、L: 肝臓) で示し、青色は発現量が減少、赤色は増加したことを示している。B–C: エラ (B)、腎臓 (C)、肝臓 (D) における各酵素をコードする遺伝子の発現量 (発現量 +1 を $\log_2$ でとっている)。グルタミン合成酵素 (GS1–5) については図 2.6 に対応している。エラーバーは標準偏差。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

本研究において、ポリプテルスおよびその近縁種のアミメウナギにおいてグルタミン合成酵素の遺伝子重複が初めて確認された (図 2.6A)。脊椎動物の広範な種のグルタミン合成酵素の遺伝子の系統樹を構築したところ、顎口類 (図 0.1) に共通して存在するグルタミン合成酵素 (GS1) と獣亜綱 (有袋類、有胎盤類) を除く顎口類に存在するグルタミン合成酵素の大きく 2 つのクレードに分かれること

が明らかになった。ポリプテルス科特異的に遺伝子重複が確認されたグルタミン合成酵素は、GS2-5
のクレードに含まれていた (図 2.6B)。

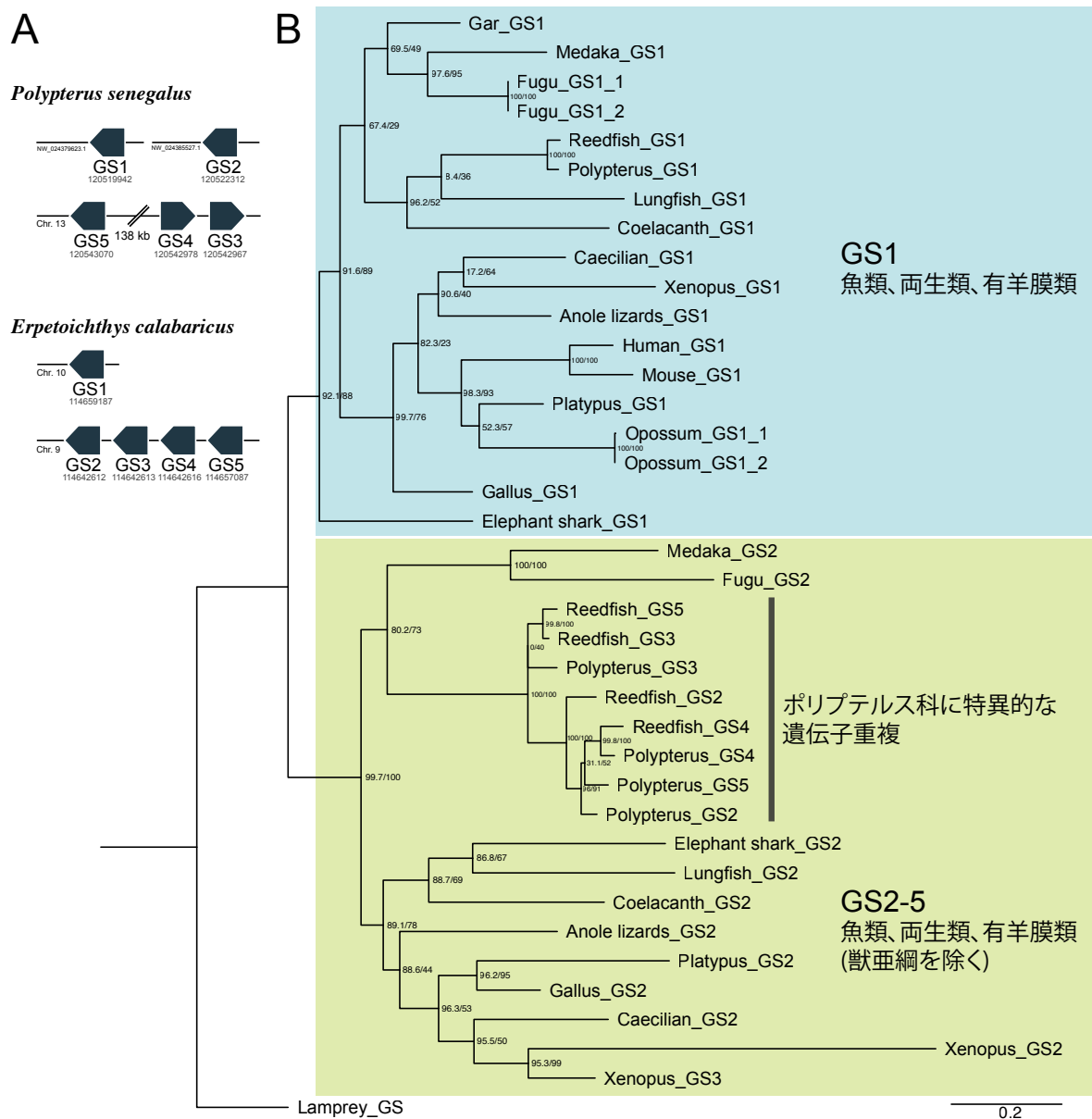


図 2.6: ポリプテルス類のグルタミン合成酵素 (GS) のシンテニーと系統樹。A: GS のゲノム上におけるシンテニー。ポリプテルス・セネガルス (上) とアミメウナギ (下)。五角形は遺伝子とその転写方向を示し、各 GS 番号の下に NCBI gene に対応する ID を示している。ひと繋ぎの染色体、scaffolds は同じ線路上に表し、線の左下に染色体、scaffolds 番号を示した。B: 脊椎動物の GS の塩基配列に基づく系統樹。GS1 はすべての顎口類以上の脊椎動物にあるが、GS2-5 は獣亜綱以外の顎口類にしか存在しない。ノード付近の数値は ultrafast bootstrap 値と SH-aLRT 値を示す。

5 考察

5.1 陸上環境における体内ナトリウム維持機構

水中環境では、魚はエラを通して周囲の水から塩分を取り込んでいることがよく知られている (Evans et al., 2005; Hwang et al., 2011; Brauner and Rombough, 2012)。本研究において、ポリプテルスはエラが使えない陸上環境下においても血漿中ナトリウムおよび浸透圧を維持していることが明らかになった (表 2.1)。アフリカハイギョは陸上環境下で尿素を体内に蓄積することで浸透圧を保っていることが示唆されている (Wilkie et al., 2007; Uchiyama et al., 2015)。陸上環境下のハイギョ血漿中のナトリウム濃度は一定の濃度で保たれるが、エラおよび腎臓における ENaC α の mRNA(*scnn1a*) 発現量は経時的に減少する。そのため、ハイギョにおいては ENaC を介さない方法で血中ナトリウム濃度を維持しているのではないかと議論されている (Uchiyama et al., 2015)。一方でポリプテルスにおいては ENaC の発現量が陸上環境で有意に増加していることが明らかになった (図 2.1)。また統計的に有意ではないが、ナトリウムポンプ (*atp1a1*, *atp1b1*) とカリウムチャネル (*kcnj1*) の発現量の増加傾向が見られた。これらのことから、陸上環境におけるポリプテルスは腎臓においてナトリウムの再吸収を促進することで、浸透圧に関する恒常性を維持していると考えられる。これは陸上で生活する四肢動物に近い特徴である。

5.2 ポリプテルス腎臓における ENaC 局在

本研究では蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって ENaC (*scnn1a*) の局在を確認したところ、遠位尿細管に観察された (図 2.2)。カエルやサンショウウオ、哺乳類における研究でも ENaC は遠位尿細管から集合管にかけて局在することが知られている (McCormick et al., 2005; Konno et al., 2007; Uchiyama et al., 2011)。ポリプテルスにおける ENaC の遠位尿細管での発現は、これらの研究と一貫した結論を示している。腎臓における ENaC の遠位尿細管での局在は、少なくとも硬骨魚類の

共通祖先まで遡ることができると考えられる。

5.3 血中ナトリウム濃度および浸透圧の進化

今回計測したポリプテルスの血漿中のナトリウム濃度および浸透圧は 106 mM、207 mOsm/kg であり、ヒト (139 mM, 291 mOsm/kg) や一般的な真骨魚類 (154 mM, 294 mOsm/kg) と比べると低かった。同じポリプテルス科であるアミメウナギについて先行研究での計測結果ではそれぞれ 91 mM、199 mOsm/kg とポリプテルスと近い値であった (Lutz, 1975)。このことはポリプテルスの値がヒトや真骨魚類と比べて低いことが実験の手技の問題によるものでないことを意味している。

血中のナトリウム濃度および浸透圧について、四肢動物を含め他の様々な動物について文献からデータを収集した (図 2.7)。その結果、ポリプテルス科の魚類以外にもハイギョや無足類 (アシナシイモリ、両生類の中でも最も祖先的な形質を残す) において、同様にヒトと比べて低い値の傾向が見られた。両生類の中でもカエルやサンショウウオを含むバトラキアでは血中ナトリウム濃度はポリプテルスらと近い値であるものの、浸透圧は両生類 + ハイギョ類の平均値 (図 2.7 緑縦線) よりも高い値であった。また、ポリプテルス以外の条鰭類 (Actinopteri) ではポリプテルスよりもナトリウム濃度、浸透圧ともに高い値であった。ENaC サブユニットの喪失がポリプテルス分岐以降の条鰭類の祖先で起こっており (Wichmann and Althaus, 2020; Wang et al., 2022)、このイベントとナトリウム濃度・浸透圧の上昇が同時期に起こったことを示唆している。

本研究で、ポリプテルスを含む陸上適応前後の動物種においては血中ナトリウム濃度、浸透圧が低い傾向を示すことが明らかになった。カエルの研究において、水棲種より陸棲種のほうが浸透圧が高いことが知られており、陸上適応との関連が指摘されている (Mullen and Alvarado, 1976)。この事象の適応的意義ははっきりとはわからないが、ポリプテルスの値はハイギョや両生類に近いいため、陸上環境で何らかの点において適応的であるのかもしれない。

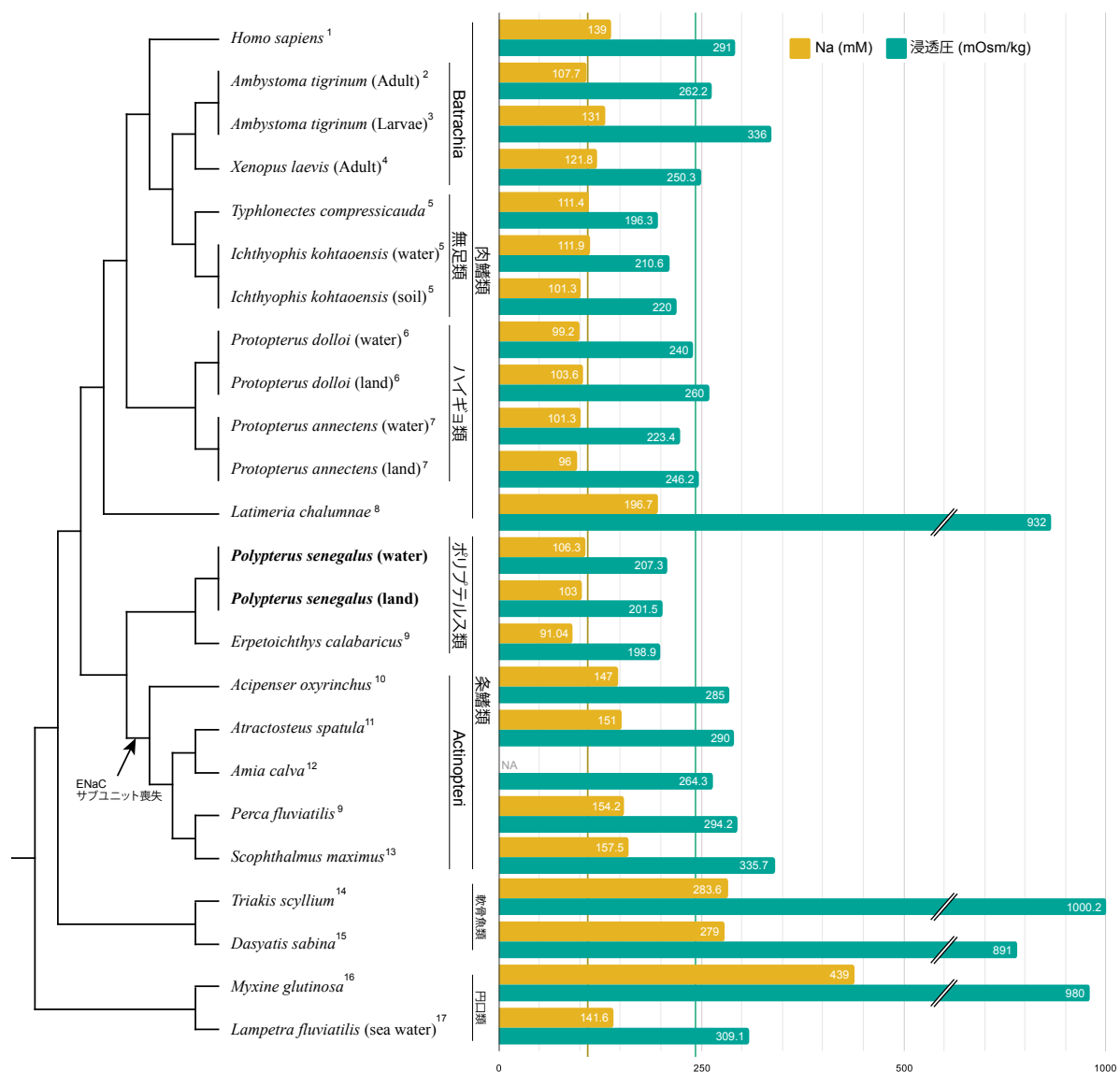


図 2.7: 魚類と四肢動物の系統関係と血液浸透圧 (mOsm/kg) とナトリウム濃度 (mM) の棒グラフ。ポリプテルスのデータは本研究で得られたもので、種名右肩の数字は以下の文献に対応する：1 Chevront et al. (2014)、2 Romsper and McClanahan (1981)、3 Gasser and Miller (1986)、4 Inoda and Morisawa (1987)、5 Stiffler et al. (1990)、6 Wilkie et al. (2007)、7 Kaiya et al. (2014)、8 Griffith et al. (1974)、9 Lutz (1975)、10 Matsche et al. (2014)、11 Schwarz and Allen (2014)、12 Jones and Woo (1991)、13 Gaumet et al. (1995)、14 Hyodo et al. (2004)、15 Janech et al. (2006)、16 Alt et al. (1981)、17 Logan et al. (1980)。グラフの黄土色と緑の線はそれぞれハイギョと両生類を合わせた血中ナトリウム濃度と浸透圧の平均値を示す。

5.4 陸上環境におけるアンモニア、尿素調節機構

魚は一般的に主にエラからアンモニアを排泄している。しかしエラが使えない陸上環境下においてポリプテルスはアンモニアをどう処理しているかは明らかではなかった。本研究において、ポリプテルスは陸上環境においても血中アンモニア濃度が維持されているということが明らかになった (表 2.2)。陸上四肢動物、とりわけ哺乳類においてはアンモニアを尿素に代謝してから尿を通じて排泄している。ポリプテルスにおいて、陸上環境下で尿素の血中濃度が有意に増加していた。アンモニアと比べ尿素は毒性が低いため、体内の濃度が高まってもアンモニアほど害は高くないと考えられる。体外へと排泄している尿素の量が水中環境と比べて陸上環境で少ないこと (図 2.4) から、排泄速度よりも生成速度のほうが高くなった結果であると考えられる (後述)。

また、本研究においてアンモニアトランスポーターである *rhbg*, *rhcg* の発現量が陸上環境の腎臓で有意に増加していることが明らかになった (図 2.3A)。血中のアンモニア濃度が陸上でも維持されていること (表 2.2)、陸上環境の飼育水中のアンモニア濃度が経時的に増加していたこと (図 2.4) から、ポリプテルスは陸上環境で腎臓からのアンモニア排泄を促進していると考えられる。通常魚類はエラから主にアンモニアを排泄する (McDONALD and Wood, 1981; Campbell and Anderson, 1991) ため、それが利用できない陸上環境下では腎臓がアンモニア排泄の機能を補償していると考えられる。今回の実験において、アンモニア、尿素ともに陸上環境の個体のほうが排泄量が少なかった (図 2.4)。これは陸上環境において行動が抑制されることによる代謝の低下、またエラからの水の流入が制限されるため尿量の低下によって排泄量の減少が引き起こされている可能性が考えられる。

また、アンモニアの排泄は酸塩基平衡とも関わっていると推察できる。ヒトでは体内の代謝で生じた酸や塩基などに対し、肺や腎臓で体液の pH を維持している (Koeppen, 2009)。魚類においてはエラが酸塩基調節の役割を担っていることが広く知られている (Perry and Gilmour, 2006) ため、陸上環境下では酸塩基調節の機能もエラ以外の器官で補償しなければならない。水素イオン (H^+) は腎臓か

ら排泄されたアンモニア (NH_3) と共に、アンモニウムイオン (NH_4^+) として排泄されることがよく知られている。そのため、ポリプテルスでは水素イオンを効率的に腎臓から排泄するためにアンモニアトランスポータの発現量を上げてアンモニアと水素イオンの排泄を促進している可能性が考えられる。

ハイギョでは陸上環境で乾眠する際に尿素を合成して、筋組織中に蓄積することで保湿・貯水に寄与していると考えられている (Loong et al., 2005; Wilkie et al., 2007)。本研究ではポリプテルスの筋組織に尿素が蓄積されているかどうかを確かめたが、陸上環境との間で有意な差は見られなかった (表 2.2)。本実験環境ではポリプテルスは完全に水が利用できないわけではなく、腹側の表皮を通じた水の流入や飲水によって体内の水分量の調節を行っていると考えられる。そのため、保湿や貯水の重要度はハイギョの乾眠と比べて低い。腹側の表皮を通じた水の流入 (吸収) はハイギョ (Wilkie et al., 2007) やアマガエル (Hasegawa et al., 2003) でも知られており、ポリプテルスも同様に腹側からの水の流入と尿からの排泄を通じて体内の水分量を維持していると考えられる。

5.5 グルタミン合成酵素と尿素回路

アンモニアから尿素への代謝は主に尿素回路を経由する。魚類は哺乳類とは異なり、CPSI という酵素を持たないため、アンモニアから直接カルバモイルリン酸を合成することができない。そのため、グルタミンを経由する必要がある (Anderson, 1995, 2001)(図 2.5)。本研究ではポリプテルス科の二種 (ポリプテルス・セネガルスとアミメウナギ) において初めてグルタミン合成酵素遺伝子 (*gs*) が 5 つに遺伝子重複を起こしていることを示した (図 2.6A)。これまで真骨魚類においてはニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) においてグルタミン合成酵素の 4 つの遺伝子重複が報告されている (Murray et al., 2003)。しかし、ニジマスはポリプテルスと分岐以降に 2 回の全ゲノム重複を経験しており、それに伴う遺伝子重複である可能性が考えられる。また、空気呼吸をするナマズの一種 (*Clarias magur*) においても *gs* 遺伝子の重複が知られており、高アンモニア環境で発現量が増加する (Banerjee et al.,

2018)。ポリプテルスと四肢動物の全ゲノム重複の回数は同じであるため、このグルタミン合成酵素遺伝子の重複は全ゲノム重複の結果ではないと考えられる。ポリプテルスにおいて、陸上環境への適応に関連しているとされる遺伝子の重複がミオグロビン (Helfenrath et al., 2021) やケラチン (Kimura and Nikaido, 2021) において確認されている。このグルタミン合成酵素遺伝子の重複も、陸上環境や浅い水たまりにおいてアンモニアの解毒を促進するという適応の結果であるかもしれない。

各組織における発現量に着目すると、*gs1* の発現量はエラ、腎臓、肝臓全てにおいて *gs* 中で一番高かった (図 2.5B–D)。*gs1* は魚類、両生類、有羊膜類すべての種に存在する遺伝子であり、体内の代謝で重要な役割を果たしていると推察できる (図 2.6B)。ポリプテルス *gs2–5* が含まれるクレードの *gs* 遺伝子については、獣亜綱 (有袋類と有胎盤類) を除く顎口類に存在していた。ポリプテルスにおいて *gs2–5* はエラ、腎臓、肝臓で発現している。肝臓における *gs3* と *gs4* は陸上環境で有意に発現量が低下していたが、発現量は *gs1* に比べると低い (図 2.5D)。エラと腎臓では陸上環境で有意な発現量の変化は見られなかった。このことから、ポリプテルスにおいてはアンモニアやグルタミンの濃度による *gs* 発現量のフィードバック制御が存在しない、あるいは陸上・水中関わらず *gs* は常時、アンモニアの代謝に十分な量が転写されていることが考えられる。

肝臓の *gs* 以外の尿素回路の遺伝子について、CPSIII や OTC などコードする遺伝子発現量が低いことからポリプテルスの肝臓内において尿素回路が完結しているとは考えにくい (図 2.5D)。エラや腎臓では *gs* 以外の遺伝子についても十分な発現量が見られるため、これら 2 つの器官では尿素回路が機能していると考えられる (図 2.5B–C)。肝臓では他器官においてシトルリンまで代謝された産物を尿素・オルニチンに代謝していると考えられる。

尿素回路の中で陸上環境で有意に発現量が増加していた遺伝子はアルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) とアルギナーゼ (ARG) であった (図 2.5)。アルギニンから尿素、オルニチンへの反応を触媒するアルギナーゼは ARG1 と ARG2 の 2 つが存在する。ヒトにおいては *arg1* は肝臓、*arg2* は脳や腎臓など肝臓以外で発現することが知られている (Li et al., 2022)。ポリプテルスにおいては *arg1*, *arg2*

の両方がエラ、腎臓、肝臓全てにおいて発現が見られた (図 2.5B–D)。肝臓で *arg1*、エラで *arg2* の発現量が陸上で有意に増加していた。特にエラでは尿素トランスポータ遺伝子 2 (*ut2*) の発現量が高い (図 2.3E) ことから、エラで生成された尿素がそのまま体外へと排泄されている可能性が考えられる。しかし、陸上環境ではエラ呼吸が抑制されるため (Kimura et al., 2023)、水中環境と比べて十分な量の尿素が排泄されず、血中尿素の増加 (表 2.2) および水中と比べて尿素排泄量が少ない (図 2.4) といった結果が見られたのではないかと考えられる。

6 結論

本研究において、まず血液のアンモニア、尿素、ナトリウム、浸透圧の計測により陸上環境下においてもこれらの恒常性が維持されているということが明らかになった。魚類では老廃物排泄と浸透圧の調節を主にエラで行っており、エラが使えない環境下においても恒常性が維持されていたことから、別の器官による補償があると考えられる。中でも今回着目した腎臓ではナトリウム再吸収に寄与する上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC、遠位尿細管で発現) およびアンモニアトランスポータ (*rhbg*, *rhcg*) の発現量が陸上環境で有意に増加していたことが示された。これによって体内の浸透圧やアンモニア (老廃物) の濃度、酸塩基などを一定に保っていると考えられる。また、ポリプテルスを含む陸上適応前後の動物において、血中ナトリウム濃度や浸透圧が哺乳類などと比べて低いことが明らかになった。ポリプテルスはハイギョや両生類に近い値であることから、陸上適応と何らかの関連があるのかもしれない。老廃物代謝について、アンモニアをグルタミンに変換するグルタミン合成酵素の遺伝子重複が見られた。エラや腎臓で発現しており、血中アンモニア濃度の維持に寄与していると考えられる。血中尿素の濃度が有意に増加したこと、尿素回路の中でも尿素を合成するアルギナーゼの発現量が陸上で増加したことから、尿素合成を促進してアンモニアの解毒を行っているかと推察できる。

本研究の結果から、エラで行われていた機能の一部については主に腎臓でその機能を補償しているということが示唆された。水中から陸上へと大きく異なる環境へと進出する以前からこうした能力の獲得 (前適応) が起きていたものと予想される。

第 III 部

古代魚で保存されたケラチン遺伝子クラスタと 陸上環境適応の関連

Kimura, Y. and Nikaido, M. (2021).

Conserved keratin gene clusters in ancient fish: An evolutionary seed for terrestrial adaptation

Genomics, 113(1, Part 2): 1120–1128.

Kimura, Y. and Nikaido, M. (2023).

Unveiling the expansion of keratin genes in lungfishes: a possible link to terrestrial adaptation

Genes & Genetic Systems, Volume 98 Issue 5 Pages 249–257.

1 要旨

魚類から両生類へと進化するとき、防御のための鱗が失われ、角質層という水分の喪失を防止するための皮膚構造が発達した。ヒトなどの陸上動物では角質層が大きく発達しており、その主成分はケラチンという中間径フィラメントである。

これまでの研究においてゼブラフィッシュやフグなどでは陸上動物と比べ、ケラチン遺伝子数が少ないという他、ケラチン遺伝子クラスタのシンテニーが保存されていないということが明らかにされてきた (Vandebergh and Bossuyt, 2012)。しかし魚類と陸上動物の共通祖先の段階においてケラチン遺伝子数やそのクラスタが保存されていたかどうかは明らかにされていなかった。以前の我々の研究においては、その共通祖先の魚類を含む複数種のゲノムを用いてシンテニー比較、分子系統解析、 d_N/d_S 解析、遺伝子数の比較を行った (Kimura and Nikaido, 2021)。

Kimura and Nikaido (2021) における主な発見としては以下の 6 つが挙げられる。1. 真骨魚類 (ゼブラフィッシュやフグ) が分岐する以前の魚類やシーラカンスにおいてもケラチン遺伝子クラスタが保存されており、両生類において遺伝子数が拡大したことが示された。2. アミメウナギという肺呼吸とエラ呼吸両方を行う魚において既知のクラスタとは異なる領域で遺伝子重複がみられた。3. 分子系統解析から、*krt18* が系統的に最も祖先的であり、どの種でも保存されていることが明らかになった。4. d_N/d_S 解析によりアミメウナギの重複した遺伝子のクレード、両生類の成体表皮で発現する遺伝子のクレードで有意な純化選択の緩みが推測された。5. *krt18* は共発現すると知られている *krt8* と共にゲノム上で head-to-head で隣り合わせになっており、4 億年以上その並びが保存されていることが明らかになった。6. 哺乳類において角質層に発現するケラチンの特定のシステイン残基が保水に重要であることがわかっており、両生類の成体上皮でのみ発現するケラチン遺伝子群に共通してそのシステイン残基が保存されていたが、魚類では一切見られなかった。

さらに本研究では、ハイギョという水陸両生魚に着目した。ハイギョは現生魚類の中で最も両生類に近い魚類であるが、そのゲノムは 2020 年時点で決定・公開がされていなかった。しかし 2021 年、ハイギョ二種のゲノムが決定されたため (Meyer et al., 2021; Wang et al., 2021)、ケラチン遺伝子の解析を行った (Kimura and Nikaido, 2023)。

その結果、ハイギョにおいてもケラチン遺伝子の重複・多様化が起きたが、両生類とは独立に生じた可能性が高いということが明らかになった。また、独立に陸上に適応した陸棲ハゼについてゲノムからケラチン遺伝子の探索を行ったが、近縁の水棲種と比べてケラチン遺伝子数の顕著な増加は見られなかった。これらの結果からケラチン遺伝子の重複は四肢動物に近い系統で繰り返し起きたが、陸上適応した種でも真骨魚類では起こらなかったことが示された。

2 背景

魚が陸上へと適応していく過程において、魚の皮膚構造というものは劇的に変化した。厚い鱗を捨て、角質層というケラチン繊維で満たされた表皮の外側の層を獲得した (Yokoyama et al., 2018; Alibardi, 2022)。角質層は哺乳類では外界からの防御の役割の他に、体内からの水分の喪失防止という重要な役割を担っている。角質層の起源については不明なことが多いが、両生類に最も近い現生魚類であるハイギョでは、角質層のようなものが見つかっている (Smith and Coates, 1937; Alibardi and Joss, 2003)。アフリカハイギョ、およびミナミアメリカハイギョは乾季を乗り越えるために泥の中に穴を掘って乾眠することが知られている (Sturla et al., 2002)。さらに、オーストラリアハイギョ (*Neoceratodus forsteri*) では、哺乳類の角質化マーカーである AE2 が、免疫染色によって表皮最外層が染色されることが確認されており、ハイギョにおける角質層の存在を示唆している (Alibardi, 2001; Alibardi and Joss, 2003)。また、アフリカハイギョ (*Protopterus annectens*) においては乾眠中に扁平な細胞が表皮に出現することが報告されている (Smith and Coates, 1937; Sturla et al., 2002; Heimroth et al., 2018, 2021)。

四肢動物における表皮最外層である角質層は中間径フィラメントであるケラチンタンパク質を主成分としている。ケラチンタンパク質は 2 つのクラス、Type I と Type II に分類され、それらが重合していくことでケラチン繊維が形成されていく (Jacob et al., 2018)。四肢動物において、ケラチンタンパク質をコードするケラチン遺伝子は 2 つのクラスタを形成しており (Cluster 1, Cluster 2)、Cluster 1 は Type I、Cluster 2 は 1 つを除き Type II のケラチン遺伝子が占めている (Zimek and Weber, 2005; Vandebergh and Bossuyt, 2012; Ehrlich et al., 2019)。これまでの研究においては真骨魚類 (ゼブラフィッシュ・フグ) のゲノムにおいて同様のクラスタは見つかっていない (Zimek and Weber, 2005; Vandebergh and Bossuyt, 2012)。我々の 2021 年の研究において、真骨魚類ではない硬骨魚類のゲノム解析から、それらの種においてもケラチン遺伝子クラスタが保存されていることが明らかになっ

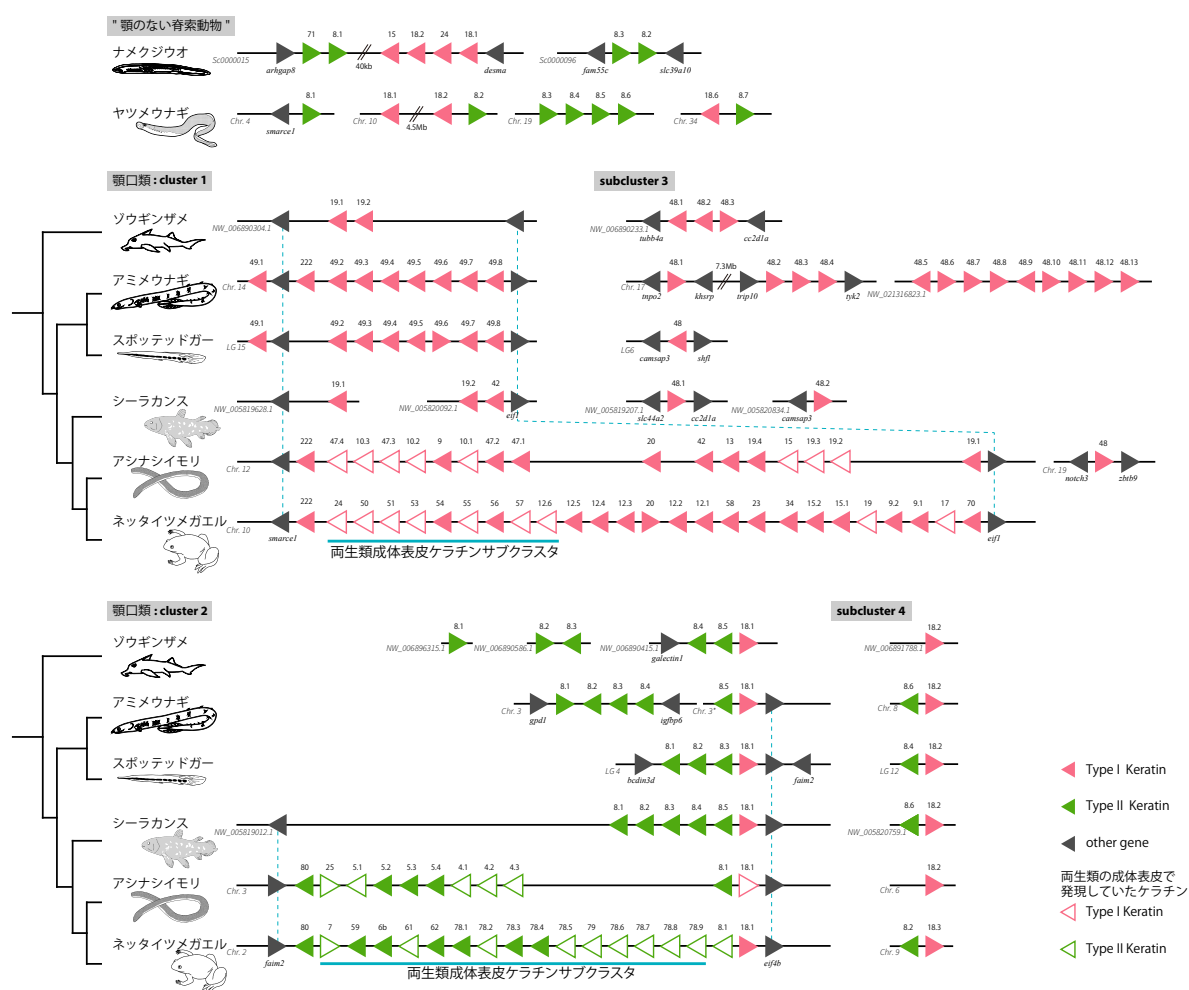


図 3.1: 非真骨魚類の硬骨魚類のゲノム上のケラチン遺伝子のシンテニー。ひとつながりの線は繋がった配列 (染色体、scaffolds) を示す。Type I ケラチン遺伝子、Type II ケラチン遺伝子、非ケラチン遺伝子についてはそれぞれ桃色、緑色、灰色で示した。各配列の左下に染色体番号等を記した。両生類の成体表皮で発現するケラチン遺伝子については白抜きで示した。三角形は転写の方向を表し、上の番号は図 3.2 の遺伝子名と対応する。先行研究 (Suzuki et al., 2017) に基づき両生類成体表皮で主に発現するケラチン遺伝子サブクラスタを図中に示した。水色の点線はクラスタ両端の非ケラチン遺伝子の対応を表す。Kimura and Nikaido (2021) より引用・改変。

た。加えて、水陸両生魚であるアミメウナギでは四肢動物とは独立に遺伝子重複・多様化が起きていることが明らかになっている (図 3.1, 3.2)(Kimura and Nikaido, 2021)。

ケラチン遺伝子とその種の生息環境 (陸上や水中) に関連があることが指摘されている。例えば、カエルにおいて成体の表皮のみで発現するケラチン遺伝子群が見つかった (Suzuki et al., 2017)。

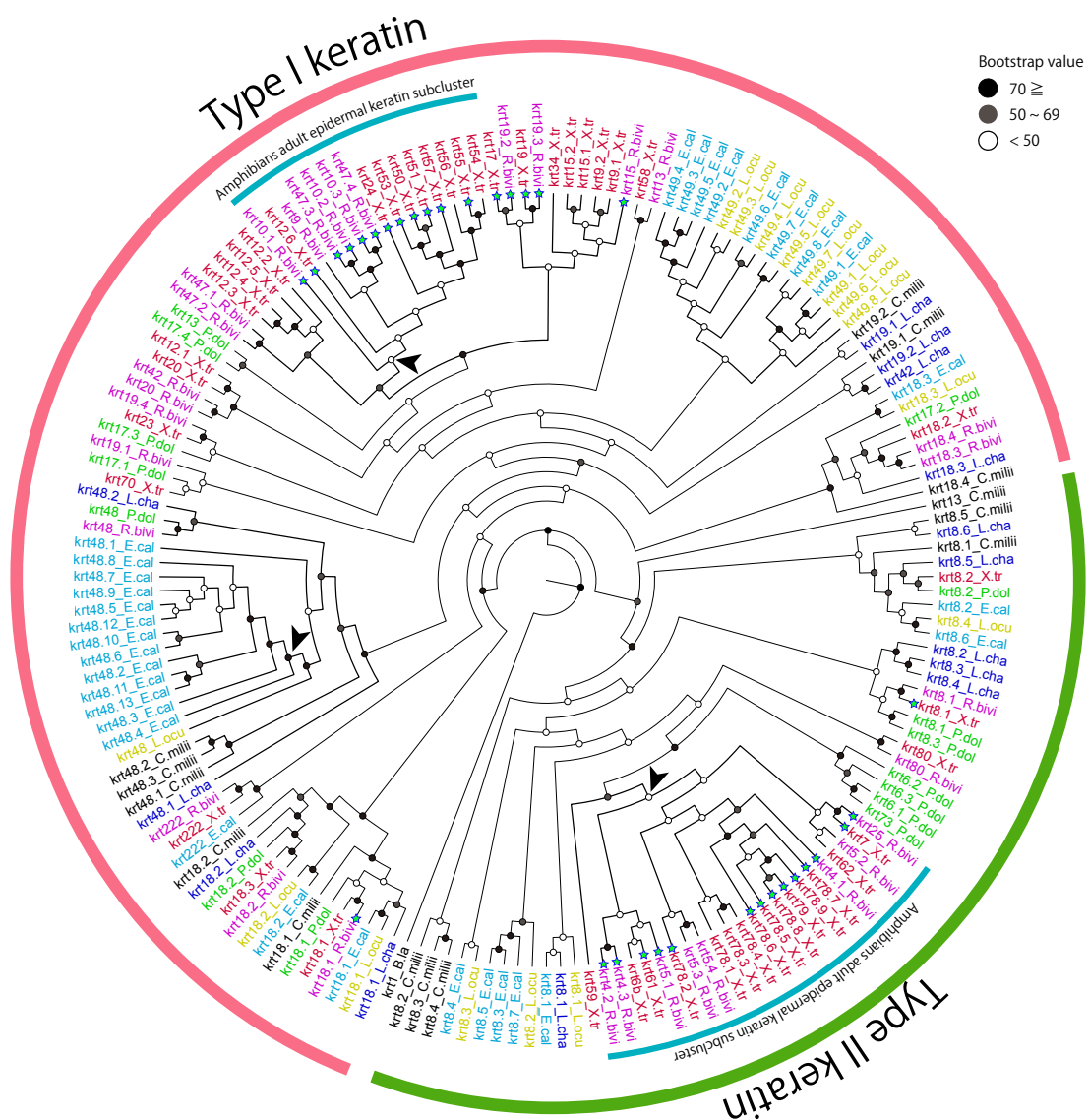


図 3.2: アミノ酸配列に基づいた Type I および Type II のケラチン遺伝子の系統樹。ナメクジウオの *krt1* をアウトグループとして描画した。節上の黒、灰、白の丸はそれぞれ Bootstrap 値が 70 以上、50-69、50 未満を示す。緑色の星は両生類の表皮で発現していたケラチン遺伝子である。ケラチン遺伝子番号は図 3.1 のものと対応する。ゾウギンザメ (C.milli, 黒色), アミメウナギ (E.cal, 水色), スポットテッドガー (L.locu, 黄色), シーラカンス (L.cha, 青色), ハイギョ (P.dol, 緑色), アシナシイモリ (R.bivi, 紫色), ネットアイツメガエル (X.tr, 赤色)。ただしハイギョの遺伝子は発現していた遺伝子に基づいている。矢じりはそのクレードで有意に純化選択の緩みが観測されたことを示す。Kimura and Nikaido (2021) より引用・改変。

また、陸から水へと生息環境を移す際に遺伝子数が減少することも知られている。アシカやクジラなどの祖先は陸に生息していたが、現生種は水中に生活の場を移している。これらのいくつかの海棲哺乳類のゲノムを解析したところ、陸上環境で表皮の乾燥を防ぐのに重要であるセラチン遺伝子のいくつか、系統独立的に失われていた (Ehrlich et al., 2019)。

ハイギョのセラチン遺伝子をゲノムレベルで調べることは脊椎動物の水中から陸上への適応を明らかにする上で重要ではあるが、近年までゲノム決定がされていなかった。発現遺伝子レベルでは調べられているものの、サンプリング時に発現していなかった遺伝子については配列を得られないという欠点があった (Schaffeld et al., 2005, 2007; Kimura and Nikaido, 2021)。ゲノム決定が遅かった要因にゲノムサイズが脊椎動物最大であることがあったが、近年、ロングリードシーケンサーによってアフリカハイギョとオーストラリアハイギョの二種のゲノムが決定された (Meyer et al., 2021; Wang et al., 2021)。

また、真骨魚類においては四肢動物とは独立に陸上に適応した系統が見られ、ハゼ科の陸棲ハゼ (トビハゼ、ムツゴロウの総称) がその 1 つにあたる。陸棲ハゼ内においても陸上適応が *Periophthalmus* 属 (トビハゼ) と *Boleophthalmus* 属 (ムツゴロウ) と、二回独立に生じている (Steppan et al., 2022)。トビハゼにおいては、表皮最外層において扁平な細胞が存在することが知られている (Park, 2002; Zhang et al., 2003)。この陸棲ハゼのセラチン遺伝子を調べることは、陸上適応とセラチン遺伝子の収斂進化を明らかにする上で有用である。本研究では、二種のハイギョと陸棲ハゼのゲノムからセラチン遺伝子の進化を明らかにする。ハイギョには四肢動物同様、2 つのセラチン遺伝子クラスタが存在したが、陸棲ハゼにはそれがなかった。これら 2 つの系統ではセラチン遺伝子において異なる陸上適応があったと考えられる。

3 材料と手法

3.1 ケラチン遺伝子配列とそのゲノム上での位置

本研究 (Kimura and Nikaido, 2023) 解析に用いるケラチン遺伝子の配列、ゲノム上における位置、遺伝子の方向については表 3.3 に示す登録配列・データベースから取得した。すべての配列は偽遺伝子かどうか目視で確認を行った。

アノテーションがないゲノムについては、BLASTN、exonerate のパイプラインソフトウェアである FATE (<https://github.com/Hikoyu/FATE>) を用いて、アフリカハイギョ、ネッタイツメガエルのケラチン遺伝子配列をクエリとしてオーストラリアハイギョ、*Proterorhinus semilunaris*、*Rhinogobius similis* のケラチン遺伝子配列の探索を行った。得られた配列はケラチン遺伝子配列であるかを smart BLAST を用いて検索を行い、また全く同じ配列の重複がないようにチェックを行った。

ケラチン遺伝子の名前については、系統解析に基づいてネッタイツメガエル、ゼブラフィッシュを基に命名した。本研究において新たに発見されたハイギョ特異的に重複が見られたケラチン遺伝子 (*krt44*, *krt100*) については、既存の遺伝子と重複がないように命名した。ケラチン遺伝子クラスタの定義については、四肢動物と同じく、*smarce1*, *eif1* (Cluster 1)、*faim2*, *eif4b* (Cluster 2) に挟まれた領域であるかどうかに基づいて決定した。サブクラスタ 3 については、Kimura and Nikaido (2021) におけるアミメウナギの系統解析に基づいて決定した。

表 3.3: 本研究において用いたゲノム一覧。

学名	和名	ゲノムアセンブリ	アノテーション
<i>Erpetoichthys calabaricus</i>	アミメウナギ	fErpCall.1	NCBI Annotation Release 100
<i>Danio rerio</i>	ゼブラフィッシュ	GRCz11	NCBI Annotation Release 106
<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	ムツゴロウ	BP.fa	NCBI Annotation Release 100
<i>Periophthalmus magnuspinnatus</i>	トビハゼ	fPerMag1.pri	NCBI Annotation Release 100
<i>Proterorhinus semilunaris</i>	-	GCA_021464625.1	-
<i>Rhinogobius similis</i>	-	GCA_019453435.1	-
<i>Latimeria chalumnae</i>	シーラカンス	LatChal	NCBI Annotation Release 101
<i>Neoceratodus forsteri</i>	オーストラリアハイギョ	GCA_016271365.1	-
<i>Protopterus annectens</i>	アフリカハイギョ	PAN1.0	NCBI Annotation Release 100
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	アシナシイモリ	aRhiBiv1.1	NCBI Annotation Release 100
<i>Xenopus tropicalis</i>	ネッタイツメガエル	UCB_Xtro_10.0	NCBI Annotation Release 104
<i>Homo sapiens</i>	ヒト	GRCh38.p14	GCF_000001405.40

3.2 分子系統解析

ハイギョを含む肉鰭類のケラチン遺伝子の系統樹を推定するために、ケラチン遺伝子すべてに加え、アウトグループとしてシーラカンスとオーストラリアハイギョの *vimentin* 遺伝子 (Type III 中間径フィラメント) を MAFFT online ver. 7.520 (Kato et al., 2019) を用いてデフォルトパラメータでアライメントした。系統樹は IQ-TREE ver. 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を使用し、JTT+F+R7 モデルを使用した。系統樹の信頼性の評価のために、ultrafast bootstrap 1,000 回と SH-aLRT テスト (Guindon et al., 2010) 1,000 回を実施した。このモデルは ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) によって決定された。ハゼ類を含む条鰭類のケラチン遺伝子の系統樹推定は、アミメウナギの *vimentin* 遺伝子をアウトグループとして、JTT+F+R5 モデルで上記と同様に実施した。

3.3 選択圧解析

ケラチン遺伝子配列における純化選択の緩みを検出・評価するために、いくつかのクレードについて d_N/d_S 解析を行った。ここにおける d_N とは非同義置換率を指し、 d_S は同義置換率を指す。まず、ケラチン遺伝子のアミノ酸配列を Type I と Type II に分けた上で MAFFT を用いてアライメントを行った。そしてこのアミノ酸配列のマルチプルアライメントに合わせて PAL2NAL (Suyama et al., 2006) でケラチン遺伝子の塩基配列をもとにコドンアライメントへと変換した。

次に、 d_N/d_S を branch model で推定するために PAML 4.9j (Yang, 2007) の codeML プログラムを使用した。今回解析を行ったクレードは、遺伝子重複が起き、遺伝子数が増えているクレードとした。解析には、3 つのコドン位置の平均ヌクレオチド頻度からコドン頻度を算出する CF2 モデルを用いた。各枝の d_N/d_S 比の上昇の統計的有意性を評価するために、すべての枝で d_N/d_S 比が変化しないと仮定した場合 (帰無仮説) と、特定の枝でのみ d_N/d_S 比が変化すると仮定した場合 (対立仮説) で、2 つのモデル間の尤度を比較し、尤度比検定を行った。

4 結果

4.1 ハイギョにおいて拡大したケラチン遺伝子クラスタ

既に述べた通り、陸上進出前の脊椎動物においてもケラチン遺伝子クラスタが見つかった (Kimura and Nikaido, 2021)。ハイギョについてはこれまで mRNA の発現データに基づいてケラチン遺伝子の同定がされてきたが、ゲノムが未決定であったため完全ではなかった (Schaffeld et al., 2005; Kimura and Nikaido, 2021)。本研究では近年決定されたオーストラリアハイギョ、アフリカハイギョ二種のゲノム (Meyer et al., 2021; Wang et al., 2021) を用いて、ケラチン遺伝子を同定した (図 3.3)。ハイギョのケラチン遺伝子クラスタも、四肢動物と同様に *smarce1*, *eif1* (Cluster1)、*faim2*, *eif4b* (Cluster 2) に挟まれた領域に存在していた (図 3.3)。例外として、オーストラリアハイギョの *krt44.5*、アフリカハイギョの *krt48.2* はクラスタと同じ染色体上にありながら、クラスタからは離れた場所に位置していた。

クラスター内のケラチン遺伝子間の距離は、ヒト（最大で 0.4 Mbp）よりもハイギョ（オーストラリアハイギョ：最大 1.4 Mbp、アフリカハイギョ：最大 2.3 Mbp）の方がはるかに長かった。ハイギョのケラチン遺伝子数は、同じ肉鰭類の魚類であるシーラカンスよりも多かった。ハイギョ二種におけるケラチン遺伝子の数は、オーストラリアハイギョ（22 個）よりもアフリカハイギョ（33 個）の方が多かった (図 3.3、図 3.4)。2 種のハイギョに共通する特徴は、*krt18* が重複してクラスター 2 の末尾に位置していることであった (図 3.3)。*krt48* 遺伝子はハイギョを含む軟骨魚類から無足類 (アシナシイモリ) まで保存されている (Kimura and Nikaido, 2021) が、*krt48* 遺伝子のシンテニクな関係はすべての種で保存されていなかった (図 3.3)。特に、アフリカハイギョの *krt48* 遺伝子の 1 つはクラスター 2 と同じ染色体上に位置しているが、この遺伝子はこのクラスターに近接しておらず、450 Mb 離れていた。

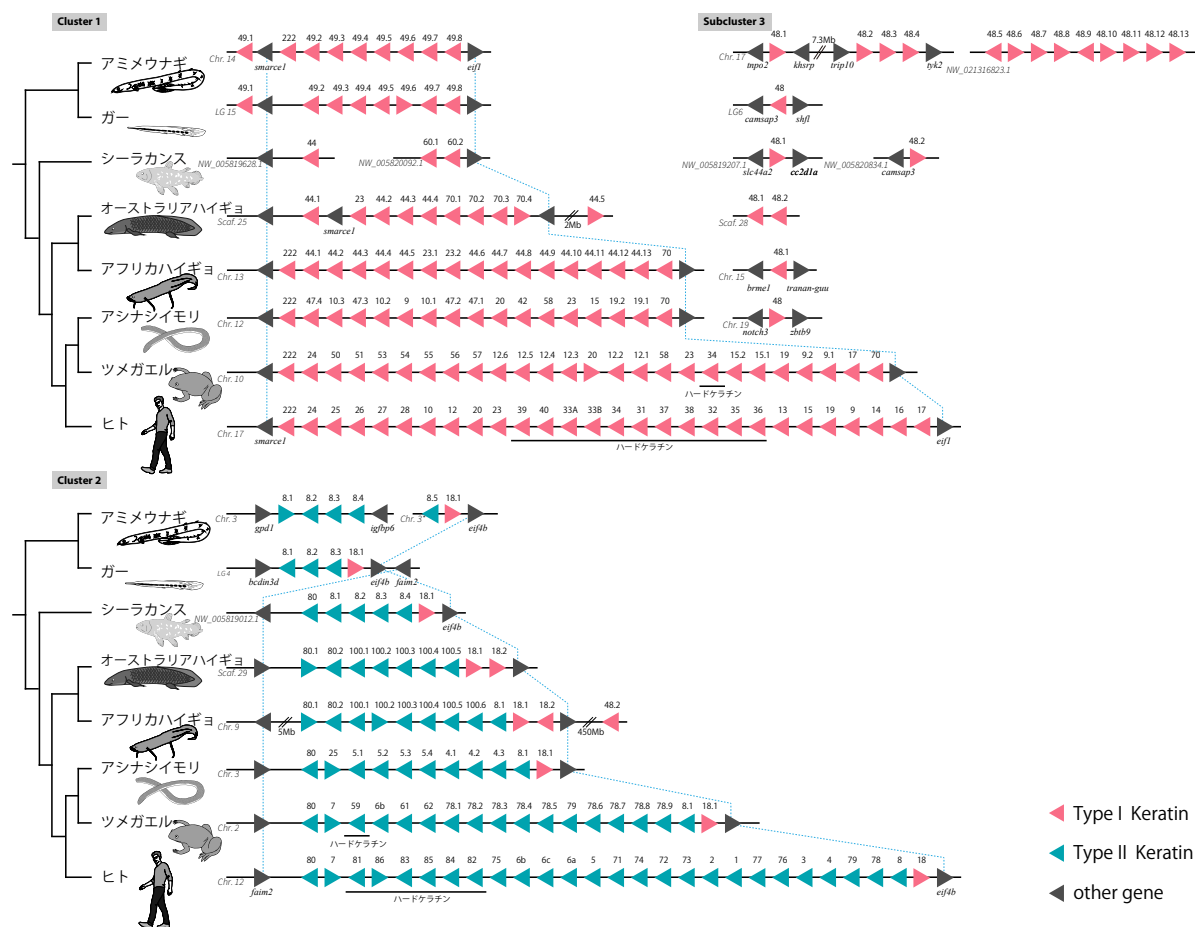


図 3.3: 硬骨魚類のゲノム上のケラチン遺伝子のシンテニー。ひとつながりの線は繋がった配列 (染色体、scaffolds) を示す。Type I ケラチン遺伝子、Type II ケラチン遺伝子、非ケラチン遺伝子についてはそれぞれ桃色、青緑色、灰色で示した。各配列の左下に染色体番号等を記した。ハードケラチンは先行研究に従った (Ehrlich et al., 2020)。三角形は転写の方向を表し、三角形の上の数字は遺伝子名に対応する。水色の点線はクラスタ両端の非ケラチン遺伝子の対応を表す。Kimura and Nikaido (2023) より引用・改変。

4.2 肉鰭類のケラチン遺伝子の系統関係

mRNA の配列に基づいて行われた研究では、ほとんどのハイギョケラチン遺伝子は単系統であることが示されている (Schaffeld et al., 2005)。しかし、この研究では mRNA に基づいているため、サンプリングした組織、時点で発現していない遺伝子については見落としている可能性があるため、全

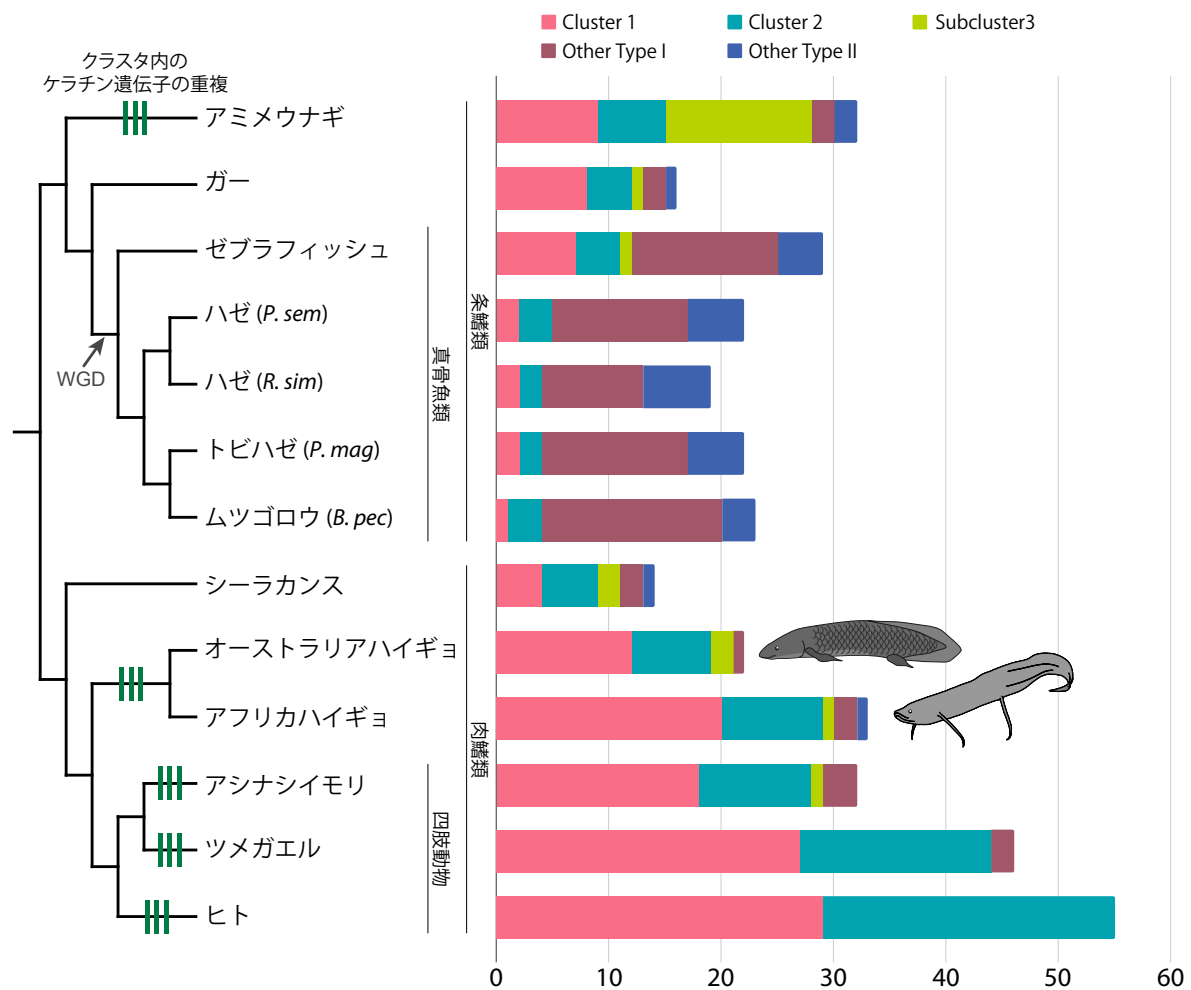


図 3.4: ケラチン遺伝子の数のまとめ。Cluster 1(ピンク)、Cluster 2(青緑)、Subcluster 3(黄緑)、その他 Type I ケラチン (小豆色)、その他 Type II ケラチン (青)。Cluster1 および 2 は四肢動物で保存されているクラスタ両脇の遺伝子に基づいて分類し、その 2 つに分類されないケラチン遺伝子は Subcluster 3 かその他ケラチンに分類される。Subcluster 3 については系統樹に基づいて決定した (*krt48* のクレード)。矢印で示した WGD は真骨魚類の全ゲノム重複が起きたタイミングを示している。ケラチン遺伝子の重複が起きたと推定されるタイミングを三本の緑の線で系統樹上に示した。Kimura and Nikaido (2023) より引用・改変。

ゲノムでの解析が必要であった。本研究ではシーラカンス、ハイギョ、四肢動物を含む肉鰭類の全ゲノムから同定されたケラチン遺伝子の系統樹を推定した (図 3.5)。*krt18*、*krt8* および *krt80* は、オーストラリアハイギョを除くすべての脊椎動物の間で保存されていた。実際、我々の相同性検索では

オーストラリアハイギョのゲノムに *krt8* は見つからなかったが、この遺伝子は現在までに調査されたすべての脊椎動物で見つかっており、*krt18* と逆向きの転写方向で隣接している (Zimek and Weber, 2005; Vandebergh and Bossuyt, 2012; Ehrlich et al., 2019; Kimura and Nikaido, 2021)。したがって、オーストラリアハイギョにだけ *krt8* が存在しないというのは進化的にありえないことであり、ゲノムアセンブリのエラーを示唆している。

我々は、ハイギョ特異的にケラチン遺伝子が高度に重複している 3 つのクレードを発見し、*krt44*、*krt70*、*krt100* と名付けた (図 3.5)。*krt44* クレードはアフリカハイギョのケラチン遺伝子 (アフリカハイギョでは 11 個、オーストラリアハイギョでは 4 個) が主であり、*krt70* クレードはオーストラリアハイギョのものが主である (図 3.5)。*krt100* クレードはアフリカハイギョでもオーストラリアハイギョでもほぼ同じ数のケラチン遺伝子から構成されている。

4.3 選択圧解析

d_N/d_S 比はタンパク質をコードする遺伝子にはたらく自然選択を調べるのに有用である。一般に、純化選択下にある機能タンパク質をコードする遺伝子の d_N/d_S 比は 1 未満である。非機能的遺伝子や緩やかな純化選択下にある遺伝子の d_N/d_S 比は 1 に向かって上昇する。 $d_N/d_S > 1$ は、遺伝子が正の選択下にあることを示す。

本研究では、ハイギョ類においてケラチン遺伝子が高度に重複している 3 つのクレード (*krt44*, *krt70*, *krt100*) について d_N/d_S を計算し (図 3.3、図 3.5)、これらの遺伝子が正の選択下にある可能性を検討した。選択解析を図 3.5 と表 3.4 にまとめた。バックグラウンドの d_N/d_S は 0.25–0.28 であり、ほとんどのケラチン遺伝子が純化選択下にあることが示唆された。*krt44* クレードの d_N/d_S (3.86) はバックグラウンドの d_N/d_S (0.28) より有意に高く、このクレードが正の選択下にあることを示唆している。*krt70* クレード (0.37) と *krt100* クレード (0.30) の d_N/d_S は、バックグラウンド (それぞれ 0.28 と 0.25) と有意差はなかった。

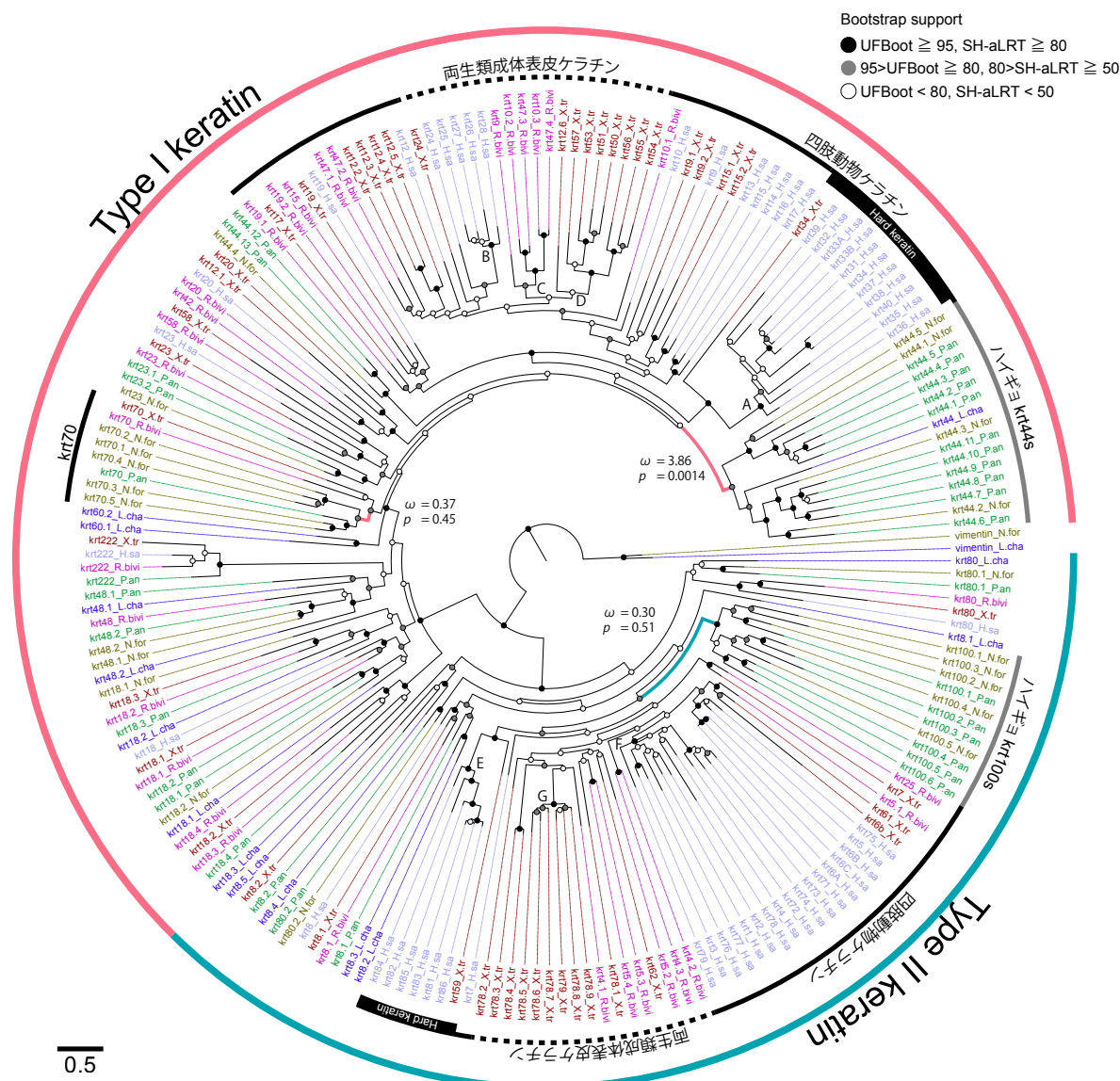


図 3.5: 肉鰐類ケラチン遺伝子のアミノ酸配列に基づいた系統樹。シーラカンス (*Latimeria chalumnae*, L.cha, 紺色)、オーストラリアハイギョ (*Neoceratodus forsteri*, N.for, 黄土色)、アフリカハイギョ (*Protopterus annectens*, P.an, 緑)、アシナシイモリ (*Rhinatrema bivittatum*, R.bivi, ピンク)、ツメガエル (*Xenopus tropicalis*, X.tr, 赤)、ヒト (*Homo sapiens*, H.sa, 薄紫) が含まれる。色がつけられている枝は選択圧解析が行われた枝である (表 3.4)。選択圧解析の結果 (d_N/d_S 値 (ω) と p 値) は枝の近くに示した。A-G は本文中で参照するノードを示している。各ノードの色は右上の凡例に示すようにブートストラップ値を示している。Kimura and Nikaido (2023) より引用・改変。

表 3.4: d_N/d_S 解析の結果と尤度比検定の結果。np: 自由パラメーターの数; P-value: 帰無仮説と対立仮説の両方に対する尤度比検定結果の帰無仮説の下での確率。

	np	lnL	p-value	d_N/d_S
Clade <i>krt44</i>				
帰無仮説	252	−142274.4661	0.001359	0.2767
対立仮説	253	−142269.3358		3.8629
Clade <i>krt70</i>				
帰無仮説	252	−142274.4661	0.452049	0.2767
対立仮説	253	−142274.1833		0.3699
Clade <i>krt100</i>				
帰無仮説	154	−91932.32944	0.51355	0.2486
対立仮説	155	−91932.11602		0.3007

4.4 ハゼと陸棲ハゼのケラチン遺伝子の系統関係

ハイギョ類に加えて、陸上適応が肉鰭類とは独立に起こった陸棲ハゼに注目した。水棲のハゼ (Gobiidae) と陸棲のハゼ (Oxudercidae) の各 2 種のケラチン遺伝子の系統樹を作成した (図 3.6)。アミメウナギとゼブラフィッシュのケラチン遺伝子を解析に加えたのは、ハゼにおける遺伝子重複のオーソロジーと時期を明らかにするためである。*krt18*、*krt8* および *krt222* のクレードでは、解析したほとんどの種でオルソログが同定された。特に、*krt18.1.E.cal* (A) と *krt18.3.E.cal* (B) にオルソログを持つケラチン遺伝子は、ほとんどの条鰭類の間で保存されていた (図 3.6)。アミメウナギの *krt49* を含むクレードではケラチン遺伝子は高度に多様化していたが、ハゼや陸棲ハゼでは高度な重複は観察されなかった。

5 考察

5.1 ハイギョ特異的に重複したケラチン遺伝子

本研究では、ハイギョおよび陸上四肢動物の全ゲノム配列からケラチン遺伝子を同定した。また、ハイギョのケラチン遺伝子のシンテニーを明らかにし、その系統関係を示した（図 3.3、図 3.5）。その結果、ハイギョのケラチン遺伝子は四肢動物の主要なクラスタであるクラスタ 1 とクラスタ 2 内において高度に重複していることがわかった（図 3.3）。しかし、ハイギョのこれらの重複遺伝子は四肢動物のクラスタ内の遺伝子とオーソログではなかった（図 3.5）。これらの結果は、ケラチン遺伝子がハイギョと四肢動物で独立に重複・多様化したことを示唆している。アフリカハイギョでは、乾眠中の表皮に扁平な細胞が出現することから、ハイギョの扁平細胞と四肢動物のケラチノサイトの類似性が示唆されている (Smith and Coates, 1937; Sturla et al., 2002; Heimroth et al., 2018, 2021)。ハイギョゲノム内で重複し、多様化したケラチン遺伝子は、おそらく乾燥から身を守るために発現しているのではないかと考えられる。同様に、トビハゼの表皮にも扁平化した細胞が観察される。表皮における扁平化した細胞は、ハイギョではほとんどが単層であるが (Heimroth et al., 2018, 2021)、トビハゼでは 1 層から 5 層である (Park, 2002)。ハイギョの表皮は乾眠中に繭に覆われるため、繭を持たないトビハゼよりも扁平細胞の保湿への寄与は小さいと予測される。これらの扁平細胞で発現するケラチン遺伝子を同定することは、皮膚の乾燥を防ぐ機能的役割を解明する上で重要であると考えられる。

「両生類成体表皮ケラチン (amphibian adult epidermal keratin)」と名付けられたケラチン遺伝子は、両生類の成体の表皮で発現し、ゲノム中にサブクラスターを形成することが知られている (Suzuki et al., 2017)。これらのケラチン遺伝子は、陸上環境に適応するために機能が多様化したと提唱されている (Kimura and Nikaido, 2021)。系統解析の結果、ハイギョにおいて重複していたケラチン遺伝子 *krt44* は、両生類の成体表皮ケラチン遺伝子とは独立して重複・多様化したか、それらは共通して

クラスタ 1 に位置していることが明らかになった (図 3.3、図 3.5)。ケラチン遺伝子の重複は、ヒトのクレード A、B、E、F、アシナシイモリの C、ツメガエルの D、G でそれぞれ独立して観察された (図 3.5)。これらの発見は、クラスタにおけるケラチン遺伝子の重複と多様化は、脊椎動物が陸上環境に適応する過程で繰り返し独立に起こったことを示唆している (図 3.4)。

先行研究の解析から、陸上環境で生存可能なアミメウナギや両生類のケラチン遺伝子のいくつかのクレードでは、純化選択が緩んでいることが示唆された (図 3.2) (Kimura and Nikaido, 2021)。本研究では、ハイギョの *krt44* クレードが正の選択を受けているように見えることから (図 3.5)、重複したケラチン遺伝子が進化の過程で新しい機能や発現パターンを獲得したことが示唆される (Zhang, 2003)。ケラチン遺伝子の重複と多様化が両生類や四肢動物で繰り返し起こっていることを考えると、ケラチン遺伝子の拡大が陸上適応と関連しているのは十分にあり得ることである。

また、ハイギョではクラスタ内のケラチン遺伝子間の距離が他の種に比べて著しく伸びていた。遺伝子間領域にトランスポゾンが蓄積したことが、遺伝子間の距離を生み出していると考えられる。実際、ハイギョのゲノムは他の脊椎動物に比べて非常に大きく、トランスポゾンの蓄積が寄与していると示されている (Meyer et al., 2021; Wang et al., 2021)。ハイギョではケラチン遺伝子クラスタが大幅に間延びしているにもかかわらず、その構造自体はほとんど保存されていた (図 3.3)。

我々の以前の研究で、哺乳類と両生類の成体の表皮に発現するケラチンにはシステイン残基 (Cys401) が保存されていることが明らかになっている (Kimura and Nikaido, 2021)。Cys401 はハイギョと陸棲ハゼのケラチン配列のいずれにも保存されていない。Cys401 は両生類とその後の四肢動物で獲得されたと考えられる。

5.2 ハゼにおける陸上適応とケラチン遺伝子の関連性

水棲と陸棲のハゼに着目してケラチン遺伝子の系統関係を解明した (図 3.6)。これは真骨魚類において四肢動物とは独立に生じた陸上適応と、ケラチン遺伝子の関連性を示したものである。この解析

に用いた 2 匹の陸棲ハゼ、*B. pectinirostris* と *P. magnuspinnatus* は、それぞれ独立して陸上に適応したと言われている (Steppan et al., 2022)。いくつかの遺伝子（例えば krt49.6_B.pec や krt49.7_B.pec）は種特異的な重複を示すが、陸棲ハゼでのみ起きた顕著な重複は見られなかった。実際、陸棲ハゼのケラチン遺伝子の総数はゼブラフィッシュよりも少なく（図 3.4）、ハゼにおいて陸上適応とケラチン遺伝子の重複との間に明らかな関連はないことが示唆された。また、メダカやフグのケラチン遺伝子数はゼブラフィッシュよりも少なく (Vandebergh and Bossuyt, 2012; Kimura and Nikaido, 2021)、種特異的な遺伝子重複によって、これまで解析された真骨魚類の中でゼブラフィッシュのみケラチン遺伝子数が増加したことが示唆された（図 3.6）。加えて、魚類の主要なケラチン遺伝子（図 3.4 では Other Type I、II）は四肢動物とは異なり、主要なクラスタである Cluster1 と 2 内には少なかった。これについて、先行研究では、全ゲノム重複とそれに続く染色体再構成が真骨魚類の共通祖先で起こり、それに伴いケラチンクラスタが分散した可能性が議論されている (Zimek and Weber, 2005; Kimura and Nikaido, 2021)。真骨魚類のケラチン遺伝子の数は非真骨魚類（例えばガー）と比べて多く、しかもその数は進化を通じて安定しているという特徴がある。このようなコピー数の保存は、ケラチン遺伝子が四肢動物やその近縁種とは対照的に、生存のために厳しい純化選択を受けていたことを示唆している。

6 結論

我々の一連の研究 (Kimura and Nikaido, 2021, 2023) において、四肢動物、ハイギョ、ポリプテルス (アミメウナギ) ではケラチン遺伝子の顕著な重複を明らかにしたが、真骨魚類のハゼ類では見られなかった。従って、陸上適応とケラチン遺伝子の重複との関連は、四肢動物やハイギョのような肉鰭類やポリプテルス・アミメウナギのような早くに分岐した条鰭類には当てはまるが、ハゼのような真骨魚類には当てはまらないことが考えられる。これらの結果は、脊椎動物の表皮における陸上適応戦略は系統によって異なることを示唆している。さらに幅広い種でのゲノム解析を進めることで、陸上適応における表皮のバリア機構の進化に関する重要な知見が得られると考えている。

総論

本研究では魚類から両生類にかけて起こった陸上適応に焦点を当てた。水陸両生魚であるポリプテルスを陸上飼育し、形態観察や生理学的データの収集、RNA-seq 解析から陸上環境における様々な変化を発見した。第 I 部ではポリプテルスのエラに動纖毛が存在することを明らかにし、それが陸上・高二酸化炭素環境において可塑的に消失することを明らかにした。またこの纖毛は動纖毛でありエラの表面に水流を作り出していることが明らかになった。RNA-seq 解析で纖毛に関連した遺伝子発現量が陸上環境で減少していることに着目し、纖毛の運動性以外の機能に着目したが、化学受容や免疫等に関与している可能性は低いと結論づけた。この纖毛の消失は陸上では水がなく機能しなくなるためにエネルギーの節約といった点において適応的であると考えられる。第 II 部では陸上環境での生存に直結する生理学的な面に着目した。浸透圧やアンモニアなどの生存において重要な要素は陸上環境でも維持されており、またそれを維持するための遺伝子発現の変化を明らかにした。特に腎臓において ENaC の発現量が増加しており、Na を再吸収することで浸透圧の維持というエラの機能を補償していると考えられる。アンモニアをグルタミンに変換するグルタミン合成酵素の遺伝子重複や、尿素へ変換するアルギナーゼの発現量増加が見られ、アンモニアから尿素への代謝を促進していることが示唆された。加えてアンモニアトランスポータの発現量が増加していたことから、アンモニアの排泄量も増やすことで陸上環境下でも体内のアンモニア濃度を維持している可能性が示唆された。第 III 部では、比較ゲノムを通じてポリプテルス類やハイギョにおいてケラチン遺伝子が大きく重複していることを発見した。我々哺乳類のケラチンとは独立に重複をしたものであることが明らかになったが、ケラチン遺伝子は保湿など皮膚のバリア機構に関連している可能性がある。

脊椎動物の進化史の中で陸上への進出は一大イベントであった。ただしその適応の生理・遺伝的な基盤については化石記録から明らかにできない。これまでにポリプテルスを使用して陸上環境での形態的な変化を研究した例はあるが、生理・遺伝的な変化を明らかにした研究は本研究が初めてとな

る。特に陸上で使えなくなるエラの生理的な機能 (浸透圧の維持やアンモニア排泄) は陸上へ適応する上で別の器官で補わなければならない。本研究では陸上環境においてエラの恒常性維持のための機能が主に腎臓で補償されることを明らかにした。しかし、体内の様々な恒常性を維持するためには、表皮のバリア機構の形成やホルモンによる制御など、数多くの重要な課題が残されている。こうした課題について、ポリプテルスやハイギョといった水陸両生魚を陸上環境で飼育し、その変化をひとつひとつ明らかにしていくことで、脊椎動物の陸上適応への理解をより深められるであろう。

参考文献

- Aamar, E. and Dawid, I. B. (2008). Isolation and expression analysis of *foxj1* and *foxj1.2* in zebrafish embryos. *Int. J. Dev. Biol.*, 52(7):985–991.
- Ahmad, R. and Dalziel, J. E. (2020). G Protein-Coupled receptors in taste physiology and pharmacology. *Front. Pharmacol.*, 11:587664.
- Alibardi, L. (2001). Keratinization in the epidermis of amphibians and the lungfish: comparison with amniote keratinization. *Tissue Cell*, 33(5):439–449.
- Alibardi, L. (2022). Vertebrate keratinization evolved into cornification mainly due to transglutaminase and sulfhydryl oxidase activities on epidermal proteins: An immunohistochemical survey. *Anat. Rec.*, 305(2):333–358.
- Alibardi, L. and Joss, J. M. P. (2003). Keratinization of the epidermis of the australian lungfish *neoceratodus forsteri* (dipnoi). *J. Morphol.*, 256(1):13–22.
- Alt, J. M., Stolte, H., Eisenbach, G. M., and Walvig, F. (1981). Renal electrolyte and fluid excretion in the atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. *J. Exp. Biol.*, 91(1):323–330.
- Anderson, P. M. (1995). 3 urea cycle in fish: Molecular and mitochondrial studies. In Wood, C. M. and Shuttleworth, T. J., editors, *Fish Physiology*, volume 14, pages 57–83. Academic Press.
- Anderson, P. M. (2001). Urea and glutamine synthesis: Environmental influences on nitrogen excretion. In *Fish Physiology*, volume 20, pages 239–277. Academic Press.
- Baatrup, E. (1983). Terminal buds in the branchial tube of the brook lamprey (*Lampetra planeri* (bloch))-putative respiratory monitors. *Acta Zool.*, 64(2-3):139–147.
- Babiker, M. M. (1984). Development of dependence on aerial respiration in *Polypterus senegalus* (cuvier). *Hydrobiologia*, 110(1):351–363.
- Banerjee, B., Koner, D., Bhuyan, G., and Saha, N. (2018). Differential expression of multiple glutamine synthetase genes in air-breathing magur catfish, *clarias magur* and their induction under hyperammonia stress. *Gene*, 671:85–95.
- Barreiro-Iglesias, A., Villar-Cerviño, V., Villar-Cheda, B., Anadón, R., and Rodicio, M. C. (2008). Neurochemical characterization of sea lamprey taste buds and afferent gustatory fibers: presence of serotonin, calretinin, and CGRP immunoreactivity in taste bud bi-ciliated cells of the earliest vertebrates. *J. Comp. Neurol.*, 511(4):438–453.
- Bayley, M., Damsgaard, C., Thomsen, M., Malte, H., and Wang, T. (2019). Learning to Air-Breathe:

- The first steps. *Physiology*, 34(1):14–29.
- Beyenbach, K. W. (2004). Kidneys sans glomeruli. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 286(5):F811–27.
- Bi, X., Wang, K., Yang, L., Pan, H., Jiang, H., Wei, Q., Fang, M., Yu, H., Zhu, C., Cai, Y., He, Y., Gan, X., Zeng, H., Yu, D., Zhu, Y., Jiang, H., Qiu, Q., Yang, H., Zhang, Y. E., Wang, W., Zhu, M., He, S., and Zhang, G. (2021). Tracing the genetic footprints of vertebrate landing in non-teleost ray-finned fishes. *Cell*, 184(5):1377–1391.e14.
- Braun, E. J. and Dantzler, W. H. (2011). *Vertebrate Renal System*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Brauner, C. J. and Rombough, P. J. (2012). Ontogeny and paleophysiology of the gill: new insights from larval and air-breathing fish. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 184(3):293–300.
- Bullard, S. A., Frasca, Jr, S., and Benz, G. W. (2001). Gill lesions associated with *Erpocotyle tiburonis* (monogenea: Hexabothriidae) on wild and aquarium-held bonnethead sharks (*Sphyrna tiburo*). *J. Parasitol.*, 87(5):972–977.
- Büsst, C. J. (2013). Blood pressure regulation via the epithelial sodium channel: from gene to kidney and beyond. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 40(8):495–503.
- Campbell, J. W. and Anderson, P. M. (1991). Chapter 3 - evolution of mitochondrial enzyme systems in fish: the mitochondrial synthesis of glutamine and citrulline. In Hochachka, P. W. and Mommsen, T. P., editors, *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, volume 1, pages 43–75. Elsevier.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17):i884–i890.
- Chevront, S. N., Kenefick, R. W., Heavens, K. R., and Spitz, M. G. (2014). A comparison of whole blood and plasma osmolality and osmolarity. *J. Clin. Lab. Anal.*, 28(5):368–373.
- Choksi, S. P., Lauter, G., Swoboda, P., and Roy, S. (2014). Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development*, 141(7):1427–1441.
- Clack, J. A. (2012). *Gaining Ground, Second Edition: The Origin and Evolution of Tetrapods*. Life of the Past. Indiana University Press, Bloomington, MN, 2 edition.
- Clausen, M. V., Hilbers, F., and Poulsen, H. (2017). The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front. Physiol.*, 8:371.
- Coates, M. I. and Clack, J. A. (1991). Fish-like gills and breathing in the earliest known tetrapod. *Nature*, 352(6332):234–236.
- Cupello, C., Hirasawa, T., Tatsumi, N., Yabumoto, Y., Gueriau, P., Isogai, S., Matsumoto, R., Saruwatari,

- T., King, A., Hoshino, M., Uesugi, K., Okabe, M., and Brito, P. M. (2022). Lung evolution in vertebrates and the water-to-land transition. *eLife*, 11(e77156):e77156.
- Damsgaard, C., Baliga, V. B., Bates, E., Burggren, W., McKenzie, D. J., Taylor, E., and Wright, P. A. (2020). Evolutionary and cardio-respiratory physiology of air-breathing and amphibious fishes. *Acta Physiol.*, 228(3):e13406.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1):15–21.
- Donald, J. A., Forgan, L. G., and Cameron, M. S. (2015). The evolution of nitric oxide signalling in vertebrate blood vessels. *J. Comp. Physiol. B*, 185(2):153–171.
- Ehrlich, F., Fischer, H., Langbein, L., Praetzel-Wunder, S., Ebner, B., Figlak, K., Weissenbacher, A., Sipos, W., Tschachler, E., and Eckhart, L. (2019). Differential evolution of the epidermal keratin cytoskeleton in terrestrial and aquatic mammals. *Mol. Biol. Evol.*, 36(2):328–340.
- Ehrlich, F., Lachner, J., Hermann, M., Tschachler, E., and Eckhart, L. (2020). Convergent evolution of Cysteine-Rich keratins in hard skin appendages of terrestrial vertebrates. *Mol. Biol. Evol.*, 37(4):982–993.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., and Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, 85(1):97–177.
- Freund, J. R., Mansfield, C. J., Doghramji, L. J., Adappa, N. D., Palmer, J. N., Kennedy, D. W., Reed, D. R., Jiang, P., and Lee, R. J. (2018). Activation of airway epithelial bitter taste receptors by pseudomonas aeruginosa quinolones modulates calcium, cyclic-AMP, and nitric oxide signaling. *J. Biol. Chem.*, 293(25):9824–9840.
- Gasser, K. W. and Miller, B. T. (1986). Osmoregulation of larval blotched tiger salamanders, *ambystoma tigrinum melanostictum*, in saline environments. *Physiol. Zool.*, 59(6):643–648.
- Gaumet, F., Boeuf, G., Severe, A., Le Roux, A., and Mayer-Gostan, N. (1995). Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. *J. Fish Biol.*, 47(5):865–876.
- Graham, J. B., Wegner, N. C., Miller, L. A., Jew, C. J., Lai, N. C., Berquist, R. M., Frank, L. R., and Long, J. A. (2014). Spiracular air breathing in polypterid fishes and its implications for aerial respiration in stem tetrapods. *Nat. Commun.*, 5:3022.
- Griffith, R. W., Umminger, B. L., Grant, B. F., Pang, P. K., and Pickford, G. E. (1974). Serum composition of the coelacanth, *latimeria chalumnae* smith. *J. Exp. Zool.*, 187(1):87–102.

- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.*, 59(3):307–321.
- Hanukoglu, I. and Hanukoglu, A. (2016). Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*, 579(2):95–132.
- Hardie, D. C. and Hebert, P. D. N. (2003). The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes. *Genome*, 46(4):683–706.
- Harris, A. N., Skankar, M., Melanmed, M., and Batlle, D. (2023). An update on kidney ammonium transport along the nephron. *Adv Kidney Dis Health*, 30(2):189–196.
- Hasegawa, T., Tani, H., Suzuki, M., and Tanaka, S. (2003). Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin-dependent water-channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3. *Endocrinology*, 144(9):4087–4096.
- Heimroth, R. D., Casadei, E., Benedicenti, O., Amemiya, C. T., Muñoz, P., and Salinas, I. (2021). The lungfish cocoon is a living tissue with antimicrobial functions. *Sci Adv*, 7(47):eabj0829.
- Heimroth, R. D., Casadei, E., and Salinas, I. (2018). Effects of experimental terrestrialization on the skin mucus proteome of african lungfish (protopterus dolloi). *Front. Immunol.*, 9:1259.
- Helfenrath, K., Sauer, M., Kamga, M., Wisniewsky, M., Burmester, T., and Fabrizius, A. (2021). The more, the merrier? multiple myoglobin genes in fish species, especially in gray bichir (polypterus senegalus) and reedfish (erpetoichthys calabaricus). *Genome Biol. Evol.*, 13(7).
- Hellman, N. E., Liu, Y., Merkel, E., Austin, C., Le Corre, S., Beier, D. R., Sun, Z., Sharma, N., Yoder, B. K., and Drummond, I. A. (2010). The zebrafish *foxj1a* transcription factor regulates cilia function in response to injury and epithelial stretch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(43):18499–18504.
- Hwang, P.-P., Lee, T.-H., and Lin, L.-Y. (2011). Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 301(1):R28–47.
- Hyodo, S., Tsukada, T., and Takei, Y. (2004). Neurohypophysial hormones of dogfish, triakis scyllium: structures and salinity-dependent secretion. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 138(2):97–104.
- Ichikawa, R. and Toyozumi, R. (2020). Finely tuned ciliary alignment and coordinated beating generate continuous water flow across the external gills in *Pleurodeles waltl* larvae. *Zoomorphology*, 139(2):247–262.
- Inoda, T. and Morisawa, M. (1987). Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in xenopus laevis. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, 88(3):539–542.

- Jacob, J. T., Coulombe, P. A., Kwan, R., and Omary, M. B. (2018). Types I and II keratin intermediate filaments. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 10(4).
- Janech, M. G., Fitzgibbon, W. R., Ploth, D. W., Lacy, E. R., and Miller, D. H. (2006). Effect of low environmental salinity on plasma composition and renal function of the atlantic stingray, a euryhaline elasmobranch. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 291(4):F770–80.
- Jones, S. R. and Woo, P. T. (1991). Culture characteristics of trypanosoma catostomi and trypanosoma phaleri from north american freshwater fishes. *Parasitology*, 103 Pt 2:237–243.
- Kaiya, H., Konno, N., Kangawa, K., Uchiyama, M., and Miyazato, M. (2014). Identification, tissue distribution and functional characterization of the ghrelin receptor in west african lungfish, protopterus annectens. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 209:106–117.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., and Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*, 14(6):587–589.
- Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.*, 20(4):1160–1166.
- Kellenberger, S. and Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.*, 82(3):735–767.
- Kemp, A. (1996). Role of epidermal cilia in development of the australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* (osteichthyes: Dipnoi). *J. Morphol.*, 228(2):203–221.
- Kimura, Y., Nakamuta, N., and Nikaido, M. (2023). Plastic loss of motile cilia in the gills of polypterus in response to high CO₂ or terrestrial environments. *Ecol. Evol.*, 13(4):e9964.
- Kimura, Y. and Nikaido, M. (2021). Conserved keratin gene clusters in ancient fish: An evolutionary seed for terrestrial adaptation. *Genomics*, 113(1 Pt 2):1120–1128.
- Kimura, Y. and Nikaido, M. (2023). Unveiling the expansion of keratin genes in lungfishes: a possible link to terrestrial adaptation. *Genes Genet. Syst.*, 98(5):249–257.
- Koc, N. D. (2006). The comparative research of kidneys of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum 1792) and rat (*Rattus norvegicus*, berkenhout 1769) in morphometric and histologic manner. *Pak. J. Biol. Sci.*, 9(3):445–447.
- Koeppen, B. M. (2009). The kidney and acid-base regulation. *Adv. Physiol. Educ.*, 33(4):275–281.
- Konno, N., Hyodo, S., Yamada, T., Matsuda, K., and Uchiyama, M. (2007). Immunolocalization and mRNA expression of the epithelial Na⁺ channel α -subunit in the kidney and urinary bladder of the marine toad, *Bufo marinus*, under hyperosmotic conditions. *Cell Tissue Res.*, 328(3):583–594.

- Lee, R. J., Xiong, G., Kofonow, J. M., Chen, B., Lysenko, A., Jiang, P., Abraham, V., Doghramji, L., Adappa, N. D., Palmer, J. N., Kennedy, D. W., Beauchamp, G. K., Doulias, P.-T., Ischiropoulos, H., Kreindler, J. L., Reed, D. R., and Cohen, N. A. (2012). T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J. Clin. Invest.*, 122(11):4145–4159.
- Leguen, I. (2018). Gills of the medaka (*Oryzias latipes*): A scanning electron microscopy study. *J. Morphol.*, 279(1):97–108.
- Li, D., Shirakami, G., Zhan, X., and Johns, R. A. (2000). Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 23(2):175–181.
- Li, Z., Wang, L., Ren, Y., Huang, Y., Liu, W., Lv, Z., Qian, L., Yu, Y., and Xiong, Y. (2022). Arginase: shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases. *Cell Death Discov*, 8(1):413.
- Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014). featurecounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7):923–930.
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E. J., Shi, Z., and Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.*, 47(W1):W199–W205.
- Logan, A. G., Morris, R., and Rankin, J. C. (1980). A micropuncture study of kidney function in the river lamprey lampetra fluviatilis adapted to sea water. *J. Exp. Biol.*, 88:239–247.
- Loong, A. M., Hiong, K. C., Lee, S. M. L., Wong, W. P., Chew, S. F., and Ip, Y. K. (2005). Ornithine-urea cycle and urea synthesis in african lungfishes, *Protopterus aethiopicus* and *Protopterus annectens*, exposed to terrestrial conditions for six days. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, 303(5):354–365.
- Low, W. P., Lane, D. J. W., and Ip, Y. K. (1988). A comparative study of terrestrial adaptations of the gills in three mudskippers: *Periophthalmus chrysospilos*, *Boleophthalmus boddarti*, and *Periophthalmodon schlosseri*. *Biol. Bull.*, 175(3):434–438.
- Lutz, P. L. (1975). Osmotic and ionic composition of the polypteroid *erpetoichthys calabaricus*. *Copeia*, 1975(1):119–123.
- Magid, A. M. (1966). Breathing and function of the spiracles in *Polypterus senegalus*. *Anim. Behav.*, 14(4):530–533.
- Magid, A. M. A. (1967). Respiration of air by the primitive fish *polypterus senegalus*. *Nature*, 215(5105):1096–1097.
- Maina, J. N. (2018). Functional morphology of the respiratory organs of the air-breathing fish with

- particular emphasis on the african catfishes, *Clarias mossambicus* and *C. gariepinus*. *Acta Histochem.*, 120(7):613–622.
- Marshall, W. S. (2002). Na(+), cl(-), ca(2+) and zn(2+) transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *J. Exp. Zool.*, 293(3):264–283.
- Matsche, M. A., Arnold, J., Jenkins, E., Townsend, H., and Rosemary, K. (2014). Determination of hematology and plasma chemistry reference intervals for 3 populations of captive atlantic sturgeon (*acipenser oxyrinchus oxyrinchus*). *Vet. Clin. Pathol.*, 43(3):387–396.
- McCormick, J. A., Bhalla, V., Pao, A. C., and Pearce, D. (2005). SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. *Physiology*, 20:134–139.
- McDONALD, D. G. and Wood, C. M. (1981). Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental ph. *J. Exp. Biol.*, 93(1):101–118.
- Messerli, M., Aaldijk, D., Haberthür, D., Röss, H., García-Poyatos, C., Sande-Melón, M., Khoma, O.-Z., Wieland, F. A. M., Fark, S., and Djonov, V. (2020). Adaptation mechanism of the adult zebrafish respiratory organ to endurance training. *PLoS One*, 15(2):e0228333.
- Meyer, A., Schloissnig, S., Franchini, P., Du, K., Woltering, J. M., Irisarri, I., Wong, W. Y., Nowoshilow, S., Kneitz, S., Kawaguchi, A., Fabrizius, A., Xiong, P., Dechaud, C., Spaink, H. P., Volff, J.-N., Simakov, O., Burmester, T., Tanaka, E. M., and Scharl, M. (2021). Giant lungfish genome elucidates the conquest of land by vertebrates. *Nature*, 590(7845):284–289.
- Mukherjee, I., Roy, S., and Chakrabarti, S. (2019). Identification of important effector proteins in the FOXJ1 transcriptional network associated with ciliogenesis and ciliary function. *Front. Genet.*, 10:23.
- Mullen, T. L. and Alvarado, R. H. (1976). Osmotic and ionic regulation in amphibians. *Physiol. Zool.*, 49(1):11–23.
- Murray, B. W., Busby, E. R., Mommsen, T. P., and Wright, P. A. (2003). Evolution of glutamine synthetase in vertebrates: multiple glutamine synthetase genes expressed in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, 206(Pt 9):1511–1521.
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 32(1):268–274.
- Ong, K. J., Stevens, E. D., and Wright, P. A. (2007). Gill morphology of the mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*) is plastic and changes in response to terrestrial air exposure. *J. Exp. Biol.*, 210(Pt 7):1109–1115.

- Ord, T. J. and Cooke, G. M. (2016). Repeated evolution of amphibious behavior in fish and its implications for the colonization of novel environments. *Evolution*, 70(8):1747–1759.
- Park, J. Y. (2002). Structure of the skin of an air-breathing mudskipper, *perioththalmus magnuspinnatus*. *J. Fish Biol.*, 60(6):1543–1550.
- Pearce, D., Manis, A. D., Nesterov, V., and Korbmacher, C. (2022). Regulation of distal tubule sodium transport: mechanisms and roles in homeostasis and pathophysiology. *Pflugers Arch.*, 474(8):869–884.
- Perry, S. F. and Gilmour, K. M. (2006). Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 154(1-2):199–215.
- Phuong, L. M., Huong, D. T. T., Nyengaard, J. R., and Bayley, M. (2017). Gill remodelling and growth rate of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* under impacts of hypoxia and temperature. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 203:288–296.
- Porteus, C. S., Brink, D. L., and Milsom, W. K. (2012). Neurotransmitter profiles in fish gills: putative gill oxygen chemoreceptors. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 184(3):316–325.
- Rahn, H. (1966). Aquatic gas exchange: theory. *Respir. Physiol.*, 1(1):1–12.
- Romspert, A. P. and McClanahan, L. L. (1981). Osmoregulation of the terrestrial salamander, *ambystoma tigrinum*, in hypersaline media. *Copeia*, 1981(2):400–405.
- Sayer, M. D. J. (2005). Adaptations of amphibious fish for surviving life out of water. *Fish Fish*, 6(3):186–211.
- Schaffeld, M., Bremer, M., Hunzinger, C., and Markl, J. (2005). Evolution of tissue-specific keratins as deduced from novel cDNA sequences of the lungfish *protopterus aethiopicus*. *Eur. J. Cell Biol.*, 84(2-3):363–377.
- Schaffeld, M., Haberkamp, M., Schätzlein, S., Neumann, S., and Hunzinger, C. (2007). A novel and ancient group of type I keratins with members in bichir, sturgeon and gar. *Front. Zool.*, 4:16.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 9(7):676–682.
- Schoch, R. R. and Witzmann, F. (2011). Bystrow's paradox - gills, fossils, and the fish-to-tetrapod transition. *Acta Zool.*, 92(3):251–265.
- Schwarz, D. E. and Allen, P. J. (2014). Effects of salinity on growth and ion regulation of juvenile

- alligator gar *atractosteus spatula*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 169:44–50.
- Shah, A. S., Ben-Shahar, Y., Moninger, T. O., Kline, J. N., and Welsh, M. J. (2009). Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science*, 325(5944):1131–1134.
- Sharma, P. D. (1998). *Environmental Biology*. Rastogi Publications, U.P. India.
- Smith, G. M. and Coates, C. W. (1937). Memoirs: On the histology of the skin of the lungfish *Protopterus annectens* after experimentally induced aestivation. *J. Cell Sci.*, s2-79(315):487–491.
- Standen, E. M., Du, T. Y., and Larsson, H. C. E. (2014). Developmental plasticity and the origin of tetrapods. *Nature*, 513(7516):54–58.
- Steppan, S. J., Meyer, A. A., Barrow, L. N., Alhajeri, B. H., Al-Zaidan, A. S. Y., Gignac, P. M., and Erickson, G. M. (2022). Phylogenetics and the evolution of terrestriality in mudskippers (gobiidae: Oxudercinae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 169:107416.
- Stiffler, D. F., DeRuyter, M. L., and Talbot, C. R. (1990). Osmotic and ionic regulation in the aquatic caecilian *typhlonectes compressicauda* and the terrestrial caecilian *ichthyophis kohtaoensis*. *Physiol. Zool.*, 63(4):649–668.
- Sturla, M., Paola, P., Carlo, G., Angela, M. M., and Maria, U. B. (2002). Effects of induced aestivation in *Protopterus annectens*: a histomorphological study. *J. Exp. Zool.*, 292(1):26–31.
- Sun, J., Nishiyama, T., Shimizu, K., and Kadota, K. (2013). TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics*, 14:219.
- Suyama, M., Torrents, D., and Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.*, 34(Web Server issue):W609–12.
- Suzuki, K.-I. T., Suzuki, M., Shigeta, M., Fortriede, J. D., Takahashi, S., Mawaribuchi, S., Yamamoto, T., Taira, M., and Fukui, A. (2017). Clustered xenopus keratin genes: A genomic, transcriptomic, and proteomic analysis. *Dev. Biol.*, 426(2):384–392.
- Tatsumi, N., Kobayashi, R., Yano, T., Noda, M., Fujimura, K., Okada, N., and Okabe, M. (2016). Molecular developmental mechanism in polypterid fish provides insight into the origin of vertebrate lungs. *Sci. Rep.*, 6:30580.
- Turko, A. J., Cooper, C. A., and Wright, P. A. (2012). Gill remodelling during terrestrial acclimation reduces aquatic respiratory function of the amphibious fish *Kryptolebias marmoratus*. *J. Exp. Biol.*, 215(Pt 22):3973–3980.
- Turko, A. J., Maini, P., Wright, P. A., and Standen, E. M. (2019). Gill remodelling during terrestrial acclimation in the amphibious fish *Polypterus senegalus*. *J. Morphol.*, 280(3):329–338.

- Tuzim, K. and Korolczuk, A. (2021). An update on extra-oral bitter taste receptors. *J. Transl. Med.*, 19(1):440.
- Uchiyama, M., Konno, N., Shibuya, S., and Nogami, S. (2015). Cloning and expression of the epithelial sodium channel and its role in osmoregulation of aquatic and estivating african lungfish *Protopterus annectens*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 183:1–8.
- Uchiyama, M., Kumano, T., Konno, N., Yoshizawa, H., and Matsuda, K. (2011). Ontogeny of ENaC expression in the gills and the kidneys of the japanese black salamander (*Hynobius nigrescens stejnegeri*). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 316B(2):135–145.
- Ultsch, G. R. (1987). The potential role of hypercarbia in the transition from water-breathing to air-breathing in vertebrates. *Evolution*, 41(2):442–445.
- Ultsch, G. R. (1996). Gas exchange, hypercarbia and acid-base balance, paleoecology, and the evolutionary transition from water-breathing to air-breathing among vertebrates. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, 123(1):1–27.
- Vandebergh, W. and Bossuyt, F. (2012). Radiation and functional diversification of alpha keratins during early vertebrate evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 29(3):995–1004.
- Wang, K., Wang, J., Zhu, C., Yang, L., Ren, Y., Ruan, J., Fan, G., Hu, J., Xu, W., Bi, X., Zhu, Y., Song, Y., Chen, H., Ma, T., Zhao, R., Jiang, H., Zhang, B., Feng, C., Yuan, Y., Gan, X., Li, Y., Zeng, H., Liu, Q., Zhang, Y., Shao, F., Hao, S., Zhang, H., Xu, X., Liu, X., Wang, D., Zhu, M., Zhang, G., Zhao, W., Qiu, Q., He, S., and Wang, W. (2021). African lungfish genome sheds light on the vertebrate water-to-land transition. *Cell*, 184(5):1362–1376.e18.
- Wang, X.-P., Balchak, D. M., Gentilcore, C., Clark, N. L., and Kashlan, O. B. (2022). Activation by cleavage of the epithelial Na⁺ channel α and γ subunits independently coevolved with the vertebrate terrestrial migration. *Elife*, 11.
- Weiner, I. D. and Verlander, J. W. (2011). Role of NH₃ and NH₄⁺ transporters in renal acid-base transport. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 300(1):F11–23.
- Wichmann, L. and Althaus, M. (2020). Evolution of epithelial sodium channels: current concepts and hypotheses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 319(4):R387–R400.
- Wilkie, M. P., Morgan, T. P., Galvez, F., Smith, R. W., Kajimura, M., Ip, Y. K., and Wood, C. M. (2007). The african lungfish (*Protopterus dolloi*): ionoregulation and osmoregulation in a fish out of water. *Physiol. Biochem. Zool.*, 80(1):99–112.
- Wright, P. A. and Turko, A. J. (2016). Amphibious fishes: evolution and phenotypic plasticity. *J. Exp.*

- Biol.*, 219(Pt 15):2245–2259.
- Yang, Z. (2007). PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.*, 24(8):1586–1591.
- Yokoyama, H., Kudo, N., Todate, M., Shimada, Y., Suzuki, M., and Tamura, K. (2018). Skin regeneration of amphibians: A novel model for skin regeneration as adults. *Dev. Growth Differ.*, 60(6):316–325.
- Yu, X., Ng, C. P., Habacher, H., and Roy, S. (2008). Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat. Genet.*, 40(12):1445–1453.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.*, 18(6):292–298.
- Zhang, J., Taniguchi, T., Takita, T., and Ali, A. B. (2003). A study on the epidermal structure of perio-phthalamodon and periophthalmus mudskippers with reference to their terrestrial adaptation. *Ichthyol. Res.*, 50(4):310–317.
- Zhang, R., Liu, Q., Pan, S., Zhang, Y., Qin, Y., Du, X., Yuan, Z., Lu, Y., Song, Y., Zhang, M., Zhang, N., Ma, J., Zhang, Z., Jia, X., Wang, K., He, S., Liu, S., Ni, M., Liu, X., Xu, X., Yang, H., Wang, J., Seim, I., and Fan, G. (2023). A single-cell atlas of west african lungfish respiratory system reveals evolutionary adaptations to terrestrialization. *Nat. Commun.*, 14(1):5630.
- Zimek, A. and Weber, K. (2005). Terrestrial vertebrates have two keratin gene clusters; striking differences in teleost fish. *Eur. J. Cell Biol.*, 84(6):623–635.

謝辞

本研究を進めるにあたって、多くの方にご協力を頂きました。心より感謝の意を表します。

指導教官である二階堂雅人准教授には修士の配属から5年間の研究活動において多大なる助言や指導をいただきました。心より感謝申し上げます。私が強く希望したポリプテルスの研究テーマを自由にやらせていただき、拙い論文をアクセプトまで辛抱強く何度も添削していただきました。

共同研究者である中牟田信明准教授には SEM 観察を手伝っていただき、兵藤晋教授、神田真司准教授にはポリプテルスの血中 Na や浸透圧の計測にご協力いただきました。また、今野紀文講師には実験の検証やディスカッションに付き合ってくださいました。伊藤隆晃君には FISH 実験に協力していただきました。深く感謝申し上げます。

ご多忙の中、副査として本論文を審査していただきました本郷裕一教授、増田真二教授、立花和則准教授、加藤明准教授に深く感謝申し上げます。修士論文の審査のときから建設的な意見を多数いただきました。

長澤竜樹助教には研究に関するディスカッションをしていただいた他、研究費獲得のための研究計画書の添削を熱心にしていただきました。お礼申し上げます。

何百枚にも渡るポリプテルス切片の作製や HE 染色を指導していただいた東京慈恵会医科大学の岡部正隆教授、重谷安代講師、大木静香様に感謝いたします。ポリプテルスの血中ナトリウム濃度や浸透圧の測定には東京大学大気海洋研究所の池羽希理子様にご協力いただきました。ありがとうございます。また日頃から測定機器を貸してくださった本郷研究室に感謝申し上げます。

最初にポリプテルスの研究活動の場を提供して頂き、研究の基礎を教えていただいた京都工芸繊維大学の北島佐紀人准教授に感謝します。当時実施した高 CO₂ 実験を発展させたものが、本研究の着想に繋がりました。実験の基礎と実験ノートの書き方を丁寧に指導していただいた河合富佐子先生に感謝いたします。折に触れて食事に誘っていただきました。ショウジョウバエの研究を通して研究へ

の姿勢の手本となるものを教えてくださった高野敏行教授に感謝いたします。

本研究室の過去・現在在籍しているメンバーには、アドバイスや論文に関するコメントをいただきました。本論文におけるイラストの一部は卒業生の川辺君に描いてもらいました。相原さんには日常的な研究の多大なるサポートをしていただきました。畑島さんと中村さんには学振の申請書を見て頂きそのおかげで採用に繋がることができました。また、ひとつ上の先輩である河村理輝さんには、日頃親身になって研究の相談に乗って頂き、週末や休暇には気分転換の釣りや旅行に付き合ってくださいました。ありがとうございました。

研究を始めた頃、一緒に勉強会に付き合ってくれたり、議論に付き合ってくれた同期の河内舟月くんに感謝いたします。二人でよく京都の王将に行って安酒を煽りながら研究についてグダグダと会話を重ねたのも良い思い出です。今後の活躍を心から祈念しております。

最初に水槽を買い与え、この道へと進むきっかけを与えてくれた亡き祖父、いつも私の話を楽しく聞いてくれる祖母たちに感謝します。学費と生活費、精神面においても支援してくれた両親、共に生物系に進み、切磋琢磨した妹にお礼申し上げます。いつも家で私の帰りとエサを待っていてくれたヒョウモントカゲモドキのぼちとはち、ウーパールーパーのうば、ハムスターの生はむ、ポリプテルスたちに癒やされていました。最後に、7年間のお付き合いの間、精神的な支えとなり、昨夏結婚した人間の妻、らんに感謝します。特に「学振を取れなければ交際を再考する」と言われて尻に火がつく思いでした。ここまで来ることができたのも妻の叱咤激励のおかげです。これからもよろしくお願いします。

本研究は JSPS 特別研究員奨励費 21J21544 の助成を受けたものです。また、文部科学省先端研究基盤共用促進事業 (コアファシリティ構築支援プログラム) JPMXS0440200021 で共用された機器を利用した成果です。

報文目録

1. **Kimura, Y.** and Nikaido, M. (2021). Conserved keratin gene clusters in ancient fish: An evolutionary seed for terrestrial adaptation, *Genomics*, 113(1, Part 2): 1120 – 1128.
2. **Kimura, Y.**, Nakamuta, N. and Nikaido, M. (2023). Plastic loss of motile cilia in the gills of *Polypterus* in response to high CO₂ or terrestrial environments, *Ecology and Evolution*, 13 (4), e9964.
3. **Kimura, Y.** and Nikaido, M. (2023). Unveiling the expansion of keratin genes in lungfishes: a possible link to terrestrial adaptation, *Genes & Genetic Systems*, Volume 98 Issue 5 Pages 249-257.

補足

補足 1. 陸上環境におけるポリプテルスのエラ呼吸の抑制の様子。

<https://onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1002%2Fece3.9964&file=ece39964-sup-0002-Video1.mp4>

補足 2. ポリプテルスのエラにおける水流の様子。

<https://onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1002%2Fece3.9964&file=ece39964-sup-0003-Video2.mp4>