

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770057

研究課題名 (和文) 上皮細胞のイオン代謝応答による魚類の体液調節と環境適応

研究課題名 (英文) Environmental adaptation and body fluid homeostasis of fish by transporting epithelial cells

研究代表者

加藤 明 (KATO AKIRA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：40311336

研究成果の概要：魚類が淡水や海水の中で体液を人とほぼ同じ組成に保つ仕組みを、エラ、腎臓、腸によるイオン輸送の結果として理解することを目標に、トラフグ (ゲノム配列が公開) の近縁種で淡水・海水の両環境で生息できるメフグのイオン輸送体遺伝子を解析した。淡水魚が尿から水を排泄する仕組み、海水魚が糞からカルシウムを排泄する仕組み、及び海水魚が尿から硫酸イオンを排泄する仕組みに関わる遺伝子を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 動物生理・行動

キーワード：魚類生理, 電気生理, 体液ホメオスタシス, イオン輸送体, フグゲノム, 重炭酸輸送体, 硫酸輸送体, 輸送上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は魚からヒトまでほぼ同じイオン組成の体液を有している。地球上の様々な環境 (淡水, 海水, 陸上) で脊椎動物が繁栄しているのは環境適応力が強いからであり, イオン代謝を駆使して体液の恒常性を維持する能力が必須となる。

魚類はエラや体表の広い面積を介して淡水や海水などの環境水と接しているため, 環境水の組成は魚類のイオン代謝に大きく影響を与える。従って環境水の変化 (浸透圧, イオン組成など) に対する魚類のイオン代謝応答は明瞭で, 魚類は体液ホメオスタシスの研究材料として優れている。魚類が淡水や海水に適応する時, エラや腎臓, 腸に存在する

様々な上皮細胞が環境に応答し, イオン輸送を変化させる。中でも圧巻なのがエラの塩類細胞であるが, 高度にイオン輸送に特殊化した塩類細胞の構造と機能は分子レベルで未だ説明がつかない。私はトラフグゲノム資源と淡水適応能の異なるトラフグ近縁種を用いて体液ホメオスタシスに重要なイオン輸送体やその制御因子を特定し, 上皮細胞のイオン輸送応答の実態とその制御システムを解明したいと考えている。

私達は淡水・海水移行に伴う遺伝子発現の変化を指標として, 海水と淡水の両方で棲息できる広塩性魚類のウナギを用いて様々な遺伝子を特定してきた。2002年のトラフグゲノム配列の公開を受けて, 2003年よりフグゲ

ノム資源とトラフグ近縁種の研究を開始し、トラフグ属は海水中ではどの種も生存できるが、淡水中で1日で死んでしまうマフグ、淡水中で3~5日生存できるトラフグやクサフグ、淡水中で数ヶ月生存できるメフグの3種類に分類できることを明らかにし、トラフグ属の生理学研究のモデル動物としての重要性を提唱してきた。私は淡水や海水に移行したときのメフグの遺伝子発現の変化や、メフグとトラフグの種間の遺伝子発現の変化を指標にして遺伝子の発現解析を行い、淡水・海水適応に関わる遺伝子の候補を既に得ていた。それらの幾つかの候補について解析を進め、新たなイオン輸送モデルを提唱するに至る成果を得ることができたので以下に報告する。

## 2. 研究の目的

魚類の体液の恒常性維持を3種類の上皮細胞(エラ・塩類細胞、腎・尿細管、腸・粘膜上皮細胞)の振る舞いとして解釈し、それらの上皮細胞によるイオン輸送に関わるイオン輸送体とその制御メカニズムを明らかにする。分子の特定にはトラフグゲノム資源とトラフグ近縁種を用いて網羅的に行う。具体的には以下の現象に着目して分子モデルの構築を目指す。

(1) 飲んだ海水が白い糞になる謎(水吸収における重炭酸代謝の役割): 海水魚はエサを与えなくても海水を飲み、炭酸カルシウムを主成分とした白い糞を出す。腸の粘膜上皮細胞は飲水に応答して重炭酸イオンを分泌し、カルシウムイオンの沈殿により腸内の浸透圧を低下させ、水の吸収を容易にしている。私達は海水で誘導される粘膜上皮細胞の重炭酸イオン輸送体の候補を特定しており、それらによる重炭酸分泌とカルシウムの糞排出の分子モデルの構築を目指す。

(2) 遠位尿細管が淡水魚を決定付ける(淡水魚を決定する遺伝子の探索へ): 淡水中では浸透圧の低い環境水から絶えず体内に水が流入するため淡水魚は水を飲まず、侵入した水は腎臓から排泄する。産生された尿から極限までイオンを再吸収して希釈することは、魚類が淡水中で生きていくための必須条件である。私達は腎臓で尿の希釈に働くNaCl共輸送体の発現量とフグの淡水適応能に極めて明瞭な相関関係があることを見出した。そこでNaCl共輸送体の腎臓での局在を明らかにし、NaCl再吸収による尿希釈の分子モデルの構築を目指す。

(3) 不明な点が多い2価イオン代謝の制御機構: 海水魚は失った水を補充するために海水を飲む。海水は体液より高浸透圧であるが、余剰なNaClはエラの塩類細胞から、MgSO<sub>4</sub>は腎臓から排泄することで、差し引きとして水を得ることができる。私達は海水魚の腎臓

でSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を濃縮する候補となる輸送体遺伝子を、メフグ腎臓の解析から既に特定していた。この輸送体の局在・活性の解析により、腎臓におけるSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>排泄の分子モデルの構築を目指した。

## 3. 研究の方法

淡水で飼育したメフグと海水で飼育したメフグ・トラフグ(図1)からエラ、腎臓、腸を摘出してRNAを抽出し、様々なイオン輸送体の発現をノーザン解析やRT-PCRで定量した。その結果発現量に顕著に差のある遺伝子としてSlc26a6A, Slc26a6B, NBCe1, NCCなどを特定した。これらの遺伝子産物に対するポリクローナル抗体を作製してフグ臓器切片を免疫染色することにより発現部位の特定を行った。またこれらのcRNAを合成してアフリカツメガエル卵母細胞に注入してイオン輸送体を発現させ、電気生理学的解析により膜電位、膜電流、細胞内pH、細胞内[Cl<sup>-</sup>]、細胞内[Na<sup>+</sup>]を測定することで活性を測定した。

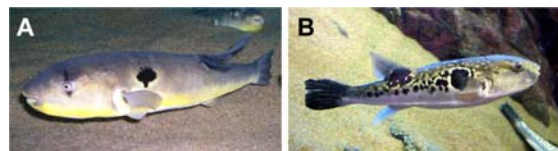


図1 実験に用いた魚。(A)メフグは淡水と海水で生息できる。(B)トラフグは海水のみで生息できる。両者の遺伝子配列は99%同一である。

## 4. 研究成果

### (1) 海水魚のカルシウム排泄機構の解明

海水魚は腸から重炭酸イオンを活発に分泌して炭酸カルシウムを形成し、白い糞として排泄する。腸による重炭酸分泌の分子機構を解明するためにメフグの腸における重炭酸輸送体ファミリー(Slc4 & Slc26)の発現解析を行ったところ、Slc26a6A, Slc26a6BとNBCe1の発現が海水適応時に上昇することを見出していた。そこでこれらのイオン輸送体遺伝子に対するポリクローナル抗体を作製してメフグ腸の免疫組織染色を行い、さらにそれらの電気生理学的活性を測定したところ、NBCe1が血液側に局在して血液から重炭酸イオンを粘膜上皮細胞に供給し、管腔側の刷子縁膜上に局在するSlc26a6AとSlc26a6Bが管腔内のCl<sup>-</sup>と細胞内の重炭酸イオンを交換輸送するモデルを構築することができ、飲んだ海水のカルシウムを白い糞として排泄する分子機構を解明することができた(図2, Am J Physiol 2008)。

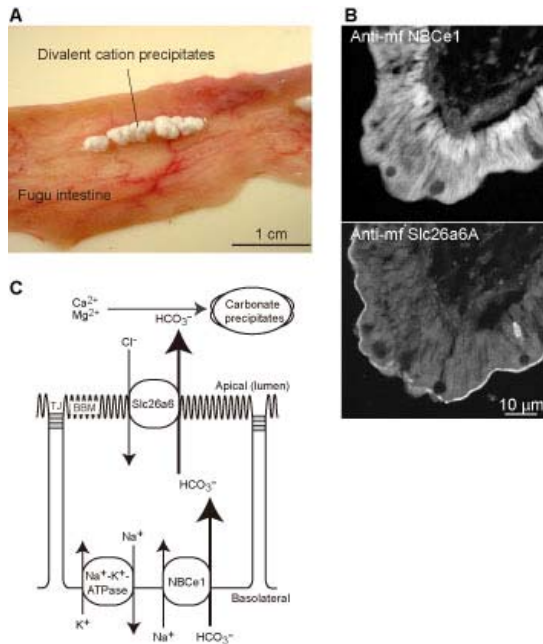


図2 海水魚のカルシウム排泄機構。(A) 腸内の白い糞(炭酸カルシウム沈殿)。海水で飼育した魚のみに観察される。(B) 免疫組織染色による腸粘膜上皮細胞におけるNBCe1とSlc26a6Aの局在。(C) 腸粘膜上皮細胞における重炭酸分泌の分子モデル。

### (2) 海水魚の硫酸排泄機構の解明

海水魚は海水のにがり成分  $MgSO_4$  を尿中に濃縮して排泄する。腎臓における硫酸排泄機構を明らかにするためにメフグ腎臓における硫酸輸送体ファミリー(Slc13 & Slc26)の発現解析を行ったところ、Slc26a6Aの発現が海水適応時に顕著に上昇することを既に見出していた。Slc26a6Aの硫酸輸送活性を、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的解析により測定したところ、驚くべき事にSlc26a6Aはこれまで知られる最も強い硫酸トランスポーターのさらに10~100倍の硫酸輸送活性を有する事が明らかとなった。Slc26a6Aは他の陰イオン(重炭酸イオン、ギ酸イオン、シュウ酸イオンなど)を輸送することが知られるが、硫酸以外の陰イオンの輸送活性は他の硫酸輸送体と同じレベルであった。さらに免疫組織染色によるメフグ腎臓の解析を行い、腎尿細管の管腔側に局在するSlc26a6Aによる硫酸の腎排出の分子モデルを提唱することができた(図3, Am J Physiol in revision)。

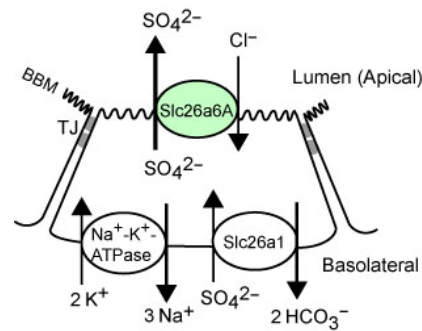


図3 海水魚の硫酸排泄機構。管腔側のSlc26a6Aは極めて強い硫酸輸送活性を有する。

### (3) 淡水魚の水排泄機構の解析

トラフグとメフグは共に近縁種であるが、その淡水適応能が大きく異なる。すなわちトラフグは淡水中では数日で死んでしまうが、メフグは淡水中で数ヶ月以上生存することができる。腎臓の組織切片を解析したところ、メフグ腎臓は遠位尿細管を含む淡水魚型のネフロン(腎単位)によって構成されていたのに対し、トラフグ腎臓は遠位尿細管を欠く海水魚型のネフロン構造を有していること、メフグとトラフグではNaCl共輸送体

(Slc12a3, NCC)の発現に顕著な違いがあることを既に見出していた。すなわち、海水魚型のトラフグの腎臓はNCCをほとんど発現していないのに対し、淡水魚型のメフグ腎臓はNCCを高発現していた。そこで免疫組織染色によりNCCの腎臓の発現部位を同定したところ、NCCが淡水メフグ腎臓の遠位尿細管の管腔側に局在することを明らかにし、淡水魚の尿希釈及び水排泄の分子モデルを構築した(未発表)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

以下は全て査読あり

- ① Kurita Y, Nakada T, Kato A, Doi H, Mistry AC, Chang MH, Romero MF, Hirose S (2008) Identification of intestinal bicarbonate transporters involved in formation of carbonate precipitates to stimulate water absorption in marine teleost fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1402-12
- ② Kato A, Nakamura K, Kudo H, Tran YH, Yamamoto Y, Doi H, Hirose S (2007) Characterization of the column and autocellular junctions that define the vasculature of gill lamellae. *J Histochem Cytochem* 55:941-53
- ③ Nag K, Kato A, Sultana N, Ogoshi M, Takei Y, Hirose S (2007) Fish calcitonin receptor has novel features. *Gen Comp Endocrinol* 154:48-58
- ④ Nag K, Sultana N, Kato A, Hirose S (2007) Headless splice variant acting as dominant negative calcitonin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 362:1037-43
- ⑤ Nakada T, Westhoff CM, Kato A, Hirose S (2007) Ammonia secretion from fish gill depends on a set of Rh glycoproteins. *FASEB J*
- ⑥ Sultana N, Nag K, Kato A, Hirose S (2007) Pillar cell and erythrocyte localization of fugu ET(A) receptor and its implication. *Biochem Biophys Res Commun*

[学会発表] (計3件)

①加藤 明, 中田 勉, 栗田 志広, 土井 啓行, Min-Hwang Chang, Michael F. Romero, 広瀬 茂久「海水魚の硫酸排泄機構の解析」第3回トランスポーター研究会, 2008年6月8日, 京都

②Kato A, Chang MH, Kurita Y, Nakada T, Hirose S, Romero MF “Functional Characterization of Pufferfish Slc26a6A and Slc26a6B” *Experimental Biology* 2008, April 8, 2008, San Diego, USA

③加藤 明, Min-Hwang Chang, 栗田 志広, 中田 勉, 広瀬 茂久, Michael F. Romero 「フグ Slc26 陰イオン交換輸送体の活性と海水適応における役割」トランスポーター研究会 第1回関東部会, 2007年12月10日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 明 (KATO AKIRA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号: 40311336

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし