

令和元年6月7日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26450295

研究課題名(和文) 魚類の塩類細胞における新規機能(H⁺・NH₄⁺・Cs⁺の排出)の解明研究課題名(英文) New functions of branchial ionocytes in teleosts: excretion of H⁺, NH₄⁺ and Cs⁺

研究代表者

廣井 準也 (HIROI, Junya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20350598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、真骨魚類の鰓において、アンモニアの排出・H⁺の排出・Na⁺の取り込みという3つの生理機能をつかさどる分子群が機能的な複合体を形成している可能性が示唆されるようになったが、このモデルは仮説にとどまっていた。本研究では候補分子群を可視化することにより、1) 候補分子群が塩類細胞の外部環境と接する細胞膜に共同在し3つの生理機能が連携していること、2) 低イオン環境や酸性環境において候補分子群の微細局在が変化することによって機能の連携が亢進されること、を明らかにすることができた。さらに、3) Cs⁺と同じ挙動をしめすK⁺が塩類細胞のサブタイプによって排出されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

塩類細胞の既知の機能であるNa⁺の取り込みに加え、本研究では新たにH⁺とアンモニアの排出に注目し、これらの3機能が連携していることと外部環境変化に応じて連携が亢進されることを明らかにすることができたが、H⁺の排出は体液の酸塩基調節のかなめであり、アンモニアの排出は窒素代謝の最終過程であるため、これらの成果は魚類生理学・水産増養殖学の両面から重要である。また、塩類細胞のサブタイプによるK⁺の排出機構を明らかにしたが、Cs⁺はK⁺と同じ挙動を示すため、この成果は放射性Csによる魚類の汚染と除染のメカニズムを明らかにするうえで重要である。

研究成果の概要(英文)：Localization patterns of NHE3b and Rhcg1 in rainbow trout ionocytes were examined with newly-raised antibodies. The immunoreactivity of NHE3b and Rhcg1 looked likely to be colocalized at the apical membrane of the ionocytes, but the higher-resolution imaging revealed that NHE3b was diffused and located rather subapically in freshwater-acclimated trout, whereas that NHE3b was concentrated at the apical membrane, being more colocalized with Rhcg1, following transfer to deionized water or acidic water. These morphological changes would imply that ammonia-dependent sodium uptake by the Rh-NHE metabolon is more active in low-sodium and low-pH environments.

研究分野：農学

キーワード：塩類細胞 トランスポーター Na⁺/H⁺交換体 Rh因子 デコンポリューション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真骨魚類は、「塩類細胞」が Na^+ と Cl^- を能動輸送することにより、淡水・海水それぞれの環境に順応できる。近年、塩類細胞における Na^+ ・ Cl^- の吸収・排出メカニズムが分子レベルで解明されたが、塩類細胞は Na^+ ・ Cl^- だけでなく H^+ ・ NH_4^+ ・ Cs^+ ・ K^+ などの輸送も積極的に行っていることが示唆されるようになった。特にアンモニアについては、真骨魚類は窒素代謝の最終産物としてアンモニアを鰓から排泄するが、その排泄機構は単純拡散によるものと考えられて注意が払われてこなかった。しかし最近、鰓におけるアンモニアの排泄が Rh アンモニアトランスポーターを介することが明らかになり、さらに、アンモニアの排泄・ H^+ の排出・ Na^+ の取り込みという3つの生理機能をつかさどるトランスポーター群が機能的な複合体(メタボロン)を形成している可能性が示唆されるようになった。ただしこのモデルは仮説にとどまっているのが現状であった。

2. 研究の目的

真骨魚類の塩類細胞による新規機能、すなわち H^+ ・ NH_4^+ ・ Cs^+ の排出などのメカニズムを分子レベル・単一細胞レベルで明らかにすることを目的とする。特に上記の背景をふまえて、アンモニアの排泄・ H^+ の排出・ Na^+ の取り込みという3つの生理機能をつかさどっていると推測される候補トランスポーター群の可視化に焦点を絞る。候補トランスポーターとして、 H^+ の排出と Na^+ の取り込みを 1:1 で行うと考えられる Na^+/H^+ 交換体 (NHE3b)、アンモニアガストロトランスポーターとして機能すると考えられる Rh 因子 (Rhcg1, Rhcg2, Rhbg) をとりあげる。

3. 研究の方法

広塩性のモデル魚種としてニジマスを用い、アンモニアの排泄・ H^+ の排出・ Na^+ の取り込みに関与すると予想される候補トランスポーター群の遺伝子クローニングを行い、リアルタイムPCRによる mRNA の測定系を確立する。それぞれのトランスポーターに対する特異抗体を作成し、既知の Na^+ ・ Cl^- 輸送関連トランスポーターと合わせて、同時多重免疫蛍光染色を行う。共焦点レーザー顕微鏡で画像取得後、さらに、デコンボリューションソフトウェア Huygens Essential を導入し数学的処理(最尤法によるデコンボリューション)をほどこし、トランスポーター群の共局在をより高解像度で解析する。得られた単一細胞レベルの情報を統合し、「どのタイプの塩類細胞でどのイオンの排出が行われているか」を解明する。

4. 研究成果

(1) ニジマスにおいて、3種の Rh 因子 (Rhcg1, Rhcg2, Rhbg) に対する特異抗体の作成に成功した(図1)。これらの抗体は、タイセイヨウサケにおいても利用可能であることを確認した。

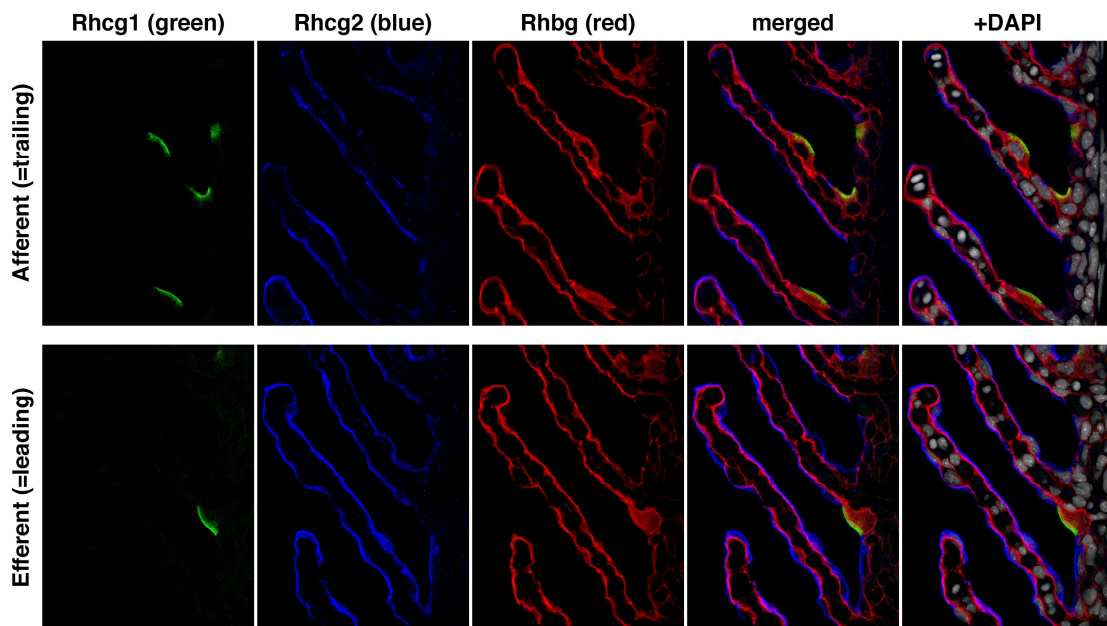


図 1. 通常淡水に順応させたニジマス鰓の Rh 因子 (Rhcg1, Rhcg2, Rhbg) の局在。Rhcg1 は塩類細胞 (NHE3b-positive ionocyte) の頂端膜, Rhcg2 は呼吸上皮細胞 (respiratory pavement cell) の頂端膜, Rhbg は塩類細胞と呼吸上皮細胞両方の側底膜に、それぞれ局在した。

同時多重免疫蛍光染色をおこなって共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、淡水および海水に順応させたニジマスとタイセイヨウサケスモルトの鰓において、 Na^+/H^+ 交換体 (NHE3b) と Rhcg1 は同一の塩類細胞の外部環境と接する細胞膜(頂端膜)に共局在するように見えた。

共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像にデコンボリューションをほどこしたところ、通常淡水に順応させたニジマス鰓の塩類細胞では、NHE3b・Rhcg1 とともに、頂端膜の表面に集中せず、

表面下に約 1,000 ナノメートルの幅をもって分布していた。さらに、Rhcg1 の局在の中心は頂端膜の表面から約 300 ナノメートルの範囲に集中していたのに対し、NHE3b は頂端膜の表面から約 300 ナノメートルの範囲には強く発現せず、300~1,000 ナノメートルの範囲に幅広く分布していた。つまり、通常淡水順応時には Rhcg1 と NHE3b の分布中心がずれていることが明らかとなった (図 2)。

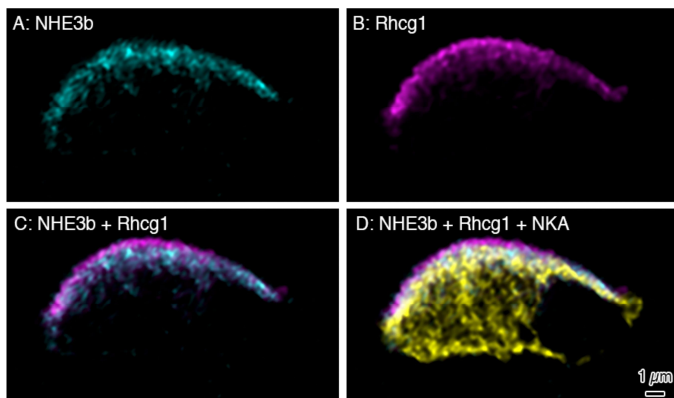


図 2. 通常淡水に順応させたニジマス鰓の塩類細胞における NHE3b と Rhcg1 の局在。NHE3b (シアン) が Rhcg1 (マゼンタ) に対してより幅広く分布しており、両者を重ねると、NHE3b の分布中心が Rhcg1 のそれよりも深部に位置していることがわかる。

次に、低イオン水または酸性水 (pH4.5) に順応させたニジマス鰓の塩類細胞を解析したところ、通常淡水と大きく異なり、NHE3b・Rhcg1 とともに、頂端膜の表面から約 200 ナノメートルの範囲に集中して分布していた。つまり、NHE3b と Rhcg1 の分布中心がほぼ一致するようになった (図 3)。

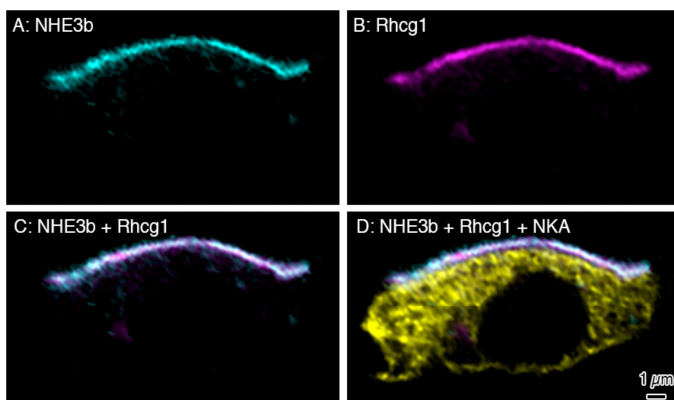


図 3. 低イオン水に順応させたニジマス鰓の塩類細胞における NHE3b と Rhcg1 の局在。図 2 に比べて、NHE3b (シアン) の分布が頂端膜の表面に集中し、Rhcg1 (マゼンタ) とほぼ重なっていることがわかる。

これらの結果は、 Na^+ が体内から激しく奪われる低イオン環境および酸性環境において、NHE3b と Rhcg1 によって形成されたメタボロンがより効率的に機能し、アンモニアと H^+ の排出に依存した Na^+ の取り込みを促進させていることを強く示唆している。NHE3b と Rhcg1 の関係の模式図を図 4 にしめす。

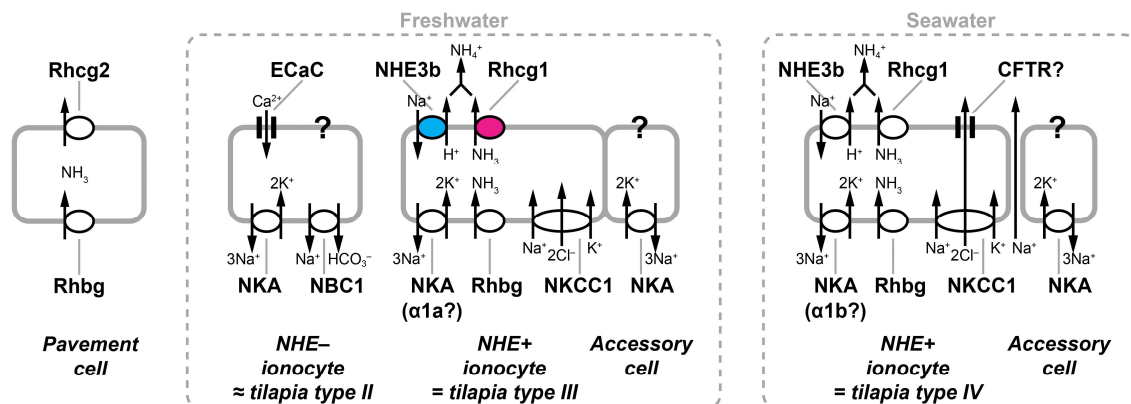


図 4. ニジマスの鰓におけるトランスポーター群の局在様式の模式図。塩類細胞の一種 (NHE3b-positive ionocyte) の頂端膜に分布する NHE3b と Rhcg1 がナノスケールで共局在の様式を変化させることにより、アンモニアと H^+ の排出に依存した Na^+ の取り込みが調節されていると考えられる。

(2) ティラピアの塩類細胞は4種類のサブタイプ(I型, II型, III型, IV型)から構成される。海水で特異的に出現するIV型細胞の頂端膜に, K^+ の排出をおこなう K^+ チャネル(ROMKa)が局在することが知られていたが, 今回, 淡水・海水どちらでも出現するI型細胞と淡水で出現するIII型細胞の頂端膜にもROMKaが局在すること, さらに, 環境水の K^+ 濃度を上昇させるとROMKaの発現が上昇することが明らかとなった。 Cs^+ は K^+ と同じ挙動を示すため, この成果は放射性Csによる魚類の汚染と除染のメカニズムを明らかにするうえで重要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Blondeau-Bidet E, Hiroi J, Lorin-Nebel C (2019) Ion uptake pathways in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Gene* 692, 126-137, 査読有

DOI: 10.1016/j.gene.2019.01.006

Inokuchi M, Nakamura M, Miyanishi H, Hiroi J, Kaneko T (2017) Functional classification of gill ionocytes and spatiotemporal changes in their distribution after transfer from seawater to fresh water in Japanese seabass. *Journal of Experimental Biology* 220, 4720-4732, 査読有

DOI: 10.1242/jeb.167320

Kawaguchi M, Okubo R, Harada A, Miyasaka K, Takada K, Hiroi J, Yasumasu S (2017) Morphology of brood pouch formation in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Zoological Letters* 3, 19, 査読有

DOI: 10.1186/s40851-017-0080-9

Sano K, Kawaguchi M, Katano K, Tomita K, Inokuchi M, Nagasawa T, Hiroi J, Kaneko T, Kitagawa T, Fujimoto T, Arai K, Tanaka M, Yasumasu S (2017) Comparison of egg envelope thickness in teleosts and its relationship to the sites of ZP protein synthesis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 328, 240-258, 査読有

DOI: 10.1002/jez.b.22729

Zimmer AM, Wilson JM, Wright PA, Hiroi J, Wood CM (2017) Different mechanisms of Na^+ uptake and ammonia excretion by the gill and yolk sac epithelium of early life stage rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 220, 775-786, 査読有

DOI: 10.1242/jeb.148429

Kawaguchi M, Nakano Y, Kawahara-Miki R, Inokuchi M, Yorifuji M, Okubo R, Nagasawa T, Hiroi J, Kono T, Kaneko T (2016) An evolutionary insight into the hatching strategies of pipefish and seahorse embryos. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 326, 125-135, 査読有

DOI: 10.1002/jez.b.22670

Wright PA, Wood CM, Hiroi J, Wilson JM (2016) (Uncommon) mechanisms of branchial ammonia excretion in the common carp (*Cyprinus carpio*) in response to environmentally induced metabolic acidosis. *Physiological and Biochemical Zoology* 89, 26-40, 査読有

DOI: 10.1086/683990

Furukawa F, Watanabe S, Kakumura K, Hiroi J, Kaneko T (2014) Gene expression and cellular localization of ROMKs in the gills and kidney of Mozambique tilapia acclimated to fresh water with high potassium concentration. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307, R1303-R1312, 査読有

DOI: 10.1152/ajpregu.00071.2014

Takei Y, Hiroi J, Takahashi H, Sakamoto T (2014) Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307, R778-R792, 査読有

DOI: 10.1152/ajpregu.00104.2014

[学会発表](計5件)

Hiroi J, Tsuboi Y, Watanabe S, Kaneko T (2018) NHE3-positive ionocytes of Japanese dace form an apical crypt in acidic water. 13th International Congress on Biology of Fish

Ichikawa K, Hiroi J, Kaneko T, Ogasawara T (2018) Salinity preference and osmoregulation of Japanese medaka, an euryhaline fresh water teleost. 13th International Congress on Biology of Fish

Hiroi J (2017) Immunohistochemistry of ion and ammonia transporting cells in teleost fish. Morphology meets Physiology: A tribute to Pierre Laurent (Society for Experimental Biology Animal Satellite Meeting)

廣井準也, 水野伸也, 金子豊二, McCormick SD (2015) ニジマス塩類細胞における新規機能の解明. 平成27年度日本水産学会春季大会

Hiroi J (2014) Immunolocalization of Rhcg1, Rhcg2, Rhbg and NHE3b in the gill ionocytes of rainbow trout. 11th International Congress on the Biology of Fish

〔図書〕(計2件)

廣井準也 (2018) 魚類学の百科事典 (担当:分担執筆, 範囲:浸透圧調節と塩類細胞 338-339)
丸善出版
廣井準也, 金子豊二 (2016) ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ V ホメオスタシス
と適応 - 恒 - (担当:分担執筆, 範囲:塩類細胞 70-86) 裳華房

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:丸山 耕一

ローマ字氏名:(MARUYAMA, Kouichi)

所属研究機関名:独立行政法人放射線医学総合研究所

部局名:福島再生支援本部

職名:主任研究員

研究者番号(8桁):70349033

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。