

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20880008

研究課題名（和文） 海産魚の希釈海水を用いた陸上養殖の可能性を探る

研究課題名（英文） Possibility of land culture of marine fishes using diluted seawater

研究代表者

李 慶美（LEE KYUNG MI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：30507885

研究成果の概要（和文）：

海産魚の陸上養殖は水質管理の容易さや環境への負荷が低減できることなどから、さまざまなビジネスチャンスを創生することにつながる。しかしその学術的なバックボーンは極めて希薄なのが現状である。本研究の結果、硬骨魚類が体表上皮での水・イオンの透過を最小限に抑える上で細胞接着が重要であることが判明した。本研究の成果は、細胞接着を人為的に調節することで、低塩分水を用いた海産魚の陸上養殖の可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

Land culture of marine fishes leads to create various business chances because of easiness of water quality management and possible reduction of environmental load. However, the scientific backbone is currently very weak. The present study showed that cell adherence in the epithelia of the body surface is important in suppressing water and ion permeability. Our findings imply that the establishment of land culture systems for marine fishes is highly possible through manipulation of cell adherence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,540,000	762,000	2,302,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：海産魚、希釈海水、陸上養殖、E-カドヘリン、浸透圧調節

1. 研究開始当初の背景

魚類の浸透圧調節は体内環境の恒常性

の維持に重要であり、その機構の解明は魚類の健全な育成を目指す上で水産学的な

意義は大きい。水圏に生息する魚類では、体表を介して外界と体内との間で各種のイオンや水が受動的に移動するが、これは陸上動物には見られない特徴である。海産魚では塩類の流入と水の流出、また淡水魚では塩類の流出と水の流入の危険に常にさらされているにも関わらず、実際には淡水、海水を問わず、体液の浸透圧は生理学的なレベルである海水のおよそ1/3に保たれている。従って、魚類の浸透圧調節は、体内外の浸透圧差により生じる水とイオンの受動的な移動に対処するため、水とイオンを能動的に輸送する機能と言える。これまでの浸透圧調節機構に関する研究は、鰓、腎臓、腸などの浸透圧調節器官における水・イオンの能動輸送に着目したものがほとんどで、体表の透過性に言及した研究は極めて少ない。そもそも水圏に生息する魚類では、体表を介した水とイオンの「勝手な移動」が体内の水・イオンのバランスを乱す最大の原因であり、体表の透過性を低く抑えることは浸透圧調節器官の負担を軽減する（エネルギーを節約する）という意味で重要な機構であることが予想される。このような状況を踏まえ、本研究は魚類の体表における水・イオンの透過性について調べるとともに、その制御機構の解明を目指した。

従来、魚の浸透圧調節の研究は浸透圧調節器官におけるイオンや水の輸送を細胞レベルや分子レベルで解明する方向で進展してきた。しかし体表の透過性を極力低く保てれば浸透圧調節の負担が軽減でき、ひいては塩分耐性の向上が期待できると考えるに至った。

2. 研究の目的

体表における水・イオンの透過性は体表の上皮組織に起因する。一般に細胞膜は脂質二重層からなり、水やイオンの透過性は極めて低い。従って、上皮組織を介した水やイオンの受動的移動は、主に細胞間に形成される細胞接着により調節されていると考えられる。細胞接着には様々な構造と分子が関わるが、中でも上皮性のカドヘリン（E-カドヘリン）は接着結合を形成する中心的な分子であり、その結合の程度は外部環境の Ca^{2+} 濃度に依存的であることが哺乳類の研究で示されている。本研究では、1) 魚類の体表上皮に発現する E-カドヘリンを同定し、その発現動態を解明する、2) 上皮の透過性に及ぼす外部環境中の各種イオンの影響を調べ、透過性の調節における E-カドヘリンの関与を検討す

る、さらに 3) 海産魚トラフグを用いて、環境水中の Ca^{2+} 等のイオン濃度が低塩分耐性に及ぼす影響を解明する。以上の研究を通して、海産魚の低塩分水による陸上養殖の可能性を多面的に模索する。

3. 研究の方法

本研究は、魚類の体表上皮における水とイオンの透過性を E-カドヘリンに着目して調べ、その特性を明らかにすることで魚類の低塩分耐性を向上させる手法を模索するもので、1) E-カドヘリンの同定と発現解析、2) 体表上皮の透過性制御機構、および 3) 海産魚の低塩分耐性の向上、の3つのステップに沿って研究を進めた。実験魚としては、広塩性魚のティラピア、および狭塩性海産魚であるトラフグを用いる予定である。

(1) E-カドヘリンの同定と発現解析

まずティラピアの鰓から E-カドヘリンを同定し、その発現部位を明らかにする。ティラピアは広塩性魚であり、淡水から海水までの広い塩分環境に適応できるため、E-カドヘリンの動態を調べる上で都合がよい。

次に決定した塩基配列からプローブを設計し、RT-PCR 法により各組織における遺伝子発現を調べる。E-カドヘリンは上皮細胞の細胞接着に関わる分子であるため、上皮組織を多く含む表皮、鰓、腸などに強い発現が予想される一方で、血球などの非上皮性の組織では発現していないと考えられる。このような各組織における発現を調べることで、当該分子が細胞接着因子である傍証が得られる。

さらに、ティラピア E-カドヘリンの組織学的局在を調べる上で特異的抗体が必要となるが、まず市販されている哺乳類の E-カドヘリン抗体の抗体作成部位のアミノ酸配列とティラピア E-カドヘリンの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を比較して両者の相同性を調べる。高い相同性が確認できた場合には、western blot 分析により市販の抗体とティラピア E-カドヘリンとの交叉性を検討した上で、市販の抗体を以降の実験に用いる。一方、E-カドヘリンの種特異性が高く既存の抗体が適用できないことが判明した時点で、ティラピア E-カドヘリンのアミノ酸配列の一部に相当するペプチドを合成し、これをウサギに免疫して特異的抗体を作製する。ティラピア E-カドヘリンの同定と並行して、シロサケとトラフグでも相同分子の同定を試みる。ティラピアの塩基配列が判明すれば、それをもとに比較的容易に解析できるものと

考えられる。これらの情報を総合的に解析し、魚類 E-カドヘリンに共通するアミノ酸配列が見出せたときには、魚類全般に適用可能なユニバーサル抗体(種によらず魚類の E-カドヘリンと広く交叉する抗体)を作製する。いずれの場合も、抗体を用いた免疫組織化学的手法により E-カドヘリン分子が鰓などの上皮組織の細胞間に局在することを示すことで、E-カドヘリンが機能的に細胞接着因子であることを確認する。

(2) 体表上皮の透過性制御機構

まず、成魚で体表の大部分を占める鰓上皮の透過性について検討するため、淡水および海水に馴致したティラピアから切り出した鰓を様々な溶液中で培養することで、生体に近い条件下で環境水中のイオン組成と濃度が鰓上皮透過性に及ぼす影響を調べる。切り出した鰓の両端を手術用の糸で縛り、切り口を通して水やイオンが移動しないようにする。次に摘出した鰓を通常の淡水および海水中で緩やかに攪拌しながら培養し、経時的にその重量を測定する。重量変化は水の移動量とみなせるので、重量変化をモニターすることで水移動の方向(内向きか外向きか)と量が推定できる。この方法により、試験魚のもともとの飼育環境で鰓を培養したときの水移動を調べ、ついで E-カドヘリンを介した細胞接着に影響を与えると考えられる Ca^{2+} に着目してその効果を検討する。脱イオン水および異なる濃度の Ca^{2+} を添加した脱イオン水で鰓を培養することで、環境水中の Ca^{2+} が鰓上皮の水透過性に及ぼす影響を明らかにする。本実験では環境水 Ca^{2+} が上皮の透過性を低く抑えるという結果が予想される。

(3) 海産魚の低塩分耐性の向上

上記の実験結果をもとに、海産魚トラフグの低塩分耐性を向上させる環境水の組成を模索し、飼育実験により低塩分耐性の向上を検証する。トラフグの低塩分陸上養殖を念頭に置き、2価のイオンを添加しつつ極力 NaCl 濃度を抑えたイオン組成を追及する。種苗生産業者から購入するトラフグ稚魚を 10%希釈海水以下の塩分濃度の水に Ca^{2+} と Mg^{2+} を加えた様々な環境水で飼育し、生残率と体液浸透圧を指標として、生理学的に十分に適応可能な飼育水を処方する。さらにトラフグ稚魚を、候補に挙げた飼育水と対照区として海水で2ヶ月程度飼育し、長期間にわたる適応能を確

認するとともに、その成長が海水飼育の対照区と比べて遜色ないことを確認する。

また最終年度のあたり、これまでの研究成果を総括し、E-カドヘリンの特性に根ざした魚類体表の透過性についてその生理学的性質を明らかにし、さらに環境水を改変することで塩分耐性を向上させる手法を可能な限り具体的に提案したい。

4. 研究成果

(1) E-カドヘリンの同定と発現解析

上皮性組織に存在すると考えられる細胞接着因子のうちで、カルシウム依存的に結合を形成する E-カドヘリンのホモログをティラピアにおいて同定した。そして、ヒトの E-カドヘリンに対する抗体を用いて免疫染色を行い、ティラピアの鰓における E-カドヘリンの局在を調べた。なお、ティラピアにおける抗体の特異性は Western blotting により確認した。

(2) ティラピアの鰓における水・イオンの透過性に対する環境中のカルシウムの影響

ティラピアの鰓を脱イオン水、0.1 mM、0.5 mM の塩化カルシウム水溶液に浸漬し、鰓上皮を通じた水の流入量を鰓の重量変化として捉えることで、環境水中のカルシウム濃度と鰓上皮の透過性の関連を調べた。次に、銀染色を用いて鰓から漏出してくる塩化物イオンを検出することにより、鰓上皮のどの部分で透過が起こっているのかを調べた。鰓の水透過性測定実験では、脱イオン水中にカルシウムを加えることで、鰓上皮を通じた水の流入が抑えられた。また、銀染色を用いた鰓上皮の観察では、上皮細胞の境界において銀の沈着が観察された。このことから、上皮細胞の細胞間隙を通して塩化物イオンが流出していると考えられる。さらに免疫染色の結果から、細胞接着部位に E-カドヘリンが局在している染色像が得られた。以上の結果から、E-カドヘリンが体表上皮における水やイオンの透過性を抑える上で重要であることが示唆される。

(3) 低カルシウム水への移行実験

淡水飼育ティラピアを人工淡水 (Ca^{2+} 濃度: 約 1 mM) と Ca^{2+} 欠乏淡水 (Ca^{2+} 濃度: 約 0.05 mM) に移行した。同時に、NaCl を用いて環境水の浸透圧を体液と等張にすることで、浸透圧ストレスを軽減した群 (isotonic+Ca 群、isotonic-Ca 群) を用意し、計 4 群で移行実験を行った。移行 1 週間後に血液浸透圧およびイオン組成、鰓の構造、

浸透圧調節の駆動力である Na⁺/K⁺-ATPase 活性を調べた。その結果、いずれの群でも血液浸透圧、Na⁺、Cl⁻、Ca²⁺濃度は一定に保たれていたが、isotonic-Ca 群で K⁺濃度が減少、Na⁺/K⁺-ATPase 活性が増加するという顕著な変化が見られた。また、Ca²⁺環境の変化による鰓表面の形態変化を走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、人工淡水群では Ca²⁺の有無にかかわらず大きな変化は認められなかった。一方、等張群では isotonic+Ca 群と比較して isotonic-Ca 群で、塩類細胞の開口部が拡張し、密度も増加していた。これらの結果から、淡水のような低イオン環境では低浸透圧適応機構が活性化されており、環境水 Ca²⁺欠乏によって上皮における透過性が上昇しても、これに容易に対処できることが考えられる。それに対し、等浸透圧環境下では、Ca²⁺の欠乏によって顕著な塩類細胞の機能亢進と考えられる現象が観察された。この原因としては、ティラピアの浸透圧調節機構の方向性は体内、体外の浸透圧差によって決定されるのに対し、浸透圧調節の強度自体は体液のイオン濃度の変化によって決定されている可能性が考えられる。

以上の研究から、環境水中の Ca²⁺が体表上皮の E-カドヘリンを中心とする細胞接着に必須であり、硬骨魚類が体表上皮での水・イオンの透過を最小限に抑える上でこの細胞接着が重要であることが判明した。

4) 海産魚の低塩分耐性の向上

まず海産魚であるトラフグを様々な濃度の希釈海水で3日間飼育した際の生残率と血液浸透圧を調べたところ、トラフグは10%希釈海水までの低塩分環境ならば十分に適応できることが判明した。一方、淡水から5%海水では生残率と血液浸透圧が低下し、適応することはできなかった。

そこで次に、5%海水に Ca²⁺ (CaCl₂) を1、2、4 mM 添加した飼育水で同様な飼育実験を行った。その結果、Ca²⁺添加の影響は認められなかった。5%海水にはおよそ 1.5 mM の Ca²⁺が含まれているが、このレベルは E-カドヘリンによる細胞接着に十分な濃度であり、そのため Ca²⁺添加の効果が見られなかったものと考えられる。

今後は K⁺や Mg²⁺などの他のイオンにも着目して研究を進める必要がある。

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 5 件)

① Choi JH, Lee KM, Inokuchi M and Kaneko, Acute responses of gill mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* following transfer from normal freshwater to deionized freshwater, *Fisheries Science*, 査読有、76、2010、p 101-109

② Seo MY, Lee KM and Kaneko T, Morphological changes in gill mitochondria-rich cells in cultured Japanese eel *Anguilla japonica* acclimated to a wide range of environmental salinity, *Fisheries Science*, 査読有、75、2009、p 1147-1156

③ Yanagie R, Lee KM, Watanabe S and Kaneko T, Ontogenic change in tissue osmolality and developmental sequence of mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia developing in freshwater, *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 査読有、154、2009、p 263-269

④ Kaneko T, Watanabe S and Lee KM, Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts, *Aqua-BioScience Monographs (ABSM)*, 査読有、1、2008、p 1-62

⑤ Inokuchi M, Hiroi J, Watanabe S, Lee KM and Kaneko T, Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities, *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 査読有、151、2008、p 151-158

[学会発表] (計 1 件)

Lee, K.M. 他、Eel leptocephali regulate ion and water balances, 5th World Fisheries Congress, October 20-25, 2008, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 慶美 (LEE KYUNG MI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：30507885