

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号: 32713

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2010~2012

課題番号: 22780183

研究課題名(和文) 真骨魚類における浸透圧調節機構の共通性と多様性の解明

研究課題名(英文) Unity and diversity of gill ionocyte morphology in teleost fishes

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

研究成果の概要(和文): 真骨魚類は、鰓の「塩類細胞」をつかって、淡水と海水という全く異なるイオン環境に適応することができる。研究代表者はこれまで、塩類細胞のイオントランスポーターを同定・可視化することにより、ティラピアの塩類細胞が4型に分類できることを報告してきたが、本研究では、ニジマスの塩類細胞は3型に分類できることを発見した。さらに、多くの魚種について、塩類細胞の機能的分類という今までにない切り口を用いることにより、真骨魚類の浸透圧調節機構の共通性と多様性を明らかにした。

研究成果の概要(英文): Teleost fishes are able to live in both fresh water and seawater by means of specialized "ionocytes" in the gill epithelium. Simultaneous immunofluorescence staining of multiple ion-transport proteins revealed morphological variations in ionocytes among teleost species (e.g. rainbow trout, tilapia and zebrafish). Ionocytes possessing apical Na^+/H^+ exchanger, apical Rh protein, basolateral Na^+/K^+ -ATPase and basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter are common in fishes.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 水産学・水産学一般

キーワード: 魚類, 環境適応, 浸透圧調節, 淡水, 海水, 塩類細胞, イオントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

真骨魚類は、鰓や体表に存在する「塩類細胞」という特殊な細胞が、海水環境では体内に過剰となるイオンを排出し、淡水環境では逆にイオンを取り込むことによって、浸透圧調節を行っている。塩類細胞の海水における Na^+ と Cl^- の排出機構については、1990年代に分子レベルでの説明が可能になったが、淡

水における Na^+ と Cl^- の取り込み機構に関しては、国内外の複数の研究室が挑戦を挑んだものの、機能分子を特定することができず、2000年代に入っても先の見えない状況が続いていた。

上記のような状況において研究代表者は、モザンビークティラピア胚の卵黄囊上皮の塩類細胞をモデルとし、複数のイオントラン

スポンターを同時免疫蛍光染色で可視化することにより、塩類細胞をI型~IV型の計4タイプに分類することに成功した (J Exp Biol 208, 2023-2036, 2005). 当時は、塩類細胞には淡水型と海水型の2タイプしか存在しないと考えられていたため、この4タイプの発見は驚きをもって迎えられた. 研究代表者はさらに、淡水で出現するII型細胞と、海水で出現するIV型細胞について、それぞれ特異的に発現するイオントランスポーターであるNCC (Na⁺/Cl⁻共輸送体) とNKCC1a (Na⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体 1a) を単離・決定することに成功した (J Exp Biol 211, 2584-2599, 2008). 特にNCCは、塩類細胞研究の約80年の歴史において、誰もその存在を予測しえなかった新規機能分子 (fish-specific NCC=SLC12A10; これまで知られていたconventional NCC=SLC12A3とは異なる) であり、混迷を極めていた魚類の浸透圧調節機構研究に解明の糸口を与えるものとなった.

その後、塩類細胞におけるイオントランスポーターの局在パターンは、魚種によって異なることが分かってきた (Am J Physiol 296, R1650-1660, 2009). どうやら、真骨魚類の浸透圧調節機構は海水におけるイオン排出機構こそ共通しているが、淡水におけるイオン取り込み機構は多様性に富んでいるようである. よって、多様な魚種を扱う我が国の水産業の現場に有用となる基礎知見を提供するためには、真骨魚類全般における浸透圧調節機構の共通性と多様性・特殊性を明らかにすることが急務であるとの考えに至った.

2. 研究の目的

上記の背景をふまえて、本研究では、通し回遊を行い水産重要種が多く含まれるサケ科 (ニジマス, タイセイヨウサケ) とキュウリウオ科 (アユ, ワカサギ) を主な対象とし、同時多重免疫蛍光染色を駆使してイオントランスポーターを可視化することにより、塩類細胞のイオン輸送機構を分子レベル・単一細胞レベルで明らかにすることを目的とする. 近年の浸透圧調節機構研究は、ゼブラフィッシュに代表されるように単一のモデル魚種を対象とし、単一のイオン輸送体に焦点を絞ったものが主流である. 複数の魚種を体系的に扱い、しかも複数のイオン輸送体を同時並列的に解析しようとする試みは、本研究の特色である.

3. 研究の方法

まず、対象魚種について、淡水と海水のそれぞれに特異的に発現することが期待される塩類細胞関連イオントランスポーター群

の遺伝子クローニングを行う. 次に、各イオントランスポーターについて、リアルタイムPCRによるmRNAの正確な測定系を確立する. さらに、特異抗体を作成し同時多重免疫蛍光染色を確立して、すべての塩類細胞関連イオン輸送体について同時並列的に単一細胞レベルでの詳細な解析を行う. 各魚種から得られた結果を統合し、真骨魚類における塩類細胞のイオン輸送機構の共通性と多様性について考察する.

4. 研究成果

淡水と海水に馴致させたタイセイヨウサケのスマルトの鰓のNa⁺/K⁺-ATPase (NKA) 免疫染色写真を図1に示す.

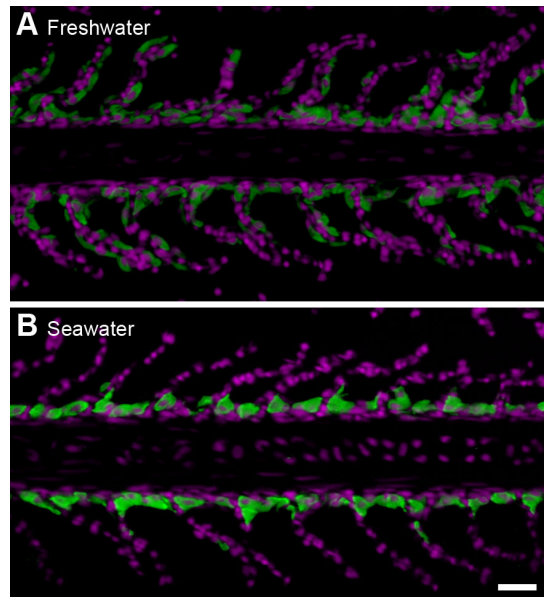


図1. タイセイヨウサケのスマルトの鰓のNa⁺/K⁺-ATPase (NKA) 免疫染色写真. NKA陽性 (緑色) の塩類細胞は、淡水 (A) では1次鰓弁と2次鰓弁の両方に存在するが、海水 (B) では2次鰓弁の塩類細胞が消失する. この現象は多くの魚種で確認されているが、1次鰓弁の塩類細胞=海水型、2次鰓弁の塩類細胞=淡水型、という解釈には注意が必要である. スケールバーは40 μm. Hiroi and McCormick 2012より.

NKA陽性 (緑色) の塩類細胞は、淡水では1次鰓弁と2次鰓弁の両方に存在するが、海水では2次鰓弁の塩類細胞が消失する. この現象は、シロサケやウナギをはじめとする多くの魚種で確認されている現象であり (図2のGroup A), 1次鰓弁の塩類細胞は海水型イオン排出細胞、2次鰓弁の塩類細胞は淡水型イオン吸収細胞であるとの説が1990年代後半に提唱された. しかし、同じサケ科でも、レイクトラウトやブルックトラウトのような原始的な魚種や、タイセイヨウサケでもパー

では、海水適応時に2次鰓弁の塩類細胞が消失しない(図2のGroup B)。よって、1次鰓弁=海水型、2次鰓弁=淡水型、という解釈には注意が必要である。抗NKA抗体は塩類細胞を可視化するためのマーカーとしては有用であるが、NKAは淡水・海水のどちらでも機能的であるため、他の淡水特異的・海水特異的イオントランスポーターを同時に可視化する必要がある。

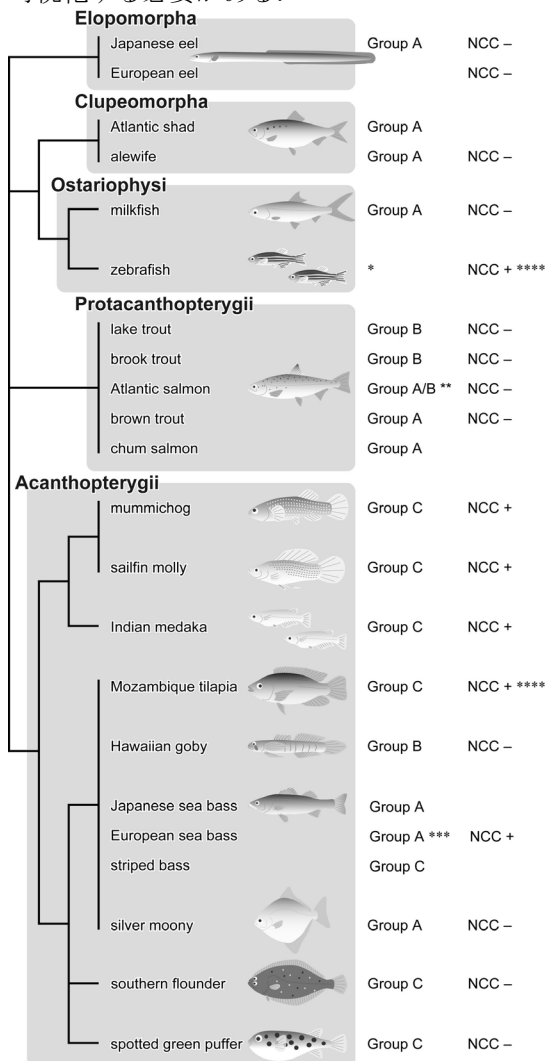


図2. 塩類細胞の機能組織学的解析に用いられた真骨魚類の系統関係。Group Aの魚種では、2次鰓弁の塩類細胞が淡水で存在するが海水で消失する。Group Bでは、2次鰓弁の塩類細胞が淡水・海水のどちらでも存在する。Group Cでは、塩類細胞は淡水・海水のどちらでも1次鰓弁にのみ存在する。NCC+の魚種では、淡水でNCC(Na⁺/Cl⁻共輸送体)陽性の塩類細胞が出現する。NCC-の魚種では、淡水でNCC陽性の塩類細胞を発見することができない。Ostariophysii(骨鰐上目、ゼブラフィッシュを含む)とAcanthopterygii(棘鰭上目、ティラピアを含む)の共通祖先がNCC(fish-specific NCC, SLC12A10)を獲得し、その後の進化の過程で魚種によりNCC

の取舍選択が進んだのか、それとも、OstariophysiiとAcanthopterygiiが独立的にNCCを獲得したのかは、興味深い問題である。Hiroi and McCormick 2012より。

研究代表者が2008年に世界に先駆けてティラピアの鰓から発見したNCC(fish-specific NCC, SLC12A10)が、真骨魚類に共通した淡水適応の機能分子であるかどうかを確認するために、淡水に馴致させたニジマスとアユの鰓からNCC遺伝子を単離しようと試みたが、成功しなかった。ニジマスとアユだけでなく、ウナギ、ニシン目ニシン科のエールワイフ、サバヒー、ミドリフグなど多くの魚種において、機能的なNCCが存在しない可能性が考えられる(図2のNCC-)。そこで、ティラピアでNCCと共に淡水適応トランスポーターであると予測されるNa⁺/H⁺交換体(NHE3)の遺伝子クローニングを行ったところ、ニジマスとアユの両者から、NHE3を単離することができた。ニジマスでは腎臓にのみ発現するNHE3aと鰓の塩類細胞にのみ発現するNHE3bが存在した。ニジマスNHE3bに対する特異抗体を作成したところ、ニジマスだけでなくタイセイヨウサケ、ウナギ、エールワイフ、ティラピアなどでも有効であった。この抗ニジマスNHE3b抗体は、真骨魚類全般で利用可能なユニバーサル抗体としての利用が期待できる。ただし、同抗体は残念ながら現時点ではアユNHE3を検出できないため、以後の研究はニジマスに集中することにした。

ニジマス(淡水・海水(20psu人工海水)・低イオン水・酸性水)の4区に馴致させ、複数のイオントランスポーターについてmRNAレベルを定量化したところ、イオン取り込み機能の亢進が期待される低イオン水区においてNHE3bのmRNAが有意に上昇することが明らかとなった。さらに、NHE3b、NKAおよびNKCC1aを同時3重免疫蛍光染色によって可視化した。その結果、ニジマスの鰓の塩類細胞は(1)NKA陽性、(2)NKA陽性、(3)NHE3b・NKA・NKCC1陽性、の3型に分類された(図3)。低イオン水区において(3)の塩類細胞は、NHE3b陽性を示すapical膜(環境水に面する細胞膜)の面積を劇的に増大させた(図3A)。よって、NHE3bのイオン取り込みにおける重要性が明らかとなった。(3)の塩類細胞は淡水・海水の両方で出現したことなどから、ティラピアのIII型・IV型塩類細胞と相同であることが示唆された。また、魚種によって若干の違いはみられたものの、他のすべての魚種においてニジマスの(3)に相当する塩類細胞が存在したため、この型の塩類細胞が真骨魚類の浸透圧調節機構において中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。

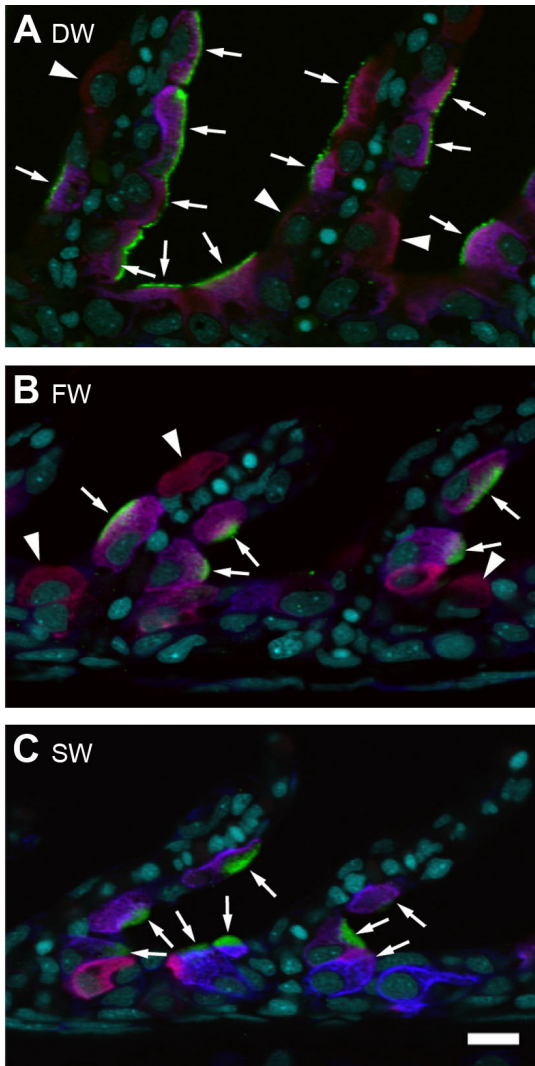


図 3. 低イオン水 (A), 淡水 (B) および海水 (C) に馴致させたニジマスの鰓の Na^+/H^+ 交換体 (NHE3b, 緑) Na^+/K^+ -ATPase (NKA, 赤), $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC1a, 青) 免疫染色写真. NHE3b 陽性の塩類細胞 (矢印) と NHE3b 陰性の塩類細胞 (矢尻) が明瞭に区別される. (C) において矢印で示した NHE3b 陽性細胞のなかには, NHE3b シグナルが見えないものがあるが, 共焦点顕微鏡でフォーカスを移動させればシグナルを確認することができる. NHE3b 陰性細胞は, さらに 2 タイプに分類できるが, この図では区別していない. スケールバーは 10 μm . Hiroi and McCormick 2012 より.

近年, 主にゼブラフィッシュを用いた実験系によって, 鰓の塩類細胞において NHE3b と Rh タンパクが協同してアンモニア依存性の Na^+ 取り込みを行うというモデルが提唱された. このモデルは, これまで化学量論的に疑問視されていた, 淡水環境における NHE3b の機能を裏付けるものである. ニジマスの Rh タンパク群から 3 種類のアイソフォームを選択し, それぞれに対する特異抗体

を作成したところ, 3 種のうち 2 種が塩類細胞の apical 膜に特異的に発現することが明らかとなった. また, これら 2 種の Rh タンパクは, NHE3b と全く同じ挙動を示したため, 上記のモデルの正当性を支持している.

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 4 件)

- ① Hiroi J and McCormick SD. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 査読有, Vol.184, 2012, 257-268. DOI:10.1016/j.resp.2012.07.019
- ② Kawaguchi M, Lavoue S, Hiroi J, Hayano H, Iuchi I, Yasumasu S and Nishida M. Remarkable consistency of exon-intron structure of hatching enzyme genes and molecular phylogenetic relationships of teleostean fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 査読有, Vol.94, 2012, 567-576. DOI:10.1007/s10641-011-9920-1
- ③ Christensen AK, Hiroi J, Schultz ET and McCormick SD. Branchial ionocyte organization and ion-transport protein expression in juvenile alewives acclimated to freshwater or seawater. *Journal of Experimental Biology*, 査読有, Vol.215, 2011, 642-652. DOI:10.1242/jeb.063057
- ④ Kawaguchi M, Hiroi J, Miya M, Nishida M, Iuchi I and Yasumasu S. Intron-loss evolution of hatching enzyme genes in Teleostei. *BMC Evolutionary Biology*, 査読有, Vol. 10, 2010, 260. DOI:10.1186/1471-2148-10-260

[学会発表] (計3件)

- ① Hiroi J. How many types of ionocytes are there in rainbow trout gills? 10th International Congress on the Biology of Fish, 2012年7月16日, Madison, WI, USA.
- ② Hiroi J. Osmoregulation & the Developmental Program. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011年6月1日, 名古屋.
- ③ 廣井準也, 水野伸也, 安増茂樹, 金子豊二. ティラピアの塩類細胞は4種類だがニ

ジマスの塩類細胞は何種類か? 平成22年度日本水産学会秋季大会, 2010年9月24日, 京都.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし