

平成30年 5月18日現在

機関番号：32663

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07243

研究課題名(和文) 広塩性オオメジロザメを用いた軟骨魚類における塩類細胞の機能とその制御機構の研究

研究課題名(英文) Ionoregulatory function of branchial ionocytes and its regulation in euryhaline bull shark

研究代表者

井ノ口 繭 (INOKUCHI, Mayu)

東洋大学・生命科学部・助教

研究者番号：90778549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨魚類の塩類細胞が浸透圧調節機構に果たす役割は未だ明らかになっていない。本研究では、広塩性のオオメジロザメを実験魚とし、鰓のイオン調節機能を検証した。その結果、CLC2が軟骨魚の鰓においてCl⁻の取込に寄与することが示唆された。また、ECaC、PMCAが鰓塩類細胞にてCa²⁺調節に関わることが示された。また、近年、軟骨魚で初めて同定されたプロラクチンの機能を解明することを目的とし、プロラクチンと受容体の組織別発現解析を行った。その結果、どちらも下垂体で発現が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of elasmobranch ionocyte in osmoregulation, we used euryhaline bull shark as experimental fish. The transcriptome analyses were performed on bull shark gills, and we focused on CLC2, ECaC, and PMCA. ECaC expression was increased after FW acclimation. The distribution of CLC2 and PMCA signals were similar to that of ionocytes. These findings indicate that CLC2, ECaC and PMCA are involved in ionoregulation in the gills. Additionally, we examine the role of prolactin in bull shark. The results showed that prolactin and its receptor is highly expressed in pituitary.

研究分野：魚類生理学

キーワード：軟骨魚類 浸透圧調節 塩類細胞 オオメジロザメ プロラクチン

1. 研究開始当初の背景

多様な塩分環境を持つ水圏に生息する魚類にとって、浸透圧調節は体液環境の恒常性維持に重要であり、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上の意義は大きい。現生魚類の大部分を占める硬骨魚では、鰓に存在する塩類細胞がイオンの調節に重要な役割を担うことが知られている。一方で、魚類を構成するもうひとつの大きなグループであり、海洋生態系の高次捕食者でもある軟骨魚類については、尿素を利用するユニークな浸透圧調節を行うことが知られているが、そのイオン調節機構については知見が少ない。

軟骨魚類のほとんどは海でしか生存できない狭塩性種であり、淡水・海水を行き来する広塩性の軟骨魚は全軟骨魚種のうちわずか2%程度である。ほとんどの軟骨魚類は海洋にのみ生息できる狭塩性魚であるのに対し、淡水・海水の両環境に適應できるオオメジロザメは、同種内で淡水適應機構・海水適應機構を比較することができるため、軟骨魚の浸透圧調節機構を明らかにするための有用なモデル生物であると言える。

(1) 硬骨魚の鰓塩類細胞にはイオンを取り込む淡水型とイオンを排出する海水型が存在し、環境水と接する頂端膜および体内側の側底膜に各種イオン輸送体が局在することでイオンを能動輸送することが知られている。先行研究により、軟骨魚の鰓にも塩類細胞様の細胞が多数存在することが知られているが、海水魚にもかかわらずイオン取込型に類似した塩類細胞を有しているなど、軟骨魚の浸透圧調節における塩類細胞の役割については未解明のままである。

(2) 近年、ゾウギンザメの全ゲノム解読が終了したことにより、最近まで軟骨魚には存在しないと考えられていたプロラクチンがゾウギンザメで同定された(Yamaguchi et al., 2015)。プロラクチンは硬骨魚では淡水適應ホルモンとして知られており、軟骨魚類においても浸透圧調節に関わる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 軟骨魚の塩類細胞はイオン輸送の駆動力として知られる Na^+/K^+ -ATPase を多く発現するという点で硬骨魚の塩類細胞と共通している。しかし、軟骨魚には尿素に依存する浸透圧調節を行うという特徴があり、塩類細胞の機能は硬骨魚とは異なることが予想される。本研究では、塩類細胞のイオン輸送モデルを確立することで、軟骨魚の浸透圧調節における塩類細胞の役割を明らかにすることを目的とした。イオン輸送機構が確立しつつある硬骨魚に加え、軟骨魚の塩類細胞の機能を明らかにすることで、魚類における塩類細胞の機能を包括的かつ進化生物学的に理解できようになることが期待される。

(2) 広塩性のオオメジロザメを用いることで、軟骨魚において初となるプロラクチンの機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 淡水、海水に馴致したオオメジロザメ鰓のトランスクリプトーム解析を行い、鰓で発現量が高かったイオン輸送体を、浸透圧調節に関わる候補遺伝子とした。候補遺伝子について淡水・海水における mRNA の発現変化を比較したのち、*in situ* hybridization 法により mRNA 発現細胞を決定した。塩類細胞で発現することが確認されたイオン輸送体については免疫組織化学染色により細胞内局在を調べた。以上の方法により、軟骨魚の塩類細胞におけるイオン輸送モデルの確立を目指した。

(2) オオメジロザメ下垂体のトランスクリプトーム解析から得られた配列をもとに、プロラクチンとその受容体の cDNA 部分配列を決定した。また、プロラクチンと受容体の組織別発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) まず血漿中に存在するイオンの大部分を占める Na^+ , Cl^- の調節に着目することとした。オオメジロザメ鰓のトランスクリプトーム解析の結果から、既に他の軟骨魚類で確認されているイオン輸送体に加え、 Na^+ , HCO_3^- 共輸送体 3、 Cl^- チャンネル 2 (CLC2)、陰イオン交換輸送体 2 が鰓で高い発現量を示した。各候補遺伝子について鰓で *in situ* hybridization を行ったところ、CLC2 のみが塩類細胞に特異的に発現する様子が観察された(図)。組織別発現解析の結果から

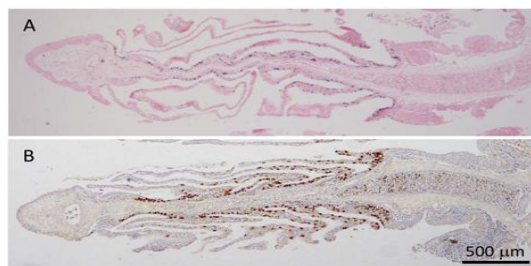


図. オオメジロザメの CLC2 mRNA シグナル

(A, 青)と塩類細胞(B, 茶色)。CLC2 は塩類細胞と類似した分布を示した。

CLC2 は鰓弁と鰓隔膜に強い発現が見られたが、淡水適應個体と海水適應個体の鰓での発現量に差は見られなかった。また隣接切片を用いた観察により、CLC2 は硬骨魚と同様に Na^+ , Cl^- 共輸送体 (NCC) と共局在している様子がみられた。ここから、CLC2 が軟骨魚類の塩類細胞において Cl^- の取込みを行っていることが示唆された。次に、支持組織の主成分でありシグナル伝達、筋肉の収縮、ホルモンの分泌など重要な働きを担う Ca^{2+} の輸

送に着目することとした。その結果、plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA), epithelial Ca^{2+} channel (ECaC)が鰹において高い発現量を示した。Real-time PCRの結果、PMCAは肝臓、ECaCは鰹において発現量は海水馴致個体に比べ淡水馴致個体で有意に増加した。この結果から、ECaCが鰹の淡水適応機構において重要であると考えられる。最後に PMCA mRNA 発現細胞を *in situ* hybridization で観察したところ、その分布が塩類細胞と似ていたことから、PMCAは塩類細胞で発現していることが示唆された。ECaCの mRNA 発現細胞については今後解析を進める。以上から、ECaC、PMCAともに鰹に発現し、 Ca^{2+} の調節に関与することが示唆された。鰹でイオン輸送を担うと考えられる遺伝子の候補が他にも存在しているため、今後はそれらの遺伝子についても解析を進め、軟骨魚類における塩類細胞のイオン輸送機構全貌の解明を目指す。

(2) オオメジロザメの下垂体トランスクリプトーム解析の結果、ゾウギンザメで同定されていたプロラクチンに加え、プロラクチン受容体も軟骨魚に存在することが初めて示された。オオメジロザメのプロラクチンとプロラクチン受容体の部分配列を決定し、組織別発現解析を行ったところ、どちらも下垂体で高く発現することが示された。プロラクチンに続き、受容体も軟骨魚で同定されたことは大きな成果である。今後はプロラクチンの機能解明にむけ、研究を進めていく。

サメやエイを含む軟骨魚類は、フカヒレや肝油を目的とした乱獲や環境変化による個体数の減少が懸念されているが、発生・成熟に多くの年数を要するため、資源量の回復が難しい。一方で、大発生による食害も社会的な問題となっている。このように、海洋生態系の頂点に立つ捕食者の個体数変動は、食物連鎖を通して生態系全体に大規模な変化をもたらすことが危惧され、軟骨魚の生理機構の解明は将来にわたって海洋生態系を維持していくために意義深い。また、軟骨魚類は現存する脊椎顎口類の中でも最も早くに分岐したグループであり、その浸透圧調節機構を明らかにすることは、脊椎動物の進化と浸透圧調節機構の関係を明らかにする足がかりとなることが期待される。

<引用文献>

Yamaguchi Y, Takagi W, Kuraku S, Moriyama S, Bell JD, Seale AP, Lerner DT, Grau EG, Hyodo, S. (2015). Discovery of conventional prolactin from the holocephalan elephant fish, *Callorhynchus milii*. *Gen Comp Endocrinol.*, **224**, 216-227.

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)

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 freshwater in Japanese seabass. *J. Exp. Biol.* **220**, 4720-4732. 査読有

DOI: 10.1242/jeb.167320

Breves JP, Keith PLK, Hunt BL, Pavlosky KK, Inokuchi M, Yamaguchi Y, Lerner DT, Seale AP, Grau EG. (2017). *clc-2c* is regulated by salinity, prolactin and extracellular osmolality in tilapia gill. *J. Mol. Endocrinol.* **59**, 391-402. 査読有

DOI: 10.1530/JME-17-0144

Breves JP, Inokuchi M, Yamaguchi Y, Seale AP, Hunt BL, Watanabe S, Lerner DT, Kaneko T, Grau EG. (2016). Hormonal regulation of aquaporin 3: opposing actions of prolactin and cortisol in tilapia gill. *J. Endocrinol.* **230**, 325-337. 査読有

DOI: 10.1530/JOE-16-0162

Miyanishi H, Inokuchi M, Nobata S, Kaneko T. (2016). Past seawater experience enhances seawater adaptability in medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Lett.* **2**, 12. 査読有

DOI: 10.1186/s40851-016-0047-2

Takabe S, Inokuchi M, Yamaguchi Y, Hyodo S. (2016). Distribution and dynamics of branchial ionocytes in houndshark reared in full-strength and diluted seawater environments. *Comp. Biochem. Physiol.* **A198**, 22-32. 査読有

DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.03.019

(学会発表)(計3件)

遠藤敬太郎・高木互・小川駿太郎・本田祐基・兵藤晋・井ノ口 蘭「トラザメ胚の発生過程における塩類細胞の分布変化」、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年3月

井ノ口 蘭「魚類の浸透圧調節における鰹塩類細胞の機能形態学的研究」、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年3月
井ノ口 蘭・高部宗一郎・今関到・原雄一郎・工樂樹洋・兵藤晋「広塩性軟骨魚オオメジロザメの鰹塩類細胞におけるイオン調節機構」、平成29年度日本水産学会春季大会、2017年3月

6. 研究組織

(1)研究代表者

井ノ口 蘭 (INOKUCHI, Mayu)

東洋大学・生命科学部・助教
研究者番号：90778549