

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2008~2009

課題番号:20780147

研究課題名(和文) 真骨魚類における淡水・海水特異的分子マーカーの同定と測定系の確立

研究課題名(英文) Identification of fresh and seawater specific molecular markers in teleosts

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): 魚類は、「塩類細胞」という特殊な細胞をつかって、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。塩類細胞の分子メカニズム(特に淡水におけるメカニズム)は近年まで謎に包まれていたが、本研究では、誰もその存在を予測できなかった新規イオントランスポーターを発見し、「魚の淡水適応の謎」を解く鍵を得ることができた。さらに、淡水適応メカニズムは魚種によって大きく異なることが明らかとなった。本研究でみいだしたイオントランスポーター群を分子マーカーとして用いれば、魚類の淡水・海水適応度をモニタリングすることが可能となる。

研究成果の概要(英文): Euryhaline fish can live in both fresh water and seawater by means of specialized “mitochondrion-rich cells (MRCs)”. Although MRCs are considered to be involved in both ion uptake in fresh water and ion secretion in seawater, the ion-uptake mechanism has been controversial for over 30 years. In this study, we identified a novel freshwater-type ion transporter in tilapia MRCs and proposed a new ion uptake model. We also found that ion uptake mechanisms vary among fish species. These findings are opening a new window for the study on fish osmo- and iono-regulation.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

サケやウナギの大回遊は多くの人の夢を誘う。これらの魚種は、川と海という浸透圧の極端に異なる環境を行き来することができるため、その浸透圧調節機構は古くから多くの生理学研究者

の興味をひいてきた。

魚類は、鰓に存在する「塩類細胞」という特殊な上皮細胞が、淡水環境では外部からイオンを取り込み、海水環境では体内に過剰となるイオンを排出することによって、浸透圧調節を行って

いる。塩類細胞の海水におけるイオンの排出メカニズムについては、過去10年間でかなりの部分が明らかにされてきたが、淡水におけるイオンの取り込みメカニズムに関しては、機能分子を特定することができず30年以上も議論が続いているのが現状であった。

研究代表者は、淡水と海水の両方に適応できるティラピア (*Oreochromis mossambicus*) の胚を実験材料として塩類細胞の研究を行ってきたが、2005年になかば偶然から、cation/Cl<sup>-</sup>共輸送体様のイオントランスポーターが淡水型の塩類細胞に発現していることを発見した (J Exp Biol 208, 2023-2036, 2005; Science 308, 1715, 2005)。Cation/Cl<sup>-</sup>共輸送体は、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>共輸送体 (NKCC) や Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>共輸送体 (NCC) をふくみ、ヒトのイオン輸送性上皮においてイオンの排出・取り込みに関与していることが知られている。そこで研究代表者は、これまでどの研究者も注目せずいわば「ノーマーク」であった cation/Cl<sup>-</sup>共輸送体が魚類の淡水型塩類細胞におけるイオン取り込みの機能分子であるとの仮説をたて、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

まず、ティラピアの淡水型塩類細胞に特異的に発現するイオントランスポーターの遺伝子を単離し、淡水型塩類細胞におけるイオン取り込みの新規モデルを確立する。次に、ティラピア胚で確立したモデルが、ティラピア成魚や他魚種で存在しているかどうかを検討し、魚類全般における浸透圧調節機構の共通性と特殊性を明らかにする。最終的には、魚類全般に共通する淡水・海水特異的塩類細胞内分子マーカーを同定し、mRNA・タンパク両レベルで簡単に検出・測定できる系を確立することをめざす。

## 3. 研究の方法

まず、淡水に適応させたティラピアの鰓から、cation/Cl<sup>-</sup>共輸送体の遺伝子クローニングを行い、淡水および海水に適応させたティラピア胚について mRNA・タンパク両レベルでの解析を行う (リアルタイムPCR, 特異抗体の作成と免疫染色)。次に、ティラピア胚から、ティラピア成魚・他魚種へと、対象を広げる。

塩類細胞におけるイオン輸送メカニズムは、複数のイオントランスポーターの共同作業によると考えられるため、mRNAレベルの解析に加えてタンパクレベルの解析 (=免疫染色による機能タンパクの細胞内局在パターン) の特定が特に重要になる。特に魚類の浸透圧調節上皮では、数タイプの塩類細胞が混在し、しかも外部環境の

イオン濃度を変化させると各タイプの細胞の挙動がいつせいに变化するため、複数のイオントランスポーターを同時並行的に解析する必要がある。同時多重免疫染色は非常に困難な技術であるが (2重染色は比較的容易であるが、3重染色以上は難易度が飛躍的に高まる)、本研究では蛍光ラベリング法を工夫し共焦点レーザー顕微鏡の機能を最大限にひきだすことにより、最大で同時5重免疫蛍光染色に挑戦する。

## 4. 研究成果

ティラピアの鰓から、まず定法であるPCRベースの遺伝子クローニング法によって、NKCC1a, NKCC1bおよびNKCC2の3種類のcation/Cl<sup>-</sup>共輸送体遺伝子を単離した。しかし、後述のmRNAレベルの解析により、淡水型塩類細胞に発現する共輸送体はこれら3種類の中には含まれていないと考えられた。そこで、手法を変更し、ヒトNKCC1に対する特異抗体を用いてcDNAライブラリーの発現スクリーニングを行った。抗体を用いた遺伝子クローニング法は現在では「古典的」と称されるが、結果として、もう1種類のcation/Cl<sup>-</sup>共輸送体、NCCを単離することができた。分子系統樹による解析から、このティラピアNCCは、既に存在が知られていたNCC (conventional NCC) とは異なるグループに属する、新規イオントランスポーター (fish-specific NCC) であることがわかった (図1)。

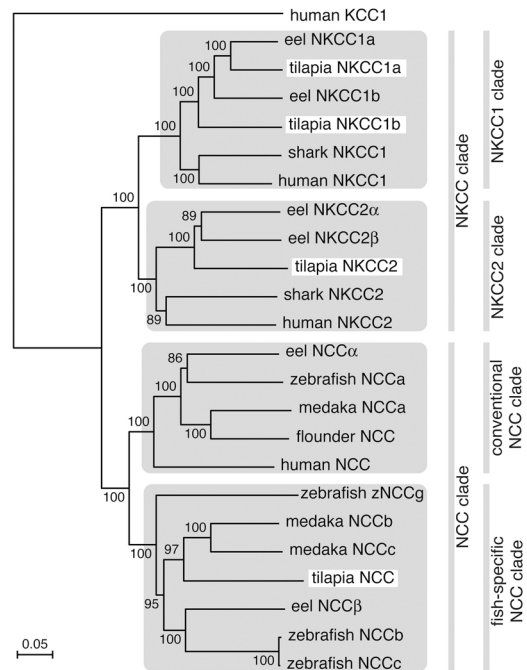


図1. ティラピアの鰓から、4種類のcation/Cl<sup>-</sup>共輸送体遺伝子 (NKCC1a, NKCC1b, NKCC2, NCC) を単離することができた。分子系統樹解析により、tilapia NCCは既に知られているNCC (conventional NCC) とは異なる新規イオントランスポーターであることがわかった。Hiroi et al., 2008より。

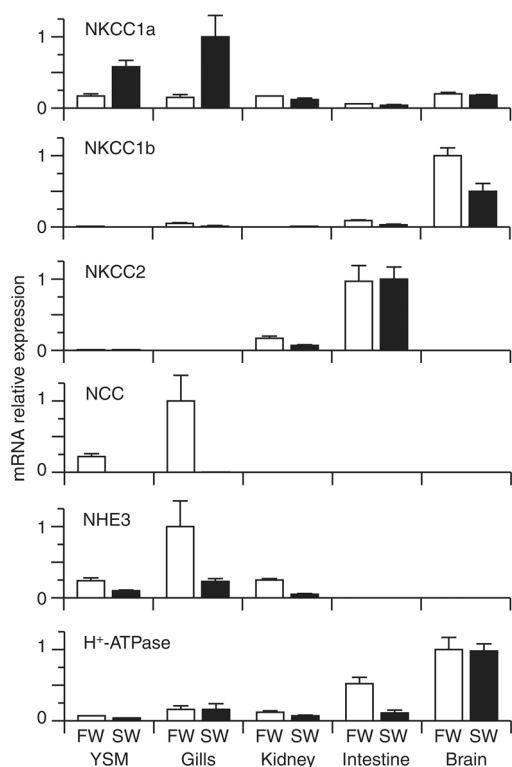


図2. ティラピアのイオントランスポーター (上よりNKCC1a, NKCC1b, NKCC2, NCC, NHE3, H<sup>+</sup>-ATPase) mRNA の組織分布. NKCC1aは海水(SW)の卵黄囊上皮(YSM)・鰓で強く発現し, NCCは淡水(FW)の卵黄囊上皮・鰓だけで発現していた. Hiroi et al., 2008より.

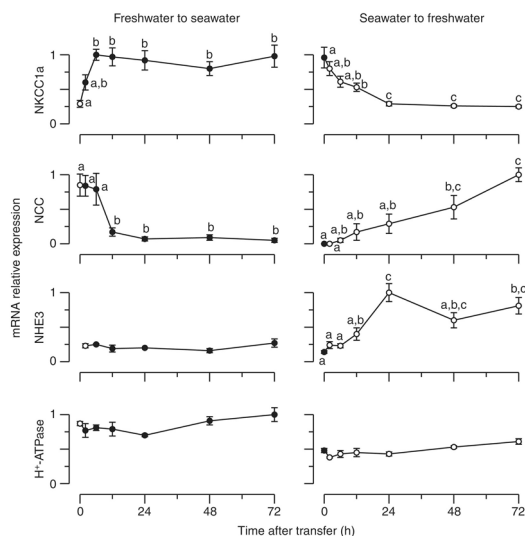


図3. ティラピア胚の淡水⇌海水移行時における, 卵黄囊上皮のイオントランスポーター (上よりNKCC1a, NCC, NHE3, H<sup>+</sup>-ATPase) mRNAの経時変化. NKCC1aは海水特異的, NCCは淡水特異的な変化をみせた. Hiroi et al., 2008より.

当時, 9種類のcation/Cl<sup>-</sup>共輸送体が同定されており (SLC12A1 ~ 9), fish-specific NCCはSLC12A10と命名されることとなった (Wang et al., 2009).

4種類のcation/Cl<sup>-</sup>共輸送体mRNAの組織分布をリアルタイムPCRで調べたところ, NKCC1aは

海水適応時の卵黄囊上皮・鰓(どちらも塩類細胞の局在部位)で強く発現し, NCCは淡水適応時の卵黄囊上皮・鰓にのみ特異的に発現していた (図2). さらに, ティラピア胚を淡水から海水, または海水から淡水へ直接移行し, 卵黄囊上皮のmRNAの経時変化をみたところ, NKCC1aは海水特異的, NCCは淡水特異的な変化をみせた (図3). これらのmRNAレベルの解析結果より, NKCC1aは海水型塩類細胞に発現するイオン排出型イオントランスポーターであり, NCCは淡水型塩類細胞に発現するイオン吸収型イオントランスポーターであると考えられた.

次に, タンパクレベルの解析に移るため, NKCC1aとNCCに対する特異抗体を作成し, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体 (NHE3), CFTR Cl<sup>-</sup> channel (CFTR)とあわせて, 同時5重免疫蛍光染色を行った. その結果, ティラピア胚の卵黄囊上皮の塩類細胞はI型~IV型の合計4種類に明瞭に分類できることがわかった (図4).

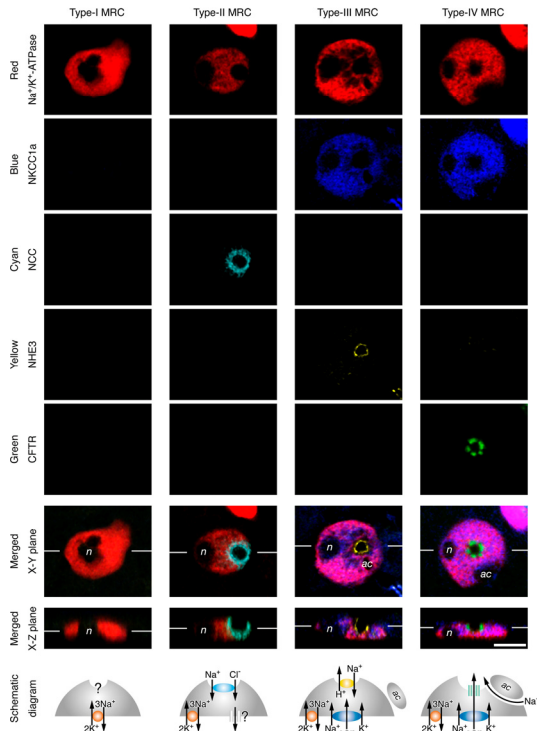


図4. 5種類のイオントランスポーター (上よりNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, NKCC1a, NCC, NHE3, CFTR) を同時5重免疫蛍光染色によって可視化すると, ティラピア胚の卵黄囊上皮の塩類細胞は合計4種類 (左よりI型, II型, III型, IV型) に明瞭に分類できた. Hiroi et al., 2008より.

II型塩類細胞の頂端細胞膜にはNCCが存在し, IV型塩類細胞の側基底細胞膜にはNKCC1aが存在していた. 淡水⇌海水移行時において, II型塩類細胞は淡水特異的, IV型塩類細胞は海水特異的な増減を示した (図5, 6). これらのタンパクレベルの解析結果は, 前述のmRNAレベルの解析結果とあわせて, NKCC1aが海水型塩類細胞に発現するイオン排出型イオントランスポー

ターであり、NCCが淡水型塩類細胞に発現するイオン吸収型イオントランスポーターであることを強く支持している。そこで、NCCを中心とする、淡水型塩類細胞によるイオン取り込みの新規モデルを構築し提唱した(図7)。このモデルは、「魚の淡水適応の謎」を解く鍵として高く評価され、掲載雑誌の表紙を飾ることとなった。原著論文の被引用数は2010年4月の時点で24回となり(Google Scholarによる)、このモデルが広く受け入れられたことを示している。

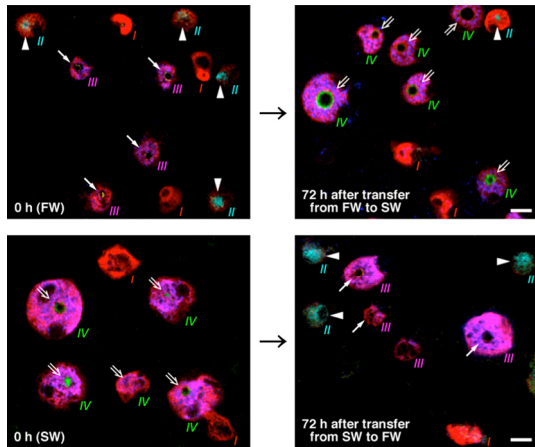


図5. ティラピア胚の淡水⇄海水移行時における、卵黄嚢上皮の塩類細胞の変化。II型細胞は淡水で出現し、IV型細胞は海水で出現した。Hiroi et al., 2008より。

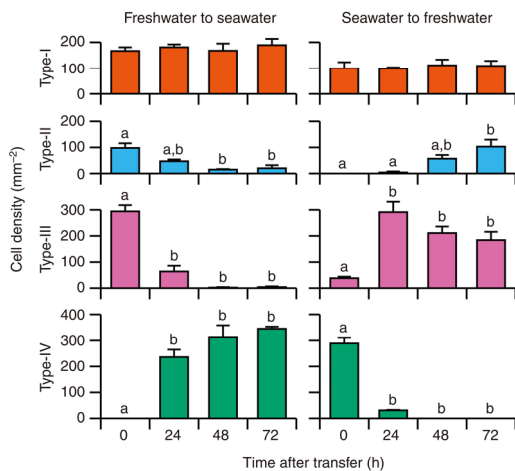


図6. ティラピア胚の淡水⇄海水移行時における、卵黄嚢上皮の4種類の塩類細胞(上よりI型~IV型)の数の経時変化。II型細胞は淡水特異的、IV型細胞は海水特異的な増減をみせた。Hiroi et al., 2008より。

新しいモデルを提唱すると同時に、従来のモデルについても検討する必要がある。そこで、従来より提唱されている、淡水型塩類細胞におけるイオン取り込みの機能分子候補であるNHE3とH<sup>+</sup>-ATPaseについても、mRNAレベルの解析を行ったところ、NHE3はNCCと同じように淡水特異的な変化をみせた(図2, 3)。また、同時5重免疫蛍光染色において、NHE3はIII型塩類細胞の頂

端細胞膜に存在することが明らかとなった(図4)。III型塩類細胞は、II型塩類細胞と同じように淡水でのみ出現する(図5, 6)。よって、NCCをもつII型塩類細胞だけでなく、NHE3をもつIII型塩類細胞も淡水でのイオンの取り込みに関与していると考えられる。NHE3すなわちNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体のイオン取り込みへの関与は最も古くから提唱されてきたものの、近年その存在が疑問視されていたため、本研究はNCCを含む新規モデルの提唱だけでなくNHE3を含む古典的モデルの再評価をすすめることとなった。なお、III型塩類細胞とIV型塩類細胞は別系統ではなく同一種の細胞であり、頂端細胞膜のイオントランスポーターがNHE3かCFTRかによって分類されるものである(図4, 5)。つまり、II型塩類細胞は単機能であるが、III型-IV型塩類細胞は機能の可塑性をそなえており、淡水ではNHE3によってイオンを取り込み、海水ではCFTRによってイオンを排出すると考えられる。

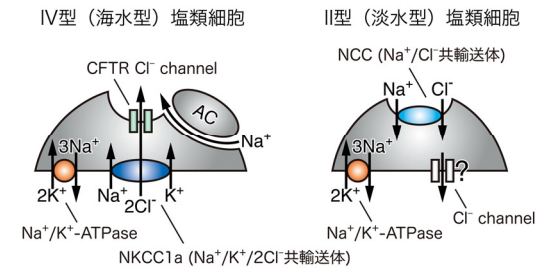


図7. 海水型塩類細胞におけるイオン排出メカニズムと、淡水型塩類細胞におけるイオン取り込みメカニズムの分子モデル。左は従来から提唱されているモデルであるが、右は研究代表者が構築した新しいモデルである。Hiroi et al., 2008より。

上記のように、ティラピアの胚の塩類細胞において、淡水適応時に強く発現するイオントランスポーター2種(NCC, NHE3)と海水適応時に強く発現するイオントランスポーター2種(CFTR, NKCC1a)を同定することに成功した。これら4種のイオントランスポーターは、淡水・海水適応度を判断するためのマーカーとして用いることが可能であると考えられる。NCCについては、その存在をティラピアの成魚の塩類細胞でも証明することができた(Inokuchi et al., 2008)。おなじくティラピアの成魚で、淡水におけるイオン取り込み機能を詳細に調べるために、Na<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>の濃度を変化させた「人工淡水」を作成し、各トランスポーターmRNAの変化をみたところ、NHE3は低Na<sup>+</sup>環境、NCCは低Cl<sup>-</sup>環境で、それぞれ強く発現したため、NHE3はNa<sup>+</sup>、NCCはCl<sup>-</sup>の取り込みに、それぞれ関与していることが示唆された(Inokuchi et al., 2009)。さらに、ゼブラフィッシュの塩類細胞でもNCCが存在すること、低Cl<sup>-</sup>環境においてNCCが強く発現すること、NCCを特異的阻害剤Metolazoneやアンチセンスモルフォリノオリゴで阻害するとCl<sup>-</sup>の取り込みが阻害されることなどが

明らかとなった(Wang et al., 2009).

NCCが、真骨魚類に共通した淡水マーカーであるかを確認するために、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。これらの魚種では機能的なNCCが存在せず、NHE3だけが機能的である可能性も考えられる。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、NHE3bは低イオン環境で強く発現することがmRNA・タンパク両レベルで明らかとなった。NHE3bは酸・塩基調節にも関与していると考えられるが、酸性環境での発現の亢進は認められなかった。また、今回作成したニジマスNHE3bに対する抗体は、ニジマスだけでなくティラピア、シャッド、タイセイヨウサケなどでも有効であったため、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。

## 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)

- ① Inokuchi M, Hiroi J, Watanabe S, Hwang PP and Kaneko T. Morphological and functional classification of ion-absorbing mitochondria-rich cells in the gills of Mozambique tilapia. *Journal of Experimental Biology*, 査読有, Vol 212, 2009, 1003-1010.
- ② Wang YF, Tseng YC, Yan JJ, Hiroi J and Hwang PP. Role of SLC12A10.2, a Na-Cl cotransporter-like protein, in a Cl uptake mechanism in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 査読有, Vol 296, 2009, R1650-1660.
- ③ Kawaguchi M, Fujita H, Yoshizaki N, Hiroi J, Okouchi H, Nagakura Y, Noda T, Watanabe S, Katayama S, Iwamuro S, Nishida M, Iuchi I and Yasumasu S. Different hatching strategies in embryos of two species, pacific herring *Clupea pallasii* and Japanese anchovy *Engraulis japonicus*, that belong to the same order Clupeiformes, and their environmental adaptation. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 査読有, Vol 312, 2009, 95-107.
- ④ 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 salinity. *Comparative Biochemistry and*

*Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 査読有, Vol 151, 2008, 151-158.

- ⑤ Hiroi J, Yasumasu S, McCormick SD, Hwang PP and Kaneko T. Evidence for an apical Na-Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 査読有, Vol 211, 2008, 2584-2599.
- ⑥ Kawaguchi M, Nakagawa M, Noda T, Yoshizaki N, Hiroi J, Nishida M, Iuchi I and Yasumasu S. Hatching enzyme of the ovoviparous black rockfish *Sebastes schlegelii* - environmental adaptation of the hatching enzyme and evolutionary aspects of formation of the pseudogene. *FEBS Journal*, 査読有, Vol 275, 2008, 2884-2898.

[学会発表] (計2件)

- ① Hiroi J. Evidence for an apical Na-Cl cotransporter involved in ion uptake in tilapia embryos. 8th International Congress on the Biology of Fish, 2008年7月30日, Portland, OR, USA.
- ② 廣井準也. 魚類の「塩類細胞」に局在する cation-chloride cotransporter. 第3回トランスポーター研究会年会, 2008年6月8日, 京都.

[図書] (計2件)

- ① 廣井準也. 魚の浸透圧調節の謎に挑む. In “稚魚学-多様な生理生態を探る” (田中克, 田川正朋, 中山耕至編), 生物研究社, 東京, 2008, pp 42-47.
- ② Kaneko T and Hiroi J. Osmo- and Iono-regulation. In “Fish Larval Physiology” (eds. R. N. Finn and B. G. Kapoor), Science Publishers, Enfield, 2008, pp 163-183.

## 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