

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20590

研究課題名(和文)トラザメの胚期に特有の塩類細胞から謎多き軟骨魚の環境適応機構を解明する

研究課題名(英文) Insight into seawater acclimation of cartilage fish from ionocytes of catshark embryo

研究代表者

井ノ口 繭 (Inokuchi, Mayu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：90778549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではトラザメ胚の塩類細胞に着目することで、軟骨魚の浸透圧調節機構の発達過程を検証した。まず、トラザメ胚での鰓の塩類細胞の分布を観察したところ、ステージ31から鰓弁上に単体の塩類細胞が存在し、体表や卵黄嚢上皮にも塩類細胞が分布した。ステージ32からは鰓隔膜に塩類細胞の集団構造が出現し、その細胞集団はtype Aの塩類細胞に似たイオン輸送体の局在を示した。また、3次元構造解析により、濾胞状の塩類細胞集団は鰓隔膜の頭部側にのみ局在する様子が観察された。この分布は、浸透圧調節器官が未発達な孵化前のトラザメが効率的に体液調節を行うのに役立っていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界のサメ類の漁獲量は増加の一途をたどり、その水揚げ量は現在では1950年の約3倍を示す。発生・成熟に多くの年数を要するサメ類が過剰な漁獲から受ける影響は大きく、資源量の回復は容易ではない。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る。軟骨魚の環境適応機構を解明する本研究は、環境変動が海洋生態系に及ぼす影響を評価すると共に生態系維持への解決策を提唱する重要な研究になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In elasmobranch fish, the ionoregulatory function of the gills is still poorly understood. The present study investigated the development of gill ionocytes in the embryo of cloudy catshark. We first observed ionocyte distribution by immunohistochemical staining with anti-Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) and anti H⁺-ATPase (V-ATPase) antibodies. The single NKA- and V-ATPase-rich ionocytes appeared in the filament from stage 31. The ionocytes on the body skin and yolk-sac membrane were immunoreactive to anti-NKA and their apical membrane is open with microvilli. Since stage 32, some NKA-rich-cell aggregates were developed on the gill septa. The ionocytes aggregates possess NKA in the basolateral membrane and NHE3 in the apical membrane. Three-dimensional analysis revealed that the distribution of ionocyte aggregate was limited to the cranial side of gill septum. Our findings indicate that ionocyte aggregates contribute efficient body fluid homeostasis regulation in the gills of catshark embryo.

研究分野：魚類生理学

キーワード：軟骨魚類 浸透圧調節 環境適応 塩類細胞 胚

1. 研究開始当初の背景

恒常性維持に重要なイオン調節機構の解明は、魚類の健全な生育を目指すうえで水産学的な意義は大きい。現生魚類の大部分を占める真骨魚では、鰓の塩類細胞がイオンの調節に最も重要な役割を担う。塩類細胞にはイオンを取込む淡水型とイオンを排出する海水型が存在する。一方、魚類を構成するもうひとつの大きなグループである軟骨魚類は、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。先行研究により、軟骨魚の鰓にも塩類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ことから、軟骨魚類において塩類細胞は酸・塩基調節に重要であると考えられている。軟骨魚のイオン排出器官としては直腸腺が知られているが、直腸腺を除去しても血漿 NaCl 濃度は若干上昇する程度であることから、鰓が NaCl を排出している可能性も捨てきれない。このように、軟骨魚類における塩類細胞の役割は未だに多くの謎が残されている。これまで軟骨魚の鰓における浸透圧調節研究には成魚が用いられることが多かった。研究が進まない原因として、鰓は多様な細胞で構成され、塩類細胞の分子機構だけを抽出して調べるのが難しい、軟骨魚はサイズが大きく、環境水の影響を飼育実験で検証するのが困難であるという2つの理由が考えられた。

申請者は軟骨魚の成魚と胚の研究を並行して進める中で、トラザメ胚の鰓で塩類細胞の集団構造が顕著に発達していることを発見した。この胚期に発達する細胞集団は塩類細胞のマーカーとして知られる Na^+/K^+ -ATPase(NKA)を強く発現しており、この細胞集団に着目することで塩類細胞の機能検証が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、トラザメ胚期に発達する塩類細胞集団を調べることで、これまで成魚を用いた実験では解明されなかった軟骨魚の環境適応機構を明らかにすることを目的とする。塩類細胞集団の機能解明には、レーザーマイクロダイセクション法による細胞の切り出しと次世代シーケンサーによる発現遺伝子の網羅的な解析を組み合わせる。また、胚のサイズが小さいというメリットを利用し飼育実験を行うことで、塩類細胞の機能を探っていく。

3. 研究の方法

本研究は3つの実験から構成される。

実験1. トラザメ胚の鰓に存在する塩類細胞の構造解析

トラザメの初期発生における鰓の発達および塩類細胞の分布を明らかにするため、トラザメ胚を発生段階ごとにサンプリングした。HE染色による鰓の形態および免疫組織化学染色による塩類細胞の分布の観察を行った。

トラザメ胚の鰓で観察された集団構造を形成する塩類細胞の微細構造を明らかにするため、透過型電子顕微鏡による観察を行った。

トラザメ胚のエラを採取し、連続切片を作製した。鰓隔膜でNKA-免疫陽性を示した細胞について3D解析を行うことで、複雑な塩類細胞集団の立体構造を明らかにした。

実験2. トラザメ胚の鰓で発達する塩類細胞集団の機能解析

トラザメ胚の塩類細胞のイオン輸送機能を明らかにするため、免疫組織化学染色を行い塩類細胞で発現するイオン輸送体の局在を調べた。

飼育実験により塩類細胞の機能を検証した。pHを変化させた環境水で飼育し、塩類細胞集団の形態・機能を調べることで、塩類細胞集団の浸透圧および酸・塩基調節機能を検討した。

軟骨魚類の塩類細胞の新たな機能を解明することを目的とし、レーザーマイクロダイセクション法を用いて塩類細胞集団を切り出した。十分なRNA量が採取できなかったため、次世代シーケンサー解析は行わなかった。

実験3. トラザメ胚の体表および卵黄囊上皮における塩類細胞の観察

トラザメ胚の体表および卵黄囊上皮に存在する塩類細胞を光学顕微鏡、蛍光顕微鏡

および走査型電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

実験1. トラザメ胚の鰓に存在する塩類細胞の構造解析

トラザメ胚の鰓の形態を観察したところ、プレハッチ後のステージ32から二次鰓弁が発達する様子が観察された。また、塩類細胞はプレハッチ前のステージ31から一次鰓弁上に観察されるようになり、ステージ32からは鰓弁にある単体の塩類細胞に加えて鰓隔膜で塩類細胞の集団構造も観察された。ここから、プレハッチ後から鰓でのイオン輸送が活発になると考えられた。

塩類細胞集団が最も発達するステージ33の胚の鰓を透過型電子顕微鏡で観察したところ、頂端膜に微絨毛を持つ細胞が開口部を共有している様子が観察された。また、細胞内にはミトコンドリアが多く観察されたことから、成魚の塩類細胞と同様の特徴が見られた(図1)。

NKAを免疫組織化学染色した連続切片を用いて3D解析を行い、塩類細胞集団の立体構造を検証した。興味深いことに、塩類細胞集団は鰓隔膜上の頭部に近い面のみ観察された。一方、鰓隔膜の尾部側の面には単体の塩類細胞のみ観察された。

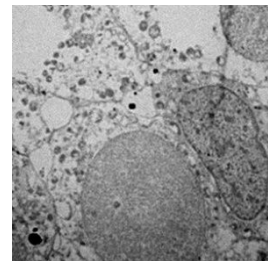


図1. 塩類細胞集団を構成する細胞。スケールバーは1 μm 。

実験2. トラザメ胚の鰓に存在する塩類細胞の機能解析

トラザメ胚の鰓に存在する塩類細胞の機能を明らかにするため、イオン輸送体の抗体を作成し、免疫組織化学染色を行った。その結果、成魚で提唱されているモデルと同様に、NKAとV-ATPaseが発現する二種類の塩類細胞がトラザメ胚の鰓でも存在することが明らかになった(図2)。また、胚期に特異的に発達した塩類細胞集団については、側底膜にNKAが頂端膜には Na^+/H^+ exchangerが局在し、海水中では H^+ 排出すなわち酸・塩基調節に関与することが示唆された。

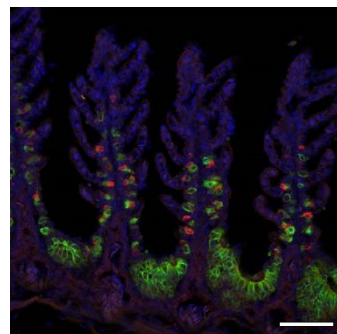


図2. トラザメ胚鰓の塩類細胞。赤はV-ATPase、緑はNKA。スケールバーは100 μm 。

塩類細胞集団の酸塩基調節機能を調べるため、pH 7, pH 8及びpH 9の海水を調整し、ステージ33のトラザメ胚を1週間飼育した。その結果、海水が塩基性になるほど、塩類細胞集団が大きく発達する様子が察された。 H^+ の排出する塩類細胞集団は環境水が酸性に傾くほど発達すると予想されたが、逆の結果になった。pH 7およびpH 9に調節した海水は、海水の強い緩衝作用により徐々にpH 8に近づいてしまったため、飼育水の調整についてはさらなる検討が必要である。

実験3. トラザメ胚の鰓以外に存在する塩類細胞

真骨魚では、鰓が未発達な胚では塩類細胞は卵黄囊上皮および体表に存在することが知られている。そこで、トラザメにおいても体表を観察したところ、鰓の二次鰓弁が発達する前のステージ31の胚で体表に塩類細胞が多く存在する様子が観察された。また走査型電子顕微鏡でトラザメ胚の体表を観察したところ、成魚の鰓と同様に塩類細胞の開口部が観察された。以上から、トラザメ胚の鰓にも成魚と同様に二種類の塩類細胞が存在し、鰓隔膜に存在する塩類細胞集団が H^+ の排出を行っていることが示唆されるとともに、軟骨魚胚の体表にも塩類細胞が分布することが示された。卵黄上皮のホルマウント免疫組織化学染色を行い、体表と同様に卵黄上皮にもNKA陽性細胞が察された。ミトコンドリアの生体染色を行った結果、卵黄上皮にミトコンドリアに富んだ細胞が観察された。以上の結果から、真骨魚と同様に、軟骨魚の鰓の発達前の胚では、卵黄囊上皮及び体表に塩類細胞が分布することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inokuchi Mayu, Yamaguchi Yoko, Moorman Benjamin P., Seale Andre P.	4. 巻 2
2. 論文標題 Age-Dependent Decline in Salinity Tolerance in a Euryhaline Fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging	6. 最初と最後の頁 675395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fragi.2021.675395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Iida Atsuo, Sano Kaori, Inokuchi Mayu, Nomura Jumpei, Suzuki Takayuki, Kuriki Mao, Sogabe Maina, Susaki Daichi, Tonosaki Kaoru, Kinoshita Tetsu, Hondo Eiichi	4. 巻 224
2. 論文標題 Cubam receptor-mediated endocytosis in hindgut-derived pseudoplacenta of a viviparous teleost <i>Xenotoca eiseni</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 242613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb.242613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Seale Lucia A., Gilman Christy L., Zavacki Ann Marie, Larsen P. Reed, Inokuchi Mayu, Breves Jason P., Seale Andre P.	4. 巻 538
2. 論文標題 Regulation of thyroid hormones and branchial iodothyronine deiodinases during freshwater acclimation in tilapia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111450 ~ 111450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2021.111450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 菅原 和宏、井ノ口 繭、金子 豊二	4. 巻 2月号
2. 論文標題 塩水浴による淡水魚のスレ対策の有効性とその応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊養殖ビジネス	6. 最初と最後の頁 13-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inokuchi Mayu, Hiroi Junya, Kaneko Toyoji	4. 巻 13
2. 論文標題 Why can Mozambique Tilapia Acclimate to Both Freshwater and Seawater? Insights From the Plasticity of Ionocyte Functions in the Euryhaline Teleost	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 914277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.914277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horie Takashi, Takagi Wataru, Aburatani Naotaka, Yamazaki Manabu, Inokuchi Mayu, Tachizawa Masaya, Okubo Kataaki, Ohtani-Kaneko Ritsuko, Tokunaga Kotaro, Wong Marty Kwok-Sing, Hyodo Susumu	4. 巻 40
2. 論文標題 Segment-Dependent Gene Expression Profiling of the Cartilaginous Fish Nephron Using Laser Microdissection for Functional Characterization of Nephron at Segment Levels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs220092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井ノ口 蘭・染谷友美子・遠藤敬太郎・神岡克典・片野 亘・小柴和子・本田祐基・小川駿太郎・高木互・兵藤晋
2. 発表標題 トラザメ胚における 鰹塩類細胞の分布変化の観察とイオン調節機能の解明
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------