

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248021

研究課題名(和文) 魚類の浸透圧調節機構の解明とその実践的展開

研究課題名(英文) Study on fish osmoregulation and its application

研究代表者

金子 豊二 (KANEKO, TOYOJI)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：70221190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円、(間接経費) 10,770,000円

研究成果の概要(和文)：魚における浸透圧調節の分子・細胞機構をより深く理解し、その成果を水産業に応用する可能性を模索した。まず、ティラピアで塩類細胞の機能の可塑性とライフサイクルを明らかにした。また、塩類細胞からのカリウム排出とその分子機構を解明するとともに、セシウムがカリウム排出機構を介して排出されることを示した。さらにティラピアとトラフグで、筋肉の細胞内浸透圧調節における遊離アミノ酸の関与を明らかにし、魚を高塩分環境に晒すことで呈味が一過的に向上する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to clarify molecular and cellular mechanisms of fish osmoregulation, and seek a possibility to apply fish osmoregulatory studies to fisheries industry. First, we clarified the functional plasticity and life cycle of gill ionocytes in tilapia. Second, gill ionocytes were demonstrated to excrete potassium, and the molecular mechanism of potassium excretion was shown in tilapia. Cesium was also secreted from gill ionocytes through the potassium-excreting mechanism. Finally, the involvement of free amino acids in intracellular osmoregulation was shown in tilapia and puffer fish. It is highly possible that temporal exposure of fish to higher salinity water causes a transient increase in intracellular amino acid concentration, resulting in a transient increase in fish meat taste.

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：浸透圧調節 ティラピア 塩類細胞 カリウム セシウム 温泉トラフグ アミノ酸輸送体 イオン輸送体

1. 研究開始当初の背景

コイやフナなどの淡水魚は海水に適応できない。アジやイワシなどの海産魚は逆に淡水では生きられない。一方でウナギやサケに代表される通し回遊魚は、一生のうちで淡水と海水の双方の環境を経験する。またティラピアなどの汽水に生息する広塩性の魚は、いつでも自由に淡水域と海水域を行き来できる。このように、水圏に適応した魚類でも塩分耐性は魚種によって驚くほど異なる。

一般に魚類は、鰓、腎臓、腸などの浸透圧調節器官の調和のとれた働きにより、生息環境の塩分濃度に関わらず、体液の浸透圧(塩分濃度)を海水のおよそ 1/3 に保っている。海水に適応している魚では、外界から体内に侵入する過剰な塩類を、鰓に存在する塩類細胞と呼ばれるイオン輸送に特化した細胞から能動的に排出することで体液浸透圧を維持している。一方、淡水中の魚では体内の塩類が体外に流出する傾向にあるが、同じ鰓の塩類細胞が逆に塩類を能動的に取込むことで、体内に塩類を保持している。研究代表者の金子のこれまでの一連の研究により、海産魚の塩類細胞は塩類の排出能をもつが取込みはできず、逆に淡水魚の塩類細胞は塩類の取込みに特化し排出はできないことが明らかとなってきた。一方で広塩性魚の塩類細胞は、環境の塩分濃度に応じてその塩類輸送の方向を逆転することができる。このことにより魚類の浸透圧調節の理解が格段に深まった。

2. 研究の目的

(1) 浸透圧調節機構の解明

本研究ではまず、浸透圧調節器官(鰓、腎臓、腸)の塩類と水の輸送を可能にする分子・細胞機構をより深く理解するとともに、それらの相互作用に着目することで、個体が多様な浸透圧環境に適応するメカニズムの解明を目指す。

(2) 浸透圧調節研究の実践的展開

基礎研究と並行して、浸透圧調節研究の成果を水産業に応用する可能性を模索する。塩分濃度を調整した環境での淡水魚や海産魚の飼育、種苗生産の効率化の可能性を実験的に実証する。

3. 研究の方法

(1) 浸透圧調節機構の解明

塩類細胞の機能可塑性とライフサイクル

まず海水に順致したティラピアを淡水に移行し、塩類細胞の経時的変化を調べた。また鰓における NCC、NHE3、CFTR および NKCC1a の淡水移行に伴う発現動態を調べた。

次に、ティラピアを海水から淡水に移行した際の塩類細胞の機能の可塑性をより詳細に検討した。既存の塩類細胞と新規に出現した塩類細胞を区別した上で各種イオン輸送タンパク質の局在を調べるため、新たに開発した「時間差蛍光多重染色法」を用いた。

塩類細胞からのカリウム/セシウム排出

まず、カリウム(K)がテトラフェニルほう酸と反応して不溶性の沈殿を形成することを利用して、鰓における K⁺排出の有無を検討した。

次に、塩類細胞に存在する K⁺排出の分子機構を解明するため、陸上動物の腎臓等で K⁺の輸送を行うことが知られる K⁺輸送体、ROMK、Maxi-K、KCC1、KCC2、KCC4 をティラピアで同定した。その後、淡水、海水、高 K⁺人工海水に馴致したティラピアの鰓で、上記遺伝子の発現量を定量した。また、K⁺排出を担う塩類細胞の型を特性するため、ROMK に特異的な抗体を作製し、鰓で免疫染色を行った。

さらに、K⁺と同じアルカリ金属に属し生体内で K⁺と類似した挙動を示すことが知られるセシウム(Cs)について、鰓の塩類細胞から排出される可能性を検討した。

(2) 浸透圧調節研究の実践的展開

体液は血漿や組織液などの細胞外液と細胞内液に分けられるが、細胞内液における浸透圧調節機構は知見が乏しい。そこで本研究では、細胞内浸透圧調節機構の解明を目的とし、ティラピアおよびトラフグの筋肉細胞を用いて実験を行った。また浸透圧が違う環境水での食味の違いも同時に検討し、浸透圧調節研究の水産業への応用を模索した。

4. 研究成果

(1) 浸透圧調節機構の解明

塩類細胞の機能可塑性とライフサイクル

海水順致魚で発現が低かった NCC は淡水移行に伴い発現が著しく増大した。NHE3 も淡水に移すと発現が増加した。一方で、海水中で高い発現を示した CFTR および NKCC1a はともに淡水中で発現が低下した(図 1)。

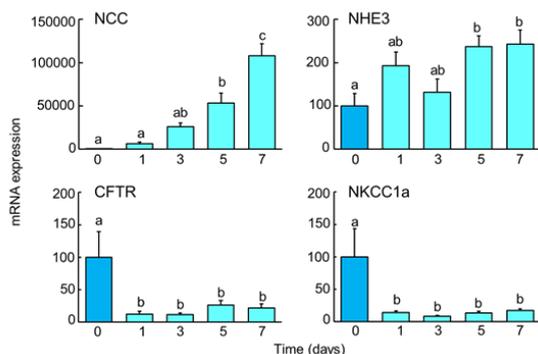


図 1 ティラピアを海水から淡水に移行した際の塩類細胞に発現する各種イオン輸送体の発現変動

海水馴致魚の塩類細胞の大部分は海水型の4型であったが、4型は淡水移行に伴い急激に減少し、逆に3型が増加した。また4型から3型への移行型(3/4型)が、淡水移行直後から頻繁に見られた。以上の結果、海水型の4型塩類細胞は3/4型を経て淡水型塩類細胞である3型に機能的・形態的に変化すると考えられる(図2)。

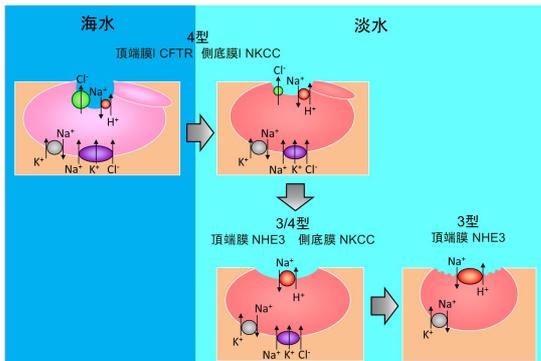


図2 ティラピアを海水から淡水に移行した際の塩類細胞の機能形態学的変化

一方、淡水移行時に出現した2型塩類細胞のうち83%が既存の細胞で、残り17%は新規に発達した細胞だった。多くの2型塩類細胞は既存の1型から分化したものと考えられる。

塩類細胞からのカリウム/セシウムの排出
海水ティラピアから切り出した直後の鰓をテトラフェニルほう酸と反応させたところ、塩類細胞の外界への開口部に顆粒状の沈殿を得た。この沈殿をエネルギー分散型X線分析に供した結果、Kを多量に含んでいることが判明し、魚類の鰓塩類細胞がK⁺を排出することが初めて明らかとなった(図3A)。

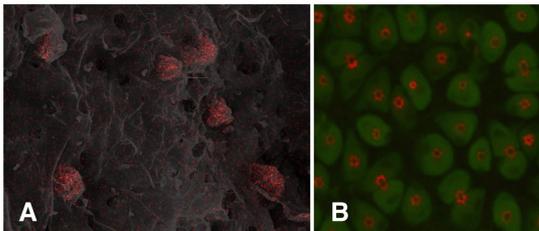


図3 A.テトラフェニルほう酸とK⁺が反応して生じた鰓表面の沈殿。赤い点はカリウムの存在を示す。B. 塩類細胞(緑)の頂端部に発現するROMK(赤)

調べたK⁺輸送体のうち、ROMKのみが環境K⁺濃度依存的に有意な発現上昇を示し、鰓でのK⁺排出に重要な役割を持つことが示唆された。さらに、ティラピアROMKに特異的な抗体をウサギで作製し、その特異性をウエスタンブロット法で確認した。この抗体を用いて、海水および淡水ティラピアの鰓で免疫染色を行ったところ、海水ティラピアでは4型塩類細胞の、淡水ティラピアでは3型塩類細胞のそれぞれ頂端膜にROMKの反応が認められた(図3B)。3型(海水型)と4型(淡水型)の

塩類細胞は機能的可塑性を有する同一の細胞であることが判明しているため、ROMKを発現する塩類細胞は3/4型塩類細胞と結論できる。

入鰓動脈からCs⁺を注入した鰓をテトラフェニルほう酸と反応させると、塩類細胞の開口部に沈殿が形成された。続いてマイクロX線分析で元素分析を行ったところ、形成された沈殿中にCsが検出され、鰓の塩類細胞からK⁺と同じようにCs⁺が排出されることが証明された。このようなCs⁺の排出は、塩類細胞に備わるK⁺排出経路を介したものと考えられる(図4)。この結果は、K⁺の排出と同様の経路で、魚体内より放射性Cs⁺が能動的に排出される可能性を示すものである。

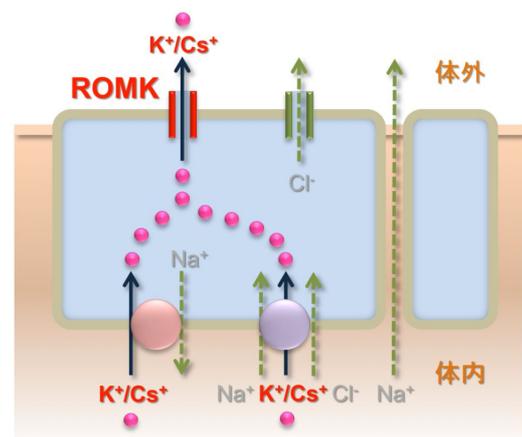


図4 塩類細胞におけるK⁺/Cs⁺排出の分子モデル

(2) 浸透圧調節研究の実践的展開 ティラピア

淡水および海水馴致ティラピアで細胞内の低分子有機物量を調べたところ、海水群で15mM高く、これは細胞外液の浸透圧差と同一であったことから細胞内では低分子有機物が浸透圧調節に寄与していることが分かった。低分子有機物の詳細を調べると特に遊離アミノ酸が重要であった。また、淡水から70%希釈海水への移行実験において、血漿浸透圧、水分含量、遊離アミノ酸量の関連を調べたところ、遊離アミノ酸の変化は血漿浸透圧と同期しており、細胞膜内外の浸透圧差をなくすため、細胞内で遊離アミノ酸量を調節していることが示唆された。またアミノ酸膜輸送体PAT1を同定し、アミノ酸供給源として細胞間に豊富にあるコラーゲンを分解し産生したアミノ酸を取り込んでいることが示唆された。食味の観点からは、海水移行後24時間でアミノ酸濃度が1.34倍、また水分含量も変化していることから呈味性、食感が異なる可能性が高い。

温泉トラフグ

次に狭塩性魚での細胞内浸透圧調節機構の検討と、それを利用した魚肉の味の最適化の可能性を探るため、1/3希釈海水と同等の浸透圧を示す温泉水で育成した「温泉トラフグ

グ」を海水に移行し、遊離アミノ酸量、血漿浸透圧および水分含量を測定した。

水分含量に顕著な変化はなかったが、移行12時間で低い傾向を示した。血漿浸透圧は移行3時間で最高値を示すと急激に減少し、移行後12時間で最低値をとり、元より少し低めの水準で安定した。これは、元来トラフグがもっている海水型塩類細胞が体液とほぼ等張な温泉水中では休止状態であり、それが海水移行に伴い体液浸透圧が急上昇することで直ちに活性化したことによると推察される。遊離アミノ酸量は移行12~24時間まで高い値を示したが、その後、元より僅かに低い水準で安定した。つまり、海水移行に伴う遊離アミノ酸量の増加は、血漿浸透圧の急激な上昇に遅れて見られた。各アミノ酸に注目すると、甘味であるグリシン、アラニンが移行12~24時間でピークを示した。

以上の結果は、1/3希釈海水に相当する温泉水で養殖したトラフグを出荷直前に高塩分の海水に晒すことで、呈味が一過的に向上する可能性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計25件)[すべて査読有]

- 1) Mekuchi, M., Watanabe, S., and Kaneko, T. (2013). Bicarbonate secreted from the pancreas contributed to the formation of Ca precipitates in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J. Exp. Zool.* 319A, 53-62. DOI: 10.1002/jez.1774
- 2) Lee, K.M., Yamada, Y., Okamura, A., Tsukamoto, K., and Kaneko, T. (2013). Hyposmoregulatory ability and ion- and water-regulatory mechanisms during leptocephalus stages of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 79, 77-86. DOI: 10.1007/s12562-012-0576-3
- 3) Teranishi, K., Mekuchi, M., and Kaneko, T. (2013). Expressions of sodium/hydrogen exchanger 3 and cation-chloride cotransporters in the kidney of Japanese eel acclimated to a wide range of salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A* 164, 333-343. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.011
- 4) Miyanishi, H., Okubo, K., Kaneko, T., and Takei, Y. (2013). Role of cardiac natriuretic peptides in seawater adaptation of medaka embryos as revealed by loss-of-function analysis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R423-R434. DOI: 10.1152/ajpregu.00384.2012
- 5) Seo, M.Y., Mekuchi, M., Teranishi, K., and Kaneko, T. (2013). Expressions of ion transporters in gill mitochondrion-rich cells in Japanese eel acclimated to a wide range of environmental salinity. *Comp. Biochem. Physiol. A* 166, 323-332. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.07.004
- 6) Furukawa, F., Watanabe, S., Kimura, S., and Kaneko, T. (2012). Potassium excretion 1 through ROMK potassium channel expressed in gill mitochondrion-rich cells of Mozambique tilapia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302, R568-R576. DOI:10.1152/ajpregu.00628.2011
- 7) Furukawa, F., Watanabe, S., and Kaneko, T. (2012). Excretion of cesium and rubidium via the branchial potassium-transporting pathway in Mozambique tilapia. *Fish. Sci.* 78, 597-602. DOI: 10.1007/s12562-012-0492-6
- 8) Inokuchi, M., and Kaneko, T. (2012). Recruitment and degeneration of mitochondrion-rich cells in the gills of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* during adaptation to a hyperosmotic environment. *Comp. Biochem. Physiol. A* 162, 245-251. DOI:10.1016/j.cbpa.2012.03.018
- 9) Choi, J.H., Lee, K.M., Inokuchi, M., and Kaneko, T. (2011). Morphofunctional modifications in gill mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia transferred from freshwater to 70% seawater, detected by dual observations of whole-mount immunocytochemistry and scanning electron microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. A* 158, 132-142. DOI:10.1016/j.cbpa.2010.09.019
- 10) Watanabe, S., Mekuchi, M., Ideuchi, H., Kim, Y. K., and Kaneko, T. (2011). Electroneutral cation-Cl⁻ cotransporters NKCC2 β and NCC β expressed in the intestine and rectum, respectively, in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 159, 427-435. DOI:10.1016/j.cbpa.2011.04.009
- 11) Mekuchi, M., Hata, T., and Kaneko, T. (2010). Mg-calcite, a carbonate mineral, constitutes Ca precipitates produced as a byproduct of osmoregulation in the intestine of seawater-acclimated Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 76, 199-205. DOI:10.1007/s12562-009-0199-5
- 12) Teranishi, K., and Kaneko, T. (2010). Spatial, cellular and intracellular localization of Na⁺/K⁺-ATPase in the sterically-disposed renal tubules of Japanese eel. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 707-719. DOI: 10.1369/jhc.2010.955492

〔学会発表〕(計42件)

1. 金子豊二:機能と形態から探る魚類生理学(平成26年度日本水産学会賞受賞講演).平成26年度日本水産学会春季大会, 函館, 2014年3月27日~31日.
2. 金子豊二:魚類におけるセシウムの動態

- を探る.第38回日本比較内分泌学会大会,宮崎市民プラザ,宮崎,2013年10月24日~26日.
3. 金子豊二:海が嫌いなキングヨの話.東京大学オープンキャンパス2013農学部コース,東京大学農学部,東京,2013年8月8日.
 4. 金子豊二:水産動物におけるセシウムの取り込みと排出.公益財団法人農学会・日本農学アカデミー共同主催シンポジウム,放射能汚染の不安に答える-水産物はどこまで安全か-,東京大学弥生講堂,東京,2013年2月24日.
 5. 金子豊二:海水魚におけるセシウムの取込みと排出.第四回放射能の農畜水産物等への影響についての研究報告会-東日本大震災に関する救援・復興に係る農学生命科学研究科の取組み-.東京大学弥生講堂・一条ホール,東京,2012年9月8日.
 6. 金子豊二:海水魚のエラからセシウムが排出される.第三回放射能の農畜水産物等への影響についての研究報告会-東日本大震災に関する救援・復興に係る農学生命科学研究科の取組み-.東京大学安田講堂,東京,2012年5月26日.
 7. 古川史也・渡辺壮一・金子豊二:ティラピア鰓における K^+ 排出機構の解明と Rb^+ , Cs^+ 輸送の検討.平成24年度日本水産学会秋季大会,長崎,2011年9月28日~10月2日.
 8. Inokuchi, M., and Kaneko, T. Differentiation and apoptosis of mitochondria-rich cells in gills of Mozambique tilapia. 8th International Congress on Comparative Physiology and Biochemistry, May 31-June 5, 2011, Nagoya, Japan.
 9. 坂本安弘・渡邊壮一・山口洋子・金子元・渡部終五・金子豊二:広塩性魚における環境浸透圧変化による筋肉中遊離アミノ酸量変動と呈味への影響.平成22年度日本水産学会秋季大会,京都,2010年9月22日~25日.
 10. 古川史也・渡辺壮一・井ノ口繭・金子豊二:酸性環境に曝露したティラピアにおける塩類細胞の応答.平成22年度日本水産学会春季大会,藤沢,2010年3月26日-30日.
 11. 崔 丁玄・李慶美・井ノ口 繭・金子豊二:ティラピアを淡水から脱イオン水に移行後した際の鰓塩類細胞の経時的变化.平成22年度日本水産学会春季大会,藤沢,2010年3月26日-30日.

〔図書〕(計4件)

- 1) Kaneko, T., Furukawa, F., and Watanabe, S. (2013). Excretion of cesium through

potassium transport pathway in the gills of a marine teleost. In "Agricultural Implications of the Fukushima Nuclear Accident" (Nakanishi, T. M. and Tanoi, K. Eds), Springer, pp. 105-118.

- 2) 会田勝美・金子豊二 編 (2013): 増補改訂版 魚類生理学の基礎,恒星社厚生閣. 265頁.
- 3) 金子豊二 (2012): ウナギの塩分濃度適応戦略,ウナギの博物誌(黒木真理 編著),化学同人,75-94頁.
- 4) 金子豊二 (2012):「最新 水産ハンドブック」,講談社サイエンティフィク,43-48頁.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 豊二 (KANeko, Toyoji)
 東京大学・農学生命科学研究科・教授
 研究者番号:70221190

(3) 連携研究者

李 慶美 (LEE, Kyung Mi)
 東京大学・農学生命科学研究科・特任
 研究員
 研究者番号:30507885
 (平成22年~23年)

渡邊 壮一 (WATANABE, Soichi)
 東京大学・農学生命科学研究科・助教
 研究者番号:20507884