

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23657054

研究課題名（和文） 鰾（うきぶくろ）ガス充填を担う酸素ガスチャネルの同定

研究課題名（英文） Identification of oxygen gas channels involved in gas secretion into the swimbladder

研究代表者

加藤 明 (KATO AKIRA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：40311336

研究成果の概要（和文）：魚の鰾（うきぶくろ，浮き袋）は水深数百メートルの高水圧下でも内腔に酸素ガスを充填して膨らむことができる。鰾内壁はグルコースを活発に代謝して血液を酸性化し，血中酸素を取り込んで内腔側に分泌する。トラフゲノムデータベースを利用した鰾の遺伝子発現解析の結果，鰾内壁の血液を局所的に酸性に維持する分子機構を明らかにし，また鰾が熱をガス充填に利用する発熱器官である可能性を見出した。さらにガス充填を担う酸素ガスチャネルの候補遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：The gas in the swimbladder of teleost fish is composed primarily of O<sub>2</sub>, and the swimbladder volume is regulated by O<sub>2</sub> transfer between the luminal space of the swimbladder and the blood. In the swimbladder, lactic acid generation by anaerobic glycolysis in the gas gland epithelial cells and its recycling through the rete mirabile bundles of countercurrent capillaries are essential for local blood acidification and oxygen liberation from hemoglobin by the “Root effect.” To identify genes involved in the local blood acidification, we analyzed the swimbladder of fugu (*Takifugu rubripes*) by genome database mining, expression analyses, and immunohistochemistry. Gas gland cells contained glycogen, GAPDH, and a gluconeogenesis enzyme FBP1 at high levels, suggesting that a futile cycle consumes ATP and generates heat. In basolateral membrane of gas gland cells, GLUT6 and a cinnamate-insensitive low-affinity/high-conductance lactic acid transporter MCT4b were highly expressed and may mediate glucose uptake and lactic acid secretion, respectively. A cinnamate-sensitive high-affinity lactic acid transporter MCT1b was highly expressed in arterial, but not venous, capillary endothelial cells in rete mirabile and may mediate recycling of lactic acid in rete mirabile. Two aquaporins were expressed in apical membrane of gas gland cells, and may mediate O<sub>2</sub> secretion as gas channels. These results provide new insights for how swimbladder secretes O<sub>2</sub> and inflates under water pressure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：ガスチャネル，アクアポリン，鰾，フグゲノム，乳酸輸送体，グルコース輸送体，ガス腺細胞，奇網

## 1. 研究開始当初の背景

魚の筋肉や骨格は淡水や海水より比重が大きい。そこで多くの真骨魚は鰾(うきぶくろ)に気体を蓄えて浮力を維持し、遊泳時の運動量を最小限に節約する。口から取り込んだ空気を鰾に蓄えることができる(開鰾)魚と完全に閉じた鰾(閉鰾)を持つ魚とがあり、水面から遠く深い水深に棲む魚はエラから取り込んだ酸素を鰾の内壁から分泌するため、鰾の内腔に含まれるガスのほとんどは酸素である。水深 1000 m では水圧は 100 気圧、鰾内の酸素分圧は 90 気圧にも達するが、鰾の内壁はその状況下でも酸素ガスを分泌することができる(鰾以外では血液の酸素分圧は 0.2 気圧ほど)。

高水圧下で酸素ガスを分泌する仕組みは、生理学、組織学、及び生化学的な解析により、魚の血液、鰾内壁、血管に見られる3つの特徴によりこれまで説明されてきた。1つ目の特徴は、魚の赤血球に含まれるヘモグロビンが pH の低下に対して非常に敏感に酸素を放出する性質であり、しかもどんなに高酸素濃度の下でも酸素を遊離できる点が哺乳動物とは異なっている。この性質は Root 効果と呼ばれている。2つ目の性質は鰾の薄い膜の腹側の内腔を覆う上皮細胞(ガス腺細胞, 図1)に隠されている。「ガスを分泌する細胞」という意味でガス腺細胞と名付けられたこの細胞は活発に血糖(グルコース)を取り込んで嫌氣的解糖を行い、乳酸を産生・分泌して鰾膜内の血液を pH 7.0~6.5 にまで酸性化してヘモグロビンから酸素を放出させる。3つ目の性質としては、鰾内壁を流れる血液と体循環とを繋ぐ血管が奇網(きもう)と呼ばれる対向流を形成している点が挙げられる。鰾の奇網は数十から数百の毛細血管の束からなり、動脈と静脈が交互に並んで対向流を成す。奇網では動脈が静脈から乳酸や酸素を回収するため、乳酸や遊離した酸素が体全体に流れ出してしまおうのを防ぎ、鰾の血液が局所的に高酸素・低 pH 状態になるのを維持している。

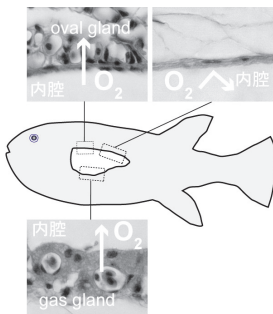


図1 鰾(うきぶくろ)における酸素ガスの移動。

生体内ではガス( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$  など)は脂質二重膜を容易に通過し、チャネルなどの膜タンパク質は関与しないとこれまで考えられてきた。近年 Rh 血液型抗原 (Rh glycoprotein) やアクアポリンが  $CO_2$  や  $NH_3$  チャネルとして働くことが分かり、ガスチャネルの生理学的役割が議論されている(図2)。魚類の鰾は主に  $O_2$  ガスを充填しているが、 $O_2$  分泌を担うガス腺細胞 (gas gland cell) に特異的に発現する  $O_2$  ガスチャネルの存在が強く示唆される。すなわち鰾は  $O_2$  ガスチャネルを同定するのにこの上なく有利な実験材料である。そこで魚類の鰾を用いたガスチャネル解析の着想を得た。

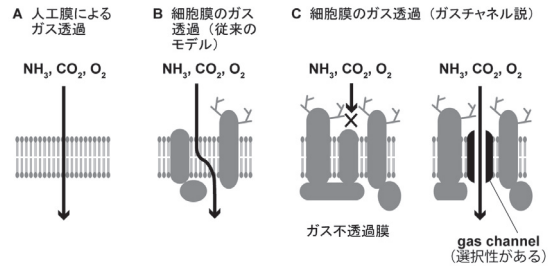


図2 ガスの膜透過モデル。

## 2. 研究の目的

鰾の酸素分泌に関わる分子機構を遺伝子レベルで解析するとともに、 $O_2$  ガスチャネルの同定を試みた。

## 3. 研究の方法

モデル生物としてトラフグを用いた。トラフグの鰾はこれまでほとんど研究の対象とされてこなかったが、解剖学的・組織学的な解析を行った結果、非常に発達した閉鰾を有していることが観察された。トラフグが水深 100~200 m にも棲息することからも、高水圧下における酸素分泌モデルとして適すると判断された。トラフグを用いた最大の理由はゲノム配列が公開されている点にある。トラフグのゲノムサイズはヒトの約 1/8 のためゲノム研究の良いモデルとされ、2002 年に脊椎動物ではヒトに次いで 2 番目にゲノム配列が解読された。トラフグゲノムデータベースを利用することで、網羅的な遺伝子発現解析を短時間で実現できる。そこで(1)ゲノムデータベース検索による遺伝子ファミリーの網羅的同定、(2)分子系統解析およびシンテニー解析による遺伝子間系統関係の決定、(3)RT-PCR による組織分布の解析、(4)in situ hybridization による発現細胞の特定、(5)免疫組織化学による細胞内局在部位の同定、及び(6) *Xenopus* oocyte の発現系を用いた電気生理学的な解析による活性測定を行った。

#### 4. 研究成果

トラフグはゲノム中に 16 のアクアポリン遺伝子と 7 つの Rh glycoprotein 遺伝子を有している。RT-PCR 及び in situ hybridization による網羅的な発現解析の結果、2 種のアクアポリン遺伝子が鰾ガス腺細胞に高発現することを見出した。これらアクアポリンに対する特異的抗体を作製して免疫組織染色を行ったところ、アクアポリンがガス腺細胞の管腔側に発現していることを突き止めた。鰾管腔に存在するガスの主要成分は酸素であることから、同定した 2 種のアクアポリンが酸素ガスチャネルである可能性が期待される。現在、電子顕微鏡を用いた詳細な細胞内分布の解析を進めている。また *Xenopus* oocyte の発現系を構築し、今後 O<sub>2</sub> ガス透過性を評価する予定である(未発表)。体内の酸素運搬およびその効果的な分配は、高等動物の最も重要な適応戦略の一つである。近年、細胞・臓器の低酸素応答や、呼吸を担うミトコンドリアの機能制御、血管新生などの分子機構に関する研究が盛んに行われ、酸素の戦略的利用や病態におけるその破綻が分子レベルで理解されつつある。酸素チャネルの同定により体内の戦略的な酸素分配ならびにエネルギー代謝への理解が高まることが期待され、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病の理解に繋がることも期待される。

鰾の局所的な血液酸性化機構を明らかにするために、乳酸輸送経路の解析を行った。細胞膜の乳酸輸送を担う輸送体には、H<sup>+</sup>/乳酸イオン共輸送体(H<sup>+</sup>/monocarboxylate transporter, MCT)と Na<sup>+</sup>/乳酸イオン共輸送体(Na<sup>+</sup>/monocarboxylate transporters, SMCT)が存在する。トラフグゲノムデータベースを解析した結果、フグゲノム中には 17 の MCT と 2 つの SMCT の関連遺伝子が存在していた。鰾におけるそれら全ての遺伝子発現を調べたところ、2 種類の乳酸輸送体(MCT4b, MCT1b)がそれぞれガス腺細胞による乳酸分泌と奇網の毛細血管による乳酸回収を担っていることを見出した(Umezawa et al. PLoS ONE 2012)。また同様の手法でガス腺細胞による活発なグルコースの取り込みを担うグルコース輸送体遺伝子 2 種(GLUT1a, GLUT6)を同定した(Munakata et al. BBRC 2012)。アフリカツメガエル卵母細胞にトラフグ MCT4b, MCT1b を発現させたところ、培地に乳酸を加えた時に細胞内 pH が大きく低下したことから、実際に H<sup>+</sup>/乳酸イオン共輸送活性を有することが確認された。

明かとなったグルコースと乳酸の輸送経路を図 3 に示す。血中のグルコースはガス

腺細胞に発現する GLUT (GLUT1a 及び GLUT6) により細胞内に取り込まれ、嫌気的解糖により乳酸に変換される。生じた乳酸は細胞膜上の MCT4b を介して血中に分泌され、血液を酸性化する。乳酸はそのまま静脈へと移動するが、奇網で動脈血に移動して鰾に戻る。鰾内の毛細血管や奇網の静脈性内皮細胞では血管が leaky なため、グルコースや乳酸は血管内皮細胞の隙間を自由に通過する。一方、奇網内の動脈性内皮細胞においては細胞間の tight junction がしっかりしていて多くの物質は自由に血管壁を透過できない。MCT1b がこの血管に発現することで、乳酸の選択的な透過を担っている。これらの成果は、奇網内の動脈性内皮細胞が強いバリアーを形成し、乳酸など決まった物質だけを透過することの重要性を明るみに出した。奇網内の動脈性内皮細胞は肥厚しており、組織学的にも通常の血管内皮細胞と明らかに形態が異なる。もし仮に動脈性内皮細胞も他の内皮細胞と同様に leaky だとしたら、グルコースが動脈から静脈に漏れてしまうためにガス腺細胞にグルコースを届ける事ができなくなってしまう。動脈性内皮細胞のバリアーはグルコースの漏洩を防いで確実にガス腺細胞にグルコースを届け、同時に乳酸を選択的に回収する優れた特性を有していることが明らかとなった(Umezawa et al. PLoS ONE 2012)。

鰾における遺伝子発現解析の過程で、非常に興味深いことを発見した。ガス腺細胞が fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1) という酵素を非常に大量に発現していたのである。FBP1 は解糖系の逆反応、すなわち糖新生の酵素である。通常は肝臓で乳酸やアミノ酸からグルコースを合成(糖新生)するとき活躍する酵素である。糖新生にはミトコンドリアが必用なため、ミトコンドリアのほとんど無いガス腺細胞で糖新生が起きることは考えにくい。それでは FBP1 はガス腺細胞内で何をしているのであろうか？ FBP1 の糖新生以外の役割として、マルハナバチの体温保持が知られている。飛行時に羽根を動かす筋肉(飛翔筋)は低い温度では十分な力を発揮できないため、マルハナバチは体温を常に 35~40°C に維持している。花にとまって蜜を集める時に羽根を止めると体温が下がってしまい、すぐに飛び立てなくなる。それを防いでいるのが FBP1 であるとされている。解糖と FBP1 が同時に細胞内で働くと代謝の空回り(無益回路, futile cycle)が生じて ATP が無駄に消費され、熱を生じる。飛翔筋を休めている時に無益回路が体温低下を防ぐため、マルハナバチは羽根を止めて蜜を集めた後でもウォームアップ無しに瞬時に飛び立ち、次の花

に移動できる。ちなみに哺乳動物の肝臓には解糖と糖新生が同時に働かないようにする交通整理役の仕組みが存在するため、ハチの飛翔筋の様な無益回路による発熱は起きない。魚のガス腺細胞でもマルハナバチの飛翔筋と同様に、FBP1 と解糖系が無益回路を形成して発熱している可能性が考えられる(図3)。ガス腺細胞では無益回路による発熱は2つの大きなメリットがある。1つ目のメリットはATPの消費である。乳酸を大量に産生するために生じたATPはガス腺細胞では副産物的な邪魔な存在であり、無益回路でATPを簡単に消費して熱に換えてしまえるメリットは大きい。結果としてATPの蓄積による解糖系の阻害を回避でき、必用に応じていくらかでも乳酸を産生することができる。2つ目のメリットは熱が酸素の溶解度を局所的に低下させ、ガス放出を促す点である。鰾内壁では高い酸素分圧が維持されているが、内腔表面で局所的に酸素の溶解度を下げればガスの放出を促進できる。ガス溶解度を下げるためには、溶質の濃度を高めるか温度を上げるかのどちらかが有効である。ガス腺細胞周辺では乳酸濃度が高いことから、高い乳酸濃度がガス溶解度を低下させる可能性がこれまで指摘されてきた。鰾における無益回路の発見により、「熱」もガス溶解度の低下に寄与する可能性が強く示唆された(Munakata et al. BBRC 2012)。鰾の薄い膜に隠された酸素を蓄える巧妙な仕組みの研究は一世紀の歴史を有するが、遺伝子レベルでの理解はあまり進んでいない。本研究の成果は鰾の分子生理学の大きな前進であり、魚類生理学の教科書を更新する発見である。

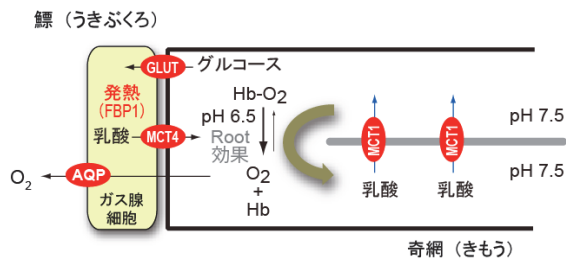


図3 鰾の酸素分泌機構。赤で示した部分は本研究で明らかになった知見である。

## 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2件)

- ① Umezawa T, Kato A<sup>#</sup>, Ogoshi M, Ookata K, Doi H, Romero MF, and Hirose S. (<sup>#</sup>corresponding author) O<sub>2</sub>-filled swimbladder employs monocarboxylate transporters for the generation of O<sub>2</sub> by lactate-induced Root effect hemoglobin. *PLoS ONE* 7(4): e34579 doi:10.1371/journal.pone.0034579
- ② Munakata K, Ookata K, Doi H, Baba O, Terashima T, Hirose S, Kato A<sup>#</sup>. (2012) (<sup>#</sup>corresponding author) Histological demonstration of glucose transporters, fructose-1,6-bisphosphatase, and glycogen in gas gland cells of the swimbladder: is a metabolic futile cycle operating? *Biochem Biophys Res Commun* 417: 564-9 doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.006

[学会発表](計2件)

- ① 宗像 啓司郎, 大方 香代子, 馬場 麻人, 土井 啓行, 広瀬 茂久, 加藤 明  
A metabolic futile cycle is operating in gas gland cells of fugu swimbladder 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, パシフィコ横浜
- ② 加藤 明, Islam Zinia, 梅澤 誉広, 御輿 真穂, 林 菜穂子, 土井 啓行, Min-Hwang Chang, Michael F. Romero, 広瀬 茂久  
海水魚腎臓の Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 排出を担うイオン輸送体および鰾(うきぶくろ)の酸素ガス充填を担う乳酸輸送体の解析  
第6回トランスポーター研究会年会, 2011年6月11日, 東北大学(仙台)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.hirose.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 明 (KATO AKIRA)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
助教  
研究者番号:40311336

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

広瀬 茂久 (SHIGEHISA HIROSE)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
教授  
研究者番号:10134199