

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24657085

研究課題名（和文） 魚の浮き袋に隠された代謝トリックの解明

研究課題名（英文） A metabolic futile cycle is operating in gas gland cells of the swimbladder.

研究代表者

広瀬 茂久 (Hirose Shigehisa)

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

研究成果の概要(和文):魚類の浮き袋のガス腺と対向流血管系に発現する乳酸輸送体を同定し、乳酸の回収とグルコースの送達が効率よく行われるための仕組みを解明した。さらに、ガス腺細胞に予想外の酵素 (Fbp: Fructose bisphosphatase) が特異的に高発現していることから、代謝の空転サイクルが作動していることを明らかにした。解糖系の一部を空回りさせることによって熱を発生させ、浮き袋内にガスを閉じ込めやすくしているという驚くべき仕組みを解明した。

研究成果の概要(英文): H⁺/monocarboxylate transporters MCT1b and MCT4b were found to be highly expressed in the fugu swimbladder. Immunohistochemical analyses of metabolic enzymes demonstrated that a gluconeogenesis enzyme fructose-1,6-bisphosphatase (Fbp1) and a glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) are highly expressed in gas gland cells. The simultaneous catalyses of glycolysis and gluconeogenesis reactions suggest the presence of a futile cycle in gas gland cells to maintain the levels of ATP low and to generate heat that helps reduce the solubility of O₂.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学機能生物化学

キーワード：酵素の調節・代謝調節・ルート効果ヘモグロビン・解糖系・乳酸輸送体・Fructose bisphosphatase・空転サイクル・熱発生

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚の浮き袋に関する研究は 150 年以上にわたる歴史を有し、当初は Nature や Science で取り上げられるホットな領域であったが、形態学や発生学や生理学的研究が一段落したあとは、忘れ去られた領域となっており、現在では研究者もほとんどいない。これまでの研究で明らかになったことは、①浮き袋は肺の相同器官であること、②浮き袋を膨らませている気体は酸素であること、③酸素は魚類に特徴的なヘモグロビンで運ばれてきて、ガ

ス腺近傍でヘモグロビンから遊離し浮き袋に集積すること、④このヘモグロビンは酸性下で酸素を遊離するという特異的な性質を有することなどである。浮き袋を持った魚に特異的なヘモグロビンは、発見者の名前にちなんで Root-effect hemoglobin (Hb) と呼ばれている。Root-effect Hb に関しては、酸性下で劇的に性質が変化する分子基盤も解明されている。⑤浮き袋のガス腺は、形態学的にも注目すべき構造をしている。すなわち、内腔に面したガス腺細胞層とそこに血液を送り込む対向

流 血管系 (Countercurrent system) からなっている (図 1)。

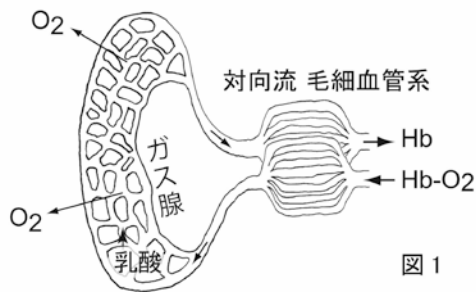


図 1

(2) 最も重要な酸性化の仕組みが分子レベルで解明されていないことに驚いた私たちは、分子生物学的な手法を駆使して、この重要課題に挑むことにした。まずゲノム情報が入手可能なフグを用いてガス腺細胞における代謝系酵素の発現を RT-PCR と *In situ* hybridization で網羅的に解析したところ、解糖系の酵素群が多量に発現し、乳酸の生産に特化した細胞であることが明らかになった。

(3) 過去の研究では、ガス腺細胞から V-ATPase 等によってプロトン (H^+) が周囲の血管に分泌され、血液の pH を下げることにより、Root-effect Hb から O_2 が遊離すると考えられていた。しかしガス腺細胞にはミトコンドリアが極端に少なく、エネルギー的に V-ATPase の駆動は難しいのではないかと考えた私たちは、乳酸そのものが分泌され酸性化に寄与していると仮定して、乳酸輸送体の有無を調べたところ、予想が的中し、ガス腺細胞に多量に発現していることが明らかになり、本研究の基盤を築くことができた。

2. 研究の目的

魚の浮き袋 (鰾) 中の気体が酸素であることはあまり知られていない。私たちは、この酸素発生の仕組みを分子レベルで解明するために、浮き袋の内面にパッチ状に存在するガス腺細胞の代謝過程の解析に着手した。驚いたことにガス腺細胞にはほとんどミトコンドリアが存在せず、解糖系が高度に発達し、乳酸を多量に作っていることが明らかになった。本研究では、この乳酸が酸素発生にいかに関与しているかを明らかにするとともに、解糖系の効率を極限まで高め、かつ酸素の浮き袋内への閉じ込めに寄与する巧妙な代謝の仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

ゲノム情報が入手可能で、浮き袋が比較的大きく組織切片等が作り易いフグを用いた。cDNA クローニング、*In situ* ハイブリダイゼーション、抗体染色、電気生理学的解析等は

通常の方法に従った。

4. 研究成果

(1) ガス腺細胞での糖代謝の出発点となるグルコースの取り込みを行う輸送体の特定



図 2. フグの浮き袋 (鰾) とその微細構造

まず、グルコースを細胞内へ取り込むための輸送体の同定を試みた。トラフグのゲノム上に 22 の glucose transporter (*glut*) 遺伝子と 7 つの Na^+ -dependent glucose transporter (*sglt*) 遺伝子が存在することを同定し、RT-PCR 法や組織染色法を駆使した結果、*Glut1a* と *Glut6* の 2 つのグルコース輸送体がガス腺細胞でのグルコースの取り込みを担っている可能性が高いことが明らかになった。

(2) ガス腺細胞内でのグルコースの代謝

次に、ガス腺細胞内でのグルコースの代謝について解析を進めた。免疫組織染色を用いた解析より、解糖経路の代表的な酵素である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) がガス腺細胞で高発現しておりグルコースの解糖が活発に行われていることが確認された。一方、トラフグの鰾では解糖と逆の経路である糖新生の経路で働く酵素 fructose-1,6-bisphosphatase (*Fbp*) 1a が活発に働いていることを突き止めた。解糖と糖新生という相反する代謝経路が同時に働くことは不思議に思えるが、過去にはマルハナバチの飛行筋において解糖経路で働く酵素 phosphofructokinase (*Pfk*) と *Fbp* が基質をやり取りする形で ATP を加水分解し、熱を発生させ筋肉を加温するという報告があり、トラフグの鰾でもこのユニークな代謝経路を利用して熱を発生させている可能性が高い。ATP を加水分解することで熱を産生し、血液中の酸素溶解度を低下させ鰾内部への酸素の分泌を有利にするとともに、ガス腺細胞内の ATP

濃度を低く保つことで解糖経路を円滑に進行させるために、この相反する酵素反応が同時に行われていることを明らかにしたことは生理学上意義のある発見といえよう。

(3). 代謝産物である乳酸の排出を担う輸送体の特定

解糖によるグルコースの代謝産物である乳酸を血液中に排出するための輸送体を同定するために *In situ hybridization* 及び免疫組織染色法を用いた解析を行い、乳酸輸送体として知られる H^+ -monocarboxylate cotransporter (*mct*) 遺伝子群の中で *Mct4b* がガス腺細胞内で毛細血管と接する基底膜付近に局在していることを突き止めた。このことから、ガス腺細胞内で生じた乳酸は乳酸輸送体 *Mct4b* を通じて血中へと排出され、ガス腺細胞近辺の血液を酸性化しヘモグロビンからの酸素の解離を促していることが明らかになった。

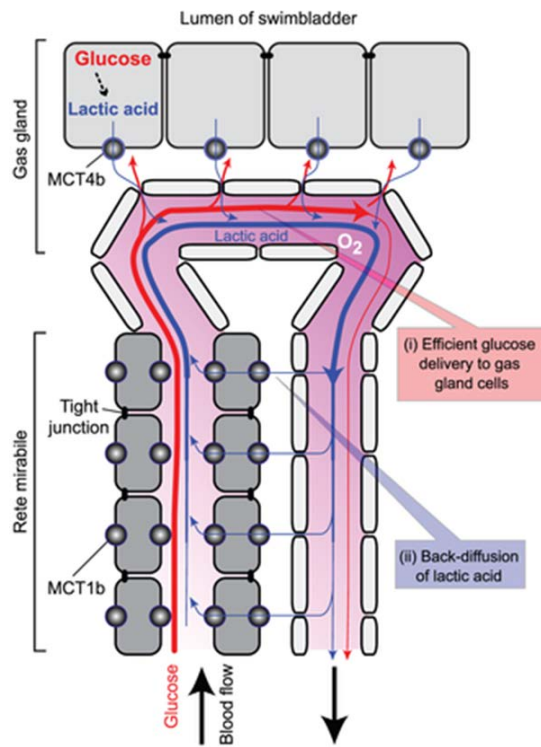


図3. 乳酸輸送体 *Mct4b*, *Mct1b* の局在部位と役割

以上の結果に基づいて、鰾のガス腺と対向流系 (Rete mirabile) で起きている現象を分子生理学的に分り易く説明すると以下ようになる。**①** 魚類の多くは肺の相同器官である浮き袋をもっている。私たちの肺と同じように食道経由で外界につながった浮き袋もあるが、大部分は発生の途中段階で食道との

連絡は途切れ独立の袋として存在する。しかも中の気体のほとんどは O_2 である。この O_2 はどこからくるのかはミステリーだったが、Root [Science 1931] によって、ヘモグロビン由来であることが明らかにされた。浮き袋をもった魚類のヘモグロビンは特殊で、酸性下で O_2 を遊離する性質を有する。この種のヘモグロビンは発見者にちなんで、**Root effect hemoglobin** と呼ばれている。浮き袋の内腔に面するガス腺 (赤体) では、解糖系によって盛んに乳酸が作られ、これが血液中に分泌されて pH が下がると赤血球中のヘモグロビンから強制的に O_2 が遊離し、酸素分圧が上昇して浮き袋に注入される仕組みになっている。この pH 低下がガス腺近傍のみで起こり、全身をめぐる血液に影響しないように、ガス腺への入口と出口の血管は絡まりあって対向流系 (Counter-current system, Rete mirabile) を形成し、効率よく乳酸や O_2 等を回収している。このリサイクルの仕組みを分子レベルで明らかにするとともに、ガス腺に動力源ともいべきグルコースを効率よく届けるための仕組みも対向流系に隠されていることを明らかにした。

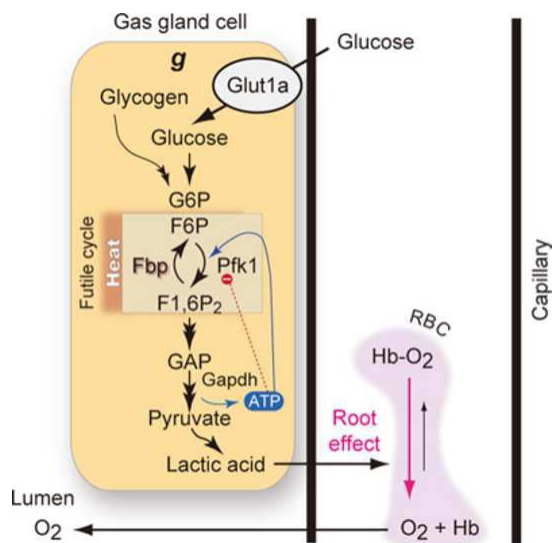


図4. ガス腺細胞における代謝の空転サイクルとその生理的意義

② ガス腺細胞は特殊な機能分化をし、ほとんどミトコンドリアを持たず、グルコースから乳酸 Lactate を作ることに特化した細胞だとすると、途中の解糖系で生成する ATP を消費する系がないと ATP が細胞内に蓄積し、解糖系にフィードバック阻害をか

けてしまうので、乳酸を大量に作り供給することができなくなり困るのではないかという問題に気付いた。ATPの消費系として空転サイクル (Futile cycle) が組み込まれていれば、継続的に乳酸を供給できるのみならず、局所的に熱が発生し、O₂の溶解度を下げることにより、間接的に酸素分圧をあげることにも貢献できる。一石二鳥の代謝戦略だと考えて、空転サイクルに関わる代謝酵素を調べてみた。予想通りの結果で、ミツバチが天敵のスズメバチを集団で蜂球 (ほうきゅう) を作って熱殺してしまうときの代謝空転サイクルが魚の浮き袋 (ガス腺細胞) でも作動していることが明らかになった

(4). ガス腺細胞から鰾の内腔へ酸素を輸送する酸素チャネルの候補

最後に、ガス腺細胞から鰾の内腔へ酸素を分泌するためのチャネルについて調べた。従来では生体中の気体分子は細胞間を単純に拡散して移動するものと考えられていたが、近年になって気体分子を選択的に透過させるチャネルの存在が明らかになっている。トラフグの鰾では、気体を通すチャネルとして近年脚光を浴びている Aquaporin (aqp) ファミリーの中で Aqp7 と Aqp12 がガス腺細胞の内腔に接する細胞膜付近に局在していることを突き止めた。ほぼ酸素で満たされている鰾の内腔へこれらの Aqp タンパク質が酸素を選択的に透過させている可能性が高い。今後 Aqp タンパク質が酸素を選択的に透過させることを証明できれば、酸素を選択的に透過させるタンパク質を世界で初めて同定したことになり、大きな発展が期待される。

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, Ogoshi M, Ookata K, Munakata K, Yamamoto Y, Islam Z, Doi H, Romero MF, Hirose S. O₂-filled swimbladder employs monocarboxylate transporters for the generation of O₂ by lactate-induced root effect hemoglobin. **PLoS One** 7:e34579, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0034579. PMID: 22496829. 査読有り
- ② Munakata K, Ookata K, Doi H, Baba O, Terashima T, Hirose S, Kato A. 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.** 417:564-569, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.006. PMID: 22177956. 査読有り

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 茂久 (Hirose Shigehisa)
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

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号:
()

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号: