

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 17 年度博士課程進学

氏名 渡邊 壮一

指導教員名 金子 豊二

論文題目 Molecular physiological studies on osmosensing mechanisms in fish

(魚類の浸透圧変化感知機構に関する分子生理学的研究)

水圏に生息する硬骨魚類では、体表を介して外界と体内との間で各種のイオンや水が濃度勾配に従って移動する。このような生息環境においても、淡水、海水を問わず、体液の浸透圧は海水の約 1/3 に保たれている。これを担う機構についての研究は主にイオン調節に着目して進められ、魚類の浸透圧調節機構における詳細なイオン輸送モデルが提唱されている。浸透圧調節機構は常に最適化されていなければ逆に体内環境の不安定化要因となることから、体液浸透圧情報によるフィードバック制御を受けていると考えられる。しかし浸透圧変化感知機構に関する知見は極めて乏しいのが現状である。近年、浸透圧調節上皮や下垂体プロラクチン(PRL)細胞が浸透圧変化感知能を持ち、自らの機能を調節している可能性が示されている。これらの機構はイオン濃度変化ではなく浸透圧変化を感知する可能性が高いことが示され、浸透圧差による細胞内外での水移動およびそれに伴う細胞体積変化がこの機構に関与していることが考えられる。そこで本研究では魚類における浸透圧変化感知機構の詳細を明らかにすることを目的に浸透圧調節に関する知見が豊富な広塩性魚モザンビークティラピアを用いて実験を行なった。

第1章 鰓における水チャネル分子、アクアポリン-3の発現およびその局在

魚類の鰓は効率的な呼吸のために表面積の増大が図られ、しかも常に環境水の水流に晒されており、非常に大きな環境浸透圧ストレスを受ける場である。近年、鰓において水チャネル分子、アクアポリン-3 (AQP3)の発現が報告された。このような環境水に接する器官において、水の受動的移動を促進するチャネルが存在することの生理学的意義を検討した。まず淡水飼育ティラピアの鰓から AQP3 を同定、組織別発現解析を行なったところ、AQP3 は淡水、海水両飼育魚において鰓、下垂体を含む広範な組織において発現が確認された。また AQP3 の機能解析を行なった結果、ティラピア AQP3 は機能的な水チャネルであり、その機能は水銀により阻害され、その阻害は β -メルカプトエタノール(BME)処理によって無効化することが示された。従って、ティラピア AQP3 は生体内において実際に機能している水チャネルであると言える。

次に免疫組織化学的手法により鰓における AQP3 の局在を淡水および海水ティラピアにおいて観察した。その結果、淡水、海水両方において塩類細胞の側底膜（体内側細胞膜）に AQP3 が局在することが示された。このことは AQP3 が塩類細胞内液と体液間の水の移動に関わることを示唆している。塩類細胞は鰓における浸透圧調節で中心的役割を果たすイオン輸送細胞の総称であり、その頂端部は環境水に開口している。またナトリウムポンプを豊富に発現させているため、その判別、同定は容易である。近年、塩類細胞は開口部に発現するイオン輸送体によって、イオン輸送能が異なる少なくとも4つのタイプに分類できることが判明した。AQP3 の局在はナトリウムポンプの局在と完全に一致するが、このことはすべてのタイプの塩類細胞において側底膜を介した受動的な水移動が起こっていることを示している。AQP の水輸送は受動的なものであり、水分子を能動的に輸送することはできないことから、外界に直接面している細胞において浸透圧勾配に逆らって水の排出および取り込みを行なうとは考えにくい。このことから AQP3 は塩類細胞と体液間での浸透圧差による水の移動を促進することで、塩類細胞における浸透圧変化感知機構や体積調節に関与することが考えられる。

第2章 プロラクチン細胞の浸透圧変化感知機構における AQP3 の関与

前章の結果から、AQP3 は下垂体においてもその発現が確認された。硬骨魚類において下垂体は浸透圧調節機構の内分泌的中枢を担う器官であり、淡水適応ホルモンである PRL を産生することが知られている。PRL 細胞は細胞外浸透圧の低下に伴い、自発的に PRL の分泌を促進する。またこの反応には細胞体積の増大とそれに伴う stretch-activated calcium channel の gating による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が関わるということが報告されている。しかし脂質二重膜はほとんど水を透過させないため、体液の僅かな浸透圧変化によって水移動を起こし、細胞体積を変化させるには水チャネル分子の存在が必要と考えられる。そこで次に AQP3 の発現と PRL 細胞の浸透圧変化感知機構との関連を検討することとした。まず淡水および海水個体より PRL 細胞を採取し、AQP3 と PRL について発現量解析を行なった。その結果、AQP3、PRL ともに淡水飼育ティラピアでの発現量が有意に高いことが示された。また PRL 細胞における AQP3 の局在を観察したところ、細胞膜上に局在していることが明らかとなった。次に、淡水および海水飼育ティラピアから単離した PRL 細胞を等張培養液中で初代培養し、培養液の浸透圧を低下させた際の細胞体積変化を顕微鏡下で経時的に解析した。その結果、淡水飼育個体由来の PRL 産生細胞の方がより小さな浸透圧低下によって細胞体積を増大させることが明らかとなり、AQP3 の発現量と細胞体積変化に相関関係があることが示された。次に AQP3 の阻害剤である水銀が淡水個体由来 PRL 細胞の低浸透圧刺激時細胞体積変化に及ぼす影響を検討したところ、水銀処理群では細胞体積変化量や細胞膜の水透過性が有意に低下した。また水銀による細胞体積変化抑制は、BME 処理によって無効化される傾向があり、細胞死につながる水銀の不可逆的細胞毒性による阻害でないことが示された。このことは淡水個体由来 PRL 細胞の浸透圧変化に対する反応性に AQP3 が関与することを示唆している。以上の結果を踏まえて、低浸透圧刺激による PRL 分泌促進機構への水銀の影響を検討したところ、水銀処理群では有意に PRL の分泌が抑えられた。またこの水銀による阻害は体積変化と同様に BME 処理によって無効化される傾向を示した。また高カリウム刺激によ

り細胞内 Ca^{2+} を人為的に上昇させた際には、水銀処理にも関わらず PRL 分泌が促進された。よって水銀は PRL の自発的分泌に重要な Ca^{2+} シグナル伝達カスケードを阻害していないことが示された。

これらの一連の実験結果は、AQP3 が淡水個体中の PRL 細胞において僅かな浸透圧変化の受容を可能し、PRL の分泌調節を速やかに行なうことで、低浸透圧適応能を最適化する機構に関与することを示している。

第 3 章 低浸透圧適応としての PRL 発現調節機構の検討

まず、生体での外界浸透圧変化に伴う下垂体 PRL 発現変化を解析するため、移行実験を行なった。その結果、海水個体淡水移行群、淡水個体海水移行群において PRL 発現量が移行後 1 日以内に顕著に変化した。このことから PRL 分泌だけでなく発現量調節においても浸透圧変化感知機構の関与が示された。前章では淡水個体 PRL 細胞での PRL 分泌調節に AQP3 を介した細胞体積変化が関与することが示されたが、細胞体積変化は淡水、海水両個体由来 PRL 細胞で観察され、浸透圧低下が激しいと変化率はほぼ同等であった。このことを踏まえ、PRL 細胞が浸透圧変化を感知し、自発的に PRL 発現調節を行なうかを検討した。淡水および海水個体 PRL 細胞を等浸透圧および低浸透圧環境で培養した際の PRL の発現量変化を測定した結果、いずれの環境においても PRL の発現量に変化はみられなかった。このことは PRL 発現調節を司る浸透圧変化感知機構はより上位の中枢に存在することを示唆している。また単離培養期間中でも、PRL 発現レベルは海水個体由来細胞よりも淡水個体由来細胞で常に高かった。このことは PRL 発現調節は恒常的な刺激を必要とせず、PRL 発現誘起および抑制シグナルが一旦作用するとエピソード的な制御が行なわれている可能性を示している。一方、近年、哺乳類の PRL 分泌ペプチド (PrRP) のホモログが硬骨魚類の脳で同定され、PRL 発現上昇への関与が示唆されている。そこで淡水および海水個体の PRL 細胞を PrRP 添加培養液で培養したところ、海水個体由来細胞での PRL の発現量が PrRP 添加 2 日後に有意に上昇した。この結果は海水適応魚が淡水環境に移行し

た際、PrRP が直接 PRL 細胞に作用し、PRL 発現活性化を誘発する可能性を示唆している。また淡水および海水飼育ティラピア脳における PrRP mRNA の発現量を測定したところ、両者の間に差は見られなかった。このことから、ティラピアのような広塩性魚においては外界浸透圧変化による急激な体液の低張化に対応するために、常に PrRP の発現を維持し、PrRP の転写、翻訳といった過程によるタイムラグなしに PRL の発現を上昇させる機構が存在することが示唆された。次に PrRP レセプターを下垂体より同定し、PRL 細胞での発現量解析を行なったところ、脳での PrRP と同様に淡水、海水で差は見られなかった。また免疫組織化学により下垂体における局在を観察した結果、PrRP レセプターは PRL 細胞および神経下垂体組織に豊富に局在していることが示された。このことから、PrRP は淡水、海水両個体 PRL 細胞に何らかの直接的作用を持ち、また未知の神経修飾・神経伝達物質様作用を持つことが考えられる。

以上の一連の結果を踏まえると、浸透圧調節担当細胞は浸透圧変化感知機構を持つことが示唆され、細胞外浸透圧変化に伴う細胞体積変化による浸透圧変化感知機構は水チャネル分子の存在によりその感度を向上させていることが示された。また、それぞれの場に即した浸透圧調節機構の微調整を行なうことで、個体全体としての浸透圧調節を最適化していると考えられる。