

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 馬久地 みゆき

本研究ではウナギを用いて、海水魚が浸透圧調節のために腸管内で形成するカルシウム沈殿の形成メカニズムと形成意義の解明を目指した。

1. カルシウム沈殿の物理化学的解析

カルシウム沈殿の元素分析、結晶構造解析、分子構造解析を行った。カルシウム沈殿は粘液に包まれた直径 1~5 μm の球状構造の集合体であった。構成元素は Ca, Mg, C, O, P, S であり、主要元素 Ca, Mg は全体の 77.0%, 22.5% を占めていた。さらに結晶構造解析、分子構造解析を行った結果、カルシウム沈殿は一部 Mg-calcite (炭酸マグネシウムと炭酸カルシウムの混合物) として結晶化し、残りは水分子を含む非晶質であることが分かった。

2. カルシウム沈殿の形成機構

カルシウム沈殿の材料である Ca^{2+} , Mg^{2+} と重炭酸イオン (HCO_3^-) の由来を検討した。ウナギを低 Ca^{2+} , 低 Mg^{2+} 海水で飼育したところ、カルシウム沈殿量は減少した。これよりカルシウム沈殿は外部環境である海水の Ca^{2+} , Mg^{2+} に由来することが強く示唆された。

次に HCO_3^- の由来を検討するため、 HCO_3^- 分泌器官候補の膵臓および胆嚢の除去個体を作成し、カルシウム沈殿量を測定した。膵臓除去個体で顕著にカルシウム沈殿量が減少したことよりカルシウム沈殿形成に必要な HCO_3^- は以前より報告されている腸の他に膵臓からも分泌されることが示唆された。

3. 膵臓および腸における重炭酸イオン輸送体の同定

膵臓、腸の上皮細胞から HCO_3^- 輸送体 solute carrier (SLC)4 および 26 ファミリー、Cl/ HCO_3^- チャネル (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: CFTR) を網羅的にクローニングし、得られた遺伝子配列を基に、遺伝子特異的プライマーを作製し、組織別発現解析を行った。膵臓では Slc4a8, Slc26a1, Slc26a6A, CFTR が発現し、腸では Slc4a2, Slc26a1, Slc26a3, Slc26a6B, Slc26a11, CFTR が発現していた。さらにリアルタイム PCR により海水適応下で発現が上昇した輸送体を選別した。膵臓において Slc26a1, Slc26a6A、腸において Slc26a1, Slc26a3 が海水適応下で HCO_3^- 分泌に関与することが示された。

4. 膵臓における重炭酸イオン分泌機構の解明

魚類の腸での HCO_3^- 分泌機構は解明されつつあるが、膵臓においては皆無であるため、膵臓での HCO_3^- 分泌機構解明を試みた。膵臓より膵管を単離し、pH 蛍光指示薬を膵管内に注入したところ、膵管外に HCO_3^- が有るときのみ膵管内へ HCO_3^- が分泌される様子が観察された。また HCO_3^- 輸送体の阻害剤を添加すると HCO_3^- 分泌が阻害された。これより HCO_3^- は膵管外から供給され、 HCO_3^- 輸送体を介して分泌されることが示唆された。さらに HCO_3^- を産生する炭酸脱水酵素の活性は膵臓において低いことより、 HCO_3^- は膵臓外で産生されていることが示唆された。その上、導管細胞の血管側に Na^+ , HCO_3^- 共輸送体が確認されたことより HCO_3^- は膵管外より導管細胞内へ取込まれ、それを膵管内に分泌しているという機構の存在が強く示唆された。

5. カルシウム沈殿形成阻害による海産魚の浸透圧調節障害

カルシウム沈殿形成の形成意義を検証するため、腸内に塩酸を注入しカルシウム沈殿形成の阻害を行った。塩酸注入によりカルシウム沈殿量は減少傾向を示した。また、体液浸透圧、血漿中の Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 濃度も上昇傾向を示し、脱水の指標となるヘマトクリット値、筋肉の水分含量、体重も減少した。これらの結果を総合的に判断すると、カルシウム沈殿形成が阻害されると、 Ca^{2+} が腸内より除去されにくくなり、水の補給に支障をきたすと考えられた。カルシウム沈殿形成は、海水魚が水を効率よく吸収するために重要であると示された。

以上の結果、魚類の腸管内で形成されるカルシウム沈殿について、生理学的観点より包括的な理解が得られた。未知の物質であったカルシウム沈殿の物理化学的分析を行い、その形成機構を分子生理学的に解明し、さらにカルシウム沈殿形成は魚類が海水に適応する上での生理的な現象であることが証明された。これらの知見は学術上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学術論文として価値のあるものと認めた。