

論文内容の要旨

論文題目 Physiological studies on sulfate regulation in the eel:
with special reference to renal regulation.

(ウナギにおける硫酸イオン調節機構に関する生理学的研究:
腎臓における調節を中心として)

渡邊 太郎

背景

硫酸イオン(SO_4^{2-})は軟骨形成や粘液産生、および生合成経路などに関与する重要な2価イオンであり、脊椎動物を通じてほぼ一定の血漿濃度(0.5~1 mM)に保たれている。 SO_4^{2-} が希薄な陸上や淡水(<0.5 mM)では、腎臓による保持機構が発達していることが示唆されている。淡水環境における魚類の SO_4^{2-} 保持に関する適応戦略の特殊な例として、ウナギが高い血漿 SO_4^{2-} 濃度を保つという現象が報告されている。一方、海水で生活する魚類は常に多量の SO_4^{2-} (30 mM)に曝されており、腎臓の近位尿細管から SO_4^{2-} を初めとする2価イオンの排出を積極的に行うことが示唆されている。しかし、海水環境における SO_4^{2-} の個体レベルにおける収支、およびその分子・輸送体レベルでの排出機構についてはまだ明らかになっておらず、さらに SO_4^{2-} の調節を保持(淡水)から排出(海水)に切り替える機構に関してもまだ明らかではない。本研究では、体液調節機構を切り替えて淡水と海水のいずれの環境でも生活可能な広塩性魚類に着目した。広塩性魚類は SO_4^{2-} 調節を環境に応じて切り替えていると考えられ、同一種で異なる現象を比較できる利点は大きいと考えたためである。実際、淡水と海水それぞれに馴致したウナギ、シロザケ、ティラピ

アの血漿 SO_4^{2-} 濃度を測定すると、淡水ウナギ(～6 mM)を除くいずれの魚種でも他の脊椎動物と同等の低い(～1 mM)値を示した。すなわち、ウナギは低 SO_4^{2-} 環境(淡水)と高 SO_4^{2-} 環境(海水)において、他の広塩性魚類よりもはるかに大きな SO_4^{2-} 調節の切り替えをおこなっていると考えられる。さらにウナギは外科手術に強く、個体レベルの生理学実験を行えるため、分子生物学的データとの統合を図ることも可能である。そこで本研究では、ウナギをモデル動物として、 SO_4^{2-} 調節機構を生理学的に解明することを試みた。

第1章 海水ウナギにおける SO_4^{2-} の調節機構

1-a. SO_4^{2-} の個体レベルの収支

まず初めに海水と淡水に馴致したウナギの血漿 SO_4^{2-} 濃度を測定したところ、海水ウナギでは他の海産真骨類と同様に1 mM未満であったが、淡水ウナギでは他の淡水真骨類とは異なり6 mMを超えていた。すなわち、ウナギは海水環境では、他の魚種と同様に血漿 SO_4^{2-} を低く保っていることがわかる。そこでウナギの血管にカニューレを施し、 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ を用いて無麻酔下で体内外の SO_4^{2-} の収支を詳細に調べた。その結果、海水ウナギは淡水ウナギの10倍の SO_4^{2-} が流入すること、および食道結紮群との比較から、環境中の SO_4^{2-} の流入経路は飲んだ海水を吸収している腸ではなく、85%以上が体表(鰓)であることが明らかになった。一方、血中に $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ を投与して排出経路を調べたところ、投与直後から尿中の ^{35}S 濃度が急増し、投与後1時間では排出される血中 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の95%以上を尿が占めていた。一方、投与後3～6時間から腸内容液及び環境水中の ^{35}S 濃度が増加したが、これは $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ が代謝産物に取り込まれたためと予想し、陰イオン交換樹脂によりイオン性 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の分離を試みた。すると、尿では85%が吸着されたが、腸内容液(33%)や環境水(10%)の吸着率は低かった。したがって、海水ウナギの体表から侵入する SO_4^{2-} は、腎臓だけではなく体表(鰓・皮膚)や消化管からも含硫代謝産物(おそらく粘液)として排出されることがわかった。以上の結果から、腎臓がイオン性 SO_4^{2-} の排出器官であり、その調節が淡水と海水で大きく変化することがわかった。

1-b. 腎臓における SO_4^{2-} 排出に関わる輸送体とその局在

ウナギにおける淡水と海水での調節機構の切り替えを詳細に調べるため、淡水から海水への移行にともなう体液中の SO_4^{2-} 濃度や腎臓における排出の経時変化を測定した。その結果、血漿 SO_4^{2-} 濃度は移行1日目に変化がみられなかったが、3日目には有意に減少し1週間で海水レベルで安定した。尿 SO_4^{2-} 濃度は1日目に急激に上昇した後、3日目以降に減少し、海水よりも高い濃度で安定した。一方、腸内液中の SO_4^{2-} 濃度は血漿や尿ほど大きな変化が見られなかった。この結果から、 SO_4^{2-} 調節は3日目を境として海水型に切り替わることが示唆された。次に本研究で同定された *Slc26a2* を加えた7種の SO_4^{2-} 輸送体遺伝子(*Slc13a1*、*Slc26a1*～3、*Slc26a6a*～

6c)の経時的な発現変化を調べたところ、移行後3日目に再吸収特異的な *Slc13a1* の発現が消失し、新たに *Slc26a6a* が腎臓で特異的に発現することがわかった。この結果は、放射性 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ を用いた実験から得られた SO_4^{2-} 排出器官としての腎臓の重要性を支持する。また、海水で発現量が変わった輸送体の免疫染色による観察から、海水ウナギでは *Slc26a6a* が近位尿細管の管腔側に、*Slc26a1* が基底膜側に局在していることを明らかにした。他魚種において、*Slc26a6a* が近位尿細管管腔側に局在することが確認されており、*Slc26a1* が淡水ウナギの腎臓で SO_4^{2-} の輸送に関与することが示唆されている。これらの結果から、海水ウナギの腎臓の管腔側には *Slc26a6a* が局在し、基底膜側に存在する *Slc26a1* と共に SO_4^{2-} 排出に関与していることが示唆された。しかし、隣接切片による観察から、*Slc26a1* と *Slc26a6a* は同一の細胞に共局在していないことが明らかになった。このことから、それぞれの輸送体において対となる SO_4^{2-} 輸送体の存在が示唆された。

第2章 淡水と海水における SO_4^{2-} 調節の切り替えを担う因子の同定

前述したように、広塩性魚類は環境に応じて SO_4^{2-} 調節機構を切り替えている。しかし、生活史における環境中の極端な SO_4^{2-} の濃度変化は水中に限られるため、もっとも研究が進んでいる陸上哺乳類においても、切り替え機構に関する知見はない。そこで、海水中に含まれるイオンや浸透圧が切り替えの因子であると仮定し、海水に含まれるイオンで SO_4^{2-} 調節を排出型に切り替えるものを調べた。その結果、海水と同濃度の SO_4^{2-} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} を含む溶液では切り替えが見られず、海水に高濃度に含まれる SO_4^{2-} が切り替え因子ではないことがわかった。一方 50 mM (海水の 10% 相当) の NaCl 溶液中に移すと、血漿 SO_4^{2-} 濃度の減少、尿中 SO_4^{2-} 濃度の上昇、および海水型輸送体遺伝子の発現が観察された。さらに、 Na^+ と Cl^- のみを含む溶液中への移行実験から、 Na^+ と Cl^- が共存することが必要で、また Cl^- が主要なイオンであり Na^+ が補助的に関与することで切り替えを引き起こしていることがわかった。さらに血漿 Cl^- 濃度と血漿 SO_4^{2-} 濃度に強い負の相関がみられ、環境水中の NaCl 濃度と血漿 Cl^- 濃度に正の相関が観察されたが、 Cl^- のみを含む環境水では正の相関が見られなかったことから、環境水中の Cl^- 取り込みに対して Na^+ が必要であると考えられる。これは、外部環境中の Na^+ と Cl^- を受容して切り替えを生じさせるのではなく、血中 Cl^- 濃度の増加が切り替えを生じさせる因子である可能性を示す。そこで、淡水ウナギの血中に Cl^- を含む溶液を注入したところ、陽イオンの種類を問わず、血中 Cl^- 濃度が増加した群において排出型輸送体の遺伝子発現が観察された。このことから、環境水中の Na^+ と Cl^- が血漿 Cl^- 濃度を上昇させた結果、腎臓の SO_4^{2-} 輸送体を海水型に切り替え、 SO_4^{2-} を排出していると考えられる。海水中では体液よりも周囲の Cl^- 濃度が高いため、体内に Cl^- が浸入し、血中 Cl^- 濃度を増加させることが知られている。そのため、他の海水魚においても血漿 Cl^- 濃度が SO_4^{2-} 調節に重要と考えられる。

結論

本研究により、私は淡水と海水によく適応するウナギを用いて、個体レベルの生理学実験、分子生物学的手法や形態学的手法を用いて、次の実験結果を得ることにより高 SO_4^{2-} 環境である海水中で低い血漿 SO_4^{2-} 濃度を保つ機構を明らかにした(下図)。すなわち、1) 海水中で鰓から浸入する SO_4^{2-} は主に腎臓から積極的に排出されること、2) 血漿 SO_4^{2-} 濃度の減少と海水型 (SO_4^{2-} 排出型) 腎臓への切り替えが海水移行後3日以内に起こること、3) 海水移行後3日で排出型 SO_4^{2-} 輸送体である *Slc26a6a* 遺伝子の発現が腎臓で上昇し、吸収型 *Slc13a1* 遺伝子の発現が減少すること、4) *Slc26a6a* が近位尿細管の管腔膜側に *Slc26a1* が基底膜側に存在すること、5) *Slc26a6a* と *Slc26a1* は同一細胞ではなく異なる近位尿細管分節に存在すること、6) 海水中に含まれるイオンのうち 50 mM 以上の Cl^- と Na^+ が海水型への切り替えを惹起すること、7) 環境水中の Cl^- と Na^+ が Cl^- の取り込みを促進し、その結果血漿 Cl^- 濃度が上昇して切り替えのスイッチを押すこと、を明らかにした。本研究は、イオン環境の変化がどのような経路を通じて体内のイオン調節系を切り替えているかを初めて明らかにした実験であるといえる。

