

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 崔 丁 玄

海産魚では塩類の流入と水の流出、また淡水魚では塩類の流出と水の流入の危険に常にさらされているにも関わらず、実際には淡水、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。このような浸透圧調節は浸透圧調節器官の調和のとれた働きによるものであるが、中でも鰓に存在する塩類細胞は魚類の浸透圧調節で中心的な役割を果たしている。真骨魚類は海水中で体内に過剰となる塩類を塩類細胞から環境水に排出し、また淡水中で不足する塩類を環境水から塩類細胞によって取込むことで、いずれの環境でも体内のイオン濃度を生理的範囲内に保っている。広範囲の塩分環境に適応できる広塩性魚は、環境水の塩分濃度に応じて塩類細胞の機能が切り替わると考えられる。本研究では、広塩性魚における塩類細胞のイオン輸送能の可塑性を明らかにするため、ティラピアを材料に用いて塩類細胞の機能形態学的研究を行った。

塩類細胞は頂端膜および側底膜に発現するイオン輸送タンパク質により機能的に以下の4つのタイプに分類された。

- 1) いずれの発現もない type-1
- 2) 頂端膜に  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  共輸送体(NCC)を発現する type-2
- 3) 頂端膜に  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換体(NHE3)を発現する type-3
- 4) 頂端膜に cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR)を、側底膜に  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  共輸送体(NKCC)を発現する type-4

### 1. ティラピアを淡水から脱イオン水に移行した際の鰓塩類細胞の経時的変化

まず、ティラピアを淡水から脱イオン水に移行した際の塩類細胞の変化を調べた。淡水順致のティラピアで、鰓塩類細胞の開口部の形態は小型の孔型、凸型、および凹型に分けられた。小型の孔型塩類細胞は頂端膜に NCC(type-2)もしくは NHE3(type-3)を発現し、また凸型細胞は頂端膜に NCC(type-2)を、凹型細胞は NHE3(type-3)をそれぞれ発現していた。凸型開口部の面積は 1 日目有意に増加した。凹型開口部の数は増加傾向を示し、面積は移行 6 時間から有意に増加した。その結果、鰓の塩類細胞は脱イオン水移行に伴い迅速に応答し、急激な環境水の変化に対応することが明らかとなった。

### 2. ティラピアを淡水から 70%海水に移行した際の鰓塩類細胞の機能形態的变化

次に、ティラピアを淡水から 70%海水に移行した際の塩類細胞の経時的変化を同様に調べた。淡水順致ティラピアでは、type-1~3 の塩類細胞が観察されたが、70%海水移行後、淡水型の type-2 と type-3 の塩類細胞が減少し、逆に海水型である type-4 が出現した。塩類細胞開口部は 70%海水に移行すると凸型および凹型が直ちに減少し、大型の孔型と大型

の孔型と凹型の間中型が増加した。また免疫染色と走査電子顕微鏡の同時観察の結果、70% 海水に移行すると type-2 塩類細胞がその開口部を閉じることが判明した。同時に、小型の孔型もしくは凹型の開口部をもつ type-3 塩類細胞は、その開口部を中間型さらに大型の孔型に変化させながら、海水型塩類細胞である type-4 へと変化した。以上の結果は、type-3 塩類細胞は機能の可塑性を有し type-4 に機能が変化し得ることを示している。

### 3. ティラピアを海水から淡水に移行した際の鰓塩類細胞の経時的変化

本章では海水に順致したティラピアを淡水に移行し、塩類細胞の経時的変化を調べた。また鰓における NCC、NHE3、CFTR および NKCC1a の淡水移行に伴う発現動態を調べた。海水順致魚で発現が低かった NCC は淡水移行に伴い発現が著しく増大した。NHE3 も淡水に移すと発現が増加した。一方で、海水中で高い発現を示した CFTR および NKCC1a はともに淡水中で発現が低下した。海水順致魚の塩類細胞の大部分は海水型の type-4 であったが、type-4 は淡水移行に伴い急激に減少し、逆に type-3 が増加した。また type-4 から type-3 への移行型 (type-3/4) が、淡水移行直後から頻繁に見られた。以上の結果、海水型の type-4 塩類細胞は type-3/4 を経て淡水型塩類細胞である type-3 に機能的・形態的に変化を遂げると考えられる。

### 4. 時間差蛍光多重染色法による鰓塩類細胞の機能の可塑性の検証

最後に、ティラピアを海水から淡水に移行した際の塩類細胞の機能の可塑性をより詳細に検討した。既存の塩類細胞と新規に出現した塩類細胞を区別した上で各種イオン輸送タンパク質の局在を調べるため、新たに開発した「時間差蛍光多重染色法」を用いた。その結果、淡水移行時に出現した type-2 塩類細胞のうち 83% が既存の細胞で、残り 17% は新規に発達した細胞だった。多くの type-2 塩類細胞は既存の type-1 から分化したものと考えられる。一方、type-4 塩類細胞は淡水移行後直ちに消失し、対照的に type-3/4 と type-3 が出現した。淡水移行後に出現したほとんどの type-3 とすべての type-3/4 が既存の細胞であり、このことは既存の type-4 塩類細胞が type-3/4 と type-3 に変化したことを示している。

以上のように、本論文ではティラピアにおける鰓塩類細胞のイオン輸送能の可塑性が明らかとなり、学術上および応用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）の学位論文として価値あるものと認めた。