

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井ノ口 繭

本研究では広塩性魚ティラピアを用い、塩類細胞におけるイオン輸送機能の多様性と細胞の入替りという二つの観点から真骨魚の浸透圧調節を検証することを目的とした。

### 第1章 多様な浸透圧環境下での塩類細胞の観察

環境水の浸透圧が塩類細胞の形態および機能に及ぼす影響を調べるため、ティラピアを脱イオン淡水(DFW)、淡水(FW)、1/3海水(1/3SW)、海水(SW)に一週間馴致した。まず、走査型電子顕微鏡を用いて塩類細胞の開口部を観察した。次に  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase に対する抗体を用いて免疫染色を行い、塩類細胞の形態を比較した。DFW では微絨毛が存在する開口部が大型化し、イオン吸収のための表面積を広げている様子が観察された。一方、SW では塩類細胞のサイズが有意に拡大した。次に、real-time PCR 法により、塩類細胞のイオン輸送体  $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{2Cl}^-$  共輸送体 1a (NKCC1a)、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 3(NHE3)、液胞型  $\text{H}^+$ ポンプ (V-ATPase)、 $\text{Na}^+,\text{Cl}^-$  共輸送体(NCC) の mRNA 発現量を比較した。外界の浸透圧上昇に伴って NKCC1a の発現量が、また浸透圧低下に伴って NHE3、NCC の発現量が高くなった。ここから、NKCC1a は高浸透圧適応、NHE3、NCC は低浸透圧適応に重要であることが示唆された。また、免疫染色の結果から、高浸透圧環境下では NKCC1a が側底膜上に存在する塩類細胞が、低浸透圧環境下では NHE3 もしくは NCC が頂端膜上に存在する塩類細胞が多く存在した。これらの結果より、NKCC1a が側底膜上に存在する塩類細胞（海水型）がイオンを排出し、NHE3 もしくは NCC が頂端膜上に存在する塩類細胞（淡水型）がイオンを取り込むことが示唆された。

### 第2章 淡水におけるイオン取り込み機構の解明

淡水型塩類細胞のイオン取り込み機構を解明するため、ティラピアを人工淡水(Control)、低 Cl<sup>-</sup>水(LowCl)、低 Na<sup>+</sup>水(LowNa)、低 Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>水(LowNa/LowCl)に移行して一週間飼育した。塩類細胞の開口部を比較したところ、LowCl、LowNa/LowCl では凸型で微絨毛を持つ開口部の大型化が観察された。一方 LowNa、LowNa/LowCl では網状構造を持つ凹型開口部が拡大していた。次に、前章で低浸透圧適応に重要だと考えられた NHE3、NCC の mRNA 発現量を比較した。LowNa、LowNa/LowCl で発現量が高くなったことから、NHE3 は低 Na<sup>+</sup>環境で Na<sup>+</sup>の取り込みに重要なことが示唆された。一方 NCC は LowCl で発現量が高くなったことから、低 Cl<sup>-</sup>環境で Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>の取り込みに必要であると考えられた。また免疫染色の結果から、NHE3 は LowNa、LowNa/LowCl で、NCC は LowCl、LowNa/LowCl で染まる範囲が大きくなる様子が観察された。これらの結果から、NHE3 は凹型開口部に、

NCC は凸型開口部に局在すると予想された。そこで走査型電子顕微鏡像と免疫染色像を同時に観察することにより、塩類細胞開口部の形態とイオン輸送体の局在の関係を直接的に示す方法を開発した。その結果、NHE3 は凹型開口部上に、凸型開口部には NCC が存在していることが証明された。

### 第 3 章 環境水の浸透圧変化に伴う塩類細胞の入替り

環境水の浸透圧変化に伴う塩類細胞の入替りについて明らかにするため、ティラピアを淡水から 70%海水へ直接移行し 1/4,1,3,7 日目にサンプリングを行った。まず環境水の浸透圧変化による鰓での細胞死を検証するため、TUNEL 法を用いてアポトーシスを検出した。その結果、移行 1 日後にアポトーシスを起こす細胞が有意に増加した。更に、移行 1 日後の鰓上皮細胞を透過型電子顕微鏡で観察したところ、アポトーシスが塩類細胞で起きていることが確認された。以上から、淡水型塩類細胞がアポトーシスを起こすことで鰓でのイオン吸収が抑えられ、70%海水移行に伴い高くなった体液浸透圧の正常化に寄与していると考えられた。

次に、BrdU 法を用いて塩類細胞の加入を検討するため、淡水馴致ティラピアを BrdU で処理した後、淡水または 70%海水へ移行し 1,3,7 日後に鰓をサンプリングした。この鰓を BrdU と  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase に対する抗体を用いて二重免疫染色を行い、新しく分化した塩類細胞を検出した。その結果、BrdU 陽性の核を有する塩類細胞は「単体の塩類細胞」と「塩類細胞の複合体」の 2 種類に分類できた。BrdU で標識された単体の塩類細胞は、70%海水移行群でも淡水群と同様に出現するのに対し、塩類細胞の複合体の分化は移行群で有意に増加した。ここから 70%海水移行群では、単体の塩類細胞に加え塩類細胞複合体を新たに分化させることで海水適応能を高めていると考えられた。

本研究により、高浸透圧環境下では NKCC1a を発現する塩類細胞がイオンを排出し、低浸透圧環境下では NHE3、NCC を発現する塩類細胞がイオンを吸収していることが示唆された。更に NHE3 は塩類細胞の凹型開口部に、NCC は凸型開口部に存在していることが示された。また、ティラピアを淡水から 70%海水に移行すると、淡水型塩類細胞はアポトーシスを起こし、単体の塩類細胞に加え塩類細胞複合体を分化させることで海水適応能を発達させることが示唆された。

以上のように、本論文では塩類細胞の機能の多様性に加え、細胞の入替りについても検証したことで、塩類細胞の浸透圧調節機構の全貌の解明に向け大きな進展をもたらしたものと考えられる。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。