

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 徐 美暎

本研究では通し回遊魚であるニホンウナギ *Anguilla japonica* を実験材料として用い、ウナギに特有な浸透圧調節機構を解明することを目指した。

1. 様々な塩分環境に馴致したウナギにおける鰓塩類細胞の形態変化

様々な塩分濃度の環境水(脱イオン水、淡水、30%希釈海水、海水)にウナギを馴致し、鰓の塩類細胞の形態学的変化を調べた。鰓における塩類細胞の局在を検討するため、 Na^+/K^+ -ATPase に対する特異的抗体を用いて塩類細胞を免疫組織化学的に検出した。その結果、一次鰓弁の塩類細胞は海水で最も発達していたが、脱イオン水では殆ど観察されなかった。定量的に分析した結果、一次鰓弁の塩類細胞の数は環境水の塩分濃度の上昇に伴い増加したが、二次鰓弁の塩類細胞は脱イオン水で最も多く観察された。このような結果は、一次鰓弁および二次鰓弁の塩類細胞がそれぞれイオンを排出および吸収することを示唆している。次に環境水による塩類細胞の変化を走査型電子顕微鏡で調べた。二次鰓弁の塩類細胞の開口部表面は網状構造をもつ平坦もしくは若干突出した構造を示したが、一次鰓弁の塩類細胞の開口部は深く陥入していた。このような構造は塩類細胞がそれぞれイオンを吸収および排出するのに有利であると考えられる。さらに、海水型塩類細胞を特定する目的で Na^+/K^+ -ATPase 抗体および cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 抗体を用い、鰓の whole-mount 試料で蛍光 2 重免疫染色を施した。その結果、30%希釈海水群と海水群だけで塩類細胞の頂端膜に CFTR 免疫反応が見られた。これは30%海水と海水で発現した塩類細胞はイオン排出機能を有することを支持する。以上のようにウナギは鰓の塩類細胞の形態を変化させることで幅広い塩分環境に適応することが明らかになった。しかし Na^+/K^+ -ATPase 抗体に対する明瞭な免疫反応が鰓の鰓弁の最外層を覆う被蓋細胞にも観察されたことから、被蓋細胞もイオン調節に補助的な役割を果たしていると考えられた。

2. 様々な塩分環境に馴致したウナギにおける鰓塩類細胞の機能解明

様々な塩分濃度の環境水にウナギを馴致し、鰓の塩類細胞の機能を発現するイオン輸送体に着目して調べた。塩類細胞のイオン輸送を担っていると考えられるイオン輸送タンパク vacuolar-type H^+ -ATPase (V-ATPase)、 Na^+/H^+ exchanger-3 (NHE3) および $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter-1 (NKCC1) に注目し、まずウナギの鰓からこれらのイオン輸送タンパクをコードする cDNA をクローニングした。次に real-time PCR 法により、各イオン輸送タンパクの mRNA 発現量を比較した。NHE3 は脱イオン水と海水群で高かったが、海水以外の群では環境の浸透圧低下に伴って発現量が高くなった。NKCC1a は外部環境の浸透圧上昇に伴って発現が高くなった。また特異的な抗体を用いた免疫染色の結果、低浸透圧環境下では NHE3 が

頂端膜上に存在する塩類細胞が、高浸透圧環境下では NKCC1 が側底膜に存在する塩類細胞が多く観察された。これらの結果より、ウナギの鰓塩類細胞では NHE3 が低浸透圧適応に、また NKCC1 が高浸透圧適応にそれぞれ重要なイオン輸送タンパクであることが示唆された。

3. ウナギ体表の被蓋細胞によるイオン調節の可能性

Na⁺/K⁺-ATPase 抗体に対する明瞭な免疫反応が塩類細胞だけではなく被蓋細胞にも観察されたことから、被蓋細胞もイオン調節に補助的な役割を果たしている可能性が示された。これを検討するため、まず、Na⁺/K⁺-ATPase に対する特異的抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、淡水のウナギだけで体表の最外層に強い免疫反応が観察された。これは、淡水ウナギの体表で Na⁺/K⁺-ATPase によって駆動されるイオンの能動輸送が行われていることを示唆する。次に環境水による皮膚被蓋細胞の形態変化を調べた。被蓋細胞は淡水、海水を問わずその表面に指紋状構造をもち、細胞質には適度に発達したミトコンドリアと基底部の陥入が観察された。特に透過型電子顕微鏡観察の結果、海水で観察された被蓋細胞は 1 種類なのに対し、淡水に馴致したウナギの被蓋細胞には明細胞と暗細胞の 2 種類の細胞が観察された。さらに Na⁺/K⁺-ATPase の細胞内局在を調べた結果、海水群の被蓋細胞には Na⁺/K⁺-ATPase の免疫反応がなかったのに対し、淡水群では Na⁺/K⁺-ATPase 陽性および陰性の細胞が観察された。次に、低浸透圧環境下でイオンの取り込みに関わっていると考えられる NHE3 と V-ATPase を免疫染色で調べた結果、V-ATPase が Na⁺/K⁺-ATPase と共局在していることが確認された。また、V-ATPase の mRNA 発現量を比較したところ、外界浸透圧の低下に伴って発現量が高くなる傾向を示した。この結果から、ウナギの皮膚の被蓋細胞は鰓の塩類細胞に加え、低浸透圧環境でイオンを取り込む補助的な役割を担っている可能性が高いことが示された。

以上の一連の研究から、ウナギは鰓の塩類細胞のイオン輸送機能を変化させるとともに、被蓋細胞で補助的なイオンの取り込みを行うことで、淡水から海水まで幅広い塩分環境に適応できることが明らかとなった。

以上のように、本論文ではウナギに特有な浸透圧調節機構が明らかとなり、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）の学位論文として価値あるものと認めた。