

論文の内容の要旨

水圏生物学専攻
平成22年度博士課程進学
氏名 寺西 慶太郎
指導教員名 金子 豊二

論文題目 Morphofunctional studies on osmoregulatory mechanisms of the kidney in Japanese eel
(ウナギの腎臓における浸透圧調節機構に関する機能形態学的研究)

魚類の体液浸透圧調節は体内環境の恒常性維持に必須であり、その機構の解明は魚類の健全な育成を目指す上で水産学的意義は大きい。水圏に生息する真骨魚類では、体内と環境水とのイオン濃度・浸透圧差により体表を介して、淡水中ではイオンの流出・水の流入、海水中ではイオンの流入・水の流出が受動的に起こる。そのため真骨魚類は陸上動物とは異なる独自の浸透圧調節機構を備えている。この調節には主に鰓、腎臓および腸が関与するが、中でもイオン・水の双方を調節する腎機能の理解は重要である。腎臓の糸球体で血液が濾過され、原尿となって細尿管、集合管を流れる過程で、淡水魚は原尿から1価イオンを再吸収し、低張尿を生成することで過剰な水を体外へ排出する。一方で海水魚は、腎臓において高濃度の2価イオンを含む尿を少量生成し、不足する水を保持しつつ過剰な2価イオンを体外へ排出する。これは、細尿管を流れる原尿中に血中の過剰な2価イオンを排出するとともに、原尿から1価イオンと水を再吸収することで可能となる。このように腎臓は浸透圧調節において重要な役割を担うが、複雑な形態を呈することも影響し、形態学的知見と分子生物学的知見が融合した浸透圧調節機構の包括的な理解は十分ではない。

そこで本研究では、真骨魚類の腎臓における浸透圧調節機構を解明するため、幅広い浸透圧(塩分濃度)環境に適応できるニホンウナギ(ウナギ)*Anguilla japonica* を用いて研究を行った。まず、浸透圧調節の基盤となる腎臓の形態を電子顕微鏡レベルの微細構造

の観察、細尿管の立体構造の観察など様々な視点から明らかにした。次に浸透圧調節に関与すると考えられるイオン輸送体の mRNA の塩基配列の決定および発現量の定量、免疫組織化学的観察により、各イオン輸送体の役割を検討した。さらに浸透圧調節ホルモン受容体に着目し、mRNA の塩基配列の決定、発現量の定量および *in situ hybridization* を行い、腎臓の浸透圧調節における内分泌系の関与を検討した。一連の研究により、腎臓における浸透圧調節機構の包括的な解明を目指した。

第 1 章 ウナギ腎臓の細尿管の構造と Na^+/K^+ -ATPase の局在

腎臓の機能単位であるネフロンは腎小体と細尿管からなるが、細尿管の構造は複雑で不明な点が多い。本章では、後の研究の基盤となるウナギ細尿管の構造を明らかにすることを目的とした。またイオン輸送の駆動力を供給する Na^+/K^+ -ATPase (NKA) の局在を検証し、浸透圧調節における腎機能の基礎的知見を得ることを目的とした。

光学および電子顕微鏡による観察の結果、ウナギ細尿管は腎小体に近い側から順に、近位細尿管前節・後節および遠位細尿管から構成されることが明らかになった。近位細尿管細胞は頂端部に微絨毛を備え、細胞内にリソソームが多く存在した。このような近位細尿管細胞の特徴は魚類から哺乳類まで共通であり、この部位の機能的な類似を示唆する。特にリソソームは哺乳類と同様に飲作用により再吸収したタンパク質をアミノ酸に分解し、血中に戻すことに関与すると考えられる。遠位細尿管細胞は他の部位に比べてミトコンドリアが多く、細胞基底部の陥入が顕著であった。細尿管全部位の細胞内構造に関して淡水・海水に馴致したウナギで大きな違いは認められなかったが、遠位細尿管と集合管における NKA 免疫反応は海水ウナギよりも淡水ウナギで顕著であった。このことは、淡水ウナギの遠位細尿管と集合管において能動的なイオン輸送が活発に行われていることを示唆する。次に、淡水ウナギをモデルとして細尿管の立体構造解析を行った。レーザースキャン顕微鏡を用いた立体再構築、連続切片の観察、単離した細尿管の観察において、複数の細尿管が規則的に配置されるような特殊な配置は観察されなかったことから、細尿管と細尿管の間での相互作用は考えにくい。また、同一ネフロン中の細尿管は規則的な構造を示さず、蛇行した形状で存在し、その末端は直線状の集合管に接続する。哺乳類や軟骨魚類では同一ネフロン中の細尿管が規則的なループ構造を形成し、尿生成の機能を効率化する。このような立体構造の差は、生息環境や適応戦略の違いを反映していると考えられる。本章において、ウナギ細尿管は部位ごとに役割が異なり、タンパク質再吸収、浸透圧調節など幅広い役割を担うことが機能形態学的に示唆された。また浸透圧調節に関しては、遠位細尿管と集合管の NKA の発現を調節することが、淡水適応と海水適応の機能を切り替える上で重要な要素の一つであると考えられる。

第 2 章 ウナギ腎臓の 1 価イオン再吸収機構

淡水魚は、淡水環境で不足する 1 価イオンを、原尿から再吸収することで体内に保持する。一方、海水魚は 1 価イオンと水を再吸収し、海水環境で不足する水を保持しつつ過剰な 2 価イオンを尿中に濃縮して排出する。本章では淡水魚・海水魚の双方に共通する 1 価イオンの再吸収による浸透圧調節に着目し、その分子機構の解明を目指した。

まず、哺乳類の腎臓において 1 価イオン再吸収に関与するイオン輸送体である Na^+/H^+ 交換輸送体 3(NHE3)、 Na^+ , K^+ , 2Cl^- 共輸送体 2(NKCC2)、 Na^+ , Cl^- 共輸送体(NCC)のウナギにおける mRNA の塩基配列を決定した。分子系統解析から、mRNA の塩基配列を決定したイオン輸送体は NHE3、NKCC2、NCC であることが支持された。ウナギの他組織で発現するアイソフォーム、他魚種での報告、命名等を踏まえて、これらのイオン輸送体遺伝子をウナギ NHE3、NKCC2 α 、NCC α とした。

次に脱イオン水、淡水、30%希釈海水および海水にウナギを馴致させた後、上記イオン輸送体の腎臓における mRNA 発現量を定量 PCR により測定したところ、NHE3 は海水で発現量が上昇し、NCC α は塩分濃度が低いほど発現量が上昇した。また、NKCC2 α は塩分濃度の違いによる発現変動はなかった。さらに抗体を作製し、免疫組織化学的観察を行ったところ、NHE3 は海水ウナギの近位細尿管後節を構成する細胞の管腔側細胞膜に局在していた。NKCC2 α および NCC α はそれぞれ遠位細尿管、集合管を構成する細胞の管腔側細胞膜に局在しており、免疫反応性は淡水ウナギの方が海水ウナギより強かった。以上の結果は、NHE3 が海水適応時に Na^+ の再吸収を担い、原尿の浸透圧を下げることで水の再吸収を促進することを示唆する。一連の再吸収により、過剰な 2 価イオンの原尿中への濃縮が可能になると考えられる。一方、NCC α は淡水適応時に不足する Na^+ 、 Cl^- の再吸収に関与することで、浸透圧調節に貢献することが示唆された。また、mRNA 発現変化と免疫染色の結果が一致しなかった NKCC2 α に関しては、演繹アミノ酸配列の N 末端に、細胞質から細胞膜への移動の促進に関与する酵素の結合モチーフ配列、および酵素によりリン酸化されるトレオニン残基が存在していた。このことから、NKCC2 α は転写後の調節を受けることで遠位細尿管細胞の管腔側細胞膜への集積が促進され、淡水適応に関与すると考えられる。

第 3 章 ウナギ腎臓における浸透圧調節機構と内分泌系

鯉の塩類細胞におけるイオン輸送を介した浸透圧調節は内分泌系により調節されることが知られている。しかし、腎臓における浸透圧調節機構と内分泌系の関係については不明な点が多く、特に受容体の発現部位を細胞レベルで明らかにした研究は少ない。そこで、本章では、浸透圧調節に関与する内分泌因子として淡水適応に関与するプロラクチン(PRL)と海水適応に関与する成長ホルモン(GH)の受容体に着目した。

まず、ウナギ腎臓から PRL 受容体(PRLR)mRNA の塩基配列を決定し、分子系統解析からこの配列が PRLR であることが支持された。また GH 受容体(GHR)はウナギ肝臓より既に GHR1 および GHR2 が同定されているが、そのうち GHR2 が腎臓で発現するこ

とを RT-PCR により明らかにした。

次に PRLR、GHR2 に加え、GH の作用を仲介する因子であり、海水適応能を上昇させるインスリン様成長因子 I(IGF-I)の腎臓における mRNA 発現量を、様々な塩分濃度の環境水に馴致したウナギで定量 PCR により測定した。その結果、PRLR は塩分濃度の違いによる発現変動はなかったが、GHR2 は 30%希釈海水で発現量が最も高く、IGF-I の発現量は 30%希釈海水で最も低かった。GHR の発現量はリガンドである GH の血中量と負の相関があることが知られている。このことは GH-GHR2 を介した腎臓における IGF-I の産生が 30%希釈海水中で抑制されていることを示唆し、今回の IGF-I 発現量の結果からも支持される。一方で IGF-I 発現量は脱イオン水と海水に馴致したウナギで高かった。また、PRLR および GHR2 が細尿管、集合管を構成する細胞で発現することを *in situ hybridization* により明らかにした。PRL の作用の一つに細胞の水透過性の低下が知られている。第 1 章と第 2 章で、淡水ウナギ腎臓の細尿管、集合管における原尿からの積極的な 1 価イオン再吸収が示された。淡水適応ホルモンとして知られる PRL が細尿管、集合管を構成する細胞の水透過性を下げ、水の再吸収を抑制することで低張尿の排出をさらに促進すると考えられる。また、GHR2 も管全部位に発現していたことから、細尿管、集合管を構成する細胞で GH-GHR2 を介して IGF-I の発現を上昇させ、海水適応能だけでなく淡水適応能も上昇させることが示唆された。IGF-I は Na^+ の輸送を促進することが知られている。ウナギ腎臓において淡水適応、海水適応の双方に必要な Na^+ の再吸収を調節することで浸透圧調節に関与する可能性が考えられる。

本研究により、ウナギの腎臓は必要な物質の再吸収から浸透圧調節まで幅広い役割を担うことが明らかとなった。特に浸透圧調節では NHE3 が海水適応に、NKCC2 α 、NCC α が淡水適応に関与することが示唆された。また細尿管と集合管を構成する細胞は PRLR と GHR2 を発現し、内分泌調節を受けて浸透圧調節を行っていることが示唆された。本研究では電子顕微鏡レベルの微細構造観察から分子生物学的手法まで幅広いアプローチで研究を行い、腎臓における浸透圧調節機構を形態、イオン輸送、内分泌系による調節という視点から明らかにした。このような総合的な研究は前例がなく、魚類腎臓の浸透圧調節機構の全貌解明に向けて大きな前進をもたらしたと考えている。