

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 寺西 慶太郎

---

本研究ではウナギ *Anguilla japonica* を用いて、真骨魚類の腎臓の浸透圧調節機構に関して形態学的知見と分子生物学的知見が融合した包括的な理解を得ることを目的とした。

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

腎臓の浸透圧調節において重要な役割を担う細尿管の構造、イオン輸送の駆動力を供給する  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase(NKA)の腎臓における局在を検証した。

光学および電子顕微鏡による観察から、ウナギ細尿管は近位細尿管前節・後節および遠位細尿管から構成されることが明らかとなった。各部位は細胞の形態により明確に分けられ、部位ごとの機能の違いが示唆された。細尿管全部位の細胞の構造に関して淡水・海水に馴致したウナギで大きな違いはなかった。免疫染色の結果、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り、淡水ウナギの遠位細尿管と集合管において能動的イオン輸送が活発に行われていることが示唆された。次に、淡水ウナギをモデルとして細尿管の立体配置・構造の解析を行った結果、細尿管は規則的な配置・構造を示さなかったため、機能的な立体配置・構造は無いと考えられた。哺乳類、軟骨魚類では同一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た。以上の結果からウナギ腎臓の浸透圧調節は、細尿管の立体配置・構造に依存せず、各部位での機能の分担および遠位細尿管と集合管の NKA の発現調節により行われていることが示唆された。

### 第2章 ウナギ腎臓の1価イオン再吸収機構

淡水、海水適応に共通する原尿からの1価イオン再吸収による浸透圧調節機構を解明するため、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体3(NHE3)、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $2\text{Cl}^-$ 共輸送体2(NKCC2)、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 共輸送体(NCC)の mRNA の塩基配列を決定し、ウナギ NHE3、NKCC2 $\alpha$ 、NCC $\alpha$ とした。

多様な塩分濃度の環境水に馴致したウナギの腎臓における上記イオン輸送体の mRNA 発現量を定量 PCR により測定した。NHE3 は海水で発現量が上昇し、NCC $\alpha$ は塩分濃度が低いほど発現量が上昇した。また、NKCC2 $\alpha$ は塩分濃度の違いによる発現変動はなかった。免疫染色の結果、NHE3 は海水ウナギの近位細尿管後節細胞の管腔側細胞膜に局在した。NKCC2 $\alpha$ および NCC $\alpha$ はそれぞれ遠位細尿管細胞、集合管細胞の管腔側細胞膜に局在し、免疫反応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  $\text{Na}^+$ の再吸収を担い、原尿の浸透圧を下げることにより海水で不足する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、原尿中に2価イオンを濃縮し、海水で過剰にな

る 2 価イオンを体外に排出することが考えられた。一方、 $NCC\alpha$ は淡水で不足する  $Na^+$ 、 $Cl^-$  を原尿から再吸収して体内に保持する役割を担うことが示唆された。また、mRNA 発現と免疫染色の結果が一致しない  $NKCC2\alpha$ は、演繹アミノ酸配列の N 末端配列の特徴から哺乳類と同様の転写後の調節を受けることで、淡水適応に関与することが示唆された。

### 第3章 ウナギ腎臓における浸透圧調節機構と内分泌系

淡水適応に関与するプロラクチン(PRL)および海水適応に関与する成長ホルモン(GH)と腎臓の浸透圧調節の関連性を受容体に着目し検証した。まず、ウナギ PRL 受容体(PRLR)mRNA の塩基配列を決定し、GH 受容体(GHR)は、GHR2 が腎臓で発現することを明らかとした。

次に PRLR、GHR2 に加え、GH の作用を仲介する因子であ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、多様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。PRLR は塩分濃度の違いによる発現変動はなかった。一方で GHR2 と IGF-I は塩分濃度により発現が変動し、GH-GHR2 および IGF-I による調節が塩分濃度ごとに異なることが示唆された。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* により明らかとした。PRL は細胞の水透過性低下作用を持つ。前章までで、淡水ウナギの細尿管、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ので、PRL が細尿管、集合管の水透過性を下げ、水の再吸収を抑制することで、淡水で過剰になる水の排出をさらに促進することが考えられた。また、細尿管、集合管を構成する細胞で GH-GHR2 を介して IGF-I の発現が上昇し、海水適応能だけでなく淡水適応能も上昇することが示唆された。IGF-I は  $Na^+$  の輸送促進作用を持つ。淡水、海水適応の双方に必要な  $Na^+$  の再吸収を調節し、浸透圧調節に関与することが考えられた。

本研究により、NHE3 が海水適応に、 $NKCC2\alpha$ 、 $NCC\alpha$ が淡水適応に重要なことが示唆された。また細尿管、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うことが示唆された。

以上のように、本論文は腎臓の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大きな進展をもたらしたと考えられる。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。