

# 魚類のイオンホメオスタシス維持機構

広瀬 茂久

世紀の難問が解けつつある。「めだかの学校」に歌われているように、魚はゆうゆうと生きているように見えるが、実際は生きるために必死なのだ。淡水中では水分の流入と塩分の漏出が起こる。水分は尿として捨てればいいが、塩分の補充は並大抵ではない。イオン濃度が極端に低い環境水から濃度勾配に逆らって塩分を取り込む必要があるからだ。この仕組みを解明することが、動物生理・生化学分野での大きな課題となっていた。私たちはpH 3.5の恐山湖にすむ魚の解析から、この難問を解く手がかりを得た。さらに一見無関係に思えたアンモニア排泄系の解析から得られたヒントがもとになり、淡水魚がいかにしてエネルギー障壁を克服し塩分を取り込んでいるかが明らかになりつつある。先に解かれた海水魚の適応機構と合わせて紹介したい。

## 1. はじめに

ノックアウトマウス全盛時代に、あまりお金のかからないアプローチはないものかと考えた。レニン-アンジオテンシン系やナトリウム利尿ペプチド系を中心とする循環系の恒常性維持機構を研究していたので、ウナギに目を付けた。ウナギは淡水と海水の両方に適応できる。淡水ウナギと海水ウナギで遺伝子発現を比較すれば面白いことが分かるに違いないと期待した。結果は、ウナギの特異的な生態を説明する点では興味深かったが、哺乳類を含めた動物一般の生理学には大きく貢献できなかった。学内や同窓会では「ウナギの先生」として少し有名になった。数年したところで、pH 3.5の湖に生息する魚（ウグイ）の話を知った。体液の酸-塩基バランスの維持機構を研究するには格好の材料に思えた。しかも、東京大学の海洋研究所のグループと地元の研究者によって形態学的及び生理学的な研究がなされており<sup>1,2)</sup>、分子生物学的な解析が待たれていた。さっそく共同研究を開始し、中性ウグイと酸性ウグイ

で発現に差のある遺伝子を探した。H<sup>+</sup>の排出やNa<sup>+</sup>の取込みに関与する一連のイオン輸送体の発現量に驚くほど大きな差がみられることが明らかになり、魚類の酸性適応機構のモデルを提出することができた。この仕事は、予想以上に大きな話題になったが、それには酸性適応以外の理由もあった。当時、魚が川や湖といった淡水中で生きていけるなぞが解けていなかった。イオン濃度が極端に低い淡水中から積極的にイオンを取り込まないと体液浸透圧を生理的条件下に保つことができないゆえ、淡水魚には高度なイオン取り込み機構が必要になるが、その仕組みが不明だった(図1B)。私たちのモデルは、この生物学上の重要課題にも解決のヒントを与えた。問題のウグイがすむ酸性湖(恐山湖)は淡水で、しかもpHが低い。ということは、難しい淡水適応に加え酸性適応という二重苦を克服していることになる。通常の淡水魚の解析からは手掛かりが得られにくかった問題が、特殊環境(酸性の淡水)に適応するために淡水適応能を強化した生物を材料にすることにより、解けそうな状況になった。ここまで来ると、動物一般や医学への応用とは直接結びつかなくても、生物学的に面白いということで、教科書で基本的な勉強をしながら、「魚類のイオンホメオスタシス維持機構」の解明を目指すことにした。本稿では分野外の読者を想定して、分かり易い解説を心掛けた。学術的な正確さを多少犠牲にしたところもあるので、詳細は最近の総説<sup>3-7)</sup>を参照していただきたい。

東京工業大学大学院生命理工学研究科生体システム専攻  
(〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259-B-19)  
Mechanism of maintaining body fluid and ion homeostasis  
in fish

Shigehisa Hirose (Department of Biological Sciences, Tokyo  
Institute of Technology, 4259-B-19 Nagatsuta-cho, Midori-  
ku, Yokohama 226-8501, Japan)

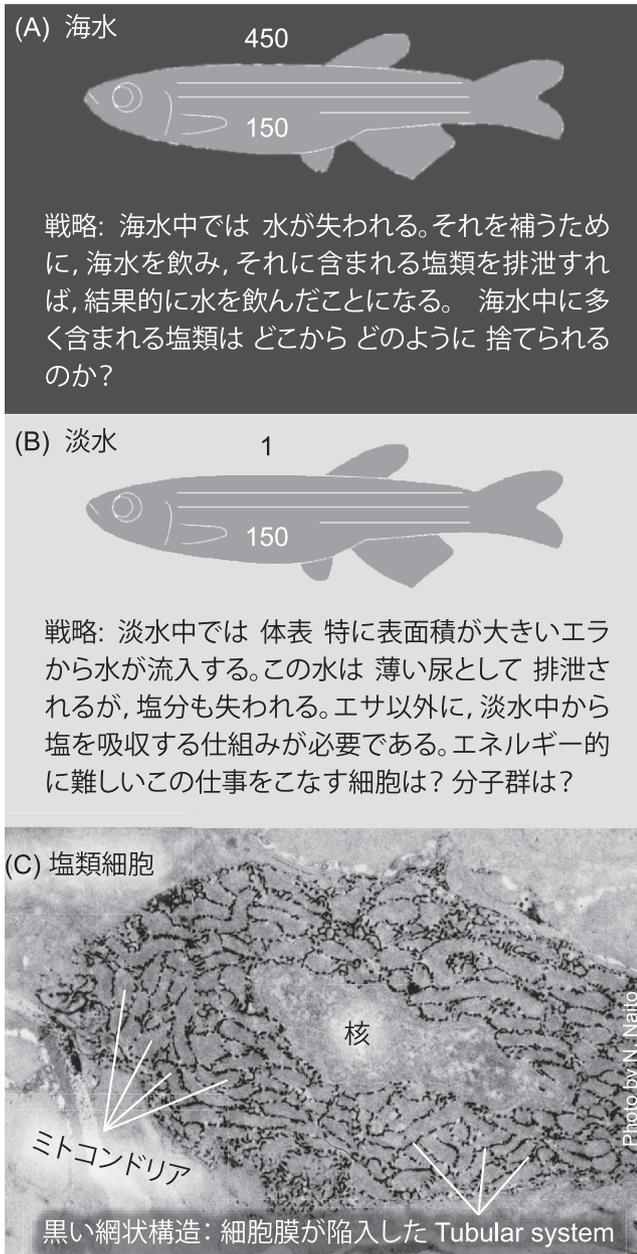


図1 海水魚及び淡水魚のイオン環境とエラに存在する塩類細胞 (A) 硬骨魚類の体液はNaCl換算で約150 mM (浸透圧の単位で約300 milliosmoles/L, mOsm)であるのに対し、海水はNaCl換算で約450 mM (約900 mOsm)で約3倍もイオン濃度が高く、海水魚は常に脱水の危険にさらされている。(B) 淡水魚は逆に水の体内への流入とイオンの流出という原理的に避けられない問題を抱えている。(C) イオン輸送に特化した塩類細胞、NaClの排泄や取り込みに必要なイオン輸送体を備え、魚類の浸透圧調節に中心的役割を果たしている。イオン輸送の駆動力は基本的にNa-K-ATPaseによって作り出されるイオンの濃度勾配と細胞内外の電位差である。多量のATPが必要とされるので、多数のミトコンドリアが存在し、それらによって細胞質が埋め尽くされるほどである。近くに塩類細胞専用のエネルギー貯蔵庫ともいべきGlycogen-rich cellが存在する<sup>(9)</sup>。細胞の表面積を広げ、多数のイオン輸送体を配置するために、細胞膜は複雑に入り込みTubular systemを形成している(ゲル濾過のビーズないしはスポンジのイメージ)。エラの微細構造に関しては文献<sup>(2)</sup>を参照。

## 2. 研究の歴史的背景

呼吸(ガス交換)のための器官と考えられていたエラにイオン輸送に特化した細胞が同定され、エラが浸透圧調節器官でもあることが明らかになった<sup>(8)</sup>。イオン輸送に特化した細胞は、Na-K-ATPaseとミトコンドリアに富むことから、塩類細胞(Chloride cell or Ionocyte)ないしはMitochondrion-rich cell (MRC)と呼ばれている(図1C)。細胞の表面積を大きくしてイオン輸送能を高めるために、塩類細胞では細胞膜が折りたたまれて細胞質内に陥入し、複雑なひだ状ないしは管腔状構造(Tubular system)が発達している。塩類細胞をNa-K-ATPaseの抗体で染めると、光学顕微鏡レベルでは、細胞質が染まっているように見える程である(実際に論文を投稿すると膜タンパク質なのに、細胞質が染まるのはおかしいのではないかというコメントが返ってくる)。塩類細胞は、孵化したばかりの稚魚では卵黄膜表面に、成魚ではエラのフィラメント上に(ときとしてラメラ上にも)点在して存在する。それら点在のメカニズムや前駆細胞からの分化機構も、私たちのグループ及び台湾とドイツのグループによってかなり明らかにされている<sup>(9-13)</sup>。

形態学的な解析と並んで、ホルモンと海水・淡水適応の関係が調べられた。当時はホルモンの研究が全盛期であったこと、イオン輸送体の実態が不明だったことなどの時代背景を考えると自然な流れといえる。脳下垂体を摘除すると淡水適応ができなくなるが、プロラクチンを補充すると淡水適応能が回復することや海水適応には成長ホルモンが重要な役割を果たしていることなど、大きな成果が得られ、研究は活況を呈した<sup>(14-18)</sup>。淡水と海水の両方に適応できる魚を淡水で飼っておいて海水に移した時に、どのようにして海水を認識するのか? 浸透圧と考えたいところだが、実際にはClイオン濃度をモニタリングしているという興味深い事実も明らかになっている<sup>(19,20)</sup>。

## 3. 海水適応機構(図2,3)

### (1) 海水からいかに水分を獲得するか(過剰のNaCl排泄機構)

塩濃度の高い海水中では体内の水分が失われるので、海水魚は常に脱水の危機に直面している。これを避けるために、海水魚は海水を飲み、そこから水分を吸収する戦略をとっている(図1A)。浸透圧に逆らって水分を吸収することは難しいので、飲み込んだ海水中の塩分を先ず吸収し、浸透圧を下げることにより水分を取り込む。最初に取り込んだ余分な塩分はエラの塩類細胞からエネルギーを使って捨て、結果的に水分のみを取り込んだ形にし、脱水状態に陥るのを避けている。見事な戦略であるが、このときに要となるエラの塩類細胞でNaClの排泄に関与するイオン輸

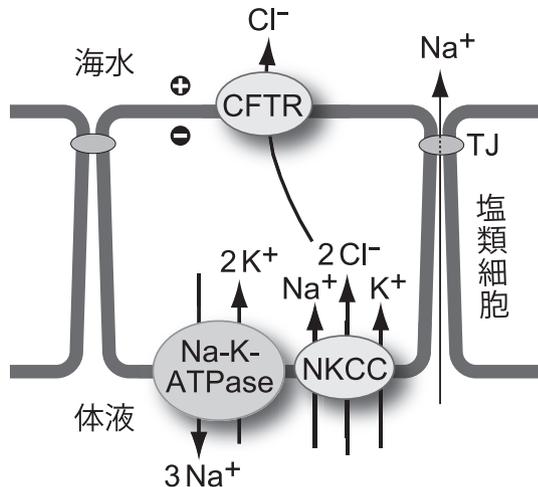


図2 海水型塩類細胞と主要なイオン輸送体

ヒトの気管上皮細胞で働いている  $\text{Cl}^-$  チャンネル (CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; 遺伝病の原因遺伝子として最初に同定されたためにこの名がある) によって、 $\text{Cl}^-$  が排出される。これに対し  $\text{Na}^+$  は電気的中性則に従って、細胞間隙 (Paracellular pathway) 経路で外界に分泌される。

送体 (CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; 及び NKCC: Na-K-2Cl cotransporter) が同定され<sup>21, 22)</sup>、海水適応機構の概要が明らかにされた (図2)。血液中から塩類細胞内に  $\text{Cl}^-$  イオンを取り込むのが NKCC で、取り込まれた  $\text{Cl}^-$  イオンを外界に向かって排出するのが CFTR である。NKCC によって  $\text{Cl}^-$  イオンと一緒に取り込まれる  $\text{Na}^+$  イオンと  $\text{K}^+$  イオンは Na-K-ATPase 及び  $\text{K}^+$  チャンネル (図では省略されている) によって体液側に戻される ( $\text{Na}^+$  イオンがいかんして外界に排出されるかは次節で述べる)。

海水魚の塩類細胞から  $\text{Cl}^-$  イオンが排泄されているのを初めてとらえた仕事は 1982 年に Science に掲載されたが<sup>23)</sup>、この画期的な研究を可能にしたのは、塩類細胞がエラ本体の他にエラ蓋の内面にも存在することが明らかになってきたからである。エラ本体の塩類細胞は他の細胞に埋もれて存在するため、容易にアクセスできないが、エラ蓋内面の塩類細胞は単層のシート状上皮に規則正しく配置されており、イオン電極等での測定が可能となった。塩類細胞から  $\text{Cl}^-$  イオンが排泄される様子を光学顕微鏡で観察することも可能となっている。 $\text{Cl}^-$  イオンを化学的に  $\text{AgCl}$  の沈殿として可視化すると、まるで火山から立ち上る噴煙のように見える、塩類細胞の威力が感じられる<sup>24)</sup>。CFTR (Apical 膜) と NKCC (Basolateral 膜) が海水適応の要の分子であることの最初の手掛かりが得られたのは、軟骨魚類のサメの直腸腺に存在する特殊な塩類細胞を用いた解析からだったことは、研究材料の重要性をよく物語っている<sup>21, 25, 26)</sup>。

## (2) 駆動力源としての Na-K-ATPase とその関連因子

塩類細胞には多量の Na-K-ATPase が存在する。それらが働くと 3 個の  $\text{Na}^+$  イオンが細胞外に汲み出され、2 個の  $\text{K}^+$  イオンが取り込まれるので、結果として細胞内が負に荷電した状態となる。この分極状態が  $\text{Cl}^-$  イオンを細胞外に排斥する方向に働き ATP 依存性  $\text{Cl}^-$  チャンネルである CFTR の働きを助ける。 $\text{Na}^+$  イオンは細胞間隙経路で、電気的中性則にしたがって排泄されるが、この時に  $\text{Na}^+$  イオンのフィルターとして働くと考えられている Claudin の種類等は未同定である。

Na-K-ATPase を効率よく回転させるためには、細胞内に蓄積する  $\text{K}^+$  イオンを細胞外にリサイクルする必要がある。すべての細胞に存在し重要な動力源として働いていることから、Na-K-ATPase は細胞の世界の King に例えられることもあるが、その働きを補佐する Queen ともいべき  $\text{K}^+$  チャンネルが長い間不明のままだった。この  $\text{K}^+$  チャンネル無しでは、上述のように細胞内に  $\text{K}^+$  イオンが蓄積し、Na-K-ATPase が思うように働けなくなる。私たちの研究室の鈴木と中村は、海水ウナギで誘導のかかる遺伝子群の解析からこの  $\text{K}^+$  チャンネルを同定することに成功した<sup>27, 28)</sup>。Na-K-ATPase に結合し活性を制御する膜タンパク質 FXFD (フィクスイッツと発音) ファミリーも見つかり、新展開が期待されている<sup>29, 30)</sup>。

## (3) 過剰の Ca イオンと Mg イオンの処理

海水には、体液に比べ、過剰の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと  $\text{Mg}^{2+}$  イオンが含まれているので、海水魚にとってはこれらのイオンを極力吸収しないような仕組みと、吸収しても効率よく排泄する仕組みが必要である。上述のように生存のために飲み込んだ海水から  $\text{NaCl}$  を吸収し、浸透圧を下げて水分を吸収できるようにしても、水分の吸収と共に海水に含まれていた残りのイオン ( $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  など) が濃縮され、再び浸透圧が高くなって、それ以上の水分の吸収ができなくなる。そこで海水魚の腸では、重炭酸イオン  $\text{HCO}_3^-$  が分泌され、濃縮された  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  イオンを  $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{MgCO}_3$  の沈殿 (白色ゆえ、通称 White cake) として除去することにより、さらなる水分の吸収と  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  の流入を抑える仕組みを発達させている。このときに要となる  $\text{HCO}_3^-$  輸送体が最近栗田と中田らにより同定され分子レベルでの理解が進んだ<sup>31)</sup>。この同定には、淡水と海水の両方に適応できる特殊なフグ (メフグ)<sup>32)</sup> を使い、ゲノムデータを活用するとともに、海水に移した時に腸で誘導のかかる遺伝子を探索する方法がとられた。分子生理学の研究には特殊機能を発達させた動物種がいかんにか有用かを物語っている。水吸収に関わる Aquaporin に関しては青木らの優れた研究がある<sup>33)</sup>。

血中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を一定に保つことは生物の生存にとっ

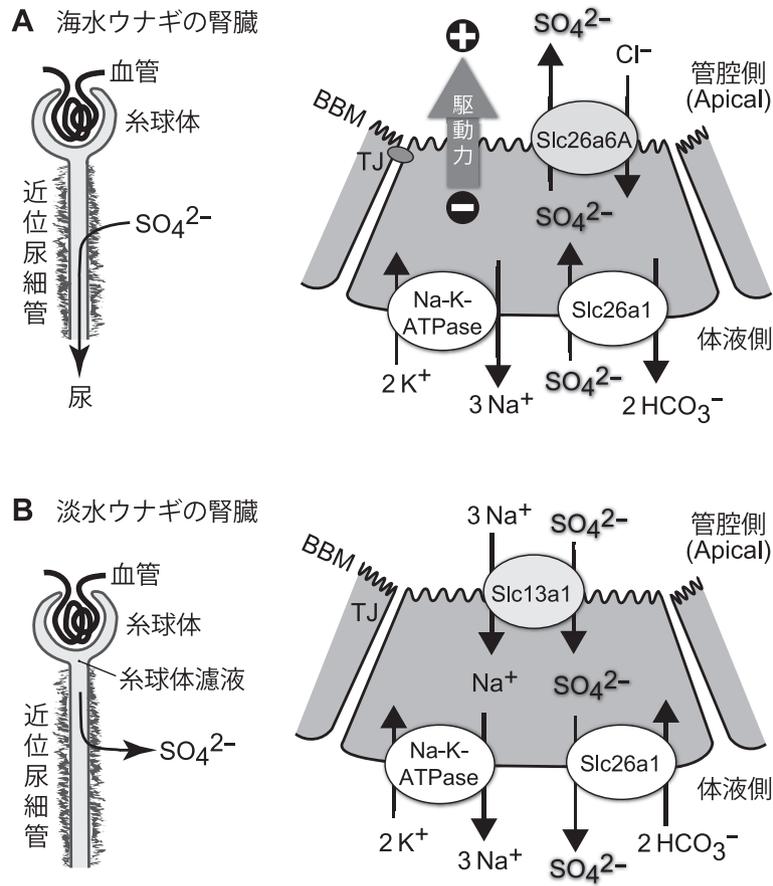


図3 硫酸イオンの処理

(A) 海水中には比較的多くの硫酸イオンが含まれている。この毒性から逃れるために、海水魚は腎臓の近位尿細管に  $\text{SO}_4^{2-}$  排出系を備えている。(B) 淡水ウナギにおける硫酸イオン回収系、コンドロイチン硫酸等の生合成の原料として、微量の硫酸イオンは生体に不可欠である。従って、淡水魚は貴重な  $\text{SO}_4^{2-}$  を回収し有効利用する仕組みを備えているが、ウナギではこれが極端に発達し、生合成に必要な素材として  $\text{SO}_4^{2-}$  を利用する以外に、浸透圧調節物質としても  $\text{SO}_4^{2-}$  を活用するという驚くべき戦略をとっている(浸透圧維持コストの軽減)。BBM, brush border membrane; TJ, tight junction; Slc, solute carrier family protein (輸送体を体系的に記述するために導入された略号で、硫酸イオン輸送体は13番と26番のファミリーに分類される)。

て重要であり、そのための調節系が何重にも組み込まれている。この問題は、過剰な  $\text{Ca}^{2+}$  の流入の危機にさらされ続ける海水魚にとっては、より深刻で、海水魚特有の調節系を発達させている。Stannius 小体から分泌されるホルモン Stanniocalcin が関与する調節系がそれで、血中の  $\text{Ca}^{2+}$  及びリン酸濃度を低下させる<sup>34)</sup>。私たちの研究室の Islam と林と加藤は、上記メフグを活用して海水適応時に腎臓の近位尿細管で発現誘導のかかる  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体と  $\text{Mg}^{2+}$  輸送体を同定することに成功しており、海水魚で起こりがちな  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  危機を克服するための輸送体である可能性が高まっている<sup>35)</sup>。問題の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体がスタニオカルシンの制御下にあるか否かは今後の課題である。

#### (4) 過剰の硫酸イオンとホウ酸イオンの処理 (図3)

海水中には硫酸イオンとホウ酸イオンも比較的多く含まれるので、これらのイオンの排泄系も海水魚にとっては重要である。濃度が高くなると有毒なこれら陰イオンは腎臓から排泄されると推定されていたが、それを担う輸送体は不明だった<sup>36)</sup>。加藤ら<sup>37)</sup>は、先に述べた戦術、すなわち海水適応したメフグの腎臓で誘導のかかるクロンを RT-PCR で網羅的に調べ、それらの発現部位を In situ hybridization によって細胞レベルで決定し、抗体染色で細胞膜の Apical に局在するかそれとも Basolateral 側かを明らかにし、最終的に活性を測定することにより、候補分子を同定した。

実は、メフグで探索する前にウナギでも同様の試みをし

たが、結果は予想外のものだった(図3B)。しかし、ウナギの特異性を示す点では、以下に述べるように、きわめて興味深い結果だった。中田ら<sup>38)</sup>は淡水と海水の両方で生きられる広塩性のウナギを用いて、海水ウナギの腎臓で誘導のかかる硫酸輸送体を網羅的に調べ、候補分子を探した。当時はまだメフグ(日本ではとれず韓国から輸入)が使えず、やむを得ずゲノムが未解読のウナギを使った。その分、苦労も多かった。ようやく候補分子をそろえ、ノーザン解析により淡水ウナギと海水ウナギの腎臓で発現量を比較してみると、なんと淡水で激増しているではないか。何度繰り返しても同じ結果だった。そこで血中の硫酸イオン濃度を測ることにした。硫酸イオンの定量は比較的難しく、イオンクロマトグラフ法が登場する以前の生理学ではあまり測定されていなかった。海水ウナギの血中 $\text{SO}_4^{2-}$ が約2mMに対し、淡水ウナギでは約40mMという値が得られ、ウナギは淡水中では老廃物である硫酸イオン(Sを含むアミノ酸の最終代謝産物)を腎臓で回収することにより粘液成分(Sulfated glycan)の原料としてリサイクルするのみならず、体液浸透圧の調節物質としても利用し、淡水中から塩を吸収するという難しい仕事(次節で詳述)の軽減を図っているらしいことが明らかになった。究極の淡水適応機構で、これが他の淡水魚でも使われていれば、大発見ということで数種の淡水魚を入手し調べてみたが、残念ながらウナギに特異的な戦略であることが分かった。陸地を伝って池の間を移動できるというウナギの超能力とも関係あるのかもしれない。この仕事はウナギの専門家の興味を引き、新書で2頁にわたって紹介されている<sup>39)</sup>。この淡水適応戦略とは別に、ウナギの海水適応に必要な硫酸イオン排出系はその後、渡辺と竹井により解析され、上記メフグと似た系の存在が確認されている(図3A)<sup>40)</sup>。

ホウ酸輸送体の研究は植物で先行している。ホウ素は植物の生育に必須な微量元素で、細胞壁の構造維持に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。ホウ素欠乏下で育てたシロイヌナズナの研究を通してホウ酸輸送に関わる分子群が同定されている<sup>41,42)</sup>。動物にとってもホウ素は必須元素であるがその作用点はよくわかっていない。植物の研究に刺激されて、動物のホウ酸輸送体<sup>43)</sup>の研究が始まっているがまだ大きな流れになっていない。私たちの研究室の木村と加藤らは、メフグを活用し、海水適応で誘導のかかるクローンの中からホウ酸の輸送に関わるものを同定するという上述の方法を適用して、海水魚がホウ酸過剰から逃れるための輸送体の有力候補を捕え最後の詰めをしている。

#### 4. 淡水適応機構(図4)

##### (1) 恐山ウグイから得られたヒント(主役はNHE3)

青森県下北半島の中央部に宇曽利湖がある。硫化水素ガ

スが噴き出す恐山地内(日本三大霊場の一つ)にあるので、ここでは俗称の恐山湖と呼ぶことにする。pH 3.5の酸性カルデラ湖で、生物にとっては棲みにくい環境であるがウグイ(魚)が生息している。産卵期になると中性の沢を遡上するので、少数ならば許可を得て捕獲し研究に用いることができる。時々、サギなどの鳥もウグイを狙って沢にやってくるが、つつくだけであまり食べない。恐山ウグイでは、アンモニアを生成するグルタミンの代謝系が活性化しており、味がまずいせいであろう。

恐山ウグイは、酸性でも中性でも生きられるゆえ、両者で発現量に差のある遺伝子を同定すれば酸性適応機構が解明できるに違いないと私たちは期待した。今ならば、DNAマイクロアレイ解析やゲノムプロジェクトをスタートさせたいところだが、研究に着手した1995年当時は網羅的な解析が難しかった。ディファレンシャルディスプレイで差のあるクローンを探すとともに、候補となりうるイオン輸送体等を片っ端からクローニングし、ノーザン解析で発現量の差を確認するという気の遠くなるような作業を続け、7年がかりでようやく酸性適応の仕組みを一通り説明できるようにした<sup>44~46)</sup>。恐山ウグイの特殊性から競争相手がいなかったことが幸いした。

酸性適応の要の分子として、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 3(NHE3)が浮上した<sup>44)</sup>。NHE3は $\text{H}^+$ を排出し代わりに $\text{Na}^+$ を取り込むので、一石二鳥の適応戦略といえる。なぜならば、(i)  $\text{H}^+$ 排出により酸性化を防ぐとともに、(ii) 通常のウグイ

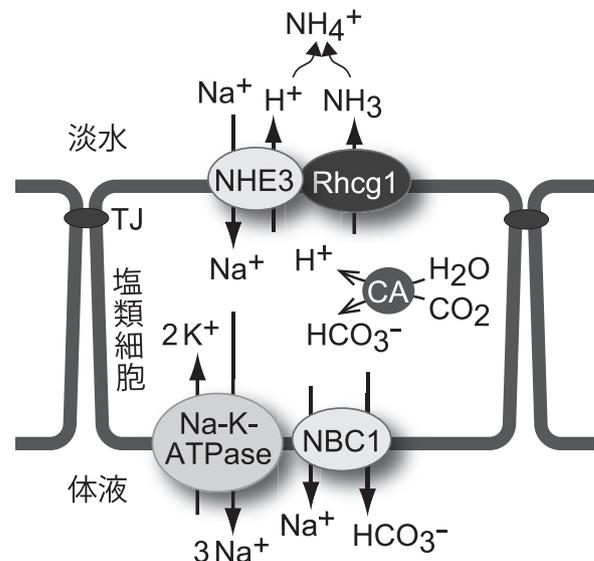


図4 淡水型塩類細胞と主要なイオン輸送体  
極限環境に適応するために特殊機能を発達させた生物(恐山ウグイ)の解析から、NHE3/NBC1の組合せが明らかになり、さらにアンモニア排泄系の解析からアンモニア輸送体Rhcg1が同定され、これらが複合体(Super transport metabolon)を形成することにより、淡水からの塩(特にNa<sup>+</sup>)の吸収という難作業を可能にしていると推定されている。NHE, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger; CA, carbonic anhydrase; NBC, sodium/bicarbonate cotransporter.

を酸性の湖水につけると、急速に塩分 ( $\text{Na}^+$ ) の漏出が起こり、多くは1.5日以内で死んでしまうが、恐山ウグイでは血中  $\text{Na}^+$  濃度がほとんど変化しない事実をうまく説明できるからである。NHE3 はエラの塩類細胞に存在し、その発現量は酸性下で著増する。抗体で染めると塩類細胞の頭頂膜（湖水に面する Apical 部）が強く染まる。これらの事実と、恐山湖は淡水湖であることを考え合わせると、NHE3 が淡水適応機構を解明するうえで鍵になる分子である可能性が高くなった。

淡水適応の要である  $\text{Na}^+$  の取り込み機構に関しては、2説あり、論争的となっていた。一つは Epithelial sodium channel (ENaC) を介する機構で、もう一つは NHE が関与する機構である。歴史的には NHE 説が最初に提唱されたが、エネルギー的に難しいと考える研究者が多くなり、代わりに ENaC と V-ATPase の共役説が有力となっていた。しかし、肝心の魚類の ENaC のクローニングはことごとく失敗に終わっていた。このような状況下で恐山ウグイの研究は NHE 説を蘇らせたが、当初は簡単には受け入れられず、論文にするのに苦労した。風向きが変わったのは、似たような NHE 系が他の魚類でも見つかり<sup>47)</sup>、さらにゾウギンザメのゲノム解析の際に哺乳類やゾウギンザメには存在するが硬骨魚では欠落している遺伝子群の一つとして ENaC が指摘され、私たちの NHE 説が支持されてからである<sup>48)</sup>。フグやゼブラフィッシュのゲノム情報が不完全で ENaC 領域がカバーされていないのではないかと考え、ENaC 説を諦めきれない研究者もいた。NHE 説では、極微量の塩分しか含まない淡水中から、大きな濃度勾配に逆らって、体内に  $\text{Na}^+$  を取り込む際のエネルギー障壁をいかに克服するかがうまく説明できなかつたからである。

NHE ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体) を介して細胞内に  $\text{Na}^+$  を取り込むには、細胞内の  $\text{Na}^+$  濃度を低くし、 $\text{H}^+$  濃度を高くしてやる必要がある。前者は Na-K-ATPase、後者は Carbonic anhydrase (CA) によって、局所的に水と二酸化炭素からプロトンを生産する ( $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ) ことで、ある程度実現できるが、十分ではなく、何かほかに仕組みがあるに違いないと考えられた。

## (2) 予想外の助っ人 (アンモニア輸送体 Rhcg1)

窒素代謝の観点からすると、魚類は非常にユニークである。アミノ酸代謝等で生成するアンモニアを (i) 直接エラ経由で環境水中に排泄する硬骨魚類と (ii) 尿素に変換するがそれを体内に貯留し、浸透圧調節物質として利用しているサメ等の軟骨魚類がある。生きる化石としてよく話題になるシーラカンスは尿素派である。ここでは硬骨魚類のアンモニア排泄機構に的を絞る。長い間アンモニアは細胞膜を自然拡散により透過すると考えられてきたが、栄養源としてのアンモニアを欠乏させた培地で生育させた酵

母<sup>49)</sup>や植物<sup>50)</sup>の研究からアンモニア輸送体が同定された。しばらく動物のものは見つからなかったが、わずか15%程度のアミノ酸配列の相同性を手掛かりに、血液型物質として知られていた Rh 糖タンパク質が動物のアンモニア輸送体であることが明らかになり<sup>51)</sup>、状況は一変した。

魚類のエラからのアンモニアの排泄機構に興味を持っていた中田は、フグを用いて Rh 糖タンパク質4種類クローニングすることに成功し、それらのエラにおける局在部位を抗体染色によって決定した。その結果、エラの広い表面積を作り出しているラメラ構造を支える細胞群 (Pillar cell と Pavement cell) に Rh アンモニア輸送体が規則正しく配置され効率の良いアンモニア排出系を形成していることが明らかになった<sup>52)</sup>。この仕事は魚類生理学の長年の課題を解決したものとして高く評価されたが、もう一つ興味深い事実があった。

ラメラの根元に点在する塩類細胞にもアンモニア輸送体の一種 Rhcg1 が高レベルで発現していたのである。半信半疑の結果だったが、本当ならば何かが起こりそうな予感がした。そこで、中田はさらに、ゼブラフィッシュを用いて Rhcg1 をクローニングしフグと同じように調べた。結果は同じで塩類細胞が見事に染色された。しかも、ゼブラフィッシュの水槽の NaCl 濃度を変化させ、低イオン状態にすると誘導がかかることも分かった。淡水適応に必要な  $\text{Na}^+$  の取り込みに関わることを示唆する画期的な結果だった<sup>53)</sup>。

NHE3 は  $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  を 1:1 で交換輸送すると考えられているので、Na-K-ATPase によって細胞内を電氣的にマイナスにしても、これ (細胞内外の電位差) が NHE3 の駆動力にはならない。しかし、NHE3 とアンモニア輸送体が共役して一つの輸送体として働けば、見かけ上、 $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  が少なくとも 1:2 で交換輸送されることになり、NHE3 は電氣的に中性ではなく、起電性の輸送体として働くことになる。このような形で NHE3 が起電性を獲得できれば、濃度勾配に逆らって Na イオンを取り込む際のエネルギー障壁が克服できるのみならず、アンモニアも効率よく排出できることになる (図4)。

## (3) Super transport metabolon

魚類の窒素代謝とアンモニア輸送体に関する総説を書かないかと誘われ、1/3程度書いたところで、忙しさにかまけて放ったらかしにしていたところ、古くから魚類におけるアンモニア代謝の研究をしてきていた別のグループが総説を書いて、NHE と Rhcg1 が共役するモデルを提案した<sup>54)</sup>。私たちが漠然と描いていたモデル (図4) とほぼ同じで、このような総説の形で、実験に先立って提案する道もあるのだと感心するとともに、英語を母国語としない日本人のハンディをも痛感した。私たちは、NHE と Rhcg1

が物理的に相互作用し、前述の炭酸脱水酵素 CA をも含む形で複合体を形成していることを示唆する結果を得ている。あとは、これらを再構成し電気生理学的に活性を測定することにより、 $\text{Na}^+$  取込み系とアンモニアの排泄系の共役を証明したいと考えている。このマルチ共役説を支持する結果が世界の多くのグループから報告され始めており<sup>55-57)</sup>、近い将来、長年の課題だった魚類の淡水適応機構が分子レベルで明らかになるだろう。

硬骨魚類が窒素代謝過程で生成するアンモニアをエラから直接外界に捨てているのは、アンモニアを無毒な尿素に変換するコストを抑えるための戦略と考えられてきたが、それだけではなく、淡水魚が外界から  $\text{Na}^+$  を取込む際のエネルギー障壁を乗り越える役割もはたしているとする、まさしく窒素代謝系をも駆使した高度なイオン輸送系が構築されていることになり、Super transport metabolon といえるのではないだろうか。

ここまでの議論では、外界に面する Apical 側の Na イオン取込み装置に的を絞ってきたが、塩類細胞に取り込まれた Na イオンを体液側に送り込む仕組みも必要である (図 4)。塩類細胞膜の Basolateral 側には Na-K-ATPase が大量に発現しているため、Na イオンの体液側への汲み出しは Na-K-ATPase が担っているとして、あまり注意が払われてこなかったが、前述した恐山ウグイの解析<sup>49)</sup>から、NBC1 ( $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransporter 1) も重要な働きをしていることが明らかになっている。

## 5. おわりに

ここでは話を単純化するために、典型的な海水型塩類細胞と淡水型塩類細胞の2種類についてのみ説明したが、実際にはイオン輸送に特化した塩類細胞の種類はもっと多く、魚の種類によって、それらが巧妙に使い分けられていることが明らかになりつつある。特に淡水型塩類細胞には、ここで紹介した NHE3 主役型の他に、NCC (Na-Cl cotransporter) が主役となって外界から塩分を取り込むサブタイプが存在することが明らかになっている<sup>58-60)</sup>。この事実一つとっても、水環境下での体液バランスの保持がいかに難しい仕事であるかがよくわかる。水生生物の存在基盤となっている塩類細胞の理解 (発生・分化・構造・機能) とともに、エラ・腸・腎臓などの連携によって維持されている体液イオンホメオスタシスの維持機構の解明を目指す分子生理学は、ポストゲノム時代にあって、実りの季節を迎えている。

本稿で紹介した私たちの研究は国内外の多くの共同研究者及び私たちの研究室のスタッフと学生の努力の結晶である。「生データを読む」のが唯一の趣味である私に根気よく付き合ってくれた彼らに感謝。

## 文 献

- 1) Satake, K., Oyagi, A., & Iwao, Y. (1995) *Water, Air and Soil Pollution*, **85**, 511-516.
- 2) Kaneko, T., Hasegawa, S., Uchida, K., Ogasawara, T., Oyagi, A., & Hirano, T. (1999) *Zool. Sci.*, **16**, 871-877.
- 3) Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., & Takei, Y. (2003) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **136**, 593-620.
- 4) Perry, S.F., Shahsavariani, A., Georgalis, T., Bayaa, M., Furimsky, M., & Thomas, S.L. (2003) *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, **300**, 53-62.
- 5) Evans, D.H., Piermarini, P.M., & Choe, K.P. (2005) *Physiol. Rev.*, **85**, 97-177.
- 6) Hwang, P.P. & Lee, T.H. (2007) *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **148**, 479-497.
- 7) Evans, D.H. (2011) *Acta Physiol. (Oxf.)*, **202**, 349-359.
- 8) Keys, A.B. & Willmer, E.N. (1932) *J. Physiol.*, **76**, 368-378.
- 9) Esaki, M., Hoshijima, K., Kobayashi, S., Fukuda, H., Kawakami, K., & Hirose, S. (2007) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **292**, R470-R480.
- 10) Hsiao, C.D., You, M.S., Guh, Y.J., Ma, M., Jiang, Y.J., & Hwang, P.P. (2007) *PLoS One*, **2**, e302.
- 11) Janicke, M., Carney, T.J., & Hammerschmidt, M. (2007) *Dev. Biol.*, **307**, 258-271.
- 12) Esaki, M., Hoshijima, K., Nakamura, N., Munakata, K., Tanaka, M., Ookata, K., Asakawa, K., Kawakami, K., Wang, W., Weinberg, E.S., & Hirose, S. (2009) *Dev. Biol.*, **329**, 116-129.
- 13) Janicke, M., Renisch, B., & Hammerschmidt, M. (2010) *Int. J. Dev. Biol.*, **54**, 837-850.
- 14) Foskett, J.K., Bern, H.A., Machen, T.E., & Conner, M. (1983) *J. Exp. Biol.*, **106**, 255-281.
- 15) Bolton, J.P., Collie, N.L., Kawachi, H., & Hirano, T. (1987) *J. Endocrinol.*, **112**, 63-68.
- 16) Sakamoto, T. & McCormick, S.D. (2006) *Gen. Comp. Endocrinol.*, **147**, 24-30.
- 17) Takei, Y., Kawakoshi, A., Tsukada, T., Yuge, S., Ogoshi, M., Inoue, K., Hyodo, S., Bannai, H., & Miyano, S. (2006) *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, **305**, 787-798.
- 18) Breves, J.P., Seale, A.P., Helms, R.E., Tipsmark, C.K., Hirano, T., & Grau, E.G. (2011) *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **158**, 194-200.
- 19) Hirano, T. (1974) *J. Exp. Biol.*, **61**, 737-747.
- 20) Watanabe, T. & Takei, Y. (2011) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **301**, R402-R411.
- 21) Greger, R. & Schlatter, E. (1984) *Pflugers Arch.*, **402**, 63-75.
- 22) Marshall, J., Martin, K.A., Picciotto, M., Hockfield, S., Nairn, A.C., & Kaczmarek, L.K. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 22749-22754.
- 23) Foskett, J.K. & Scheffey, C. (1982) *Science*, **215**, 164-166.
- 24) Kaneko, T. & Shiraishi, K. (2001) *Fisheries Science*, **67**, 541-543.
- 25) Burger, J.W. & Hess, W.N. (1959) *Science*, **131**, 670-671.
- 26) Silva, P., Solomon, R.J., & Epstein, F.H. (1997) *J. Exp. Zool.*, **279**, 504-508.
- 27) Suzuki, Y., Itakura, M., Kashiwagi, M., Nakamura, N., Matsu-ki, T., Sakuta, H., Naito, N., Takano, K., Fujita, T., & Hirose, S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 11376-11382.
- 28) Nakamura, N., Suzuki, Y., Sakuta, H., Ookata, K., Kawahara, K., & Hirose, S. (1999) *Biochem. J.*, **342**, 329-336.

- 29) Tipsmark, C.K. (2008) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **294**, R1367–R1378.
- 30) Saito, K., Nakamura, N., Ito, Y., Hoshijima, K., Esaki, M., Zhao, B., & Hirose, S. (2010) *Front Physiol.*, **1**, 129.
- 31) Kurita, Y., Nakada, T., Kato, A., Doi, H., Mistry, A.C., Chang, M.H., Romero, M.F., & Hirose, S. (2008) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **294**, R1402–R1412.
- 32) Kato, A., Doi, H., Nakada, T., Sakai, H., & Hirose, S. (2005) *BMC Physiol.*, **5**, 18.
- 33) Aoki, M., Kaneko, T., Katoh, F., Hasegawa, S., Tsutsui, N., & Aida, K. (2003) *J. Exp. Biol.*, **206**, 3495–3505.
- 34) Yeung, B.H., Law, A.Y., & Wong, C.K. (2012) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **349**, 272–280.
- 35) Islam, Z., Kato, A., Romero, M.F., & Hirose, S. (2011) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **301**, R1427–R1439.
- 36) Renfro, J.L. & Pritchard, J.B. (1983) *Am. J. Physiol.*, **244**, F488–F496.
- 37) Kato, A., Chang, M.H., Kurita, Y., Nakada, T., Ogoshi, M., Nakazato, T., Doi, H., Hirose, S., & Romero, M.F. (2009) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **297**, R1647–R1659.
- 38) Nakada, T., Zandi-Nejad, K., Kurita, Y., Kudo, H., Broumand, V., Kwon, C.Y., Mercado, A., Mount, D.B., & Hirose, S. (2005) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **289**, R575–R585.
- 39) 井田徹治 (2007) ウナギ 地球環境を語る魚, 岩波書店.
- 40) Watanabe, T. & Takei, Y. (2011) *J. Exp. Biol.*, **214**, 1783–1790.
- 41) Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., & Fujiwara, T. (2002) *Nature*, **420**, 337–340.
- 42) Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wiren, N., & Fujiwara, T. (2006) *Plant Cell*, **18**, 1498–1509.
- 43) Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Zeng, W., & Muallem, S. (2004) *Mol. Cell*, **16**, 331–341.
- 44) Hirata, T., Kaneko, T., Ono, T., Nakazato, T., Furukawa, N., Hasegawa, S., Wakabayashi, S., Shigekawa, M., Chang, M.H., Romero, M.F., & Hirose, S. (2003) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **284**, R1199–R1212.
- 45) 広瀬茂久, 金子豊二 (2003) エネルギー・資源, **24**, 221–225.
- 46) 広瀬茂久, 大八木昭, 金子豊二 (2004) 現代化学, **5**, 28–33.
- 47) Choe, K.P., Kato, A., Hirose, S., Plata, C., Sindic, A., Romero, M.F., Claiborne, J.B., & Evans, D.H. (2005) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **289**, R1520–R1534.
- 48) Venkatesh, B., Kirkness, E.F., Loh, Y.H., Halpern, A.L., Lee, A.P., Johnson, J., Dandona, N., Viswanathan, L.D., Tay, A., Venter, J.C., Strausberg, R.L., & Brenner, S. (2007) *PLoS Biol.*, **5**, e101.
- 49) Marini, A.M., Vissers, S., Urrestarazu, A., & Andre, B. (1994) *EMBO J.*, **13**, 3456–3463.
- 50) Ninnemann, O., Jauniaux, J.C., & Frommer, W.B. (1994) *EMBO J.*, **13**, 3464–3471.
- 51) Marini, A.M., Urrestarazu, A., Beauwens, R., & Andre, B. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 460–461.
- 52) Nakada, T., Westhoff, C.M., Kato, A., & Hirose, S. (2007) *FASEB J.*, **21**, 1067–1074.
- 53) Nakada, T., Hoshijima, K., Esaki, M., Nagayoshi, S., Kawakami, K., & Hirose, S. (2007) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, R1743–R1753.
- 54) Wright, P.A. & Wood, C.M. (2009) *J. Exp. Biol.*, **212**, 2303–2312.
- 55) Wu, S.C., Horng, J.L., Liu, S.T., Hwang, P.P., Wen, Z.H., Lin, C.S., & Lin, L.Y. (2010) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **298**, C237–C250.
- 56) Zimmer, A.M., Nawata, C.M., & Wood, C.M. (2010) *J. Comp. Physiol. B*, **180**, 1191–1204.
- 57) Kumai, Y. & Perry, S.F. (2011) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **301**, R1517–R1528.
- 58) Hiroi, J., Yasumasu, S., McCormick, S.D., Hwang, P.P., & Kaneko, T. (2008) *J. Exp. Biol.*, **211**, 2584–2599.
- 59) Inokuchi, M., Hiroi, J., Watanabe, S., Lee, K.M., & Kaneko, T. (2008) *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **151**, 151–158.
- 60) Hwang, P.P. (2009) *J. Exp. Biol.*, **212**, 1745–1752.
- 61) Tseng, Y.C., Huang, C.J., Chang, J.C., Teng, W.Y., Baba, O., Fann, M.J., & Hwang, P.P. (2007) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, R482–R491.
- 62) Kato, A., Nakamura, K., Kudo, H., Tran, Y.H., Yamamoto, Y., Doi, H., & Hirose, S. (2007) *J. Histochem. Cytochem.*, **55**, 941–953.