受賞者総説

魚類のイオン・浸透圧調節に関する機能形態学的研究

(平成 17 年度水産学進歩賞受賞者)

金子 豊 二*

東京大学大学院農学生命科学研究科

Functional and morphological studies on ion- and osmoregulation in fish

TOYOJI KANEKO*

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

魚類の浸透圧調節は体内環境の恒常性の維持に重要であり、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な意義は大きい。海産魚、淡水魚を問わず、魚類の体液浸透圧は海水の約 1/3 の値に保たれている。水圏に生息する魚類では鰓を介して水やイオンが受動的に移動するが、体液浸透圧を生理的範囲内に保つため魚類は陸上脊椎動物とは異なる浸透圧調節機構を備えている。魚類の浸透圧調節器官として鰓、腎臓および腸が挙げられるが、中でも鰓に存在する塩類細胞は各種イオンの取り込みおよび排出を行ない、淡水や海水といった大きく異なるイオン・浸透圧環境に適応する上で重要な役割を果たしている。¹⁾ 塩類細胞はミトコンドリアに富んだ大型の細胞で、その頂端部(頂端膜)が外界に接する。頂端膜の形状は環境条件によって異なるが、一般に海水の魚では陥入してピットを形成し、淡水中では拡張することが多い。体内側の膜(側底膜)は細胞質に複雑に入り込み管状構造を形成するため、側底膜の表面積は著しく増大している。塩類細胞の頂端膜および側底膜には様々なイオン輸送体やイオンチャネルなどのイオン輸送タンパク質が分布し、外部環境に応じて各種の無機イオンが塩類細胞を介して双方向に能動的に輸送される。²⁾ 本稿では、これまでの機能形態学的研究から得られた知見をもとに、塩類細胞の機能の多様性について述べるとともに、浸透圧調節器官が未発達な胚仔魚期の浸透圧調節について概説する。

1. 成魚の浸透圧調節と鰓の塩類細胞

広塩性魚 ティラピア (*Oreochromis mossambicus*)
やウミメダカ (*Fundulus heteroclitus*) に代表される広塩性魚は古くから浸透圧調節の研究に用いられてきた

が、ティラピアが淡水嗜好性の広塩性魚であるのに対し、ウミメダカは海水嗜好性が強い。

ティラピアは優れた広塩性を有し、極端にイオン濃度の低い淡水(低イオン水)から通常の海水よりも塩分濃度の高い海水(濃縮海水)まで、幅広い塩分環境に適応できる。³⁾ 淡水に馴致したティラピアの鰓に分布する塩類細胞は小型で、イオン輸送の駆動力を供給する $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の活性は低い。通常の淡水で飼育していたティラピアを低イオン水に移すと、塩類細胞は頂端部を広げ微絨毛を発達させることで表面積を拡張する。これは低張な環境でイオンを能動的に取り込む淡水型の塩類細胞と考えられる。一方、海水に馴致すると塩類細胞は隣接するアクセサリー細胞と細胞複合体を形成して大型化するとともに、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の活性が高まる。このような塩類細胞複合体は高張な環境水中で Na^+ および Cl^- の排出を司る海水型塩類細胞である。さらに 180% 濃縮海水に移すと、複合体を形成する海水型塩類細胞はさらに発達し、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性は顕著に増大する。³⁾

海水嗜好性のウミメダカでも、海水中で細胞複合体を形成する塩類細胞が体内に過剰となるイオンを排出するが、塩類細胞は淡水中でも高い $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性を示す。⁴⁾ 淡水で発達する塩類細胞はピットを形成する海水型と形態が異なり、拡張した頂端部に微絨毛を備えた淡水型塩類細胞である。このような塩類細胞はティラピアを低イオン水で飼育した際に見られる細胞と形態的および機能的によく一致する。一般に海産魚の腎機能は 2 価・3 価のイオンを排出することにあり、淡水適応の際に原尿から 1 価イオンを再吸収する遠位細尿管が未発達である。ウミメダカのネフロンは遠位細尿管を欠

* Tel/Fax : 81-3-5841-5286. Email : kaneko@marine.fs.a.u-tokyo.ac.jp

き、腎臓の形態から判断しても海産魚に分類される。ウミメダカは多くのエネルギーを使って塩類細胞からイオンを取り込み、腎臓の1個イオンの保持機能を補完することで、嗜好性の低い淡水にも適応できるのである。⁵⁾

通し回遊魚 ティラピアやウミメダカの淡水型および海水型塩類細胞はともに鰓弁上に位置するが、サケ科魚やウナギ (*Anguilla japonica*) などの通し回遊魚では鰓弁と二次鰓弁に機能の異なる塩類細胞が分布する。^{6,7)}

遡河回遊魚であるシロサケ (*Oncorhynchus keta*) は、秋から冬にかけて母川に遡上し産卵する。稚魚にまで発育したシロサケの体側にはパーマークが見られるが、海に下る春先になるとパーマークは消失し、体は鮮やかな銀白色に包まれる。銀化したシロサケは降海に向けての生理学的な準備が万端整い、優れた海水適応能を獲得している。降海期のシロサケ稚魚の鰓には、鰓弁に円形ないしは円柱状の塩類細胞が、また二次鰓弁に扁平な塩類細胞が認められる。鰓弁上の塩類細胞は海水移行に伴って大型化し、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ に対する染色性が高まることから、イオンを排出する海水型の細胞と考えられる。一方、二次鰓弁上に見られる扁平な塩類細胞は海水に移すと徐々に数が減少し最終的には消失することから、低張な環境でイオンを取り込む淡水型の細胞であると推察される。⁶⁾ 実際、北洋を回遊中のシロサケでは、塩類細胞は鰓弁上の海水型からなり、二次鰓弁に淡水型の細胞は見られない。ところが成熟が進み遡上間近になると、海水型の塩類細胞が退縮し始め、逆に淡水型の細胞が出現してくる。その結果、海水にいるにも関わらず、海水適応能が低下し淡水適応能が発達する。このような生理学的変化は成熟シロサケを遡上に駆り立てる要因のひとつになっている。⁸⁾

シロサケとは対照的にウナギは降河回遊する通し回遊魚であるが、淡水型および海水型塩類細胞の出現・消失に関してはシロサケの場合と同様な挙動を示す。淡水域に生息する黄ウナギには鰓弁上の海水型塩類細胞に加え、二次鰓弁上に淡水型の細胞が存在するが、銀ウナギとなって川を下り始めると海水型の占める割合が増し、海で採集された銀ウナギでは淡水型塩類細胞が完全に消失している。⁷⁾

生活環に応じて淡水域と海水域を往来する通し回遊魚は、近い将来に遭遇する環境に適した塩類細胞を予め発達させるという点で、予期せぬ環境変化に対応できる広塩性魚とは一線を画する。

狭塩性魚 魚類の浸透圧調節に関する研究は、主に広塩性魚や回遊性魚を用いて進められてきた。一方で淡水あるいは海水のいずれかにしか適応できない狭塩性魚の浸透圧調節に関する知見は極めて乏しいのが現状である。そもそも広塩性と狭塩性の境界は明確ではなく、狭

塩性と言われる魚でもある程度まで広い塩分環境に適応できる。たとえば、狭塩性の海産魚であるトラフグ (*Takifugu rubripes*) は淡水に入れると体液浸透圧が低下して死んでしまうが、1/10に希釈した海水までならば浸透圧が生理的範囲内に保たれ適応することができる。トラフグの鰓には海水型塩類細胞が認められるが、低浸透圧環境に移しても淡水型の細胞は出現しない。⁹⁾ 広塩性魚が環境の塩分濃度に応じて淡水型あるいは海水型の塩類細胞を発達させるのに対し、狭塩性魚はいずれかの機能しか発現できず、このことが塩分耐性の良し悪しを規定する一因と考えられる。

下垂体から分泌されるプロラクチン (PRL) が広塩性魚類で淡水適応ホルモンとして機能することは古くから知られている。一方、コルチゾルや成長ホルモンは海水適応に重要なホルモンである。しかしこのような知見が狭塩性魚を含めた魚類全般に当てはまるのかについては、十分に検討されていない。淡水に適応できないトラフグでも下垂体でPRLが産生され、鰓、腎臓、腸などの浸透圧調節器官ではPRL受容体が発現している。またトラフグを体液よりも低張な25%希釈海水に移すと、下垂体におけるPRLの発現が上昇する。¹⁰⁾ これらの結果は、PRLが魚類全般で低張な環境に適応する際に体液浸透圧を上昇させる方向に作用する浸透圧上昇ホルモンであることを示唆しており、広塩性魚におけるPRLの淡水適応作用はその延長線上に位置するものと考えられる。

2. 胚仔魚期の浸透圧調節と卵黄囊上皮の塩類細胞

淡水型および海水型塩類細胞と機能の可塑性 成魚で浸透圧調節器官として機能する鰓、腎臓および腸が未発達な胚仔魚期の魚でもすでに浸透圧調節機能を備えており、血液の浸透圧は成魚とほぼ同じ値に保たれている。¹¹⁾ 発眼期のシロサケ胚を淡水から直接海水に移すと、移行直後に浸透圧は急激に上昇するが、その後徐々に低下して回復に向かう。¹²⁾ このことは、胚期シロサケが体内に過剰となるイオンを排出し、浸透圧の過度の上昇を抑えようとする機構を有することを示している。鰓が未分化な発育初期の魚では、卵黄囊上皮などの体表に塩類細胞が分布し、鰓の塩類細胞に替わりイオン調節の場として機能している。¹¹⁾

ティラピアは胚期にも優れた広塩性を示し、淡水、海水の双方の環境で正常に発生が進むばかりでなく、淡水から海水あるいは海水から淡水に移しても十分に適応できる。¹³⁾ 淡水中で発生が進む後期胚の卵黄囊上皮には小型の淡水型塩類細胞が分布するが、海水中では小型の細胞に加えアクセサリ細胞と細胞複合体を形成する大型の海水型塩類細胞が頻繁に見られる。¹⁴⁾ また孵化直後に淡水から海水に移すと海水型塩類細胞が出現し、逆に海

水から淡水に移すと海水型の細胞が減少して小型の淡水型で占められるようになる。成魚の場合と同様に、海水中で発達する細胞複合体が体内からイオンを排出することで、胚期ティラピアは海水に適応できると考えられる。卵黄嚢上皮の海水型塩類細胞が実際に Cl^- を排出することは、X線分析を用いた機能形態学的手法により証明されている。¹⁵⁾

海水移行に伴う海水型塩類細胞の出現は、既存の淡水型塩類細胞がその形態と機能を海水型に変化させることによる。卵黄嚢上皮の塩類細胞は胚を生かしたまま連続的に観察することが可能であり、塩類細胞の優れた実験モデルとなる。淡水から海水への移行に伴う塩類細胞の形態変化を連続観察すると、初めは単独に存在していた小型の淡水型塩類細胞が未分化細胞に由来するアクセサリ細胞を徐々に取り込み、最終的に細胞複合体を形成して海水型塩類細胞へと変化する様子が捉えられる。¹⁶⁾ このことは塩類細胞に機能の可塑性があることを示している。

塩類細胞の機能的分類とイオン輸送モデル 従来から提唱されている海水型塩類細胞のイオン輸送モデルは、主に3つのイオン輸送タンパク質から構成される。²⁾ 側底膜に局在する $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ は細胞内の Na^+ を体内側に排出すると同時に、細胞内の電荷を負にすることでイオン輸送の駆動力を供給する。細胞内と体内側に生じた Na^+ の濃度勾配に従い、側底膜にある $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC) を介して Na^+ 、 K^+ および Cl^- が細胞内に取り込まれる。 Cl^- は細胞内と体外の電荷勾配により、頂端膜に発現する CFTR Cl^- channel (CTFR) を通って体外に出される。一方、いったん体内側に輸送された Na^+ は、塩類細胞とアクセサリ細胞の間に形成される細胞間隙から排出される。

これらのイオン輸送タンパク質の細胞内局在から、卵黄嚢上皮の塩類細胞は4つのタイプ(1~4型)に分類される。¹⁷⁾ このうち4型の塩類細胞は、海水型モデルと完全に一致する海水型塩類細胞である。3型は頂端膜に CFTR を欠くことを除けば4型と同じイオン輸送タンパク質の局在を示すことから、このタイプは機能を停止した海水型塩類細胞と考えられる。一方、頂端膜に NKCC が見られる2型の細胞はイオンを取り込む淡水型、また $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ だけが発現している1型は未熟な塩類細胞と推察される。胚期ティラピアの卓越した広塩性は、環境塩分濃度の変化を察知して未熟塩類細胞(1型)が機能的細胞(2~4型)に分化し、あるいは塩類細胞のイオン輸送能が可逆的に変化することに起因する。特に、機能を停止した海水型である3型が淡水中の魚でも存在し、海水移行に伴い速やかに機能的な海水型(4型)に変化することで、胚期ティラピアは急激な環境変化にも対応できると考えられる。¹⁷⁾

卵黄玉培養系の確立と塩類細胞における機能分化の自律性 塩類細胞の機能分化のメカニズムは未だ解明されるに至っていないが、そのひとつの理由として塩類細胞の優れた *in vitro* 実験系が確立されていないことが挙げられる。これまでに塩類細胞の細胞培養や鰓の器官培養などが試みられたが、いずれの場合も塩類細胞を長期間にわたって培養することはできない。そうした中、我々はこれまでにない斬新な実験モデルである「卵黄玉培養系」を開発した。¹⁸⁾ 卵黄玉は胚期ティラピアの卵黄とその表面を覆う卵黄嚢上皮からなり、卵黄嚢上皮の塩類細胞は培養条件下でも機能分化能を保持している。胚期ティラピアの胚体を取り除いた卵黄嚢を平衡塩類溶液中で培養すると、胚体を切り取った傷口が完全に塞がり、その結果、卵黄嚢が卵黄嚢上皮によって完全に包まれた卵黄玉が作製できる。卵黄嚢上皮にある塩類細胞はその極性を保ったまま長期間の培養が可能であり、また培養液と体内側は卵黄嚢上皮を挟んで完全に隔離されているため、別々に実験操作することができる。さらに卵黄玉は胚と同様に淡水および海水中でも培養可能である。

淡水中で培養した卵黄玉には淡水の胚と同様に1~3型の塩類細胞が見られ、海水型である4型は認められないが、海水中で培養すると新たに4型が出現する。¹⁹⁾ このように胚で観察される塩類細胞の応答が卵黄玉で再現できることは、塩類細胞の機能分化過程が胚体の内分泌系や神経系に必ずしも依存するものではないことを示している。塩類細胞は環境塩分濃度の変化を直接あるいは間接的に感知して機能分化する自律的な調節機構を備えているのである。

3. 塩類細胞の浸透圧感知機構

卵黄嚢上皮の塩類細胞が環境塩分濃度の変化を感知してそのイオン輸送機能を切り替える機構は明らかではないが、これまでの研究から塩類細胞は外界に面する頂端膜で環境水の変化を察知するのではなく、体内側の側底膜で浸透圧の変化を捉えることが示されている。²⁰⁾ 塩類細胞の側底膜には水チャンネルの1種であるアクアポリン3(AQP3)が発現している。²¹⁾ 一般に脂質二重層からなる細胞膜は水の透過性が極端に低い、細胞膜に AQP が存在すると水透過性が高まる。塩類細胞の側底膜は細胞質に深く陥入し管状構造を形成するため、他の細胞と比べその表面積は極めて広い。側底膜に AQP3 を配置する塩類細胞は体液の僅かな浸透圧の変化に反応し、細胞体積が変化すると予想される。魚が低張な環境にさらされると体液の浸透圧が僅かに低下し、塩類細胞は細胞内外の浸透圧差にいち早く反応して細胞体積が増加する。逆に高張な環境では塩類細胞が収縮する。このような細胞体積の変化が引き金となり、塩類細胞はイオン輸送機能を迅速に変化させると考えられる。²¹⁾

従来、塩類細胞の機能は海水中での Na^+ と Cl^- の排出という一元的な捉え方がされてきた。しかし、塩類細胞はイオンの取り込みばかりでなく、酸性環境での H^+ の排出にも関わっている。塩類細胞のイオン輸送における機能の多様性と可塑性が、水圏という変化に富んだ環境に魚が適応する上で極めて重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。

謝 辞

本稿で紹介した一連の研究は、過去 10 年余りにわたしと苦労を分かち合った多くの方々との共同研究の成果です。筆を進めるにつれ、あらためて感謝の気持ちで一杯になります。この場をお借りして共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。また、この研究分野にお導き下さった元東京大学海洋研究所所長(現ハワイ大学教授)の平野哲也先生に深く感謝申し上げます。

文 献

- Marshall WS, Grosell M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: Evans DH, Claiborne JB (eds). *The Physiology of Fishes*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton. 2005; 177–230.
- Hirose S, Kaneko T, Naito N, Takei Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2003; **136**: 593–620.
- Uchida K, Kaneko T, Miyazaki H, Hasegawa S, Hirano T. Excellent salinity tolerance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Elevated chloride cell activity in the branchial and opercular epithelia of the fish adapted to concentrated seawater. *Zool. Sci.* 2000; **17**: 149–160.
- Katoh F, Hasegawa S, Kita J, Takagi Y, Kaneko T. Distinct seawater and freshwater types of chloride cells in killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Can. J. Zool.* 2001; **79**: 822–829.
- Katoh F, Hyodo S, Kaneko T. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish, *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J. Exp. Biol.* 2003; **206**: 793–803.
- Uchida K, Kaneko T, Yamauchi K, Hirano T. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na^+ , K^+ -ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *J. Exp. Zool.* 1996; **276**: 193–200.
- Sasai S, Kaneko T, Hasegawa S, Tsukamoto K. Morphological alteration in two types of gill chloride cells in Japanese eel (*Anguilla japonica*) during catadromous migration. *Can. J. Zool.* 1998; **76**: 1480–1487.
- Uchida K, Kaneko T, Yamaguchi A, Ogasawara T, Hirano T. Reduced hypoosmoregulatory ability and alteration of gill chloride cell distribution in mature chum salmon (*Oncorhynchus keta*) migrating upstream for spawning. *Mar. Biol.* 1997; **129**: 247–253.
- Lee KM, Kaneko T, Aida K. Low-salinity tolerance of a marine pufferfish, fugu *Takifugu rubripes*. *Fish. Sci.* 2005; **71**: 1324–1331.
- Lee KM, Kaneko T, Aida K. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006 (in press)
- Kaneko T, Shiraishi K, Katoh F, Hasegawa S, Hiroi J. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 1–9.
- Kaneko T, Hasegawa S, Takagi Y, Tagawa M, Hirano T. Hypoosmoregulatory ability of eyed-stage embryos of chum salmon. *Mar. Biol.* 1995; **122**: 165–170.
- Ayson FG, Kaneko T, Hasegawa S, Hirano T. Development of mitochondrion-rich cells in the yolk-sac membrane of embryos and larvae of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, in fresh water and seawater. *J. Exp. Zool.* 1994; **270**: 129–135.
- Shiraishi K, Kaneko T, Hasegawa S, Hirano T. Development of multicellular complexes of chloride cells in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae in seawater. *Cell Tissue Res.* 1997; **288**: 583–590.
- Kaneko T, Shiraishi K. Evidence for chloride secretion from chloride cells in the yolk-sac membrane of Mozambique tilapia larvae adapted to seawater. *Fish. Sci.* 2001; **67**: 541–543.
- Hiroi J, Kaneko T, Tanaka M. *In vitro* sequential changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae during seawater adaptation. *J. Exp. Biol.* 1999; **202**: 3485–3495.
- Hiroi J, McCormick SD, Ohtani-Kaneko R, Kaneko T. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na^+/K^+ -ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter and CFTR anion channel. *J. Exp. Biol.* 2005; **208**: 2023–2036.
- Shiraishi K, Hiroi J, Kaneko T, Matsuda M, Hirano T, Mori T. *In vitro* effects of environmental salinity and cortisol on chloride cell differentiation in embryos of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, measured using a newly developed “yolk-ball” incubation system. *J. Exp. Biol.* 2001; **204**: 1883–1888.
- Hiroi J, Miyazaki H, Katoh F, Ohtani-Kaneko R, Kaneko T. Chloride turnover and ion-transporting activities of ‘yolk balls’, yolk-sac preparations separated from Mozambique tilapia embryos, incubated in freshwater and seawater. *J. Exp. Biol.* 2005; **208**: 3851–3858.
- Marshall WS, Bryson SE, Luby, T. Control of epithelial Cl^- secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 2000; **203**: 1897–1905.
- Watanabe S, Kaneko T, Aida K. Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater. *J. Exp. Biol.* 2005; **208**: 2673–2682.