平成 25 年度日本水産学会賞

「機能と形態」から探る魚類生理学^a

金子 豊 二

東京大学大学院農学生命科学研究科

Functional and morphological approaches to fish physiology

TOYOJI KANEKO

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

1. はじめに

魚類に限らず生理学的現象では、機能が変化するとそれに伴い形態も変化することが多い。そのため機能と形態の変化を合わせて調べることで、より深く生理現象を理解することができる。ひとつの現象を多面的にアプローチすることは、その本質を理解する上で重要だ。立体的な物体を一方からだけ眺めるのでは、その全体像を捉えるのは難しい。機能と形態という異なったベクトルを手にするすることで、研究の視界が大きく開けるように思える。私はこれまでに、魚類の生殖生理、カルシウム代謝、および浸透圧調節に関する研究に従事し、機能と形態の両側面からこれらの生物現象の解明を目指してきた。本稿では、これまで行ってきた魚類生理に関する機能形態学的研究の中からいくつかの例を紹介したい。

2. ハゼ科魚チチブの生殖周期と下垂体 GTH 細胞

魚類の生殖周期に関して個体レベルの成熟現象から下垂体の細胞レベルにまで掘り下げて研究を進め、ハゼ科魚チチブの生殖周期とその成立における水温・日長の役割を解明した(図1)。¹⁾ 春から夏に産卵するチチブは、春先の水温上昇が引き金となって卵黄蓄積が進み産卵に至るが、晩夏の日長短縮に応答して成熟が抑制されることが明らかとなった。一方、秋から冬にかけては一見成熟の進行が停滞しているように見えるが、この時期に低水温を経験することがその後の成熟に重要である。この間、生殖腺体重比はわずかに上昇するだけだが、低水温により卵濾胞組織が発達し、その結果、卵巣の性ステロイドホルモン(E2)産生能が高まる。冬の間でも見えないところで成熟が着実に進んでいるのである。また、

図1 チチブの生殖周期とその成立における水温・日長の役割

春から夏にかけての産卵期にうち、早い時期に産まれて十分に成長した早熟個体は直ちに成熟し産卵に至るが、産卵に適した環境条件が整っているうちに成長できなかった個体は翌年まで成熟することはない。

このようなチチブの生殖年周期の成立に下垂体で産生・分泌される生殖腺刺激ホルモン(GTH)の関与が予想されたので、GTH細胞の微細構造を電子顕微鏡で詳細に観察した。その結果、生殖年周期に伴って細胞の微細構造が大きく変化することが示され、生殖腺刺激ホルモン分泌細胞のライフサイクルが明らかとなった(図2)。²⁾ GTH細胞はまるでひとつの生物のように、その表情を変化させながら自らに与えられた仕事を淡々とこなし、最後は細胞死によって戦線を離脱することになる。電子顕微鏡はそんな細胞の表情のわずかな変化を機敏に捉えることができる。

図2 チチ卜下垂体の生殖腺刺激ホルモン（GTH）産生細胞のライフサイクル

未熟なGTH細胞（I）が、徐々に分泌顆粒を細胞質に蓄える（II）。GTHの産生・分泌活性が高まると分泌顆粒は減少し、粗面小胞体が拡張し始め（III, IV），最終的には細胞死によりその役割を終える（V）。

3. 下垂体研究と免疫組織化学

下垂体には様々なホルモン分泌細胞が分布する。腺下垂体に限っても10種類ほどのホルモンが産生・分泌される。従来、これらの分泌細胞の同定は、一般染色による細胞質の染色性（つまり分泌顆粒の染色性）と細胞の分布部位に基づいて行われてきた。たとえば、下垂体前葉端部の好酸性細胞（酸性色素で染色される細胞）はプロラクチン産生細胞といった具合である。このような古典的な同定法は技術と熟練を要する厄介な作業だ。そこに登場したのが免疫組織化学（免疫染色）である。免疫組織化学は抗体を用いた極めて特異的の高い染色法である。この導入により、抗体さえあれば誰でも簡単に、しかも正確に下垂体細胞を同定できるようになった。もちろん免疫染色は万能というわけではなく、抗体の特異性の検討など最低限のマナーは守らなくてはならない。プロラクチンに対する抗体を用いてプロラクチン産生細胞を免疫染色するケースを考えてみよう。プロラクチン細胞は前葉端部の大部分を占めることが知られている。免疫反応が案の定、下垂体前葉端部に検出されれば、それはまず間違えなくプロラクチン細胞と考えて構わないだろう。しかし、プロラクチン免疫反応が仮に脳の視蓋で見られたらどうだろうか。世紀の大発見と考えるのは、少し楽天的すぎる。視蓋がプロラクチンを作っているか可能性は否定できないが、こういうときこそ染色法の特異性を疑ってみる必要がある。つまり、同じ免疫反応であっても画一的に結果を信用してはならず、慎重な検討が必要である。マニュアル本にはどんなコントロールを行えばよいか書いてあるが、状況に応じてやり方は必然的に変わることを忘れてはならない。

ニジマスのソマトラクチン産生細胞 魚類のホルモンは、は乳類で最初に発見された後に魚でも見つけられることが多いが、ソマトラクチン（SL）は例外的に魚類で最初に発見された下垂体ホルモンである。ニジマス下垂体をSLの抗体で免疫染色すると、黒色素刺激ホルモン（MSH細胞）以外の中葉の細胞が染まる（図3A）。その隣接切片でSLのmRNAを*in situ* hybridization法により検出すると、SL mRNAのシグナルが見られる

図3 ニジマス下垂体ソマトラクチン（SL）産生細胞の免疫染色と*in situ* hybridization

A 免疫染色，B 隣接切片の*in situ* hybridization，C, D 電子顕微鏡レベルの免疫染色。SLのシグナル（金粒子）は分泌顆粒に認められる（D）。

細胞はSL免疫陽性細胞と一致する（図3B）。さらに、電子顕微鏡レベルの免疫染色（図3C, D）を施すと、SLタンパク質のシグナルはSL細胞の分泌顆粒上に検出される（図3D）。これらの観察から、中葉のSL細胞ではSL遺伝子の転写と翻訳が行われ、合成されたSLタンパク質が分泌顆粒に蓄えられることが明らかとなった。³⁾ソマトラクチンというひとつのホルモンをターゲットに3つの異なる形態的手法を駆使することで、ホルモンの産生と蓄積を明らかにした一例である。免疫染色にしても*in situ* hybridization法にしても、見たいものだけを染め出すという点では極めて都合がよいが、それは同時に他の情報をバツサリと切り捨てることでもある。これらの手法は一般染色による観察と併用することで、その特性がさらに活かされる。また電子顕微鏡レベルの免疫染色になると組織の保存と抗原性の保持は相反する場合が多く、免疫反応性を優先させると微細構造の保持にはある程度目をつぶらなくてはならない。

4. 魚の浸透圧調節研究

私はここ 25 年ほど魚の浸透圧調節の研究に関わってきたが、この分野の研究を始めたのは 30 台半ばであった。すでに研究者として経験をそれなりに積んでからの再スタートだった。初めは戸惑うことも多かったが、悪いことばかりではない。浸透圧調節に関して素朴な疑問をもち続けられたことは、ある程度の年齢に達していたお蔭かもしれない。学部学生のころから慣れ親しんでいる研究分野だと当たり前と考えるしてしまうことが、新鮮な疑問に感じられたのだ。私は今でも機会があるたびに、「キンギョを海水に入れたらどうなると思う？」と老若男女を問わず質問する。まず例外なく、「死んでしまう」という答えが返ってくる。実際にキンギョを海水に入れたら、しばらくは生きていたがやがて死んでしまう。では、試したことがあるのかと問い返すと、そんなことをしたことのある人はまずいない。では、なぜキンギョが海水で生きられないことを知っているのだろうか。またサンマやイワシなどの海水魚が川を泳いでいる姿は想像しにくい。実際に、淡水魚の場合とは逆に、多くの海水魚は真水では生きていけない。一方で、淡水と海水の混じり合う河口付近に棲む魚が、淡水と海水の双方に適応できることは容易に想像がつく。水の中の生活に特化しているはずの魚なのに、なぜそのような好き嫌いがあるのか。こんな素朴な疑問を常に胸に抱いて研究を進めてきたが、やっとその答えの一端が見えてきた。

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や排出を行ない、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。⁴⁾ 塩類細胞はミトコンドリアに富んだ大型の細胞で、外界に接する頂端膜および体内側の側底膜に局在する各種のイオン輸送タンパク質を介して、様々なイオンが双方向に能動的に輸送される。特に側底膜に発現する $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (Na^+ ポンプ) は塩類細胞のイオン輸送の駆動力を供給する。後に述べるように、塩類細胞は機能的に異なるいくつかの型に分類されるが、いずれの塩類細胞にも発現する $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ は塩類細胞を組織学的に検出するための良いマーカーとなる。

5. 広塩性魚と狭塩性魚の浸透圧調節

広塩性魚 モザンビーク・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から通常の海水よりも塩分濃度の高い海水まで、幅広い塩分環境に適応できる。^{5,6)} 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、塩類細胞の $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性が高まり、拡張した頂端部に微絨毛が発達する。このような機能と形態の変化は、イオンを能動的に取り込む淡水型塩類細胞が機能を亢進した状態と考えられる。⁶⁾ 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。⁵⁾

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。⁷⁾ 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るのが特徴である。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によく一致する。一般に海水魚の腎機能は 2 価のイオンを排出することにより、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き、腎臓の形態から判断すると海水魚に分類される。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 価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。⁷⁾

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意外と乏しい。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、狭塩性の海水魚であるトラフグ *Takifugu rubripes* は、淡水に入れたら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。⁸⁾ トラフグの鰓には海水型塩類細胞が発達するが、低浸透圧環境に移しても淡水型の細胞は出現しない。逆に淡水魚のキンギョ *Carassius auratus* は海水中では生きられないが、1/3 希釈海水までならばどうにか適応できる。⁴⁾ キンギョの塩類細胞は淡水型で、高浸透圧環境に移しても海水型塩類細胞は現れない。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決める一因なのである。

6. 発育初期の浸透圧調節と卵黄能上皮塩類細胞

話が前後するが、私が魚の浸透圧調節の分野に参入した当時、内分泌系による調節機構の解明が研究の主流で、淡水適応ホルモンとしてのプロラクチンや海水適応ホルモンとしての成長ホルモンやコルチゾルの作用機序が盛んに調べられていた。そこで思いついたのが胚仔魚といった発育初期の魚の浸透圧調節だ。その理由は極めて単純で、発育初期の魚なら内分泌系が未発達でまだホルモンによる調節が機能していないはずだと考えたからだ。内分泌学的アプローチでは決して解決できないテーマにとっても魅力を感じた。

まず手始めに、そもそも発育初期の魚は浸透圧調節を行っているのかを調べることにした。発眼期のシロサケ *Oncorhynchus keta* を淡水からいきなり海水に移し、血液浸透圧の変化を追ってみた。⁹⁾ 淡水で飼育したシロサケ発眼卵の血液浸透圧はおよそ 360 mOsm で、海水のおよそ 1/3 だ。成魚（約 300 mOsm）よりはやや高い値だが、淡水中でもきちんと浸透圧調節している様子が伺える。発眼卵を海水に移すと、一時的に血液浸透圧が上昇するが、すぐに回復し始めた。これは発眼卵が海水適応のための浸透圧調節を行っている何よりの証拠だ。海水適応では鰓の塩類細胞が塩類を排出することが重要だが、この時期は成魚で見られる浸透圧調節器官（鰓、腎臓、腸管）がまだ機能していない。では、シロサケ発眼卵はどこから余分な塩類を出しているのだろうか。塩類細胞が鰓にあるというのは成魚での常識だが、これは必ずしも胚仔魚には通用しない。発眼期のシロサケで塩類細胞は卵黄を覆う卵黄囊上皮などの体表に広く分布し、未発達な鰓に代り浸透圧調節を行っているのである。

7. ティラピアの卵黄囊上皮塩類細胞

発眼期のシロサケが体表の塩類細胞を駆使して浸透圧調節を行っていることを確信したので、実験魚としてモザンビーク・ティラピアを使って研究をさらに進めることにした。モザンビーク・ティラピアならば、いつでも必要なときに受精卵が使えるからだ。広塩性のモザンビーク・ティラピアは淡水でも海水でも生きられるばか

りでなく、どちらの環境でも産卵できる。さらに受精卵は淡水、海水を問わず、産まれた環境でちゃんと育つ。胚仔魚のティラピアを使うことで、塩類細胞に関する新しい知見を見出すことができた。

淡水中で発生が進むティラピア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。¹⁰⁾ また孵化直後に淡水から海水に移すと大型の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。¹¹⁾ 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のである。卵黄囊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することができた。¹²⁾

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。卵黄囊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。¹³⁾ 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 各種イオン輸送タンパク質の細胞内局在から、塩類細胞を4つのタイプ（Ⅰ～Ⅳ型）に分けることができた（図4）。^{14,15)} Ⅰ型は未熟または機能が止まった状態の塩類細胞。Ⅱ型とⅢ型はどちらも淡水中で発達する細胞であるが、このうちⅡ型の塩類細胞は頂端膜に発現する Na^+/Cl^- cotransporter (NCC) を介して Na^+ と Cl^- を取り込む。Ⅲ型の細胞は頂端膜に Na^+/H^+ exchanger 3 (NHE3) を発現し、 H^+ を排出してそれと交換に Na^+ を取り込む。頂端膜に Cl^- チャネル (CFTR) を発現するⅣ型は、海水中で Na^+ と Cl^- の排出を担当する。胚

図4 ティラピアの塩類細胞の機能的分類

期ティラピアの優れた広塩性は、環境塩分濃度の変化を察知してⅠ型の塩類細胞が機能的細胞（Ⅱ～Ⅳ型）に分化することに加え、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。ふ化仔魚を淡水から海水へ移すと卵黄囊上皮の塩類細胞は小型の淡水型から大型の海水型へと変化するが、これは淡水型のⅢ型から海水型のⅣ型への変化なのである。つまり、Ⅲ型とⅣ型は同じ塩類細胞で、環境塩分濃度に応じて淡水型のⅢ型と海水型のⅣ型が可逆的に変化できるのだ。このⅢ/Ⅳ型塩類細胞の機能の可塑性こそが、ティラピアの広塩性を支えているのである。卵黄囊上皮塩類細胞で調べられた塩類細胞の機能的分類は成魚の鰓の塩類細胞にも当てはまることが明らかとなり、^{6,16)} さらに鰓においてもⅢ/Ⅳ型塩類細胞の機能の可塑性が示された。¹⁷⁾ このことから、卵黄囊上皮の塩類細胞が鰓の塩類細胞のモデルとして有用であることが伺える。

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かった。そうした中、我々の研究グループ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（図5）。¹⁸⁾ 卵黄玉（yolk ball）は胚期ティラピアの卵黄とその表面を覆う卵黄囊上皮からなり、卵黄囊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囊を平衡塩類溶液中で数時間培養すると、胚体を切り取った傷口が完全に塞がり、その結果、卵黄囊が卵黄囊上皮によって完全に包まれた卵黄玉が出来上がる（図5A-D）。卵黄囊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囊上皮を挟んで完全に隔離されているため、別々にイオン濃度を変化させるといった実験操作もできる。

卵黄玉が優れているのは、そればかりではない。卵黄玉は胚と同様に淡水および海水中でも培養可能なのである。淡水中で培養した卵黄玉には淡水の胚と同様にⅠ～Ⅲ型の塩類細胞が見られ、海水型であるⅣ型は認められないが、海水中で培養すると新たにⅣ型が出現する（図5E, F）。¹⁸⁾ 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。

8. 塩類細胞からの K^+ / Cs^+ の排出

海水魚の塩類細胞が Na^+ と Cl^- を排出することは古くから知られているが、我々の研究グループは塩類細胞が Na^+ と Cl^- に加え、同じく海水魚で体内に過剰となる K^+ を排出することを明らかにした。¹⁹⁾ 意外に思えるかもしれないが、魚で K^+ の排出に着目した研究はほとんど見当たらず、その分子機構もまったく分っていなかった。まず、テトラフェニルホウ酸が K^+ と反応して不溶性の沈殿を生じる現象を利用して、海水飼育したモザンビーク・ティラピアの鰓から K^+ が排出されることを示した。形成された沈殿は塩類細胞の開口部に位置し、マイクロX線分析による元素分析の結果、沈殿には多量の K が含まれていることが判明した。このことは、塩類細胞から排出された K^+ がテトラフェニルホウ酸と反応して沈殿を形成したことを示している。次に塩類細胞に発現する K^+ 輸送に関わる分子を検討した結果、塩類細胞の頂端膜に局在する K^+ 輸送体 ROMK (renal outer medullary potassium channel) を介して K^+ が排出されることが明らかとなった（図6）。

一方、 K^+ と似た挙動を示すセシウム (Cs^+) は、生体を構成する元素ではないが、環境水中に存在すると K^+ とともに魚体内に取り込まれてしまう。逆に体内に取り込まれた Cs^+ は、 K^+ と同様に塩類細胞から排出される可能性が考えられる。そこで、 Cs^+ を投与したティラピアで鰓の塩類細胞から Cs^+ が排出されるかを調べた。²⁰⁾ その結果、鰓に Cs^+ を直接注入した魚で、 K^+ の場合と同様にテトラフェニルホウ酸で塩類細胞の開口部に沈殿が形成された。早速、マイクロX線分析で元

図5 ティラピア卵黄玉の作製過程（A～D）と、淡水（E）および海水（F）に移行した卵黄玉の塩類細胞

図6 ティラピア塩類細胞の K^+/Cs^+ 排出モデル

素分析を行ったところ、形成された沈殿中に Cs が検出され、鰹の塩類細胞から K^+ と同じように Cs^+ が排出されることが明らかとなった (図6)。放射性セシウムの生物学的半減期は海水魚で比較的短いことが過去の報告から知られているが、これには塩類細胞の K^+/Cs^+ 排出機構が関与すると考えられる。今後、魚体内における K^+ や Cs^+ の動態をより深く理解することで、放射性 Cs 除染の効率を高める技術の開発につながるものと考えている。

9. おわりに

「機能と形態」、この密接に関連した両者が生命現象を捉える上で重要な要因であることは、今も昔も変わらない。しかし、昨今の分子生物学的・生化学的手法の目覚ましい発展は生命現象を遺伝子・タンパク質レベルで扱う方向へと発展させ、分子レベルでの機能が注目を浴びる一方で、形態的側面が疎かになっているのが現状である。免疫組織化学や *in situ* hybridization などの形態的手法は今や不可欠なものとなっているが、その役割は付加価値的な場合が多い。これらの手法はその特徴である特異性ゆえに、形態をアナログ的に読むものからデジタル情報に変換してしまい、形態学が提示してくれる豊富な情報の大部分を捨て去り、その一部を抽出しているのである。形態学のアプローチの本質は見ることである。肉眼で見えるもよし、顕微鏡などのメガネを使って見るもよし、はたまた免疫組織化学や *in situ* hybridization 法などの色メガネで見えるもよし。そこには必ず、生物が長い年月をかけて育んできた機能に適した選りすぐりのカタチが見えてくるはずである。

謝 辞

一連の研究を遂行するにあたり、多くの方のお世話になり、また多くの人と苦楽をともにした。一人ひとりの

顔を思い浮かると感謝の気持ちでいっぱいになる。私を支えて下さったすべての方々に、この場を借りて深くお礼申し上げる。中でも学生時代の恩師、羽生功先生、学生のころから今に至るまで常に温かく見守って下さった會田勝美先生、そして無名のポスドクであった私を東大海洋研の助手に取り立てて下さった平野哲也先生に衷心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kaneko T, Hanyu I. Annual reproductive cycle of the chichibu-goby *Tridentiger obscurus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1985; **51**: 1645-1650.
- 2) Kaneko T, Aida K, Hanyu I. Ultrastructural changes in the pituitary gonadotropes during the annual reproductive cycle of the female chichibu-goby *Tridentiger obscurus*. *Cell Tissue Res.* 1986; **246**: 137-144.
- 3) Kaneko T, Kakizawa S, Yada T, Hirano T. Gene expression and intracellular localization of somatolactin in the pituitary of rainbow trout. *Cell Tissue Res.* 1993; **272**: 11-16.
- 4) Kaneko T, Watanabe S, Lee KM. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. *Aqua-BioSci. Monogr. (ABSM)* 2008; **1**: 1-62.
- 5) 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.
- 6) Inokuchi M, Hiroi J, Watanabe S, Lee KM, Kaneko T. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A* 2008; **151**: 151-158.
- 7) 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.
- 8) Lee KM, Kaneko T, Aida K. Low-salinity tolerance of a marine pufferfish, fugu *Takifugu rubripes*. *Fish. Sci.* 2005; **71**: 1324-1331.
- 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
 - 15) Hiroi J, Yasumasu S, McCormick SD, Hwang PP, Kaneko T. Evidence for an apical Na–Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. *J. Exp. Biol.* 2008; **211**: 2584–2599.
 - 16) Inokuchi M, Hiroi J, Watanabe S, Hwang PP, Kaneko T. Morphological and functional classification of ion-absorbing mitochondria-rich cells in the gills of Mozambique tilapia. *J. Exp. Biol.* 2009; **212**: 1003–1010.
 - 17) Choi JH, Lee KM, Inokuchi M, Kaneko T. Morphofunctional modifications in gill mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia transferred from freshwater to 70% seawater, detected by dual observations of whole-mount immunocytochemistry and scanning electron microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. A* 2011; **158**: 132–142.
 - 18) 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.
 - 19) Furukawa F, Watanabe S, Kimura S, Kaneko T. Potassium excretion 1 through ROMK potassium channel expressed in gill mitochondrion-rich cells of Mozambique tilapia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012; **302**: R568–R576.
 - 20) Furukawa F, Watanabe S, Kaneko T. Excretion of cesium and rubidium via the branchial potassium-transporting pathway in Mozambique tilapia. *Fish. Sci.* 2012; **78**: 597–602.