

学 位 論 文 題 名

Molecular biological studies on gill Na^+, K^+ -ATPase in masu salmon,
Oncorhynchus masou

(サクラマス の 鰓 Na^+, K^+ -ATPase に関する分子生物学的研究)

学位論文内容の要旨

北部日本に広く分布するサクラマス (*Oncorhynchus masou*) は沿岸漁業資源として非常に重要な魚種である。しかし近年、その天然資源が激減しており、沿岸漁業資源の増大のため、北海道沿岸においては河川や海中への稚魚の放流事業および海中養殖が推進されているが、斃死や成長遅滞ひいては低母川回帰率等の問題を抱え必ずしも十分な成果をあげてはいない。その原因として、十分に海水適応能が発達していない稚魚を河川または海中へと放流していることが考えられる。このような問題点を克服するためには、放流魚の海水適応能を厳密に評価する方法の開発が望まれており、サクラマスの海水適応能の発達ならびにその内分泌調節機構の解明が重要な課題になっている。

サクラマスを含む降海型サケ科魚類は、海水適応能の発達、体色の銀白化といったいわゆる銀化変態を引き起こした後に降海する。一般に、海産魚の体内浸透圧は外界の浸透圧に比べ低いため、水分が奪われるとともに体内には多量の塩が侵入してくる。不足した水分を補給するため海水を積極的に飲み、過剰となった塩分は鰓塩類細胞に存在している Na^+, K^+ -ATPase によって能動的に排出されている。海産魚の鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性は淡水魚に比べ顕著に高いことや、サケ科魚類の海水適応能の発達に伴い鰓 Na^+, K^+ -ATPase の活性が上昇することから、 Na^+, K^+ -ATPase は海水適応に関与する重要な酵素の一つと考えられている。これまでに、サケ科魚類の海水適応能の発達およびその内分泌調節機構を解明するために多くの研究がなされてきた。しかし、これらの研究の多くは

Na^+, K^+ -ATPase 活性を測定するにとどまっておらず、 Na^+, K^+ -ATPase 蛋白の発現変化に着目した研究は行なわれていない。そこで本研究は、サクラマス¹の海水適応能の発達およびその内分泌調節機構の解明を目的とし、鰓 Na^+, K^+ -ATPase の蛋白並びに遺伝子レベルでの発現変化を解析した。

Na^+, K^+ -ATPase は分子量の異なる α および β サブユニットの二つのサブユニットにより構成されている。このうち α サブユニットのアミノ酸配列の中で、魚類から哺乳類に至るまで共通した配列を有し親水性の高い部位のペプチドを合成し、これを抗原に用いてポリクローナル抗体を作製し、その特異性を免疫生化学的手法により検討した。ウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) 腎臓、サクラマス鰓および腎臓のミクロソーム画分を sodium dodecyl sulfate (SDS) により可溶化し、非還元下によるウェスタンブロットにより解析した。その結果、これまでに報告されている哺乳類の Na^+, K^+ -ATPase の分子量と同じ大きさの約 150 kD の位置に免疫反応が認められた。このことから、作製された抗体は α および β サブユニットが結合したインタクトな Na^+, K^+ -ATPase 蛋白を認識していることを明かにした。免疫組織化学的解析により本抗体の特異性を検討した結果、ウサギ、サクラマス、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) およびクロソイ (*Sebastes schlegelii*) の腎臓では、近位および遠位尿細管、集合管の上皮細胞に特異的免疫陽性反応が認められた。また、サクラマス、ニホンウナギおよびクロソイの鰓では、一次および二次鰓弁上に存在する塩類細胞に特異的免疫陽性反応が観察された。これらのことから、作製された抗体は特異的に Na^+, K^+ -ATPase 蛋白を認識し、この酵素蛋白の発現変化の解析に有用であることが示された。

サクラマスの Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット cDNA の単離および塩基配列の決定を行なった。鰓由来の cDNA ライブラリーを作製し、シビレエイ (*Torpedo californica*) Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット cDNA をプローブに用いてスクリーニングを行なった。その結果、5' および 3' 側の非翻訳領域を各々含む 1432 base pair (bp) および 2234 bp の大きさを持つ二つの cDNA 断片が得られ、それぞれの塩基配列を決定した。二つの cDNA 断片には 338 bp の重複した部分が見られたが、5 箇所の塩基配列が異なっていた。しかし、両 cDNA 断

片は、アミノ酸配列において他の魚類との相同性が約 70-80% と非常に高かった。このことから、今回得られた二つの cDNA 断片はサクラマスの Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットをコードしていることが示された。

サクラマスの Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット cDNA をプローブに用いたノーザンブロットにより、サクラマスの鰓、腎臓、腸、肝臓および脳における α サブユニット mRNA の発現を調べた。その結果、鰓では約 3.3 kilo base (kb)、約 3.7 kb および約 5.0 kb の 3 本の特異的なバンドが検出された。脳では約 3.3 kb および約 5.0 kb の 2 本のバンドが、腎臓、腸および肝臓では約 3.3 kb のバンドが検出された。また、筋肉では約 4.0 kb のバンドが検出された。一般に、哺乳類の Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットには 3 つの isoform が存在していることがゲノム DNA の解析により明かにされている。サクラマスゲノム DNA を用いたサザンブロット解析の結果でも、異なる大きさの複数のバンドが検出された。これらの結果から、サクラマスにおいても哺乳類と同様に異なる複数の isoform が存在している可能性が示されたが、各々が機能的な mRNA として働いているか否かは、今後明かにすべき問題として残された。

天然サクラマスの銀化変態に伴う鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性を測定すると共に得られた Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットに対する抗体と cDNA を用いた免疫組織化学的解析およびノーザンブロット解析により、 Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット蛋白および mRNA の発現変化を調べた。鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性は銀化変態の進行に伴い徐々に上昇した。この酵素活性の上昇に先立ち、鰓一次鰓弁上の免疫陽性反応を示す塩類細胞の数および大きさが増すと共に免疫活性が強くなった。一方、鰓二次鰓弁上の塩類細胞の数は、酵素活性が最高値を示した時期には減少した。ノーザンブロット解析の結果、鰓では上述した異なる大きさを持つ 3 つの mRNA が検出された。これら mRNA の発現は、酵素活性の上昇に先立ち増加したが、酵素活性が最高値を示した時期には減少した。これらの結果は、サクラマスの海水適応能の発達には一次鰓弁上の塩類細胞の増加および肥大が深く関与していることを示している。また、 Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット蛋白の発現、塩類細胞の増加および肥大は酵素活性の低い銀化変態初期から開始していることが明かとなった。

他のサケ科魚類において成長ホルモンやコーチゾルが海水適応能の発達に深く関与していることが知られている。そこで、0 年魚サクラマスにヒツジ成長ホルモン (oGH) およびコーチゾルを投与し、免疫組織化学的解析およびノーザンブロット解析により、 Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット蛋白および mRNA の発現変化を調べた。その結果、鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性の上昇は oGH 投与群においてのみ観察された。免疫陽性反応を示す塩類細胞の増加および Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット mRNA の発現は両ホルモンによって誘起されたが、特にコーチゾル投与群において強く誘起された。これらの結果から、酵素活性の上昇には成長ホルモンが、塩類細胞の増殖および Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット蛋白並びに mRNA の発現にはコーチゾルが主に働いている可能性が示された。しかし、 Na^+, K^+ -ATPase の活性化には β サブユニットが必要と考えれるが、本研究ではこのサブユニット蛋白の発現については不明であり、今後検討すべき課題として残された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	麦谷	泰雄
副査	教授	原	彰彦
副査	助教授	上田	宏
副査	助教授	足立	伸次

学位論文題名

Molecular biological studies on gill Na^+, K^+ -ATPase in masu salmon,
Oncorhynchus masou

(サクラマスの鰓 Na^+, K^+ -ATPaseに関する分子生物学的研究)

サクラマスを含む降海型サケ科魚類は、海水適応能の発達、体色の銀白化といったいわゆる銀化変態を引き起こした後に降海する。一般に、海産魚の体内浸透圧は外界の浸透圧に比べ低いため、水分が奪われるとともに体内には多量の塩が侵入してくる。不足した水分を補給するため海水を積極的に飲み、過剰となった塩分は鰓塩類細胞に存在している Na^+, K^+ -ATPase によって能動的に排出されている。海産魚の鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性は淡水魚に比べ顕著に高いことや、サケ科魚類の海水適応能の発達に伴い鰓 Na^+, K^+ -ATPase の活性が上昇することから、 Na^+, K^+ -ATPase は海水適応に関与する重要な酵素の一つと考えられている。これまでに、サケ科魚類の海水適応能の発達およびその内分泌調節機構を解明するために多くの研究がなされてきた。しかし、これらの研究の多くは Na^+, K^+ -ATPase 活性を測定するにとどまっており、 Na^+, K^+ -ATPase タンパクの発現変化に着目した研究は行われていない。そこで本研究は、サクラマスの海水適応能の発達およびその内分泌調節機構の解明を目的とし、鰓 Na^+, K^+ -ATPase のタンパク並びに遺伝子レベルでの発現変化を解析した。

Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットのアミノ酸配列の中で、魚類から哺乳類に至るまで共通した配列を有し親水性の高い部位のペプチドを合成し、これを抗原に用いてポリクローナル抗体を作製し、その特異性を免疫生化学的手法により検討した。ウサギ腎臓、サクラマス鰓および腎臓のミクロソーム画分を可溶化し、非還元下によるウェスタンブロットにより解析した。その結果、これまでに報告されている哺乳類の Na^+, K^+ -ATPase の分子量と同じ大きさの約 150 kD の位置に免疫反応が認められた。このことから、作製された抗体は α および β サブユニットが結合したインタクトな Na^+, K^+ -ATPase タンパクを認識していることを明かにした。免疫組織化学的解析の結果、ウサギ、サクラマス、ニホンウナギおよびクロソイの腎臓では、近位および遠位尿細管、集合管の上皮細胞に特異的免疫陽性反応が認められた。また、サクラマス、ニホンウナギおよびクロソ

イの鰓では、塩類細胞に特異的免疫陽性反応が観察された。これらのことから、作製された抗体は特異的に Na^+, K^+ -ATPase タンパクを認識し、この酵素タンパクの発現変化の解析に有用であることが示された。

サクラマス の Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット cDNA の単離および塩基配列の決定を行なった。その結果、5' および 3' 側の非翻訳領域を各々含む 1432 base pair (bp) および 2234 bp の大きさを持つ二つの cDNA 断片が得られ、それぞれの塩基配列を決定した。両 cDNA 断片は、アミノ酸配列において他の魚類との相同性が約 70-80% と非常に高かった。このことから、今回得られた二つの cDNA 断片はサクラマス の Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットをコードしていることが示された。

サクラマス の Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット cDNA をプローブに用いたノーザンブロットにより、サクラマス の鰓、腎臓、腸、肝臓、筋肉および脳における α サブユニット mRNA の発現を調べた。その結果、鰓では約 3.3 kilo base (kb)、約 3.7 kb および約 5.0 kb の 3 本の特異的なバンドが検出された。脳では約 3.3 kb および約 4.0 kb の 2 本のバンドが、腎臓、腸および肝臓では約 3.3 kb のバンドが検出された。また、筋肉では約 4.0 kb のバンドが検出された。これらの結果から、サクラマス においても哺乳類と同様に異なる複数の isoform が存在している可能性が示された。

天然サクラマス の銀化変態に伴う鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性を測定すると共に免疫組織化学的解析およびノーザンブロット解析により、 Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットタンパクおよび mRNA の発現変化を調べた。鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性は銀化変態の進行に伴い徐々に上昇した。この酵素活性の上昇に先立ち、鰓一次鰓弁上の免疫陽性反応を示す塩類細胞の数および大きさが増すと共に免疫活性が強くなった。ノーザンブロット解析の結果、鰓では上述した異なる大きさを持つ 3 つの mRNA が検出された。これら mRNA の発現は、酵素活性の上昇に先立ち増加したが、酵素活性が最高値を示した時期には減少した。これらの結果は、サクラマス の海水適応能の発達には一次鰓弁上の塩類細胞の増加および肥大が深く関与していることを示している。また、 Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットタンパクの発現、塩類細胞の増加および肥大は酵素活性の低い銀化変態初期から開始していることが明かとなった。

他のサケ科魚類において成長ホルモンやコーチゾルが海水適応能の発達に深く関与していることが知られている。そこで、0 年魚サクラマス にヒツジ成長ホルモン (oGH) およびコーチゾルを投与し、免疫組織化学的解析およびノーザンブロット解析により、 Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットタンパクおよび mRNA の発現変化を調べた。その結果、鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性の上昇は oGH 投与群においてのみ観察された。免疫陽性反応を示す塩類細胞の増加および Na^+, K^+ -ATPase α サブユニット mRNA の発現は両ホルモンによって誘起されたが、特にコーチゾル投与群において強く誘起された。これらの結果から、酵素活性の上昇には成長ホルモンが、塩類細胞の増加および Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットタンパクの発現にはコーチゾルが主に働いている可能性が示された。

上述のように、本研究では、サクラマス の海水適応能の発達に伴う鰓での Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットタンパクの発現変化およびその内分泌制御機構の一部を明かにした。これらの結果は、サケ科魚類の海水適応能の発達機構のみならず魚類の浸透圧調節機構の解明に重要な基礎的知見を提供したものとして高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の業績であると認定した。