

塩類細胞の分子解剖と分化誘導機構

(サブトラクショナルクロニングの活用と一般細胞生物学への貢献)

Molecular characterization of chloride cells and their mechanism of differentiation

広瀬 茂久 (HIROSE Shigehisa)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授



研究の概要

水生生物の存在基盤となっている塩類細胞を特徴付けている分子をクローニングすることにより、(i) 恐山ウグイの酸性型塩類細胞の構造と機能を明らかにすると共に、(ii) ゼブラフィッシュの2種類の淡水型塩類細胞の分子構築にもメスを入れ、Na⁺ 吸収細胞の可視化に成功した。(iii) 淡水型塩類細胞の分化誘導機構を明らかにした。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

理学／生物学・生物形態・構造／微細形態、塩類細胞、浸透圧調節

1. 研究開始当初の背景・動機

- (1) 塩類細胞のタイピングとその機能を分子レベルで説明できるようにすることが生物学上の大きな課題として残されていた。
- (2) 酸性湖に棲む恐山ウグイや広塩性のウナギ等を用いてサブトラクショナルクロニングを行なうとこの問題に答えることが出来るのではないかと考えた。
- (3) 塩類細胞はイオン輸送に特化した非常にユニークな細胞で、表面積を広げるために tubular system が発達しており、ミトコンドリアも多いという特徴を有することから生物形態及び一般細胞生物学に貢献する知見も得られると期待した。

2. 研究の目的

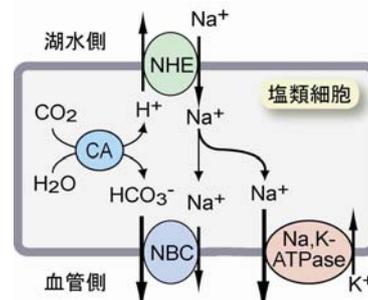
- (1) 恐山ウグイの酸性型塩類細胞の分子構築と機能の解明。
- (2) 淡水型塩類細胞のタイピング (種類分け) とマーカー分子の同定及びNa⁺ 取り込み機構の解明。
- (3) 塩類細胞の分化誘導機構の解明。

3. 研究の方法

- (1) 恐山ウグイを用いたサブトラクショナルクロニングにより酸性下で強く発現する遺伝子産物を同定した。
- (2) 候補分子の塩類細胞内での局在部位は抗体染色により決めた。
- (3) 塩類細胞のイオン輸送活性は蛍光色素や電気生理学的方法により測定した。
- (4) 分化誘導機構の研究にはモルホリンによる Knockdown 実験を活用した。

4. 研究の主な成果

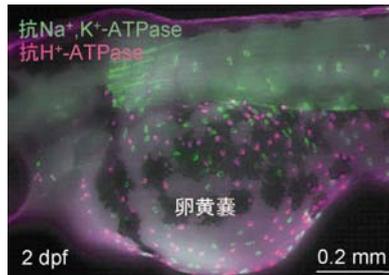
- (1) 恐山ウグイの酸性適応機構の解明：青森県下北半島の恐山湖 (pH 3.5) にすむウグイを酸性に適応させたときにエラの塩類細胞に強く発現してくる分子群の構造・機能解析から、酸性適応機構を分子レベルで説明できるようにした (AJP2003)。



- (2) 淡水型塩類細胞の機能とその分子基盤：淡水型塩類細胞の機能は分子レベルではほとんど分かっていない。私たちは恐山ウグイの解析から、淡水型塩類細胞の主要機能すなわち淡水から塩を吸収するという難しい仕事を成し遂げていると推定される有力候補分子 NHE3 を同定することに成功した (CBP2003)。より確かなものにするために、淡水と海水の両方に適応できるエイの系を解析した。その結果、淡水適応したエイ Atlantic stingray では、淡水型塩類細胞がエラのラメラ部分に増加し、そのアピカル膜に Na/H exchanger (NHE3) が著増することから、私たちが提唱している Na イオン吸収機構がエイでも作動しており一般的な機構であることが強く示唆された (Am. J. Physiol. 2005)。

(3) Na⁺ 取り込み細胞の可視化：ゼブラフィッシュ幼生の卵黄囊表面にある塩類細胞のうちNa⁺ イオンの取り込みに関わっているサブグループをNa⁺ 特異的な蛍光色素 (Sodium Green) を用いて可視化することに成功した (AJP2007)。

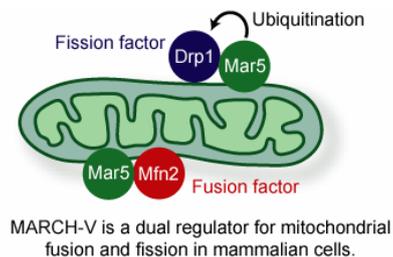
(4) 淡水型塩類細胞のサブタイプ：ゼブラフィッシュの淡水型塩類細胞には、Na⁺-K⁺-ATPase が非常に多いもの (NaK-MRC) と V-type H⁺-ATPase が多いもの (vH-MRC) の 2 種類が存在することを明らかにした。



(5) 2 種類の淡水型塩類細胞の分化が転写調節因子 Foxi3a と 3b によって制御されていることを明らかにした。さらに塩類細胞が点在する仕組みも、デルタ-ノッチシグナル系の働きによって説明できることを示した。

(6) 塩類細胞の新機能 (アンモニア排泄)：ゲノムデータベースが確立しているフグを用いてアンモニア輸送体をすべてクローニングしそれらの発現部位を決定したところ、そのうちの一種 Rhcg1 がエラの塩類細胞のアピカル膜に発現していることが明らかになった。窒素代謝とイオンホメオスタシスの関連を示唆する興味深い知見である。

(7) 一般細胞生物学への貢献 (i)：塩類細胞はミトコンドリアを例外的に多く含む。この性質との関連で、新規のミトコンドリア形態制御因子を見つけ、MARCH-V と命名した (EMBO Rep. 2006; 表紙で注目論文として紹介された)。



(8) 一般細胞生物学への貢献 (ii)：海水型塩類細胞に多量に存在する K チャネルの研究から派生して、そのトポロジー類似体 (MARCH-2 & 3) を見つけ、それらが細胞内トラフィックの新規制御因子であることを明らかにした (MBC2005)。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

塩類細胞という構造及び機能的に極めてユニークな細胞の構造と機能の主要な部分を分子レベルで明らかにするとともに、その発生と分化機構を解き明かす手掛かりを得た私たちの仕事は国内外で高く評価され、共同研究の申し込みも多くなっている。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

広瀬茂久、大八木 昭、金子豊二 (2004) “pH 3.5 の湖にすむ魚の秘密” 「現代化学」2004, 28-33.

Esaki, M., Hoshijima, K., Kobayashi, S., Fukuda, H., Kawakami, K., and **Hirose, S.** (2007) Visualization in zebrafish larvae of Na⁺ uptake in mitochondria-rich cells whose differentiation is dependent on *foxi3a*. *Am. J. Physiol.*, **292**, R470-R480.

Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and **Hirose, S.** (2006) MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* **7**, 1019-1022.

Nakada, T., Westhoff, C. M., Kato, A., and **Hirose, S.** (2007) Ammonia secretion from fish gill depends on a set of Rh glycoproteins. *FASEB J.* **21**, 1067-1074.

Hirata, T., Kaneko, T., Ono, T., Nakazato, T., Furukawa, N., Hasegawa, S., Wakabayashi, S., Shigekawa, M., Chang, M. H., Romero, M., and **Hirose, S.** (2003) Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *Am. J. Physiol.* **284**, R1199-R1212.

Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., and Takei, Y. (2003) Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **136**, 593-620. (総説)

ホームページ等

[http:// www.hirose.bio.titech.ac.jp/](http://www.hirose.bio.titech.ac.jp/)