

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュ塩類細胞に発現するトランスポーター関連タンパク質の機能とその局在
Title(English)	Functional assembly of ion transporters in ionocytes of zebrafish
著者(和文)	伊藤雄介
Author(English)	Yusuke Ito
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9239号, 授与年月日:2013年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 信大
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9239号, Conferred date:2013/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:Nobuhiro Nakamura
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野)： 博士 (理学)
学籍番号： Student ID Number			Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	伊藤 雄介		指導教員 (主)： 広瀬 茂久
			Academic Advisor(main)
			指導教員 (副)：
			Academic Advisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

魚類の多くは、体液と異なった構成の環境水中に生息しているため、様々な手段で体内のイオン恒常性を維持している。淡水魚においてはその体液に比べて非常に希薄な淡水中に生息しているため、体内から Na^+ や Cl^- などの重要なイオンが流出し、体内に余分な水分が流入する危機にさらされている。そこで淡水魚は腎臓において生成される非常に希薄な尿として余分な水分を排出し、環境水中のイオンをエラを通して能動的に取り込むことで体内のイオンホメオスタシスを保っている。この際、イオンの取り込みの場となっているのが体表やエラに存在する mitochondria-rich cell (MRC) と呼ばれる特別な細胞である。

MRC はその名の通りミトコンドリアを豊富に含むイオン輸送性の上皮細胞である。MRC は大量のミトコンドリアによって産生する ATP を用いて Na^+/K^+ -ATPase 等を駆動することによって電気化学的な濃度勾配を作り、種々のイオンの取り込みを可能にしている。しかしながら、MRC において具体的にどのような分子機構でイオンの取り込みが可能になっているかはまだよくわかっていない。本研究ではゲノムデータベースが利用可能で様々な実験手法が確立されているゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて MRC における Na^+ の取り込みに関係するタンパク質の局在とその機能の解析を行った。

ゼブラフィッシュの MRC は少なくとも 2 種類あることが分かっている。一つは vacuolar type H^+ -ATPase (H-ATPase) を豊富に含む H-MRC で、もう一方は Na^+/K^+ -ATPase を豊富に含む NaK-MRC である。過去の阻害剤を用いた実験から、 Na^+ の取り込みには Na^+/H^+ exchanger (Nhe)、Carbonic anhydrase (CA) とアンモニア輸送体 Rhcg1 が重要な役割を果たしているということが示唆されてきた。そこで本研究では前述の Nhe3b と CA2a、CA15a に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫染色を行うことによってそれぞれのタンパク質の細胞内局在を決定した。その結果、Nhe3b と CA15a は H-MRC の頭頂膜に特異的に発現していることを確認した。また CA2a に関しては H-MRC の細胞質及び頭頂膜への局在を確認した。

次に CA15a の詳細な局在を確認するため培養細胞を用いた実験を行った。哺乳類の CA IV と同一性が高い CA15a は C 末端に GPI アンカーモチーフを持っていると予想されており、細胞膜外に局在していると推定されている。これを確認するため、FLAG でタグされた CA15a (CA15-FLAG) を 293T 培養細胞に強制発現させ、ウェスタンブロッティングを行った。FLAG 抗体を用いた検出の結果、強制発現させられた CA15a は細胞膜画分に含まれていることが分かった。さらに細胞膜内か細胞膜外に発現しているかを確認するため、COS7 細胞を用いて CA15-FLAG を強制発現させ、膜透過処理を行わずに抗体免疫染色を行った。その結果、FLAG 抗

体による染色は細胞膜外に局在を確認されているヒト白血球型抗原 (HLA) と同様の染色像を示し、このことから CA15a を強制発現させられた培養細胞において CA15a は細胞膜外に局在していることが明らかになった。

さらに、CA と Na⁺ の取り込みについて詳しく調べるために異なる塩濃度の環境水中における CA2a と CA15a の mRNA の発現量を qPCR によって確認した。その結果 CA2a、CA15a 共に 0.03 mM Na⁺ 環境水中では 0.7 mM Na⁺ 環境水中と比べて発現量の増加が見られた。続いて Morpholino antisense oligonucleotide (MO) を用いた CA2a と CA15a の翻訳阻害を行い、それらの影響を Na⁺ 濃度依存の蛍光試薬 Sodium Green を用いて観測した。その結果、ca2a-MO、ca15a-MO、ca2a-MO + ca15a-MO をインジェクションした稚魚において蛍光強度の低下が観察された。以上のことから ca2a、ca15a の翻訳産物は Na⁺ イオンの取り込みに係わっており、これらのノックダウンによって Na⁺ の取り込みが阻害されることが示唆された。

これらの結果を踏まえ、*in-situ* proximity ligation immunoassay (PLA) を用いて Nhe3b と CA2a、Nhe3b と CA15a、さらに Nhe3b と Rhcg1 が近位に局在しているかを調べた。その結果、何れの組み合わせにおいてもこれらのタンパク質が近位に局在していることがわかり、これらのタンパク質が相互作用している可能性が示唆された。

最後に Nhe3b がどのような活性を持っているか確認するため、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学的実験を行った。Nhe のファミリーは長らく Na⁺ と H⁺ の交換比率が 1 : 1 だと言われてきたが、驚くべきことにゼブラフィッシュの Nhe3b は Na⁺ と H⁺ の交換比率が n : 1 という可能性が示唆された。

以上の結果からゼブラフィッシュの H-MRC では Rhcg1 や Nhe3b、CA2a、CA15a が相互作用することによって効率的に Na⁺ の取り込みを可能にし、さらには Nhe3b が通常の Nhe とは異なる活性を持つことによって、不利な Na⁺ イオン濃度勾配に逆らって Na⁺ イオンの取り込みを可能にしている可能性が示唆された。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 2 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 2 copies of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野)： 博士 (理学) Academic Degree Requested Doctor of (理学)
学籍番号： Student ID Number			指導教員 (主)： 広瀬 茂久 Academic Advisor(main)
学生氏名： Student's Name	伊藤 雄介		指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Freshwater fishes actively absorb salt from their environment to tolerate low salinities. In the zebrafish, vacuolar-type H^+ -ATPase/mitochondrion-rich cells (H-MRCs) on the skin epithelium of zebrafish larvae (*Danio rerio*) are primary sites for Na^+ uptake. In this study, in an attempt to clarify the mechanism for the Na^+ uptake, I performed a systematic analysis of gene expression patterns of zebrafish carbonic anhydrase (CA) isoforms and found that, of 12 CA isoforms, CA2a and CA15a are highly expressed in H-MRCs at larval stages. The *ca2a* and *ca15a* mRNA expression were salinity-dependent; they were up-regulated in 0.03 mM Na^+ water whereas *ca15a* but not *ca2a* was down-regulated in 70 mM Na^+ water. Immunohistochemistry demonstrated cytoplasmic distribution of CA2a and apical membrane localization of CA15a. Furthermore, cell-surface immunofluorescence staining revealed external surface localization of CA15a. Depletion of either CA2a or CA15a expression by Morpholino antisense oligonucleotides resulted in a significant decrease in Na^+ accumulation in H-MRCs. An *in situ* proximity ligation assay demonstrated a very close association of CA2a, CA15a, Na^+/H^+ exchanger 3b (Nhe3b), and Rhcg1 ammonia transporter in H-MRC. In addition, Nhe3b exhibited strong electrogenic Na^+/H^+ exchange activity when expressed in *Xenopus laevis* oocytes. This suggests that CA2a, CA15a, and Rhcg1 play a key role in Na^+ uptake under freshwater conditions by forming a transport metabolon with Nhe3b. Moreover, zebrafish Nhe3b has a unique activity that may play an essential role in the uptake of Na^+ from the extremely diluted environmental water.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 2 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 2 copies of 800 Words (English).