

学位論文題名

Physiological Studies on the Carbonate Formation
of Otoliths in Teleosts

（硬骨魚類耳石の炭酸形成に関する生理学的研究）

学位論文内容の要旨

耳石は内耳膜迷路に存在する炭酸カルシウムの生鉱物で、平衡・聴覚器官として機能する。耳石のリングは1日1本形成され、耳石微量元素組成は生理・環境条件に影響を受ける。この日周輪と微量元素組成より水温、塩分濃度、孵化および変態など、魚類の生活履歴情報解析が行われるがこれらは経験則内に過ぎず、耳石形成機構解明が望まれている。耳石形成機構に関する知見は耳石を用いた履歴解析の一般化に貢献する可能性があるためである。

耳石は非細胞性組織である故、その形成には耳石を内包する内耳小囊とそれに含まれる内リンパ液が関与すると考えられている。

本研究では、耳石形成機構解明の一助として、耳石の炭酸形成とそれに関わる炭酸代謝を、耳石、内耳小囊および内リンパ液に着目し生理学的に調べた。

I. 耳石含有内耳小囊における *in vitro* 炭酸代謝

$^{14}\text{C}\cdot^{45}\text{Ca}$ を用いた耳石含有内耳小囊器官培養法およびダブルラベルした放射性同位元素の分離法を確立し、*in vitro* における内耳の炭酸代謝と耳石炭酸形成を調べた。

耳石含有内耳小囊を培養し H^{14}CO_3 取込から算出した耳石への炭酸取込量は $1.8 \text{ nmol mg}^{-1} 2\text{h}^{-1}$ であったが、内耳小囊から分離した耳石のみを培養した場合、約40%に減少した。また、この取込は代謝阻害剤であるシアン化イオンによって阻害された。一方、 ^{14}C -グルコースおよび ^{14}C -クエン酸由来の炭素は耳石には殆ど取り込まれなかった。

以上より、耳石炭酸形成への内耳小囊における重炭酸の能動輸送の関与が示唆された。また、本培養系では内耳における代謝 CO_2 の検定は不可能と考えられた。

II. 内耳小囊における重炭酸輸送

前項に於いて示唆した内耳小囊における重炭酸の能動輸送について、その機

構を $H^{14}CO_3$ および $^{45}CaCl_2$ を用いた培養系で薬理学的に調べた。

まず、様々な HCO_3^- 濃度の培養液で耳石含有内耳小嚢を培養した結果、炭酸の内リンパ液と耳石への取込は 10 mM までは培養液 HCO_3^- 濃度に依存して増加したが、25 mM 以上ではプラトーに達した。このとき半最大取込時濃度 K_m と最大取込量 V_{max} はそれぞれ内リンパ液で 26.3 mM、36.1 nmol $\mu l^{-1} 2h^{-1}$ 、耳石で 0.6 mM、1.6 nmol $mg^{-1} 2h^{-1}$ であった。カルシウム取込には HCO_3^- 濃度の影響はなかった。培養液 Cl^- 濃度を変化させた結果、炭酸の内リンパ液および耳石への取込は Cl^- 濃度に従って減少した。また、内リンパ液および耳石への炭酸取込は、炭酸脱水酵素阻害剤、 Cl^-/HCO_3^- 交換系阻害剤、 Cl^- チャンネル阻害剤、 HCO_3^- -ATPase 阻害剤および Na^+/K^+ -ATPase 阻害剤によって減少した。

以上より、内耳小嚢細胞において、重炭酸イオンは HCO_3^- -ATPase、 Cl^-/HCO_3^- 交換系を介して内リンパ液へと輸送されることがわかった。また、小嚢細胞内における重炭酸恒常性への炭酸脱水酵素の関与が考えられた。

III. 耳石の炭酸の由来

I 項で行った *in vitro* 培養系において解明不可能であった耳石の炭酸源を *in vivo* 実験系において調べた。

$H^{14}CO_3$ を含む環境水において 24 時間飼育した、または ^{14}C -グルコースを投与後 24 時間飼育したキンギョ耳石の無機炭素の放射活性から上記 ^{14}C 化合物由来炭素の耳石への取込量を測定した。

その結果、環境水およびグルコース由来の炭酸取込量は、それぞれ 19.51 nmol $mg^{-1} d^{-1}$ および 3.94 nmol $mg^{-1} d^{-1}$ であった。則ち、耳石の炭酸の約 80% が環境水由来で約 20% は代謝 CO_2 由来であることがわかった。

IV. 耳石炭酸形成の日周期性

前項の *in vivo* 実験系を用いて、前項で調べた各炭酸源からの無機炭素取込の日周変動を調べた。

18 時-翌 6 時を暗条件とし、前項と同様の方法でキンギョを 6, 12, 18, 24 時および翌 6 時から 6 時間飼育した。飼育後、血清および耳石を採取し、それらの無機および有機炭素放射活性から耳石への炭酸取込量を測定した。また、血清総 CO_2 濃度も測定した。

各炭酸源からの耳石への炭酸取込量および代謝活性の指標として測定した血清の無機/有機放射活性比は暗期に減少し、明期に上昇する日周期性を示した。血清総 CO_2 濃度は逆位相の日周期性を示した。

以上から、耳石の炭酸形成は日周期性を示すが、血中 CO_2 濃度より代謝活性に依存することがわかった。

V. 内耳における炭酸脱水酵素と耳石の炭酸形成

II 項に於いて、内耳小囊細胞にその存在が示唆された炭酸脱水酵素についてその性状を調べた。

V-i. 炭酸脱水酵素タンパク質の性状と局在

内耳小囊タンパク質を SDS-PAGE で分離後、抗炭酸脱水酵素抗体を用いたウェスタンブロットを行った結果、分子量約 28 および 60 kDa の炭酸脱水酵素様タンパク質の存在がわかった。分子量 60 kDa の炭酸脱水酵素様タンパク質は、内リンパ液および耳石有機基質にも存在した。同抗体を用いた免疫組織化学により、本タンパク質は内耳小囊の感覚斑を除く体軸側と体表側に局在する事が明らかとなった。また、耳石研磨切片に於いても本タンパク質の局在が認められた。さらに、赤血球および鰓に比べ低いものの、内耳小囊および内リンパ液でも炭酸脱水酵素活性が確認された。

V-ii. 内耳小囊炭酸脱水酵素 cDNA のクローニング

内耳小囊において存在が確認された炭酸脱水酵素様タンパク質 2 種の関係を明らかにするために、酵素活性ドメインであり且つ高保存性部位をプローブとして炭酸脱水酵素遺伝子を内耳小囊 cDNA ライブラリーからスクリーニングした。60 kDa タンパク質遺伝子はスクリーニング出来なかったが、分子量 28.61 および 28.34 kDa の炭酸脱水酵素をコードする cDNA をクローニングした。両者の相同性は 79% であり、双方とも炭酸脱水酵素 II ファミリーに分類されることがわかった。これらがコードするタンパク質にはシグナル配列が存在せず、これらは非分泌性タンパク質であることがわかった。また、両 mRNA の発現量は器官によって異なることがわかった。

以上 5 項目の結果、本研究では耳石炭酸形成機構の一部を解明した：耳石の炭酸源は、環境水より体内に取り込まれる炭酸と代謝 CO_2 であり、耳石形成に利用される割合は約 8:2 である。各炭酸源由来の重炭酸は重炭酸の能動輸送により小囊細胞を介して内リンパ液へ輸送され、耳石に取り込まれる。小囊細胞では炭酸脱水酵素に触媒される CO_2 - HCO_3^- 平衡で重炭酸恒常性は保たれる。また、約 60 kDa の炭酸脱水酵素様タンパク質は内リンパ液側に放出されて有機基質として耳石に取り込まれ、内リンパ液および耳石表面に於いても、 CO_2 - HCO_3^- 平衡により炭酸源を確保する、“自己触媒”の機能を持つことが考えられた。

しかし、60 kDa のタンパク質に関しては不明な点が多く、今後さらなる研究が必要である。また、本研究で明らかにした 2 種の炭酸脱水酵素遺伝子が相同遺伝子であるか否かを調べる必要がある。また、炭酸脱水酵素以外の輸送体についても遺伝子解析その存在を確かめる必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 都 木 靖 彰
副 査 教 授 原 彰 彦
副 査 助 教 授 清 水 幹 博

学 位 論 文 題 名

Physiological Studies on the Carbonate Formation of Otoliths in Teleosts

(硬骨魚類耳石の炭酸形成に関する生理学的研究)

硬骨魚類の耳石は内耳に存在する炭酸カルシウムを主成分とした硬組織であり、その日周輪および微量元素特性を用いて魚類の生活履歴情報解析の手段として生態学や生物資源科学の分野において広く用いられている。しかし、耳石そのものの形成機構に関しては不明な点が多く、これら履歴情報解析は経験的に行われているにすぎない。特に耳石の炭酸形成に関する研究は少ない。耳石は無細胞性組織であるため、その形成には耳石を内包する内リンパ液および内リンパ液を満たす内耳小囊組織が重要な役割を果たすと考えられている。

本研究は、耳石、内リンパ液および内耳小囊に注目して、耳石の炭酸形成機構を生理学的、免疫組織化学的および分子生物学的手法により調べたものである。得られた研究結果の概要は次の通りである。

1. 耳石含有内耳小囊の器官培養系の確立により、内リンパ液への重炭酸輸送および耳石の炭酸形成を生理学的に調べることに成功した。培養液の HCO_3^- 濃度を変えることにより、耳石への炭酸沈着様式は Michaelis-Menten の式に従うこと、すなわち重炭酸は担体輸送により耳石へと輸送されることを示した。また、同培養系を用いた薬理学的実験により、耳石への重炭酸イオンの輸送には、 Cl^- イオン勾配によって駆動される $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換系、能動輸送系である HCO_3^- -ATPase、 CO_2 - HCO_3^- 緩衝系を触媒する炭酸脱水酵素等が関与していることを明らかにした。
2. 放射性化合物 H^{14}CO_3 を含む環境水における飼育、または ^{14}C -グルコースを腹腔内に投与することにより、これらを由来とする炭素の耳石への取り込み量を調べた。その結果、 HCO_3^- 由来の炭酸とグルコース由来の炭酸は約 4 : 1 の割合で耳石に取り込まれることを明らかにした。すな

わち、耳石の炭酸の約 80%は環境水に由来し、20%は代謝由来の CO₂ に起因することを示した。また、一日の各時間帯において飼育実験を行い、いずれの起源由来の炭酸沈着にも日周変動が認められ、夜間沈着量は昼間のそれに比べて半分以下に減少することを示した。さらに、血清総 CO₂ 濃度は耳石の炭酸沈着と逆位相の日周変動を示すことを明らかにした。すなわち、耳石の炭酸沈着の日周変動が、血液 CO₂ 濃度よりもむしろ代謝活性を反映していることを解明した。

3. 生理学的実験により、内耳小囊にその存在を明らかにした炭酸脱水酵素 (CA) の特性を調べた。抗 CA 抗体を用いた Western blotting により、小囊には 28 kDa または 60 kDa の CA 様タンパク質が、耳石の不溶性有機基質には 60 kDa の CA 様タンパク質が認められた。また、同抗体を用いて免疫組織化学を行った結果、小囊の扁平上皮細胞、移行上皮細胞および耳石の不溶性有機基質に CA タンパク質の局在が認められた。また、内耳小囊の抽出タンパクおよび内リンパ液のタンパク質に CA 活性が認められた。
4. 内耳小囊 cDNA ライブラリを用いて、全長 1.7 kb と 2.4 kb の CA cDNA をクローニングした。これらのオープンリーディングフレームは共に 780 bp で、分子量 28.6 kDa と 28.3 kDa の 2 種類の CA アイソザイム II をコードする mRNA が存在することが確認した。また、これら 2 種の遺伝子を識別するプライマーを作成して RT-PCR を行い、いくつかの組織においてこれら遺伝子の発現を調べた結果、肝臓および皮膚組織においてこれら mRNA の発現が異なることを示した。

以上の結果は、魚類耳石の炭酸形成機構とそれに関わる炭酸代謝機構を明らかにし、さらに耳石の炭酸形成に関連する炭酸脱水酵素の分子生物学的特性を明らかにしたものである。本研究の成果は、耳石の形成機構の解明に新知見をもたらしたものであり、耳石による履歴情報解析の研究分野に応用・貢献しうるものである。よって審査員一同は申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。