

氏 名	ほそ い まさ とみ 細 井 公 富
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1449 号
学位授与の日付	平成 16 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生物科学専攻
学位論文題目	STUDIES ON TAURINE TRANSPORTER IN MOLLUSCS (軟体動物のタウリン輸送体に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 林 勇 夫 教授 左 子 芳 彦 助教授 豊 原 治 彦

論 文 内 容 の 要 旨

水生生物の浸透適応機構は、浸透調節型と浸透順応型に大別できる。浸透調節型生物は、発達した上皮組織や内分泌系によって、環境水の浸透圧の変化にかかわらず体内の浸透圧をほぼ一定に保つことができる。一方、浸透順応型生物は、体内の浸透圧を環境水のそれに同調させて浸透圧変化に順応する。そのため、体内の細胞は、環境水の浸透圧変化の影響を直接受けている。

浸透圧変化に曝された細胞は、細胞内に蓄積している種々の低分子有機化合物（オスモライト）の濃度を調節し、細胞容積と細胞内イオン組成を調節することで浸透圧変化に適応していることが古くから指摘されている。しかし、その浸透順応機構には未解明の部分が多く残されている。

本研究では、代表的な浸透順応生物である軟体動物のムラサキイガイとマガキを対象生物とし、重要なオスモライトであると考えられる遊離アミノ酸の体組織での動態を明らかにし、その大部分を占めるタウリンの細胞への取込みを担うタウリン輸送体に注目して浸透順応の分子機構の解明を行った。論文内容の要旨は以下の通りである。

第 1 章では、ムラサキイガイとマガキの浸透順応についての基礎的知見を得るために、環境水を高浸透圧から低浸透圧（1 倍⇒1/2 倍海水）に変えた時（以下低浸透圧条件下）およびその逆の場合（同じく高浸透圧条件下）の血リンパ液浸透圧、組織水分含量および組織遊離アミノ酸量の変化を測定した結果について述べている。

ムラサキイガイでは、浸透圧変化によって体内浸透圧が変化し、それに伴い組織（細胞）の膨潤・収縮が起こった。また、低浸透圧条件下では、組織内の遊離アミノ酸の減少が認められたが、これは組織の膨潤を抑制するための適応であると考えられた。

一方、マガキにおいても、体内浸透圧および組織水分含量の変動はほぼ同じパターンを示した。低浸透圧条件下では遊離アミノ酸の減少が見られた上、ムラサキイガイでは認められなかった高浸透圧条件下での増加が確認された。これは、マガキはムラサキイガイに比べて長期間高浸透圧条件下においた結果であると考えられる。そして、いずれの種においても、遊離アミノ酸総蓄積量の約 80% を占め、変化量に占める割合も大きいタウリンがオスモライトとして重要な役割を果たしている可能性があることを指摘した。

第 2 章では、第 1 章の結果を受けて、タウリンの細胞内への取り込みを担う分子であるタウリン輸送体（TAUT）に注目し、ムラサキイガイのタウリン輸送体（muTAUT）のクローニングを行い、転写・翻訳レベルの浸透圧応答性を検討した。

muTAUT は、アミノ酸残基が 666 から成る膜タンパク質であり、既知タウリン輸送体と同じく 12 の膜貫通領域を持つことを明らかにした。これまでに知られている脊椎動物 TAUT は、いずれも互いに約 80% 以上のアミノ酸配列の相同性を示すのに対し、muTAUT は、これらとの相同性がおおよそ 50% とかなり低かったため、その機能にも相応の違いがある可能性が想定された。そこで、アフリカツメガエル卵母細胞発現系による機能解析を行った結果、既知脊椎動物 TAUT と比較して、①低タウリン親和性、②低タウリン特異性、③高濃度 Na⁺、Cl⁻ 要求性といった輸送機能特性を有することが明らかに

なった。これらの機能特性は高タウリン・高塩分濃度というムラサキガイの内部環境によく適応した特性であると考えられた。また、ノーザンブロット分析によって、muTAUT 遺伝子は高浸透圧応答性のみならず、既知 TAUT ではみられない低浸透圧応答性を示し、これが低浸透圧時の組織内タウリン濃度の急激な減少を補うための対応である可能性を指摘した。すなわち、細胞内の過度のタウリン濃度の減少を防ぐため、また、その後必ず起こる浸透圧回復 (= 高浸透圧) の際に速やかにタウリンを細胞内に取り込むための反応であると考えた。さらに免疫染色によって、muTAUT は浸透圧変化に直接曝されている外套膜上皮と鰓でとくに強く発現することが明らかになった。以上の結果から、muTAUT が細胞の浸透順応に重要な役割を担っていると結論づけた。

第3章では、同じくマガキからのタウリン輸送体 (oyTAUT) のクローニングの結果について述べ、その機能解析を行った。oyTAUT はアミノ酸残基が671から成り、12の膜貫通領域を有する膜タンパク質であり、muTAUT と同様、低タウリン親和性・特異性および高濃度 Na⁺、Cl⁻ 要求性を備えている。マガキの内部環境はムラサキガイと酷似していることから、本章の結果はタウリン輸送体をもつ機能特性が動物の内部環境に適応しているとする前章の指摘を支持すると結論づけた。

論文審査の結果の要旨

水生無脊椎動物の多くは移動性に乏しく、環境の変化に対しておおむね受動的な存在である。内分泌系などの高次の浸透調節機構を欠く無脊椎動物にとっては、環境水の浸透圧変化に対する浸透調節には、細胞レベルでの対応が大きなウェイトを占めており、細胞内に含まれる遊離アミノ酸などの有機低分子化合物をオスモライトとして利用し、その含有量を増減させることにより浸透調節をしていると考えられているが、そのメカニズムの詳細に関してはなお不明な点が多い。

本研究は、固着性で浸透圧変化の大きい潮間帯から潮下帯上部を主な生息域とする二枚貝のムラサキガイとマガキを対象に、飼育条件下で環境水の浸透圧を変化させ、その際にみられる生理的な応答の機構を細胞レベルで明らかにしたもので、評価すべき点は以下の通りである。

1. ムラサキガイおよびマガキとも、環境水の浸透圧を変化させると、細胞内に含まれる遊離アミノ酸を主とする低分子有機化合物のうち、その蓄積量の8割を占めるタウリン量に顕著な増減がみられることを明らかにし、タウリンが両種の浸透調節においてオスモライトとして重要な役割を果たしていることを示した。
2. 両種のタウリンの輸送に関わるトランスポーター muTAUT および oyTAUT をクローニングし、それらはアミノ酸残基がそれぞれ666および671から成る膜タンパク質であり、これまでに知られている脊椎動物 TAUT と同じく12の膜貫通領域を持つことを明らかにする一方、既知 TAUT とのアミノ酸配列の相同性がおよそ50%とかなり低いことを指摘した。
3. ノーザンブロット分析によって、muTAUT および oyTAUT 遺伝子は高浸透圧応答性のみならず、既知 TAUT にはない低浸透圧応答性をも示すことを明らかにした。また、muTAUT について免疫染色を行い、浸透圧変化に直接曝されている外套膜上皮と鰓でとくに強く発現することを確かめた。
4. 上記のタウリン輸送体について、アフリカツメガエル卵母細胞発現系による機能解析を行った結果、既知脊椎動物 TAUT と比較して、①低タウリン親和性、②低タウリン特異性、③高濃度 Na⁺、Cl⁻ 要求性といった輸送機能特性を有することを明らかにし、これらの機能特性は高タウリン・高塩分濃度というムラサキガイおよびマガキの内部環境によく適応した特性であることを指摘した。
5. 上記の結果から、海洋無脊椎動物には、それぞれの生理的特性に対応した多様な TAUT の存在が予測され、これらの構造および機能に関する詳細な比較検討が、海洋無脊椎動物の細胞レベルでの浸透調節機構のより詳細な解明に道を拓くものであることを指摘した。

以上のように、本論文は、海洋無脊椎動物が細胞レベルで行っている浸透調節の実態を明らかにするとともに、その仕組みを分子生物学的手法により解明したもので、海洋生物学ならびに動物生理学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年9月16日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。