

学 位 論 文 題 名

Cetacean osmoregulatory mechanisms based on
molecular analyses of receptors and transporters in the kidney

（クジラ類の浸透圧調節機構：腎臓の受容体・輸送体の分子生物学から探る）

学位論文内容の要旨

クジラ類のほとんどは海水という高浸透圧環境に生息しており、そこで淡水を得ることは非常に困難である。しかしその体液浸透圧や体液塩濃度は、海水の約3分の1という陸生哺乳類と大きく変わらない範囲に保たれている。クジラ類は海水中でどのように体液浸透圧を調節しているのだろうか。汗腺を有しないことから、すべての塩排出は腎臓を介していると考えられる。クジラ類の腎臓は数百から数千の分葉が集まった特殊な構造をしており、その生理学的意義は分かっていない。また海水摂取がほとんど見られないことから、クジラ類は食物の代謝によって生じる水を体内に維持していることが考えられる。ヒゲクジラ類は主に体液が海水に近い海産無脊椎動物を食し、ハクジラ類は魚や深層性のイカを食する。高濃度な塩分を含む餌を捕食するクジラ類にとって、水を少しでも保持する一方効率よく塩分を排出しなければならず、強力な塩排出機構が備わっていると考えられるが、その実体は不明である。クジラ類に関する研究は、イルカなどの小型鯨類を用いた行動実験の報告が若干あるが、ヒゲクジラ類を含む大型鯨類の報告はほとんど存在しない。近年の厳しい保護管理体制の下、クジラ類を用いた電解質平衡に関する研究は非常に少ない。このような厳しい研究条件をクリアするため、分子生物学的アプローチから取り組めないだろうか考えた。

本研究では、クジラ類の腎臓における浸透圧調節機構を探るため、野生のクジラ4鯨種の基礎的な体液成分を陸生哺乳類と比較することから着手した。得られた結果から重要と考えられる受容体・輸送体分子に着目し、クジラ類の分葉腎における機能を解析するため、分子生物学的手法を用いてそれらの核酸配列の同定を行った。

研究を始めるにあたり、野生の大型鯨類から新鮮な試料を採取するため、2002年北西太平洋鯨類捕獲調査（JARPNII）に参加した。ヒゲクジラ類のミンク、ニタリ、イワシクジラおよびハクジラ類のマッコウクジラの雌雄複数個体より、血液と尿、核酸抽出用および組織学的解析用の組織を採集した。異なる浸透圧環境に生息する陸生哺乳類と比較するため、偶蹄目の乳牛およびヒトコブラクダ、フタコブラクダからも同様の組織を採集し、それらの血漿および尿の浸透圧、電解質濃度、尿素濃度、血中ステロイドホルモン濃度、血糖値を測定した。クジラとウシ、ラクダの間で血漿の浸透圧および電解質濃度に大きな差がないものの、クジラ類が尿を海水以上の浸透圧に濃縮していること、その成分としてはナトリウムと尿素が重要であることを証明した。一方コルチコステロイド濃度には有意差が見られなかったことから、浸透圧調節機構に深く関与していない可能性が示唆された。マッコウクジラに比べヒゲクジラ類の血

漿および尿で高い浸透圧、尿素濃度が検出されたことから、今回初めて、同じ測定系でヒゲクジラ類とハクジラ類の体液浸透圧に違いがあることを明らかにした(第1章)。

一般に、高張尿生成には腎臓内に浸透圧勾配を形成することが必要であり、ナトリウムと尿素が鍵を握る。第1章の結果から、実際にクジラ類は、陸生哺乳類よりも高濃度のナトリウムと尿素を尿中に排出していることが分かった。そこで腎臓において抗利尿作用を促進するバソプレシン、および浸透圧勾配を形成する働きをもつ尿素輸送体(UT)に的を絞る、それらの機能を解析するため cDNA のクローニングを行った。

哺乳類の腎臓では、窒素代謝産物である尿素が浸透圧有効物質として受動的に輸送され、その結果腎臓内に生じる濃度勾配によって、尿細管からの水再吸収が促進される。クジラ類の腎臓における尿素輸送体の cDNA 配列を同定するため、腎臓より抽出された RNA を用いて、コピレゴンドウの配列情報を元に RT-PCR 法および RACE 法によって全翻訳領域を含む cDNA の塩基配列を決定した。4 鯨種の UT cDNA は、全長約 2.5kb からなり 397 残基のアミノ酸をコードしていた。哺乳類の尿素輸送体には、腎臓特異的な A 型と広く発現している B 型が存在するが、演繹アミノ酸配列は UT-A2 型と高い同一性を示した。UT-A2 型は腎臓のヘンレ係蹄の下行脚に存在し、尿素の再利用に重要な役割を果たしていると考えられる。演繹アミノ酸配列を鯨種間、陸生哺乳類と比較した結果、クジラ類がクラスターを形成し、他の哺乳類とはリン酸化部位に違いが見られたことから、クジラ類に特有の調節機構の存在が示唆された。また生態の異なるヒゲクジラ類とマッコウクジラの間でも、リン酸化部位に違いが見られたことから、腎臓の尿素透過性に影響を与えている可能性が示唆された(第2章)。

次にクジラの腎臓に発現しているバソプレシン受容体のサブタイプを同定するため、分子生物学的手法を用いて、それらの cDNA 配列を解析した。哺乳類のバソプレシン受容体には、肝臓など多くの組織で発現している V1a 型、主に下垂体で発現する V1b 型、腎臓に特異的な V2 型が存在し、V1a 型、V1b 型と V2 型では異なる情報伝達系を介して、抗利尿作用や血圧の調節、糖新生など幅広い生理機能を制御している。現在クジラ類のバソプレシン受容体に関する報告はない。そこで陸生哺乳類の配列情報を用いて RT-PCR 法を行い、クジラの腎臓から約 850bp の V1a 型、V1b 型、約 400bp の V2 型の cDNA 断片を得た。演繹アミノ酸配列を鯨種間、陸生哺乳類と比較した結果、いずれの受容体もクジラ類でよく保存されていることが明らかとなった。リガンド親和性に関わるとされるアミノ酸残基に変異は見られなかったものの、N 末細胞外領域などにクジラ類特有の変異が見られたことから、陸生哺乳類との間で調節機構に違いがあることが示唆された。ヒゲクジラ類とマッコウクジラの間でも変異が見られたことから、食性の異なるクジラ類でバソプレシン受容体による浸透圧調節機構に違いがあることが示唆された(第3章)。

以上の一連の研究から、クジラ類は腎臓においてナトリウムと尿素を高濃度に排出し、高張尿を生成していることが明らかとなった。マッコウクジラに比べ、ヒゲクジラ類の血液および尿で高濃度の尿素が検出されたことから、生態の異なるクジラ類の間で腎臓の尿素透過性に違いがあることが示唆された。ヒゲクジラ類およびハクジラ類の腎臓に発現している尿素輸送体とバソプレシン受容体は、陸生哺乳類に比べクジラ類でよく保存されていたが、ヒゲクジラ類とマッコウクジラの間に変異が見られたことから、実際の体液成分の違いはこれらによる浸透圧調節機構の違いを反映していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浦 野 明 央

副 査 教 授 小 池 達 郎

副 査 教 授 高 畑 雅 一

副 査 助 教 授 兵 藤 晋 (東京大学海洋研究所)

学 位 論 文 題 名

Cetacean osmoregulatory mechanisms based on molecular analyses of receptors and transporters in the kidney

(クジラ類の浸透圧調節機構：腎臓の受容体・輸送体の分子生物学から探る)

申請者は「鯨は海水の中でどうして生きていられるのか？」という疑問に分子生物学的な手法で取り組み、その謎を解きほぐす端緒となり得る多くの新たな知見をもたらした。ここで、簡単に分子生物学的と書いたが、分子レベルの研究を可能にするための新鮮凍結試料を入手することは至難の業である。したがって、申請者が得た結果は「クジラの生物学」研究に貴重なページを付け加えたと言ってもよいものである。以下、申請者が見いだした知見の主要なものを簡潔に記す。

申請者は、まず、ヒゲクジラ類のミンク、ニタリ、イワシクジラおよびハクジラ類のマッコウクジラの雌雄複数個体より、血液と尿、核酸抽出用および組織学的解析用の組織を採集した。異なる浸透圧環境に生息する陸生哺乳類と比較するため、偶蹄目の乳牛およびヒトコブラクダ、フタコブラクダからも同様の組織を採集し、それらの血漿および尿の浸透圧、電解質濃度、尿素濃度、血中ステロイドホルモン濃度、血糖値を測定した。クジラとウシ、ラクダの間で血漿の浸透圧および電解質濃度に大きな差がないものの、クジラ類が尿を海水以上の浸透圧に濃縮していること、その成分としてはナトリウムと尿素が重要であることを証明した。一方コルチコステロイド濃度には有意差が見られなかったことから、浸透圧調節機構に深く関与していない可能性が示唆された。マッコウクジラに比べヒゲクジラ類の血漿および尿で高い浸透圧、尿素濃度が検出されたことから、今回初めて、同じ測定系でヒゲクジラ類とハクジラ類の体液浸透圧に違いがあることを明らかにした。

続いて、クジラ類の腎臓における尿素輸送体の cDNA 配列を同定するため、腎臓より抽出された RNA を用いて、コビレゴンドウの配列情報を元に RT-PCR 法および RACE 法によって全翻訳領域を含む cDNA の塩基配列を決定した。4 鯨種の UT cDNA は、全長約 2.5kb からなり 397 残基のアミノ酸をコードしていた。哺乳類の尿素輸送体には、腎臓特異的な A 型と広く発現している B 型が存在するが、演繹アミノ酸配列は UT-A2 型と高い同一性を示した。UT-A2 型は腎臓のヘンレ係蹄の下行脚に存在し、尿素の再利用に重要な役割を果たしているとされる。演繹アミノ酸配列を鯨種間、陸生哺乳類と比較した結果、クジラ類がクラスターを形成し、他の哺乳類とはリン酸化部位に違いが見られたことから、クジラ類に特有の調節機構の存在が示唆された。また生態の異なるヒゲクジラ類とマッコウクジラの間でも、リン酸化部位に違いが見られたことより、腎臓の尿素透過性に影響を与えている可能性を示唆した。

さらに、クジラの腎臓に発現しているバソプレシン受容体のサブタイプを同定するため、分子生物学的手法を用いて、それらの cDNA 配列を解析した。哺乳類のバソプレシン受容体には、肝臓など多くの組織で発現している V1a 型、主に下垂体で発現する V1b 型、腎臓に特異的な V2 型が存在し、V1a 型、V1b 型と V2 型では異なる情報伝達系を介して、抗利尿作用や血圧の調節、糖新生など幅広い生理機能を制御している。現在クジラ類のバソプレシン受容体に関する報告はない。そこで陸生哺乳類の配列情報を用いて RT-PCR 法を行い、クジラの腎臓から約 850bp の V1a 型、V1b 型、約 400bp の V2 型の cDNA 断片を得た。演繹アミノ酸配列を鯨種間、陸生哺乳類と比較した結果、いずれの受容体もクジラ類でよく保存されていることが明らかとなった。リガンド親和性に関わるとされるアミノ酸残基に変異は見られなかったものの、N 末細胞外領域などにクジラ類特有の変異が見られたことから、陸生哺乳類との間で調節機構に違いがあることが示唆された。ヒゲクジラ類とマッコウクジラの間でも変異が見られたことから、食性の異なるクジラ類でバソプレシン受容体による浸透圧調節機構に違いがあることを示唆した。

以上の一連の研究から、クジラ類は腎臓においてナトリウムと尿素を高濃度に排出し、高張尿を生成していることが明らかとなった。マッコウクジラに比べ、ヒゲクジラ類の血液および尿で高濃度の尿素が検出されたことから、生態の異なるクジラ類の間で腎臓の尿素透過性に違いがあることが示唆された。ヒゲクジラ類およびハクジラ類の腎臓に発現している尿素輸送体とバソプレシン受容体は、陸生哺乳類に比べクジラ類でよく保存されていたが、ヒゲクジラ類とマッコウクジラの間に変異が見られたことから、実際の体液成分の違いはこれらによる浸透圧調節機構の違いを反映していることが示唆された。

よって、申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格を有するものと認める。