

論文内容の要旨

論文題目

Natriuretic peptides and circulatory regulation in cetaceans

(鯨類における循環調節とナトリウム利尿ペプチド)

氏 名 仲 忠臣

序論

海棲哺乳類とは、食肉目の一部(ホッキョクグマ、ラッコ、鰭脚類)、カイギュウ目(ジュゴン、マナティー)、クジラ目からなる動物群である。彼らはその生活史の一部またはすべてを水中環境に依存しており、その依存度は水中生活への適応度によって異なっている。そのなかでも、鯨類はおよそ 5000 万年前に陸上から水中へと進出した動物群であり、もっとも高度に水中生活へ適応している。現在知られているおよそ 80 種の鯨類のうち、すべての種が一生を通じて水中生活を送っている。彼らは進化の過程で非常にユニークな解剖学的、生理学的適応を遂げてきた。その代表が水中での心臓血管系の調節機構である。陸上で生活するすべての動物は等しく重力の影響下にあり、その体液は体の下方へと押し下げられている。いっぽう、水中や宇宙空間では重力から開放され、押し下げられていた体液は胸郭部へと上昇し、心臓へと灌流する静脈血(静脈還流)が増加して、全身の血行動態の変化を引き起こす。一生を通じて水中生活を送る鯨類は常に重力の影響をほとんど受けず、その血液は偏ることなしに全身を循環していると考えられる。しかし、鯨類が潜水を行う際には徐脈がおき、さらに抹消の血管が収縮することで血液は体幹部に集まり、心臓や脳などの低酸素に弱い器官を中心に灌流するということが知られている。また、ほとんどの鯨類は浸透圧が体液より約 3 倍高張である海水中に生息しており、真水に触れることは一部の種を除いて起こり難い。したがって、鯨類は餌に含まれる水分や、脂肪およびタンパク質を代謝することで産生される代謝水、また、時には海水を直接飲んで体内の水分バランスを保っているとされているが、彼らの体液調節機構についてはいまだ多くの議論がなされている。これらの点から、鯨類の循環・体液調節は非常に興味深い、大型動物であるために実験が困難であることや、動物愛護の観点から実験を行うには大きな制限があり、特にこれらの調節にかかわる内分泌学的な側面については現

在でも情報は非常に限られている。

心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)および B 型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は、ともに循環の中枢である心臓から分泌されるペプチドホルモンであり、強力な血管弛緩と腎臓における水・ナトリウムの再吸収抑制を引き起こす。その結果、血液量が減少し、血圧が低下することで心臓の負荷を軽減させる作用を持っている。ナトリウム利尿ペプチド(NP)は、心臓保護作用をもつことから臨床医学や基礎医学においてヒトや実験動物を用いて多くの研究がなされてきた。いっぽうで、重力と NP に関する研究も行われており、ヒトやイヌを水中に浸漬した場合、増加した静脈還流によって心臓が大きく伸展し、血中の ANP 濃度が上昇して利尿が引き起こされることが知られている。宇宙空間で重力から開放された場合にも、血漿 ANP 濃度は一過性に上昇する。

このように、NP は実験動物だけでなく野生動物においても循環調節、水・電解質代謝に重要な役割を果たしており、海棲というユニークな生態をもつ鯨類における NP の作用は非常に興味深い。しかし、現在までに鯨類の NP に関する情報はまったく存在しなかった。そこで、私は博士課程において、鯨類で ANP と BNP を同定するところから研究を開始した。同定した配列を基にラジオイムノアッセイによる測定系を確立して、組織や血液中の分子種を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)や質量分析により同定することにより、鯨類の ANP と BNP のプロセッシングの過程を明らかにした。さらに、水棲動物である鯨類の心臓血管系の調節における ANP や BNP の関与を調べるために、飼育下の動物を用いて重力が ANP と BNP の分泌に及ぼす効果について検討した。

鯨類の ANP と BNP の同定およびプロセッシング過程の解明

まず、バンドウイルカ(*Tursiops truncatus*)、カマイルカ(*Lagenorhynchus obliquidens*)、イシイルカ(*Phocoenoides dalli*)の3種の鯨類の心臓から、ANP と BNP の cDNA をクローニングした。cDNA から予想される ANP 前駆体のアミノ酸配列は、鯨類を含めて哺乳類間で74%以上の保存性を示し、成熟ペプチドである ANP-28 は齧歯類を除く他の哺乳類と同一であった。いっぽう、BNP 前駆体は鯨類と他の哺乳類の間で保存性は低く、マウスと比較するとおよそ30%の保存性しか示さなかった。前駆体アミノ酸および cDNA 配列をもとに哺乳類の間で分子系統解析を行ったところ、鯨類の ANP と BNP はそれぞれラクダやブタなど、偶蹄目の動物の NP とクラスターを形成した。鯨類は、系統的に偶蹄目から分岐してきたことが DNA や形態学を用いた系統解析から明らかになっており、鯨類と偶蹄類は鯨偶蹄目を形成するという説が提唱されているが、機能的制約を受けるホルモン分子である ANP や BNP の解析もその結果を支持することとなった。また、両ホルモンとも心房で最も強く発現しており、心室での発現は少なかった。いっぽう、体液調節器官である腎臓では、ANP、BNP ともにほとんど発現がみられなかった。

次に、組織や血中に存在するホルモン分子の生化学的な解析をおこなった。まず、ヒト ANP-28 とブタ BNP-26 の抗体を用いて、鯨類の ANP と BNP に特異的で高感度なラジオイムノアッセイ(RIA)系を確立した。抗原として用いたこれらの分子は、cDNA クローニングの結果明らかになったイルカ ANP-28 と BNP-26 の配列に等しい。心臓における ANP と BNP の組織含量を測定したところ、ヒトやブタなどの他の哺乳類と比べて著しく低い値を示すいっぽう、血漿濃度は他の哺乳類と比較して鯨類の方が高い値を示した。逆相およびゲル濾過 HPLC と RIA を組み合わせて分子種を

調べると、ANP は心臓ではプロホルモンとして貯蔵されているが、血液中には成熟ホルモンである ANP-28 のみが存在した。いっぽう、BNP は心臓内からは低分子量の成熟ペプチドのみしか検出されなかった。鯨類の BNP 前駆体には、プロセシング酵素である proprotein convertase の認識配列として知られる Arg-X-X-Arg 配列が 2 ヶ所に存在し、それぞれアミノ酸の数から BNP-32 と BNP-26 が切り出されることが予想されたが、鯨類の BNP-32 の N-末端には、ブタと比べて 2 箇所のアミノ酸変異があるため、HPLC の溶出位置からは正確な分子種を明らかにすることはできない。そこで、心臓抽出物をイオン交換、ゲル濾過、逆相の 3 ステップのクロマトグラフィーによって粗抽出したのち、免疫沈降法によりさらに精製して質量分析を行ったところ、心臓に貯蔵されている分子種は BNP-26 であることが明らかになった。また、血中には心臓と同様に BNP-26 が存在した。以上のことから、産生された ANP は心臓にプロホルモンとして貯蔵され、血中に放出される際に成熟ホルモンに変換されるが、BNP は組織内ですでに成熟ホルモンへのプロセシングが終わっていることが明らかになった。

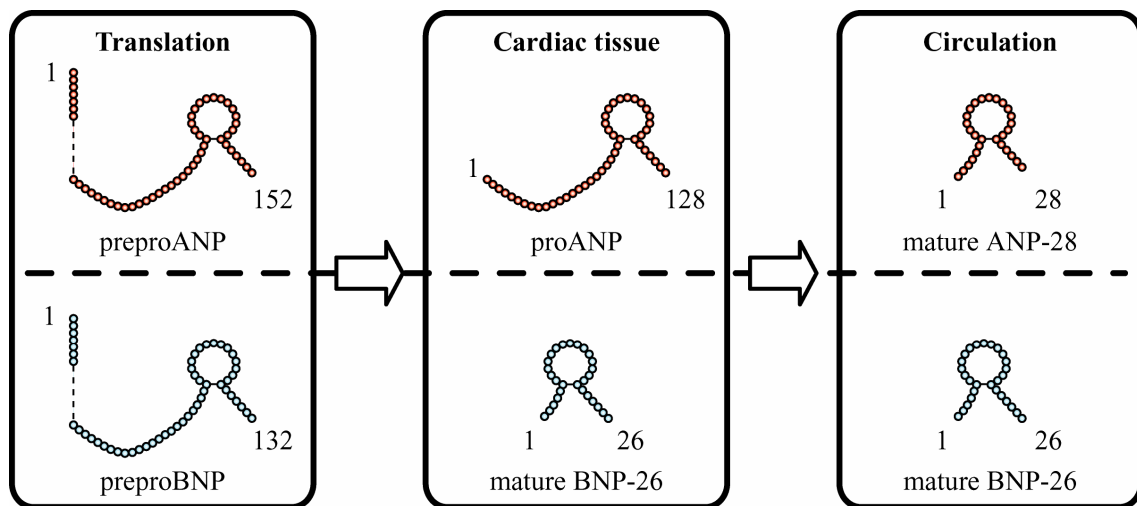


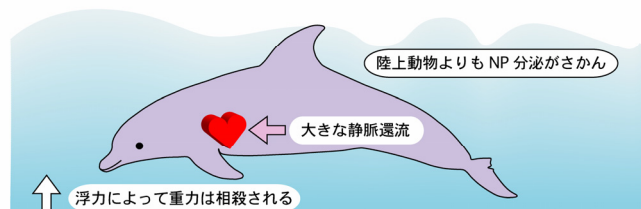
図1 鯨類における ANP と BNP のプロセシングモデル

重力の変化による ANP と BNP の分泌変化

次に、水棲動物である鯨類の心臓血管系調節における ANP や BNP の関与を調べるために、動物を陸に上げて重力をかけた際の ANP や BNP の分泌変化を調べる生理学的な実験を行った。飼育バンドウイルカを用いて、水面で浮かんでいる動物と、飼育プールから水を抜き陸上で重力にさらした動物の血漿 ANP および BNP 濃度を調べた。その結果、2 つの条件下で血漿濃度は変化しなかったが、その濃度は同様の状況にあるヒトの血漿濃度と比較すると 2-3 倍高い値であった。心臓に含まれる ANP および BNP 濃度はヒトと比べると低かったため、鯨類では心臓で合成された NP はすばやく分泌されていると考えられる。また、落水により血液中のコルチゾル濃度に有意差がみられなかったため、動物に大きなストレスはなかったと予想される。落水時には心拍数が上昇する傾向がみられたが、自重によって押しつぶされた心臓が心拍出量を維持することができなくなる

ために、代償的に心拍数が上昇したものと考えられる。鯨類の胸郭が水圧による肺崩壊を起こしやすいように柔軟であるという特徴も、心臓の圧迫に寄与していると考えられる。落水時には重力により血液の偏りが生じ、心臓への還流血液量が減少して ANP 分泌が減少すると予想されたが、心拍数の上昇は ANP 分泌を促進するため、血漿 ANP 濃度に差が見られなかったものと考えられる。いっぽう、BNP は常に血中に一定量を放出する構成性分泌様式で分泌されるため、本研究のような急性実験では血漿濃度の変化として捉えることができなかったと考えられる。これまでに鯨類を陸上にあげた際の循環動態の変化については研究例がなかったが、砂浜に座礁した鯨類もおそらく同様の循環動態に陥っていると考えられる。このように、生活の場を陸上から水中へと移行させた鯨類は、完全に水中生活に適応しており、陸上にあがった際には姿勢や胸郭の形態が異なるため陸上動物と異なる循環動態に陥り、ANP と BNP も独自の分泌動態を示すものと考えられる。

水中



陸上

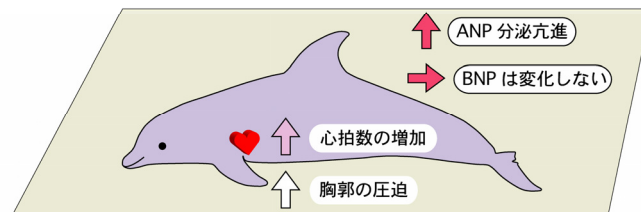


図 2 水中と陸上でのバンドウイルカの循環動態と NP の分泌動態についての仮説

まとめ

以上、鯨類の ANP および BNP を同定し、分子系統解析を行ったところ偶蹄目の類縁性を示し、他の解析により示されている結果を支持する結果となった。ANP、BNP は発現量、組織含量から心房が主な産生器官であり、その含量が低いにもかかわらず血漿濃度は他の哺乳類に比べて高値であることから、血中へのホルモンの放出が盛んであることが示唆された。ANP は安定な前駆体として組織内に貯蔵され、心筋壁の進展などの刺激に応じて血中に放出されるが、いっぽうで BNP は心臓組織内ですでにアミノ酸 26 個からなる成熟ホルモンにまでプロセッシングが進んでおり、合成された BNP は血中へと速やかに放出されることが示された。生理学的にも解剖学的にも水中生活へと完全に適応を遂げた鯨類の循環動態は陸上動物とは大きく異なり、ANP、BNP の分泌動態も陸上動物とは異なることが示唆された。