

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580265

研究課題名(和文)イルカ細胞培養技術の確立および未知アクアポリンの浸透圧調節における機能の解明

研究課題名(英文)The establishment of the method for cell culture and a study on the function of a new aquaporin in dolphins

研究代表者

鈴木 美和 (SUZUKI, Miwa)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：70409069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：我々はイルカの多器官に発現するアクアポリン2の選択的スプライシング産物(AQP2')が細胞の浸透圧耐性に寄与すると考えて研究を行い以下の成果を得た。1. バンドウイルカの複数器官の初代細胞の培養に成功した。2. AQP2は腎臓にのみ、AQP2'は調べた全器官に発現していた。3. 鯨類にのみAQP2'配列が高度に保存されていた。4. イルカ腎細胞で外液のNa⁺濃度の増加に応じてAQP2'の発現量が増加した。5. AQP2'をノックダウンするとNaClを添加した高張培地でコントロールに比べて多くの細胞が収縮し細胞死した。以上のことからAQP2'は鯨類の全身の細胞の浸透圧耐性に寄与すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our previous data suggested alternative splicing of aquaporin (AQP) -2 in bottlenose dolphins. As aqp2 gene has response element to hypertonicity, we hypothesized the alternatively spliced -AQP2 (AQP2') has some functions for cellular osmoregulation. Experiments were carried out to test the hypothesis and interesting results were obtained: (1) Culture technique of primary cells from several organs of the dolphin was established. (2) AQP2 was expressed only in the kidney, whereas AQP2' expression was confirmed in all organs tested. (3) Genomic analyses showed AQP2' sequence is highly and broadly conserved in cetacean species, but not in other mammals. (4) Expression of AQP2 and AQP2' were increased in response to increase in Na⁺ concentration in medium. (5) Knockdown for AQP2 and AQP2' by small interfering RNA resulted in severe shrinkage and lowering cellular viability in dolphins' cells. Collectively, these data suggested AQP2' may contribute to cellular osmotic tolerance.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：鯨類 浸透圧調節 細胞培養 アクアポリン 海水適応 イルカ 浸透圧耐性

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに海にすむ鯨類の浸透圧調節の仕組み、特に水の吸収について興味を持ち、水が細胞膜を通過するための孔として機能するアキアポリン(AQP; ほ乳類では13種が知られる)の役割に着目し研究を進めてきた。その結果、消化管や腎臓に特徴的に分布する複数のAQPが水の吸収や再吸収に寄与することを明らかにしてきた。その過程で、イルカの非常に多くの器官にAQP2の選択的スプライシング産物(以下、AQP2')が発現していることを偶然発見した。

予備的試験の結果、細胞外液のNa⁺濃度の上昇に応じてAQP2'の発現量が増加することが示唆された。海中にすむイルカはNa⁺が体内に流入しやすい状況におかれているため、陸上ほ乳類よりも細胞が高Na⁺外液に曝される機会が多いと考えられる。通常、細胞は高濃度のNa⁺に曝されると収縮し、DNA破壊や活性酸素の産生、細胞骨格の変性を経てやがて細胞死に至る。しかし、腎髄質の細胞は尿生成のため常に高Na⁺濃度の外液に曝されており、それに対する防御機構をもつ。すなわち急性反応として種々のイオンを取り込み、細胞内浸透圧を上昇させて細胞膜の破壊を防ぎ、続いて転写調節因子を増加させ、AQP2遺伝子発現を誘導し、水を移動させて浸透圧を調節すると共に、heat shock proteinを発現させ細胞死を防ぐ(Hasler et al. 2009, Joan et al. 2006)。前述のように、イルカにおいてAQP2が腎臓にしか発現しない一方で、AQP2'が多くの器官に発現することから、イルカの全身の細胞においては、AQP2'が高Na⁺外液への対応に寄与し、細胞の浸透圧耐性に寄与することで細胞死を回避している可能性があると考えに至った。

また、鯨類の生理学的研究は遅れている。その原因は、彼らが大型の海生哺乳類であり実験動物には適さないこと、自然保護や動物愛護の象徴的動物である鯨類では生体実験が許されないこと、研究に使用できる樹立された細胞株がないこと、の3点にある。細胞レベルでの実験が出来ない状況は鯨類学の発展を妨げ、臨床や飼育技術の向上をも遅らせている。このような状況において、日本は捕鯨国としてこれらの問題を改善できる潜在的能力を有し、またすべき立場にあるという意見もある。我々は、漁で得られた鯨類試料から細胞を培養し、これを積極的に生理学的研究に用いることで機能実験に踏み込めない現状を打破し、鯨類学の発展の礎を築いていくべきであると考えた。

2. 研究の目的

AQP2'がイルカの全身の細胞の浸透圧耐性に寄与しているとするれば、その分子は鯨類の海洋進出の鍵となった分子である可能性がある。そこで、細胞の浸透圧耐性におけるAQP2'の機能を解析することを本研究の究極の目的とした。この目的を果たすため、まず

イルカの各器官の体細胞を培養する技術を確立することを目標とした。確立された細胞培養技術を用いて、AQP2'が細胞の浸透圧調節に寄与するか否かを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 鯨類器官の採取

和歌山県太地町の追込み漁で捕殺されたバンドウイルカから、死後2時間以内に神経系(脳)、内分泌器官(脳下垂体、副腎、生殖腺)、消化器官(膵臓、肝臓、腸管)、泌尿器官(腎臓)、循環器官(心臓、血管)、支持器官(皮膚、筋肉)を採取した。

(2) イルカ細胞培養方法の確立

初代培養

生体内に近い細胞の動きを再現できるという理由から、近年は初代培養細胞を使用した研究が主流となっている。我々は、イルカの各器官から細胞を分離し、陸上哺乳類での知見を参考に各細胞に最適な培養条件を模索し、初代培養を行なった。また将来的な汎用性を考慮し、可能であれば各細胞を継代培養し、幹細胞を分離・培養することも試みた。初代培養に成功した細胞は凍結保存して保管した。

継代培養および幹細胞の選別

将来的に培養細胞を多様な実験に供するためには、様々な細胞に分化しうる細胞を培養することは不可欠である。そこで初代培養が成功したのちに細胞を継代的に培養し、幹細胞もしくは多分化能を有する細胞を分離・培養することを試みた。

(3) AQP2 および AQP2' の分布解析

発現分布

バンドウイルカ生体から得られた組織試料および培養細胞より各々RNAを抽出してcDNAを合成し、RT-PCRによりAQP2およびAQP2'の発現の有無を確認した。

タンパク質分布

AQP2'に対する抗体を作製し、生体より採取し固定した組織および培養細胞内での未知AQPの分布様式を確かめた。

他種におけるAQP2'発現の可能性探索

7科にまたがる鯨種の組織片もしくは白血球からゲノムを抽出し、バンドウイルカで認められたAQP2'の発現が他の鯨種でも共通して起こりうるか否かを確かめた。また陸上ほ乳類のAQP2遺伝子も*in silico*で解析し、配列を比較した。

(4) AQP2 および AQP2' の機能解析

外液浸透圧変化に対する発現変化

イルカ細胞が高Na⁺溶液に曝された時に未知AQPが発現し浸透圧耐性に寄与すると仮定し、培養細胞に対して、NaClまたはマンニトール添加により外液(培地)の浸透圧を段階的に変化させ、AQP2およびAQP2'の発現変

動をリアルタイム PCR により定量した。

各細胞の高浸透圧耐性の検査

培養細胞を用いて、培地に NaCl, マンニトール, 尿素をそれぞれ添加して浸透圧を上昇させ、各細胞の形態変化を観察し、細胞の浸透圧耐性を検査した。

RNA 干渉実験

AQP2 および AQP2' の mRNA に相補配列をもつ二本鎖 small-interfering RNA (siRNA) を各々培養細胞に導入して RNA 干渉を起こさせ、ノックダウンを試みた。まず siRNA のトランスフェクションの方法を確立した。続いてイルカの培養細胞に AQP2 および AQP2' の siRNA を各々トランスフェクションしたのち、培地の浸透圧を変化させて 48 時間培養し、細胞の形態変化や細胞の ATP 活性をコントロールと比べることにより AQP2 および AQP2' の細胞の浸透圧耐性への関与を調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞の培養

和歌山県太地町で捕獲されたハンドウイルカの肺、腎臓、肝臓、皮膚、筋肉、腸管、精巣、卵巣、胎盤を細切し、一般的な細胞培養液を用いて初代培養を試みた。その結果、いずれの組織からも 2~3 週間後に繊維芽細胞様または上皮細胞様の細胞の増殖が観察された。このうち、増殖能が特に高かった腎細胞を用いて以降の実験を行なった。

細胞株の樹立を試みるため、初代培養に成功した付着細胞をトリプシン液処理で剥離し、新たな容器に移して継代を行うことを繰り返したが、継代を重ねるにつれて細胞の増殖能が低下し、最終的にはいずれの器官由来の細胞も増殖を停止したため、この方法では増殖能をもつ細胞を選別回収することはできなかった。そこで、SV40 を導入したイルカ腎細胞を山口大学より譲り受けて数十継代したのち、腎臓に発現する特徴的なタンパク質である AQP2 や angiotensin II receptor type 1 などの発現を確認したところ、いずれも発現していたことから、これを初代細胞の能力を維持した腎細胞として凍結保存した。

(2) AQP2' の発現分布

バンドウイルカから採取した 19 器官を用いて、AQP2 および AQP2' に対する RT-PCR を行なったところ、AQP2 は腎臓にのみ発現が認められた一方で、AQP2' は調べた全ての器官で発現していることが確認された。AQP2' に対する特異的抗体を作製して免疫組織染色を行ったところ、複数の器官および培養腎細胞での分布が確認された。

7 鯨種 (ヒゲクジラ 1 科, ハクジラ 6 科) のゲノムを用いて AQP2 の遺伝子配列解析を行なったところ、調べたすべての鯨種において AQP2 遺伝子から AQP2' の発現が可能であり、その配列が非常に高度に保存されていることが判明した。一方で、AQP2' は鯨類以外の動物種では産生され得ないことを突き止

めた。このことから、AQP2' が鯨類に特異的であることが判明した。

(3) イルカ腎細胞の浸透圧耐性

培養したイルカの腎細胞を用いて、NaCl, マンニトール, 尿素を各々培養液 (250mOsm) に添加して 350 および 500mOsm に調整した細胞外液で培養した。その結果、NaCl 添加高張液で細胞が変形し、350mOsm では 24 時間である程度の形態が回復したが、500mOsm では半数以上の細胞が細胞死に至ることが判明した。一方、マンニトールや尿素添加群では 500mOsm でも細胞形態に異常はほとんど認められなかった。このことからイルカ細胞は Na⁺ 添加高張環境に対する耐性が低いことが判明した。

(4) 高張環境下での AQP2, AQP2' の発現
腎細胞において、Na⁺ 添加高張環境では、AQP2, AQP2' のいずれも等張環境下より発現量が劇的に増加した。一方、マンニトール添加群ではいずれの遺伝子も有意な発現増加が認められなかった。これらのことから、細胞外液の浸透圧ではなく、Na⁺ 濃度に応じて AQP2 および AQP2' の発現が誘導されることが判明した。

(5) AQP2 および AQP2' の機能解析

AQP2, AQP2' および GAPDH (内部標準) を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターおよび各々の siRNA を作製し、まずイルカ腎細胞にベクターをトランスフェクトしたのち、siRNA を導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、siRNA を導入した群でルシフェラーゼ活性が有意に減少し、RNA 干渉を起こすことに成功した。

で用いた方法でイルカ腎細胞に siRNA を導入したのち、培地に NaCl, マンニトール, 尿素を加えて高張環境にし、細胞の形態変化および細胞の ATP 活性 (細胞活性) を調べた。その結果、導入剤のみを添加したコントロール群と比較して、NaCl 添加群では AQP2 および AQP2' の siRNA 処理群では多くの細胞が収縮して異常な形態を示し、ATP 活性は有意に低下した。このことから、AQP2 および AQP2' はいずれも高 NaCl 環境での細胞の浸透圧耐性に関与することが示唆された。

以上の結果から、AQP2' が鯨類に特異的に発現し、全身の細胞の浸透圧耐性を支持する分子として機能している可能性が高いと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

Suzuki M, Vázquez-Medina JP, Viscarra JA, Soñanez-Organis JG, Crocker DE, Ortiz RM (2013) Activation of systemic, but not local,

renin-angiotensin system is associated with up-regulation of TNF- α during prolonged fasting in northern elephant seal pups. *Journal of Experimental Biology* 216: 3215-3221.(査読あり)

Segawa T, Amatsuji H, Suzuki K, Suzuki M, Yanagisawa M, Ito T, Sakai T, Nakanishi T (2013) Molecular characterization and validation of commercially available methods for haptoglobin measurement in bottlenose dolphin. *Results in Immunology* 3: 57-63.(査読あり)

Segawa T, Otsuka T, Ito T, Suzuki M, Karatani N, Sakai T (2013) Characterization of the circulating serum amyloid A in bottlenose dolphins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152: 218-224. (査読あり)
Suzuki M, Nozawa A, Ueda K, Bungo T, Terao H, Asahina K (2012) Secretory patterns of catecholamines in Indo-Pacific bottlenose dolphins. *General and Comparative Endocrinology* 177: 76-81. (査読あり)

Segawa T, Ito T, Suzuki M, Moritomo T, Nakanishi T, Sakai T (2011) Hematopoietic cell populations in dolphin bone marrow: Analysis of colony formation and differentiation. *Results in Immunology* 1: 1-5. (査読あり)

[学会発表](計3件)

Suzuki M, Vázquez-Medina JP, Viscarra JA, Soñanez-Organis JG, Crocker DE, Ortiz RM. Activation of systemic renin-angiotensin system is a causal factor of insulin resistance mediated by TNF- α upregulation & Acrp30 suppression in post-weaning fasted northern elephant seal pups? The 20th Biennial Conference of the Biology of Marine Mammals. 2013/12/12. Dunedin, NZ.

鈴木美和, Vázquez-Medina JP, Viscarra JA, Soñanez-Organis JG, Crocker DE, Ortiz RM. 絶食中のキタゾウアザラシのRASおよび免疫活性とインシュリン抵抗性. 平成 25 年度日本水産学会春季大会 . 2013/03/26 , 東京海洋大学 , 品川 , 東京 .

Suzuki M, Masaki K, Tsurumaki H, Ito T. Secretion and function of arginine-vasopressin in bottlenose dolphin. The 19th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 2011/11/29. Florida, USA.

[図書](計2件)

鈴木美和(2012)『海獣・鳥類のしくみ』^{『水族館と海の生き物たち』}杉田治男 編著, 第14章, pp.106-114. 東海大学出版会 .

鈴木美和(2012)『鯨類は水を飲まないのか?—浸透圧調節—』^{『ケトスの知恵』}, 村山司・森阪匡通 編著, pp. 27-45, 東海大学出版会 .

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
・特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 美和 (SUZUKI, MIWA)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 70409069

(2)研究分担者

伊藤 琢也 (ITOU, TAKUYA)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 20307820