

カタユウレイボヤのカルシトニンは、キンギョのウロコに存在する 破骨細胞の活性を抑制する

鈴木信雄¹, 関口俊男², 佐竹 炎², 笹山雄一¹

¹〒927-0553 鳳珠郡能登町小木, 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設 ; ²〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台, 財団法人 サントリー生物有機科学研究所
Nobuo SUZUKI¹, Toshio SEKIGUCHI², Honoo SAKAKE², Yuichi SASAYAMA¹: Calcitonin in *Ciona intestinalis* suppresses osteoclastic activity in the scales of goldfish.

カルシトニンは32個のアミノ酸から構成され、哺乳類では甲状腺のC細胞から分泌され、鳥類以下の脊椎動物では、鰓後腺という内分泌器官から分泌されるホルモンである。カルシトニンは破骨細胞の活性を抑制する作用があることは、一部の脊椎動物(哺乳類及び魚類)では明らかになっている(鈴木, 2005)。一方、無脊椎動物においてカルシトニン陽性細胞が検出されているが(Sasayama et al., 1991)、無脊椎動物のカルシトニンの構造は、これまで報告されていなかった。

カタユウレイボヤのゲノムプロジェクトが終了して、カタユウレイボヤの全ゲノム情報が明らかになった。この情報を基にして、最近、(財)サントリー生物有機科学研究所の佐竹らのグループは、カタユウレイボヤのカルシトニンの配列を決定した。このペプチドは1位と7位がシステインであり、C末端のアミノ酸がプロリンでアミド化していた。しかし、脊椎動物のカルシトニンとは異なり、30個のアミノ酸から構成されていた。ヒトのカルシトニン受容体が発現しているCOS-7細胞に、このペプチドを作用させた結果、高濃度(10^{-5} M)でないとヒトのカルシトニン受容体とは結合しない。 10^{-5} Mでしか効果がみられないので、カタユウレイボヤのカルシトニンが生理活性を有するかは不明である。カタユウレイボヤのカルシトニン受容体の配列も佐竹らのグループにより決定されているが、COS-7細胞等での発現に失敗しており、カタユウレイボヤのカルシトニンが生理活性を有するか否かは不明である。ヒトのカルシトニン(identity 25%)よりもサケのカルシトニン(identity 34.4%)の方がカタユウレイボヤのカルシトニンに似ているので、魚のアッセイシステムを用いた方が、カタユウレイボヤのカルシトニンの生理活性を正しく評価できる可能性がある。そこで、カタユウレイボヤのカルシトニンの破骨細胞に対する作用をウロコのアッセイ系で評価した。

【方法】

実験1: カタユウレイボヤのカルシトニンの破骨細胞に対する作用

材料としてキンギョ(*Carassius auratus*) (メス、体重50-80 g)を用いた。これらのキンギョをMS222で麻酔し、キンギョからウロコを取った。そのウロコを半分に分けて、実験群と対照群とに分けた。そのウロコをHEPES (20 mM) (pH 7.0) 及び抗生物質(1%)を含む培地(MEM、ICN Biomedicals Inc.)に加え、カタユウレイボヤカルシトニンの破骨細胞に対する作用をサケカルシトニンと比較した。培養温度は15°Cで、それぞれのカルシトニンの濃度は 10^{-11} Mから 10^{-6} Mにして6及び18時間培養して、カタユウレイボヤとサケカルシトニンの作用を解析した。

本研究では、破骨細胞の活性の指標として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)を用いて、Suzuki et al. (2009)の方法に従い、カルシトニンの破骨細胞に対する作用を調べた。

実験2: カタユウレイボヤのカルシトニンの骨芽細胞に対する作用

材料としてキンギョ(メス、体重50-80 g)を用いて、実験1と同様にしてウロコを培養して、カタユウレイボヤとサケカルシトニンの骨芽細胞に対する作用を解析した。

本研究では、骨芽細胞の活性の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALP)を用いて、カルシトニンの骨芽細胞に対する作用を調べた。

【実験結果】

1) カタユウレイボヤ及びサケカルシトニンの破骨細胞に対する作用

6時間の培養において、カタユウレイボヤカルシトニンは、 10^{-7} 及び 10^{-6} MでTRAP活性が低下した。一方、サケカルシトニンは、6時間の培養において、 10^{-9} MでもTRAP活性が低下した。

18時間の培養では、6時間の培養よりもTRAP活性の低下の割合が大きく、カタユウレイボヤでは 10^{-8} Mで抑制作用が認められ、サケカルシトニンでは 10^{-11} Mでも効果が認められた (Figure 1)。

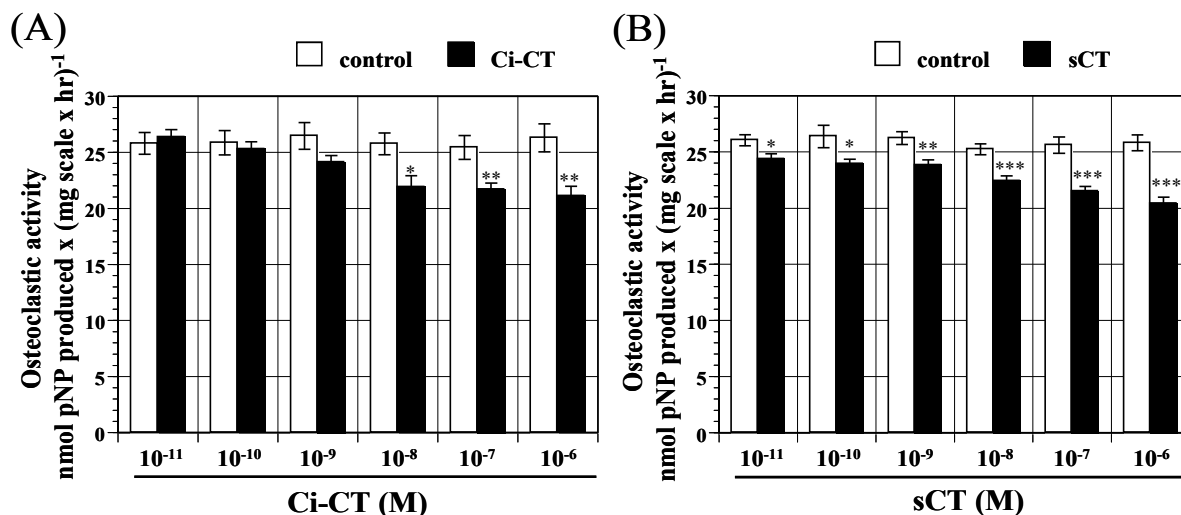


Figure 1: Effects of *Ciona intestinalis* calcitonin (Ci-CT) (A) and salmon calcitonin (sCT) (B) on osteoclastic activity in the scales of goldfish.

*, ** and *** indicate statistically significant differences at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively, from the values in the halved control scale. The results are expressed as the means \pm SEM ($n = 8$).

実験2：カタユウレイボヤ及びサケカルシトニンの骨芽細胞に対する作用

実験1と同様にして、骨芽細胞に対する作用を解析した。その結果、6時間の培養において、骨芽細胞のマーカであるALPの活性は、カタユウレイボヤ及びサケカルシトニンを添加しても変化しなかった。18時間の培養においても、ALP活性は変化しなかった。

以上のことから、カタユウレイボヤカルシトニンは、骨芽細胞の活性を変化させることなく、キンギョのウロコに存在する破骨細胞の活性を抑制することが判明した。したがって、他の脊椎動物と同様に生理活性を持っているので、ホヤ自体に何らかの生理機能を有している可能性が高い。今後、ホヤ自体におけるカルシトニンの作用を調べていく予定である。

謝辞 本研究の一部は、科学研究費補助金（基盤研究（C）No. 18500375、代表：鈴木信雄）の援助により行われた。

引用文献

鈴木信雄, *Clinical Calcium*, **15**: 459-466 (2005)

Sasayama, Y., et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **83**: 406-414 (1991).

Suzuki, N., et al., *Life Sci.*, **84**: 482-488 (2009)