

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18K06312
 研究課題名(和文) 血中Ca濃度調節機能の進化的変遷: 円口類と軟骨魚類に注目したカルシトニンの研究

研究課題名(英文) Evolution of calcium homeostasis: the functional study of calcitonin in cyclostome and cartilaginous fish

研究代表者
 関口 俊男(Toshio, Sekiguchi)
 金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授

研究者番号：40378568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、円口類と軟骨魚類のカルシトニン(CT)を機能解析し、CTによる血中カルシウム濃度調節機構の進化の解明を目指している。円口類のヌタウナギからCTとその受容体候補の遺伝子を同定し、受容体候補がCTに应答することを明らかにした。またカルシウムの経口投与により血中カルシウム濃度の上昇を認めたと、血中CTに変化はなかった。一方、軟骨魚類では、アカエイの鰓後腺よりCTを単離した。カルシウムの経口投与による血中カルシウム濃度上昇に対して、血中CT濃度の上昇は認められなかった。一方、血中CT濃度は、生殖腺重量と正の相関を示すことから、軟骨魚類ではCTが生殖機能と結びついていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物では血中のカルシウム濃度が一定になるようにホルモンで調節されているが、この調節機構の起源や進化は不明である。本研究では、血中カルシウム濃度低下に関わる代表的なホルモンであるカルシトニン(CT)に焦点を当て、原始的な脊椎動物の円口類と軟骨魚類での役割を解析した結果、硬骨魚類よりも原始的な脊椎動物では、CTが血中カルシウム濃度調節以外の役割を持つことが明らかになった。特に軟骨魚類では、生殖機能との関わりが示された。今後、これらの動物におけるCT機能の解明とともに真の血中カルシウム調節ホルモンの同定が期待される。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the evolution of the regulation mechanism of serum calcium level involved in calcitonin (CT), functional analysis of CT in cyclostome and cartilaginous fish were performed.

In hagfish, the CT and its receptor candidate gene were identified. Hagfish CT stimulated mammalian cells expressed by a CT receptor candidate. In addition, oral administration of calcium increased the serum calcium level, whereas hagfish CT concentration did not change. In red stingray, the CT gene was cloned from the ultimobranchial gland. Measurement of serum CT level using ELISA and serum calcium level revealed no correlation between serum CT level and serum calcium concentration. Contrary, serum CT level showed a positive correlation with gonadal weight, suggesting that CT is associated with reproductive function in cartilaginous fish.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：カルシトニン ヌタウナギ アカエイ 円口類 軟骨魚類 血中カルシウム濃度調節

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において血中カルシウム濃度調節は、骨や鱗(硬骨魚類)をカルシウム貯蔵庫にして、血中カルシウム低下ホルモン(カルシトニン(CT)と硬骨魚のスタニオカルシン)と血中カルシウム上昇ホルモン(副甲状腺ホルモンや1,25ジヒドロキシビタミンD₃)により一定に維持されている。これらのホルモンの役割については哺乳類から硬骨魚類まで知見が豊富であるのに対し、原始的な脊椎動物においては、不明な点が多くさらなる研究が必要であった。特に軟骨魚類と円口類の情報不足していた。軟骨魚類は、尿素を蓄積し高浸透圧の海水に適応しているが、カルシウムを含め体液中のイオン濃度を一定に保つことができる。これらの仲間は、硬骨をもたず鱗にはカルシウム調節のための細胞が存在しないため、硬骨魚類とは異なる機構で血中カルシウム濃度を調節していると予想された。円口類のヌタウナギは、顎のない脊椎動物であり、硬骨や鱗を持たない。またヌタウナギは浸透圧順応性の動物であり、外界の浸透圧変化に応じて血中の浸透圧を調節することができない。しかしながら血中のマグネシウムイオンやカルシウムイオンについては一定に保つことができる。

我々は、これらの動物がCTを持つことを突き止めており、CTが血中カルシウム濃度を調節する役割を担っていると予想していた。

2. 研究の目的

軟骨魚類と円口類におけるCTの機能を明らかにし、これらの動物における血中カルシウム濃度調節機構の進化を明らかにすることを本研究の目的とした。軟骨魚類では、アカエイ(*Hemitrygon akajei*)、円口類ではヌタウナギ(*Eptatretus burgeri*)を用いCTの機能を血中カルシウム濃度調節との関係から解析し、硬骨魚類や哺乳類におけるCT作用の知見と比較した。

3. 研究の方法

1) 経口投与実験におけるアカエイの血中カルシウム濃度及びCT濃度の測定

9個体のアカエイに経口で2.5Mの塩化カルシウムを含んだコンソメ溶液を投与し、継時的に採血を行った。ネガティブコントロールとして塩化カルシウムを含まないコンソメ溶液を投与した。これらの血漿サンプルについてアルゼナゾIII法を用いカルシウム濃度を測定すると共に、アカエイCT抗体を用い競合ELISA法でCT濃度を測定した。

2) アカエイにおける血中CT濃度と生殖腺重量の相関解析

30個体のアカエイの体重と生殖腺重量を測定した。さらに血漿を得て、競合ELISA法により血漿中のCT濃度を測定した。体重及び生殖腺重量と血漿CT濃度の相関関係を解析した。

3) エストロゲン投与によるアカエイCT濃度測定

未成熟の個体に対しエストロゲンを1 μ g/体重(g)で投与した。投与5日後に採血し、競合ELISA法でCT濃度を測定した。

4) ヌタウナギにおけるCTとCT受容体候補の同定

ヌタウナギのゲノム情報から CT と CT 受容体候補をホモロジー検索した。得られた塩基配列情報を用いヌタウナギの脳の cDNA から 1 つの CT と 3 つの CT 受容体候補の全長の塩基配列を決定した。

5) ヌタウナギ CT と CT 受容体候補の応答性の検討

3 つの CT 受容体候補をそれぞれ哺乳類細胞株に発現させ、CT を添加した際の細胞内 cAMP の蓄積を ELISA で測定した。

6) 経口投与実験におけるヌタウナギの血中カルシウム濃度及び CT 濃度の測定

ヌタウナギに 2.5M 塩化カルシウム含有のコンソメ溶液を経口で投与し、血液を継時的に採取した。血漿中のカルシウム濃度をアルゼナゾ III 法で測定した。同時に、抗ヌタウナギ抗体を用いた競合 ELISA 法により血漿 CT 濃度を測定した。

4 . 研究成果

1) 経口投与実験におけるアカエイの血中カルシウム濃度及び CT 濃度の測定

2.5M の塩化カルシウムを含んだコンソメ溶液を投与したアカエイの血漿カルシウム濃度は、3 時間でおよそ 4 倍に上昇した。一方、コンソメ溶液を経口投与したアカエイの血漿中のカルシウム濃度はほとんど変化しなかった。

2) アカエイにおける血中 CT 濃度と生殖腺重量の相関解析

アカエイの血漿 CT 濃度は、体重と正の相関を認めた ($n=30, r = 0.625, p < 0.001$)。さらに生殖腺重量とも正の相関を示すことを明らかにした ($n = 30, r = 0.471, p < 0.01$)。

3) エストロゲン投与によるアカエイ CT 濃度測定

エストロゲン投与により、投与 5 日後に血漿中の CT 濃度が有意に上昇することを明らかにした。CT を産生する鰹後腺にはエストロゲン受容体があり、発達した生殖腺から産生されたエストロゲンにより CT が分泌されると考えられた。

4)ヌタウナギにおける CT と CT 受容体候補の同定

ゲノム情報より 2 種類のヌタウナギ CT を同定した。1 つ目の CT はヌタウナギの脳由来の cDNA から単離できた。ヌタウナギ CT1 は、32 アミノ酸で構成され、N 末端側に脊椎動物 CT に特徴的な Cys 残基による環状構造を有していた。さらに C 末端側は脊椎動物 CT に共通するアミド化 Pro 残基を持つことが明らかになった。一方、2 つ目の CT は、RT-PCR の結果、成体組織の mRNA からは発現が認められなかった。また 3 つの CT 受容体候補 (CTR1, 2, 3) の全長配列を決定した。CTR1 は、N 末端の細胞外領域にホルモン結合ドメインを 2 つ持っていた。これは、硬骨魚類の CT 受容体に特徴的であり、CTR1 がヌタウナギ CT 受容体であることが示唆された。

5)ヌタウナギ CT と CT 受容体候補の応答性の検討

3 つの CT 受容体候補 (CTR1, 2, 3) をそれぞれ哺乳類細胞株に発現させ、ヌタウナギ CT を添加した結果、CTR1 発現細胞に対してヌタウナギ CT 濃度依存的な細胞内 cAMP 濃度の上昇が認められた。このことより、CTR1 がヌタウナギ CT の真の受容体であることを確認した。

6) 経口投与実験におけるヌタウナギの血中カルシウム濃度及び CT 濃度の測定

血漿カルシウム濃度は、2.5M 塩化カルシウム含有のコンソメ溶液の経口投与 6 時間後におよそ 2 倍に上昇することを明らかにした。一方、CT 濃度については有意な変化が認められなかった。

これらの結果をまとめると、軟骨魚類、円口類ともに、CT が体液カルシウム濃度の調節に関与していないことが示唆された。軟骨魚類では CT が生殖生理に関わるホルモンであると考えられる。今後は、これらの動物における CT の機能をさらに解析するとともに、血中カルシウム濃度調節に関わる真のホルモンを探索する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yazawa Takashi, Imamichi Yoshitaka, Uwada Junsuke, Sekiguchi Toshio, Mikami Daisuke, Kitano Takeshi, Ida Takanori, Sato Takahiro, Nemoto Takahiro, Nagata Sayaka, Islam Khan Md. Rafiqul, Takahashi Satoru, Ushikubi Fumitaka, Suzuki Nobuo, Umezawa Akihiro, Taniguchi Takanobu	4. 巻 196
2. 論文標題 Evaluation of 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity using androgen receptor-mediated transactivation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 105493 ~ 105493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2019.105493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zanaty Mohamed I., Sawada Niina, Kitani Yoichiro, Nassar Hossam F., Mahmoud Hamada M., Hayakawa Kazuichi, Sekiguchi Toshio, Ogiso Shouzo, Tabuchi Yoshiaki, Urata Makoto, Matsubara Hajime, Takeuchi Yutaka, Hattori Atsuhiko, Srivastav Ajai K., Amornsakun Thumronk, Suzuki Nobuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Influence of Benz[a]anthracene on Bone Metabolism and on Liver Metabolism in Nibbler Fish, <i>Girella punctata</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph17041391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekiguchi Toshio, Akitaya Hiroshi, Nakayama Satoshi, Yazawa Takashi, Ogasawara Michio, Suzuki Nobuo, Hayakawa Kazuichi, Wada Shuichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Development of the Ascidian <i>Ciona intestinalis</i> Type A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 1340 ~ 1340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph17041340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yazawa Takashi, Imamichi Yoshitaka, Yuhki Koh ichi, Uwada Junsuke, Mikami Daisuke, Shimada Masayuki, Miyamoto Kaoru, Kitano Takeshi, Takahashi Satoru, Sekiguchi Toshio, Suzuki Nobuo, Rafiqul Islam Khan Md., Ushikubi Fumitaka, Umezawa Akihiro, Taniguchi Takanobu	4. 巻 86
2. 論文標題 Cyclooxygenase 2 is acutely induced by CCAAT/enhancer binding protein to produce prostaglandin E ₂ and F ₂ following gonadotropin stimulation in Leydig cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 786 ~ 797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Takashi, Sekiguchi Toshio, Sasayama Yuichi, Hattori Atsuhiko, Watanabe Takushi X., Kitani Yoichiro, Tabuchi Yoshiaki, Matsubara Hajime, Srivastav Ajai K., Hai Tran Ngoc, Amornsakun Thumronk, Suzuki Nobuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a system for measuring calcitonin in the stingray <i>Dasyatis akajei</i> (a cartilaginous fish): the possible involvement of stingray calcitonin in gonadal development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Aquatic Research	6. 最初と最後の頁 267 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40071-019-00236-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Nobuo, Watanabe Kazuki, Sekimoto Aika, Urata Makoto, Zanaty Mohamed Ibrahim, Sekiguchi Toshio, Kitani Yoichiro, Matsubara Hajime, Srivastav Ajai Kumar, Hattori Atsuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Gadolinium at Low Concentration Suppresses both Osteoclastic and Osteoblastic Activities in the Scales of Goldfish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Environmental Sciences	6. 最初と最後の頁 137 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3844/ajessp.2019.137.144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nobuo Suzuki, Toshio Sekiguchi, Koji Yachiguchi, Makoto Urata, Yasuko Kinoshita, Hajime Matsubara, Kiyoshi Asahina, Akira Kambegawa, Ajai Kumar Srivastav	4. 巻 5
2. 論文標題 Physiological Role of a Calcitonin-Like Substance in the Life Cycle of the Lamprey, <i>Lampetra japonica</i> (Cyclostomata)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Zoological Investigations	6. 最初と最後の頁 23 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33745/ijzi.2019.v05i02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikegame Mika, 7名、Sekiguchi Toshio, 43名、Suzuki Nobuo	4. 巻 67
2. 論文標題 Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pineal Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jpi.12594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekiguchi, T., Suzuki, T., Kurokawa, T., Amornsakun, T., Hai, T.N., Srivastav, A.K. and Suzuki, N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Molecular characterization of putative calcitonin gene-related peptide receptors and expression of calcitonin gene-related peptide and its receptor in the early development of flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Zoological Investigations	6. 最初と最後の頁 106-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekiguchi, T., Yachiguchi, K., Kiyomoto, M., Ogiso, S., Wada, S., Tabuchi, Y., Hong, C.-S., Srivastav, A.K., Archer, S., Pointing, S.B., Hayakawa, K. and Suzuki, N.	4. 巻 84
2. 論文標題 Molecular mechanism of the suppression of larval skeleton by polycyclic aromatic hydrocarbons in early development of sea urchin <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 1073-1079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-018-1245-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yazawa, T., Imanichi, Y., Sekiguchi, T., Miyamoto, K., Uwada, J., Khan, R., Suzuki, N., Umezawa A. and Taniguchi, T.	4. 巻 8973076
2. 論文標題 Transcriptional Regulation of Ovarian Steroidogenic Genes; Recent Findings Obtained from Stem Cell-derived Steroidogenic Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/8973076.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekiguchi, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 The Calcitonin/Calcitonin Gene-Related Peptide Family in Invertebrate Deuterostomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2018.00695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 4. 佐藤貴弘, 井田隆徳, 関口俊男, 中町智哉, 児島将康	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6 (129-135)
3. 書名 消化管関連ペプチドが拓く恒常性フロンティア. 「臓器連環による生体恒常性の破綻と疾患」 春日 雅人 編集	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂本 竜哉 (Sakamoto Tatsuya) (10294480)	岡山大学・自然科学研究科・教授 (15301)	
研究分担者	鈴木 信雄 (Suzuki Nobuo) (60242476)	金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------