

Reptile Calcitonin: its primary structure and the bioactivity

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Sasayama, Yuichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/47575

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN

1995

27

爬虫類のカルシトニン： その一次構造と生理活性の解明

(研究課題番号：06640861)

平成6～7年度科学研究費補助金（一般研究C）

研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 笹山雄一

(金沢大学理学部教授)

爬虫類のカルシトニン：その一次構造と生理活性の解明

はしがき

平成6～7年度文部省科学研究費補助金（一般C）による「爬虫類のカルシトニン：その一次構造と生理活性の解明」の研究を終了するに当たり、その成果をここにまとめ、報告する。

結果の概略

Polymerase Chain Reaction (PCR)法を用いて3目4種の爬虫類：クサガメ、メガネカイマン、カナヘビ、アオダイショウのゲノムよりヒトのカルシトニン遺伝子と同じ大きさの、約150塩基対のDNA断片の増幅に成功した。それらをクローニングしてシーケンスするとニワトリのカルシトニン遺伝子の塩基配列に非常に似ていることがわかった。その類似の程度はこれらの爬虫類の系統発生的分化の順序と一致した。

研究組織

- 〔研究代表者〕 笹山雄一（金沢大学理学部教授）
〔研究分担者〕 鈴木信雄（金沢大学理学部助手）

研究経費

平成6年度	1,300千円
平成7年度	900千円
計	2,200千円

研究成果（後記）

研究発表（後記）

- (1) 学会誌等（後ろに綴じる）
- (2) 口頭発表

学会誌発表

1. Srivastav, A.K., Rani, L. and Sasayama, Y. (1994) Influence of prolactin administration on the ultimobranchial body and parathyroid glands of the freshwater snake, Natrix piscator. Okajimas Folia Anat. Jpn., 71, 59-66.
2. Takano, M., Sasayama, Y. and Takei, Y. (1994) Molecular evolution of shark C-type natriuretic peptides. Zool. Sci., 11, 451-454.
3. Suzuki, N., Nose, Y., Kase, Y., Sasayama, Y., Takei, Y., Nagasawa, H., Watanabe, T.X., Nakajima, K. and Sakakibara, S. (1994) Amino acid sequence of sardine calcitonin and its hypocalcemic activity in rats. Zool. Sci., 11, 713-716.
4. Suzuki, N., Takagi, T., Sasayama, Y. and Kambegawa, A. (1995) Effects of ultimobranchialectomy on the mineral balances of the plasma and bile in the stingray (Elasmobranchii). Zool. Sci., 12, 239-242.
5. Suzuki, N., Kase, Y., Sasayama, Y., Kambegawa, A., Magtoon, W. and Srivastav, A.K. (1995) Partial characterization of a calcitonin-like substance from the Brockmann bodies of the medaka Oryzias latipes. Fish. Sci., 61, 687-690.
6. Srivastav, A.K., Das, V.K., Das, S., Sasayama, Y. and Suzuki, N. (1995) Amphibian parathyroids: morphological and functional aspects. Microscopy Res. Tec., 32, 79-90.
7. Srivastav, A.K., Sasayama, Y. and Suzuki, N. (1995) Morphology and physiological significance of parathyroid glands in Reptilia. Microscopy Res. Tec., 32, 91-103.
8. Yamamoto, K., Suzuki, N., Takahashi, N., Sasayama, Y. and Kikuyama, S. (1996) Estrogen receptors in the stingray (Dasyatis akajei) ultimobranchial gland. Gen. Comp. Endocrinol., 101, in press.
9. Sasayama, Y., Suzuki, N. and Magtoon, W. (1996) The location and morphology of the ultimobranchial gland in medaka, Oryzias latipes. The Fish Biol. J. MEDAKA, 7, in press.

口頭発表

1. 鈴木信雄、加瀬陽一、笹山雄一、竹井祥郎、長澤寛道、野宋豊彦：アカエイのN-プロカルシトニンの一次構造（1994年日本比較内分泌学会第19回大会、前橋）
2. 江口睦志、鈴木信雄、笹山雄一、神戸川明：ヌタウナギの血液中に存在するカルシトニン様物質（1994年日本比較内分泌学会第19回大会、前橋）
3. 湯沢裕子、鈴木信雄、笹山雄一：ウナギのカルシトニンのサンドイッチ法を用いた酵素免疫測定法（1994年日本比較内分泌学会第19回大会、前橋）
4. 山本研介、鈴木信雄、笹山雄一：カギノテクラゲ（刺胞動物）もカルシトニン免疫陽性細胞を持つ（1994年日本比較内分泌学会第19回大会、前橋）
5. Sasayama, Y., Abe, I., Tsuda, J. and Suzuki, N.: Plasma calcitonin levels in cultivated eels. (1994年 Applications of endocrinology to Pacific rim aquaculture, California Bodega)
6. 山本和俊、鈴木信雄、高橋則行、小島健、笹山雄一、菊山栄：アカエイの鰓後腺にエストロゲン受容体が存在する（1994年日本動物学会第65回大会、名古屋）
7. 奥田糧子、河村孝介、幸貴実、鈴木信雄、笹山雄一：ニホンヒキガエルにおける鰓後腺のカルシトニン産生細胞の起源、神経冠との関係（1995年日本動物学会第66回大会、八王子）
8. 小林稔、鈴木信雄、笹山雄一：キンギョの胸部に存在するスポットに付いての形態学的研究（1995年日本動物学会第66回大会、八王子）
9. 鈴木信雄、藤彦祐貴、笹山雄一：カルシトニンと生殖生理との関係、キンギョにおける考察（1995年日本動物学会中部支部例会、岐阜）
10. 笹山雄一、早川武、小林稔、奥田糧子、鈴木信雄：硬骨魚におけるカルシトニンの生理的役割、キンギョを用いた2、3の実験（1995年日本動物学会中部支部例会、岐阜）
11. 吉田梓、鈴木信雄、笹山雄一：メダカのカルシトニンの純化（1995年日本動物学会中部支部例会、岐阜）
12. 江口睦志、鈴木信雄、笹山雄一、平井俊朗、実吉峯郎：脊椎動物におけるカルシトニン遺伝子の解析の試み、サケ科魚類を中心にして（1995年日本動物学会中部支部例会、岐阜）

研究成果

数種の爬虫類のカルシトニン遺伝子のクローニング

緒言

カルシトニンとは32個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで、哺乳類においては血中Ca濃度の過度な上昇を抑制するように働く。これはカルシトニンが骨の破骨細胞の活性を抑え、骨からのCaの溶出を減少させることによって血中Ca濃度の低下を引き起こすことによる (Stevenson, *et al.*, 1979)。従って、カルシトニンが骨に作用すると、結果として骨は丈夫になる。

これまで13種の脊椎動物においてカルシトニンの一次構造が明らかにされており、そのアミノ酸配列の類似性から、ヒト・ラット・ウサギを含むヒト系列、ブタ・ウシ・ヒツジ・イヌを含むブタ系列、硬骨魚類のサケ・イワシ・ウナギ・キンギョおよび鳥類のニワトリを含むサケ系列、そしてアカエイからなる軟骨魚類系列の計4群にまとめられている (Takei, *et al.*, 1991) (表1)。しかしながら、系統発生的に魚類と鳥類の中間に位置する両生類および爬虫類のカルシトニンの一次構造は全く解明されておらず、カルシトニンの分子進化を考察する上でブラックボックスとなっている。加えて、ニワトリのカルシトニンのアミノ酸配列がサケ系列に含められる程、硬骨魚のカルシトニンに似ている理由も大きな“謎”となっている。

一方、爬虫類は脊椎動物の進化の上で初めて陸地を自由に歩き回ることができるようになった動物群である。これは両生類が生殖・発生のために水辺から離れることができず、行動範囲がかなり制限されていたのに対して、爬虫類は有羊膜卵を完成させて、稚仔の発生に水を必要としなくなったことによる。この有羊膜卵は大量のCaを含む堅い卵殻に覆われており、発生中の胚は、そのCaを利用して骨格を形成することが知られている (Sasayama, *et al.*,

1990)。従って、爬虫類は両生類のように変態の過程を経ることなく、直接、親の形態のヒナ型として卵より生まれる。これまで、ヘビにおいて、カルシトニンの分泌源である鰓後腺は、孵化前後に最も活性化することが知られており、カルシトニンの役割は稚仔の発生と深い関わりがあることが暗示されている (Sasayama, *et al.*, 1990)。以上の事実を考え併せると、爬虫類のカルシトニンは両生類のカルシトニンとは一次構造や生理作用が異なっている可能性が強く示唆される。また、上記したように鳥類のカルシトニンはサケ系列に近いという事実を考え併せると、爬虫類のカルシトニンは、カルシトニンの分子進化を解明する上で極めて興味深い対象と考えられる。しかしながら、これまで爬虫類のカルシトニンに関する研究は少なく、数種の爬虫類において、鰓後腺中にカルシトニンが存在することや、限られた種において血中のカルシトニン濃度が報告されているのみである (Uchiyama, *et al.*, 1981; Kline, *et al.*, 1983; Sasayama, *et al.*, 1990)。

これまで明らかにされたカルシトニンの幾つかは、ペプチドの精製の手法を用いて一次構造の解明が成されている。この方法による場合、カルシトニンを産生している内分泌器官である鰓後腺を大量に集める必要がある。これまで、アカエイは200個体 (Takei, *et al.*, 1991)、キンギョは1800個体 (Sasayama, *et al.*, 1993)、イワシは320個体 (Suzuki, *et al.*, 1994) より鰓後腺が集められ、カルシトニンの構造が決定された。しかしながら、爬虫類においては、同一種の個体を数百の単位で集めることはかなりの困難さを伴う。一方、現在まで7種の脊椎動物 (ヒト、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ラット、ニワトリおよびサケ) においては、遺伝子工学的手法を用いて、カルシトニンの遺伝子が解明されている。この方法は少量の甲状腺もしくは鰓後腺組織からmRNAを抽出し、

逆転写酵素を用いて cDNA ライブラリーを作製してカルシトニンの遺伝子をスクリーニングしたものである。このように遺伝子工学的手法を用いた場合は、少量の組織よりカルシトニン遺伝子をクローニングすることが可能である。従って、本研究においては、爬虫類のカルシトニンを解明する手段として、遺伝子工学的手法の 1 種である Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて、数種の爬虫類からゲノム DNA を抽出し、カルシトニン遺伝子のクローニングを試みた。

実験方法

1) ゲノムDNAの抽出

本研究では爬虫類ワニ目のメガネカイマン (Caiman crocodilus crocodilus)、有鱗目のアオダイショウ (Elaphe climacophora) とカナヘビ (Takydromus takydromoides)、さらにカメ目のクサガメ (Geoclemys reevesii) の計3目の4種の動物より肝臓を摘出し、それよりゲノムDNAの抽出を行った。ゲノムDNAの抽出には、GENOME DNA ISOLATION KIT (BIO 101社) を用いた。その手順を図1に示す。まず、約0.25gの肝臓を摘出し、細切した後に乳鉢に入れ、液体窒素を加えながら粉末状になるまで摩砕した。これに1.85 mlの細胞懸濁液を加え、完全に懸濁させた。次に100 μ lの細胞溶解・変性液を加え、55 $^{\circ}$ Cで15分インキュベートした。15分後、25 μ lのタンパク質分解酵素混合液を加え、55 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。2時間後、500 μ lの塩析液を加え、ゆっくり攪拌した後に、溶液を1.5mlの遠心管に移し、4 $^{\circ}$ Cで10分間放置した。その後、15,000rpmで15分間遠心分離し、上清を50mlの遠心管に移した。この上清に、2mlのTE (10mM Tris-HCl[pH8.0]、1mM EDTA[pH8.0]) を加えよく混合した後に、8mlの100%エタノールを加え、ゆるやかに攪拌させた。その過程でDNAは白い糸状に析出されるので、これをピペットのチップで絡み取り、別の1.5mlの遠心管に移し、500 μ lのTEに溶解させた。次に、これに含まれるRNAを分解させる為に最終濃度が20 μ g/mlになるようにRNase Aを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。このようにしてゲノムDNAを抽出した。しかしながら、この溶液にはRNaseやタンパク質が、まだ残余しているので、以下の方法でゲノムDNAの精製を試みた。すなわち、この溶液に等量のフェノールを加え、穏やかに混和した後に、5,000

rpmで10分間遠心分離し、上清を別の遠心管に移した。同様にして、次に等量のフェノール/クロロホルム混合液を加え、遠心分離した後上清を回収した。最後に等量のクロロホルムを加え、混和した後遠心分離し、上清を回収した。この上清に、1/10量の3M 酢酸ナトリウムと2倍量の100%エタノールを加え、穏やかに混和した。生じた糸状のDNAを先程と同様にピペットのチップで絡み取り、これを70%エタノールで軽く洗浄し、別の1.5mlの遠心管に移して100 μ lのTEに溶解した。この溶液を最終的なゲノムDNA溶液とした。この溶液の一部を用いて、吸光度を測定してDNA量と精製度を調べた。また、DNAの状態をアガロースゲル電気泳動法で確認した。アガロースゲル電気泳動は、Maniatisらの方法(1989)に従って行った。アガロースはアガロースHSゲル(ニッポンジーン社)を用い、ゲル濃度を3%、泳動時間を定電圧100Vで約80分間とし、その後ゲルを臭化エチジウム溶液(1 μ g/ml)に30分間浸けてDNAを染め出した。これをトランスイルミネーター(UVP社、TM-20E)を用いて、UV光(波長302nm)下でDNAの状態を確認した。

2) プライマーの設計

PCR法には、DNAの増幅の起点としてプライマーが必要である。これまで下等脊椎動物でカルシトニンの遺伝子の塩基配列が知られているのはサケ・カルシトニンのみである(Poschl, *et al.*, 1987)。従って、Uchidaら(1993)はサケ・カルシトニンをコードしている遺伝子の配列の中で、他の動物種のカルシトニンと比べても比較的保存性の高い1位から8位のアミノ酸の領域の塩基配列、および29位以降のC末端領域を符号化している塩基配列と相補的な配列を、それぞれN末端プライマー(N-1 プライマー: 26塩基)

とC末端プライマー（C-1 プライマー：23塩基）とした。これを用い、サケのゲノムにおいて増幅された部分を *in situ hybridization* 法のプローブとして使用したところ、イワナの鰓後腺中の mRNA の検出に成功している。本研究においてもこれらをプライマーとして用い、実際に爬虫類のあるものでは、DNAの一部が増幅されたが、このプライマーではカルシトニン遺伝子の内部にその増幅起点があることになり、増幅された部分がシーケンスされたとしてもカルシトニン遺伝子の全塩基配列を明らかにすることはできない。従って、本修士論文実験ではプライマーを新たに設計し直すことにした。すなわち、カルシトニンをコードしている塩基配列のすぐ上流と下流に着目し、知られているカルシトニン遺伝子（ヒト、ウサギ、ラット、ヒツジ、イヌ、サケおよびニワトリ）の中でのなるべく保存性の高い配列に注目した（Jacobs, *et al.*, 1981; Craig, *et al.*, 1982; Lasmoles, *et al.*, 1985; Poschl, *et al.*, 1987; Matrical, *et al.*, 1990; Mol, *et al.*, 1991; Cumaraswamy, *et al.*, 1993）。その結果、N末端側では、カルシトニン遺伝子のエクソン4の始まりからカルシトニンをコードしている遺伝子の配列の1塩基前までが、共通の塩基配列を含む割合が高かった。従って、この領域の配列を、ヒトを基にして、サケに特異的に見られる塩基をランダムにミックスしてN末端プライマー（N-2 プライマー）とした。しかしながら、C末端側には、知られているカルシトニン遺伝子の中で保存性の高い領域はなかった。そこで、爬虫類は鳥類と系統分類学的に近縁であり、おそらくカルシトニン遺伝子の塩基配列も似ているだろうと推測し、さらにニワトリのカルシトニンがサケ系列に分類されることも考慮して、サケのカルシトニンとニワトリのカルシトニンをコードしている塩基配列のすぐ後から30塩基の領域をC末端プライマーとした。但し、爬虫類のカルシトニンの塩基配列

が推測と全く違う可能性もあるので、予備として、ヒトのカルシトニンの同じ領域でもプライマーを作成した。これらのヒト、サケ、ニワトリのC末端の塩基配列を、それぞれC-2、C-3、C-4 プライマーとした。N末端プライマーとC末端プライマーの塩基配列を併せて図2に示す。

3) P C R 法

P C R 法はTaylorら (1991) の方法に順じた。すなわち、THERMO PROCESSOR (タイテック社、GTU-1505) を用いて、図3に示すように、主として95°C-1~2min/1サイクル; 95°C-30sec~1min、45~55°C-30sec、72°C-30sec~1min/30~45サイクル; 72°C-5~7min/1サイクルの条件で行った。しかしながら、P C R 法は微妙な反応でもある為、これ以外にも様々な条件でカルシトニン遺伝子の増幅を試みた。本研究で行ったP C R 法の反応液組成の代表的な例を表2に示す。P C R 反応終了後、目的とするカルシトニン遺伝子が増幅されたか否かを、ゲノムDNAの確認の時と同様な方法で調べた。但し、アガロースは低融点アガロースゲル (FMC社、NuSieve GTG AGAROSE) を用い、ゲル濃度を3%、泳動時間を定電圧100 V で約80分間とした。

4) 増幅されたP C R 産物のクローニング

電気泳動後、カルシトニンの遺伝子と考えられる約150塩基対の大きさに相当するDNAのバンドのみをゲルから切り出し、遠心管に移した後に70°Cで加熱してゲルを溶解させた。これに500 μ lになるようにTEを加え、さらに10分間加熱した。この溶液に等量のフェノールを加え、激しく混和した後に10分間加熱した。10分後、再び激しく混和した後に15,000rpmで10分間遠心分離し、上清を別の遠心管に移した。残った下層に150 μ lのTEを加え激しく混和し、70

℃で10分間加熱した後に再び混和して、15,000rpmで10分間遠心分離した。その上清を先の上清と合わせ、これに等量のフェノールを加え激しく混和した。その後、15,000rpmで10分間遠心分離し、上清を別の遠心管に移した。この上清に1/10量の3M 酢酸ナトリウムと2倍量の100%エタノールを加え穏やかに混和し、-80℃で15分間放置した。15分後、15,000rpmで15分間遠心分離し、上清を捨て、沈殿を70%エタノールで洗浄した後に乾燥させ、10 μ lのTEに溶解した。このうち2 μ lを電気泳動し、目的とするPCR産物が回収できたか否かを調べた。次に、この溶液を、DNA Ligation Kit（宝酒造）を用いてT-Vector（pBluescriptIIをEcoRVで切断し、5'末端にチミジル酸を1個付加したもの）とライゲーションさせ、組み換え体プラスミドを作製した。次の段階として、氷冷した0.5ml遠心管に、この組み換え体プラスミドを6 μ l（約1ng）入れ、そこへ*E. coli* JM109のコンピテントセル（宝酒造）の溶液50 μ lを加え、穏やかに混和させた後に30分間氷冷した。氷冷後、遠心管を42℃の恒温槽に移して70秒間加熱した。これにSOB培地（2% Tryptone、0.5% Yeast Extract、2.5mM KCl、10mM NaCl、5mM NaOH、10mM MgSO₄、10mM MgCl₂）を450 μ l加え、37℃で30分間激しく振盪培養した。その培養液を4% X-Gal、0.1M IPTG、0.005% アンピシリンを添加したLB寒天培地（0.5% Yeast Extract、1% Peptone、0.5% NaCl、1.5% Agar）に塗布し、37℃で一晩インキュベートした。翌日、生育した白色および青色のコロニーをアンピシリンを含むLB培地に接種し、37℃で一晩振盪培養した。培養後、培養液の半量に、それと等量のグリセリンを加えて保存し、残りの半量は10,000rpmで10分間遠心分離して集菌し、TNE緩衝液（10mM Tris-HCl[pH 8.0]、1mM EDTA[pH 8.0]、0.1M NaCl）100 μ lに懸濁した。次に、フェノールを100 μ l加えて、穏やかに混和した後、10,000rpmで10分間遠心した。そ

の上清90 μl を別の遠心管に移し、180 μl の100%エタノールを加え、よく混ぜた後に -80°C で15分間氷冷し、15,000rpmで15分間遠心分離した。沈殿を70%エタノールで洗浄し、乾燥させた後に10 μl のRNase溶液（TEにRNase Aを1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように加えたもの）に溶解した。そのうちの2 μl を電気泳動に用いて、プラスミドがとれているか否かを調べた。確認後、その溶液6 μl に制限酵素（EcoRIとPstI）を加え 37°C でインキュベートした後、3%アガロースゲル電気泳動を行い、形質転換体をスクリーニングした（図4）。次に、その形質転換体からプラスミドDNAをアルカリSDS法によって単離し、塩基配列の決定に供した（図5）。すなわち、まず形質転換体をLB培地5mlで一晩培養し、15,000rpmで2分間遠心分離し集菌した。その菌体をグルコース緩衝液（50mM Glucose、25mM Tris-HCl[pH 8.0]、10mM EDTA[pH 8.0]）200 μl に懸濁し、リゾチーム溶液（10mM Tris-HCl[pH8.0]にリゾチームを10mg/mlに溶解）5 μl 、RNase溶液（10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）1 μl を加えて 37°C で20分インキュベートした。この溶液に、1%SDSを含む0.2NのNaOH溶液を400 μl 加え、穏やかに混和した後に、15分間氷冷した。その後、5M酢酸カリウム溶液（5M 酢酸カリウム、12M 酢酸、蒸留水を体積比60:11.5:28.5で混和）300 μl を加えて緩やかに混和し、15分間氷冷した。それを10,000rpmで10分間遠心分離し、上清を別の遠心管に移した。この上清に、600 μl のイソプロパノールを加えてよく混ぜた後に、室温で10分間放置した。それを10,000rpmで10分間遠心分離し、沈殿を200 μl のTEに溶解した。この溶液を、10,000rpmで10分間遠心して、不溶性のタンパク質を除いた。この溶液に、1/10量の3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）と2倍量の100%エタノールを加えてよく混和して -20°C で1時間放置し、15,000rpmで15分間遠心分離した。その後、上清を除き、70%エタノールで洗浄した後に乾燥させ、50

μl のRNase溶液 (RNase Aを $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTEで希釈)に溶解した。その後、その液を 37°C で30分間インキュベートした。この溶液に20% PEG-2.5mM NaClを $30\mu\text{l}$ 加え、よく混和した後に、1時間以上氷冷した。それを15,000rpmで20分間遠心分離した後に上清を捨て、沈殿を70%エタノールで3回洗浄した。洗浄後、乾燥させて $50\mu\text{l}$ のTEに溶解した。最終的に、この溶液をカルシトニン遺伝子が組み込まれた2本鎖プラスミドDNA溶液とした。これを(株)サワデーテクノロジーに委託して、Dideoxy chain termination法により塩基配列を調べた。

結果

メガネカイマンのカルシトニン遺伝子

PCR法は表3のインキュベーション組成および反応条件で、N末端プライマーはN-2プライマー、C末端プライマーはC-2プライマーおよびC-3プライマーとC-4プライマーを1:1の割合で混合したもの(Mixプライマー)を用いて行った。その結果、Mixプライマーを用いた表3の組成No. 2において、ポジティブコントロールとして用いたヒトのカルシトニン遺伝子と同じ大きさのDNAの増幅が見られた(図6)。そこで、この部分のバンドを回収し、サブスクリーニングを行った。ちなみに40個の形質転換体のコロニーよりプラスミドDNAを単離し、2種類の制限酵素で処理した結果、40個すべてのクローンにPCR産物が組み込まれていることがわかった。そのうちのコロニーNo. 7、10、12、14、31、36の塩基配列を調べた結果、すべてのコロニーにおいて、その塩基配列は同じであった。この塩基配列をニワトリのカルシトニン遺伝子の配列と比較したところ、24番目のGがAに変わっているのみで、しかもこれをアミノ酸に変換すると、ニワトリのアミノ酸配列と全く同じであることがわかった(図7)。

アオダイショウのカルシトニン遺伝子

PCR法は表4のインキュベーション組成および反応条件で、N末端プライマーはN-2プライマー、C末端プライマーはC-2、C-3、C-4プライマーを用いて行った。その結果、C-4プライマーを用いた表4の組成No. 3において、ポジティブコントロールとして用いたヒトのカルシトニン遺伝子と同じ大きさに大量のDNAの増幅が見られた(図8)。C-2プライマーを用いた時も少量だが同様の位

置にDNAの増幅が見られた。しかしながら、非特異的な増幅も認められたので、アニーリングの温度を55℃にして、同じ反応組成で再びPCR法を行った。その結果、C-2 プライマーを用いた時ではDNAの増幅は見られなくなり、C-4 プライマーを用いた時ではヒト・カルシトニン遺伝子と同じ大きさのDNA以外の非特異的なDNAの増幅が消失した。従って、C-4 プライマーで増幅された部分を回収し、サブスクリーニングを行った。43個の形質転換体のコロニーよりプラスミドDNAを単離し、2種類の制限酵素で処理した結果、43個のコロニーがすべて形質転換を起こしていることが分かった。そのうちのコロニーNo. 7、16、23、34の塩基配列を調べた結果、それらの塩基配列はすべて同じであった。その配列をニワトリのカルシトニン遺伝子の配列と比較したところ、8番目のGがAに、9番目のTがCに、15番目のTがCに、54番目のAがGに、63番目のTがGに、90番目のAがGに、93番目のTがGに変わっていた。その塩基配列をアミノ酸に変換すると、3位のSerがAsnに変わっているのが明らかになった(図9)。

カナヘビのカルシトニン遺伝子

PCR法は表5のインキュベーション組成および反応条件で、N末端プライマーはN-2 プライマー、C末端プライマーはC-2、C-3、C-4 プライマーを用いて行った。その結果、C-4 プライマーを用いた表5の組成No. 3においてのみ、ポジティブコントロールとして用いたヒトのカルシトニン遺伝子と同じ大きさのDNAの増幅が見られた(図10)。従って、その部分のバンドを回収し、サブスクリーニングを行った。30個の形質転換体のコロニーよりプラスミドDNAを単離し、2種類の制限酵素で処理した結果、30個のコロニーすべてが形質転換を起こしていることが分かった。そのうちコロ

ニ-No. 6、19、23、25の塩基配列を調べた結果、すべての塩基配列は同じであった。その配列をニワトリのカルシトニン遺伝子の配列と比較したところ、8番目のGがAに、9番目のTがCに、15番目のTがCに、25番目のCがTに変わっていた。また、その塩基配列をアミノ酸に変換すると、アオダイショウと同様に3位のSerがAsnに変わっているのが明らかになった(図11)。

クサガメのカルシトニン遺伝子

PCR法は表6のインキュベーション組成および反応条件で、N末端プライマーはN-2プライマー、C末端プライマーはC-2、C-3、C-4プライマーを用いて行った。その結果、どのプライマーを用いた時も遺伝子の増幅は見られなかった。従って、さらに条件を検討しなければならなかったが、もし増幅するならば、クサガメにおいてもC末端プライマーはC-4プライマーが有効であろうと予測をつけた。また、PCR法のポリメラーゼ反応はMgCl₂の濃度に影響されるので、様々なMgCl₂濃度でもPCR法を行ってみた。その時のPCR法のインキュベーション組成と反応条件を表7に示す。その結果、MgCl₂濃度が4.5mMから8.5mMの反応条件において(表7の組成No. 2、3、4、5、6)ポジティブコントロールとして用いたヒトのカルシトニン遺伝子と同じ大きさのDNAの増幅が見られた(図12)。そこで次に、同じ反応組成で、アニーリングの温度を55℃にしてPCR法を行ったところ、MgCl₂濃度が7.5mMの時だけに先と同様の大きさのDNAが増幅された。しかしながらクサガメにおいては、他の動物のPCR法における経過に比べて増幅がやや困難であったため、組み換え体をつくる前にPCR産物についてダイレクトシーケンスを委託し、それがカルシトニン遺伝子に似たもの

であることを確かめた。その結果、増幅されたDNAの部分的なシーケンスしかできなかったが、カメの増幅されたDNAの22番目以降の塩基は、ニワトリの塩基配列と全く同じであることがわかった。このことは、カメにおいて増幅されたDNAは、ワニ、ヘビ、トカゲのいずれの配列とも異なっていることを意味した。従って、このPCR産物を用いてサブスクリーニングを行った。

33個の形質転換体のコロニーよりプラスミドDNAを単離し、2種類の制限酵素で処理した結果、33個すべてが形質転換していることが分かった。そのうちコロニーNo. 5、6、17、27の塩基配列を調べた結果、コロニーの塩基配列はすべて同じであった。さらに、その塩基配列をニワトリのカルシトニン遺伝子の塩基配列と比較したところ、全く同じであることがわかった(図13)。この結果は、ニワトリのゲノムが操作の過程であたかも混入したように見えた。しかしながら、表8にあるように本研究はワニ、ヘビ、トカゲ、カメの順で実験を行い、カメ以外のワニ、ヘビ、トカゲにおいては、どの種においても、複数のクローンを調べたにもかかわらず、ニワトリの塩基配列は全く認められなかった。また、当然の事ながら、その期間中ニワトリのゲノムには一切触れなかった。従って、カメのDNAの中にはニワトリのカルシトニン遺伝子と同一の配列があると判断された。

論議

硬骨魚のサケにおいては主たるカルシトニンの他に、アミノ酸配列の異なるもう2種類の分子があり、計3種類のカルシトニンが発現していることが知られている (Potts, *et al.*, 1971)。キンギョやイワシにおいてもカルシトニンのN末端ペプチドが複数あることから、カルシトニン分子も少なくとも2種類以上あることが暗示されている (Sasayama, *et al.*, 1995, 未発表資料)。さらにニワトリにおいても2種類のカルシトニン分子が存在することが報告されている (Perez, *et al.*, 1982)。これらのことは、それらの動物において、カルシトニン遺伝子は少なくとも複数存在することを意味している。従って、爬虫類においてもカルシトニン遺伝子が複数存在することは十分に考えられる。本研究で用いたPCR法は、その特性上、爬虫類の鰓後腺において実際に発現しているカルシトニンを正確に特定するものではないが、PCR法の結果が常にカルシトニン分子をコードしていた事から考えて、今回増幅されたDNAの塩基配列は発現レベルのカルシトニンの遺伝子の配列に良く似たものであると推測される。また、本研究で用いたプライマーは、予備的に行った実験では、両生類において無効であった。このことも、増幅されたDNAの塩基配列が爬虫類に特有であることを示唆している。3目4種の爬虫類において、PCR法によって増幅されたDNAの塩基配列と、それがアミノ酸に発現された時の配列を図14にまとめて示す。本研究で明らかになったこれらの塩基配列が爬虫類のカルシトニン遺伝子の1つをコードしているとすると、少なくともこれらの爬虫類のカルシトニンも他の脊椎動物と同じく、アミノ酸の配列上、カルシトニンとしての典型的な特徴を有していることがわかる。すなわち、1位と7位はCysで、最後はPro

で終わっており、頭部と尾部に相当する部分のアミノ酸は他の動物のカルシトニンと同じく保存性が高い。しかしながら、これらの塩基配列の最大の特徴は、ニワトリのカルシトニンの塩基配列とほとんど同じことである。すなわち、ニワトリとクサガメの塩基配列の類似性は100%、メガネカイマンとは99%、カナヘビとは96%、アオダイショウとは93%同じであった。しかしながら、PCR法は、DNAの増幅の起点とするプライマーに特異的な領域のみが増幅されるのが特徴であり、本研究においては、ニワトリのカルシトニン遺伝子の塩基配列より設計したプライマーが有効であった。他の動物のカルシトニン遺伝子から設計したプライマーではカルシトニン遺伝子と同じ大きさのDNAの増幅はほとんど認められなかった。従って、爬虫類のゲノムDNAの中に、すでにニワトリのカルシトニン遺伝子と同一の配列か、あるいはそれに極めて近い配列が存在し、それが増幅されたと考えるべきである(図15)。

本研究で増幅された爬虫類の“カルシトニン遺伝子”の配列を、それらの種の間で比較してみると、クサガメ、メガネカイマン、カナヘビ、アオダイショウの順でニワトリのカルシトニン遺伝子の塩基配列から遠くなる。この順序は、爬虫類内において、カメ目(二畳紀後期)、ワニ目(三畳紀中期)、有鱗目のトカゲ亜目(ジュラ紀後期)、ヘビ亜目(白亜紀中期)の順で系統発生的に分化してきたという地史的資料や、また、鳥類はワニ目と同じ祖先から分岐した(ジュラ紀中期)という推測とよく一致する(Colbert and Morales., 1991)(図16)。すなわち、爬虫類の先祖がもっていたカルシトニン遺伝子は系統発生的に古い動物であるカメ類やワニ類に引き継がれ、そこより鳥類に受け渡された、と考える。一方、トカゲ類やヘビ類は爬虫類として独自のカルシトニン分子の方向へと進んだと推測される。

本研究で増幅された爬虫類の“カルシトニン遺伝子”を含めて脊椎動物全体のカルシトニンの分子進化を考えると、原始硬骨魚類がもっていたと思われるカルシトニンは、進化の過程を通して長期間に渡って保存され、現生の硬骨魚類であるサケや爬虫類、鳥類のニワトリへと受け継がれたものと思われる（図17）。従って、本研究の結果は、なぜニワトリのカルシトニンがサケ系列に入れられるほど硬骨魚類のカルシトニンに似ているのかを良く説明するものである。

要約

1. Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて3目4種の爬虫類（メガネカイマン、アオダイショウ、カナヘビおよびクサガメ）のゲノムよりカルシトニン遺伝子の増幅を試みた。その結果、ニワトリのカルシトニン遺伝子の塩基配列の一部をプライマーとして用いた時のみ、それらの爬虫類でヒトのカルシトニン遺伝子と同じ大きさである約150塩基対のDNA断片の増幅が見られた。それを大腸菌に組み込み、クローニングした結果、それらの増幅されたDNAの塩基配列はニワトリのカルシトニン遺伝子の塩基配列と非常に良く似ていることが明らかになった。
2. ニワトリのカルシトニン遺伝子と増幅されたDNA断片の類似性は、クサガメにおいては100%、メガネカイマンでは99%、カナヘビでは96%、アオダイショウでは93%であった。この類似の順序は爬虫類内において、これらの動物が系統発生的にはカメ目、ワニ目、有鱗目のトカゲ亜目、ヘビ亜目の順で分化し、鳥類はワニ目と同じ祖先から分岐してきたという地史的資料とよく一致する。
3. 本研究で増幅されたDNA断片の塩基配列が、爬虫類のカルシトニン遺伝子の1つであると考え、脊椎動物全体のカルシトニンの分子進化を考察すると、原始硬骨魚類がもっていたと思われる基本型のカルシトニンは、進化の過程を通して長期間に渡って保存され、現生の硬骨魚類に広がる一方、爬虫類を経て鳥類へと受け継がれたと思われる。

参考文献

Colbert, E. D. and M. Morales (1991)

Surviving reptiles. Evolution of the Vertebrates, pp.215-225

Craig, R. K., Hall, L., Edbrooke, M. R., Allison, J. and I. MacIntyre (1982)

Partial nucleotide sequence of human calcitonin precursor mRNA identifies flanking cryptic peptide. Nature, 295: 345-347

Cumaraswamy, A., Borges, M., Tamir, H. and B. D. Nelkin (1993)

Cloning of cDNA encoding sheep calcitonin from a thyroid C-cell library. Gene, 126: 269-273

Jacobs, J. W., Goodman, R. H., Chin, W. W., Dee, P. C. and J. F. Habener (1981)

Calcitonin mRNA encodes multiple polypeptides in a single precursor. Science, 213 pp.457-459

Kline, L. W. and J. G. Mehta (1983)

Measurement of changes in calcitonin levels with hypercalcemia using an ELISA technique. "Endocrine Control of Bone and Calcium Metabolism" Eds. by Potts, J. T. and T. Fujita, Elsevier Science, pp.206-208

Lasmoles, F., Jullienne, A., Desplan, C., Milhaud, G. and M. S. Moukhtar (1985)

Structure of chicken calcitonin predicted by partial nucleotide sequence of its precursor. Federation of European Biochemical Societies, 180: 113-116

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and J. Sambrook (1989)

Molecular Cloning: A Laboratory manual 2nd Eds. by Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 6.3-6.35

Martial, K., Minvielle, S., Jullienne, A., Segond, N.,

Milhaud, G. and F. Lasmoles (1990)

Predicted structure of rabbit N-terminal, calcitonin and katalcalcin peptides. Biochem. Biophys. Res. Commun., 171: 1111-1114

Mol, J. A., Kwant, M. M., Arnold, I. C. J. and A. W. Herman (1991)

Elucidation of the sequence of canine (pro)-calcitonin. A molecular biological and protein chemical approach. Regulatory Peptides, 35: 189-195

Perez, C. R., Galan, G. F., Girgis, S. I. and I. Macintyre (1982)

Identification of both human and salmon calcitonin-like molecules in birds suggesting the existence of two calcitonin genes. J. Endocrinol., 92: 351-355

Poschl, E., Lindley, I., Hofer, E., Seifert, J. M., Brunow-sky, W. and J. Besemer (1987)

The structure of procalcitonin of the salmon as deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett.*, 226: 96-100

Potts, J. T., Niall, H. D., Keutman, H. T. and R. M. Lquin (1971)

Chemistry of the calcitonins; Species variation plus structure-activity relations and pharmacologic implications. "Calcium, Parathyroid Hormone and the Calcitonins" Eds. by Talmage, R. V. and P. L. Munson, *Excerpta Medica*, Amsterdam, pp.121-127

Sasayama, Y., Yoshihara, M., Fujimori, M. and C. Oguro (1990)

The role of the ultimobranchial gland in calcium metabolism of amphibians and reptiles. "Progress in Comparative Endocrinology" Eds. by Epple, A., Scanes, C. G. and M. H. Stetson, *Wiley-Liss*, New York, pp.592-597

Sasayama, Y., Ukawa, K., Kai-ya, H., Oguro, C., Takei, Y., Watanabe, T. X., Nakajima, K. and S. sakakibara (1993)

Goldfish calcitonin: purification, characterization and hypocalcemic potency. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89: 189-194

Stevenson, J. C., Hillyard, C. J., Macintyre, I., Cooper, H.
and M. I. Whitehead (1979)

A physiological role for calcitonin: protection of the
maternal skeleton. *Lancet* II: 769-770

Suzuki, N., Nose, Y., Kase Y., Sasayama, Y., Takei, Y., Na-
gasawa, H., Watanabe, T. X., Nakajima, K. and S. Sakakibara
(1994)

Amino acid sequence of sardine calcitonin and its hypo-
calcemic activity in rats. *Zool. Sci.*, 11: 713-716

Takei, Y., Takahashi, A., watanabe, T. X., Nakajima, K., Sa-
kakibara, S., Sasayama, Y., Suzuki, N. and C. Oguro (1991)

New calcitonin isolated from the ray, *Dasyatis akajei*.
Biol. Bull., 180: 485-488

Taylor, G. R (1991)

Polymerase chain reaction: Basic principles and auto-
mation. In "PCR", Ed. by Mcpherson, M. J., Quire, P. and G.
R. Taylor, Oirl Press, : 1-14

Uchida, K., Yamada, H., Suzuki, N., Sasayama, Y. and T. Nishizawa (1993)

Detection of calcitonin mRNA in the ultimobranchial gland of the Japanese Char with in situ hybridization method.

"Progress in Comparative Endocrinology" Eds. by Varavudhi, M. R. P. and S. Lorlowhakarn, The Asia and Oceania Soc. Comp. Endocrinol., pp.41-42

Uchiyama, M., Yoshihara, M. and T. Murakami (1981)

Calcitonin content in the ultimobranchial gland of the snake, *Elaphe climacophora*: Comparison of adults, young, and hatchlings. Gen. Comp. Endocrinol., 43: 259-261

図の説明

- 図 1 爬虫類の肝臓からのゲノムDNAの抽出手順。
- 図 2 本研究で新たに設計したN、C末端プライマーの領域。
- 図 3 PCR法のインキュベーション条件。
以下のインキュベーション条件で行ったときの温度変化を示す。
1 サイクル / 95℃-1~2min
30~45 サイクル / 95℃-30sec~1min
45~55℃-30sec
72℃-30sec~1min
1 サイクル / 72℃-5~7min
- 図 4 形質転換とスクリーニングの手順。
- 図 5 アルカリSDS法によるプラスミドDNAの単離手順。
- 図 6 メガネカイマンのゲノムDNAから増幅されたカルシトニン遺伝子。
Lane 1 : ポジティブコントロールとして用いたヒト・カルシトニン遺伝子
PCR産物 (約150塩基対)
Lane 2 : 鋳型DNAを加えずにPCR法を行ったもの (ネガティブコントロール)
Lane 3 : C-2 プライマーを用いたメガネカイマンPCR産物
(表3のComposition No. 1)
Lane 4 : Mix プライマーを用いたメガネカイマンPCR産物
(表3のComposition No. 2)
矢印で示すように、Lane 4にヒト・カルシトニン遺伝子と同じ分子量の増幅断片が存在する。
- 図 7 メガネカイマン・カルシトニン遺伝子の塩基配列。

- 図 8 アオダイショウのゲノムDNAから増幅されたカルシトニン遺伝子。
- Lane 1 : ポジティブコントロールとして用いたヒト・カルシトニン遺伝子
PCR産物 (約150塩基対)
- Lane 2 : 鋳型DNAを加えずにPCR法を行ったもの (ネガティブコントロール)
- Lane 3 : C-2 プライマーを用いたアオダイショウPCR産物
(表4のcomposition No. 1)
- Lane 4 : C-3 プライマーを用いたアオダイショウPCR産物
(表4のcomposition No. 2)
- Lane 5 : C-4 プライマーを用いたアオダイショウPCR産物
(表4のcomposition No. 3)
- 矢印で示すように、Lane 5にヒト・カルシトニン遺伝子と同じ分子量の増幅断片が存在する。

- 図 9 アオダイショウ・カルシトニン遺伝子の塩基配列。

- 図 10 カナヘビのゲノムDNAから増幅されたカルシトニン遺伝子。
- Lane 1 : ポジティブコントロールとして用いたヒト・カルシトニン遺伝子
PCR産物 (約150塩基対)
- Lane 2 : 鋳型DNAを加えずにPCR法を行ったもの (ネガティブコントロール)
- Lane 3 : C-2 プライマーを用いたカナヘビPCR産物
(表5のcomposition No. 1)
- Lane 4 : C-3 プライマーを用いたカナヘビPCR産物
(表5のcomposition No. 2)
- Lane 5 : C-4 プライマーを用いたカナヘビPCR産物
(表5のcomposition No. 3)
- 矢印で示すように、Lane 5にヒト・カルシトニン遺伝子と同じ分子量の増幅断片が存在する。

- 図 11 カナヘビ・カルシトニン遺伝子の塩基配列。

- 図 12 クサガメのゲノムDNAから増幅されたカルシトニン遺伝子。
- Lane 1 : ポジティブコントロールとして用いたヒト・カルシトニン遺伝子
PCR産物 (約150塩基対)
- Lane 2 : 鋳型DNAを加えずにPCR法を行ったもの (ネガティブコントロール)
- Lane 3 : $MgCl_2$ 濃度が3.5mMの時のカナヘビPCR産物
(表7のcomposition No. 1)
- Lane 4 : $MgCl_2$ 濃度が4.5mMの時のカナヘビPCR産物
(表7のcomposition No. 2)
- Lane 5 : $MgCl_2$ 濃度が5.5mMの時のカナヘビPCR産物
(表7のcomposition No. 3)
- Lane 6 : $MgCl_2$ 濃度が6.5mMの時のカナヘビPCR産物
(表7のcomposition No. 4)
- Lane 7 : $MgCl_2$ 濃度が7.5mMの時のカナヘビPCR産物
(表7のcomposition No. 5)
- Lane 8 : $MgCl_2$ 濃度が8.5mMの時のカナヘビPCR産物
(表7のcomposition No. 6)
- 矢印で示すように、Lane 4～8にヒト・カルシトニン遺伝子と同じ分子量の増幅断片が存在する。

図 13 クサガメ・カルシトニン遺伝子の塩基配列。

図 14 本研究で明らかにされた爬虫類のカルシトニン遺伝子の塩基配列とアミノ酸に発現された時の配列。

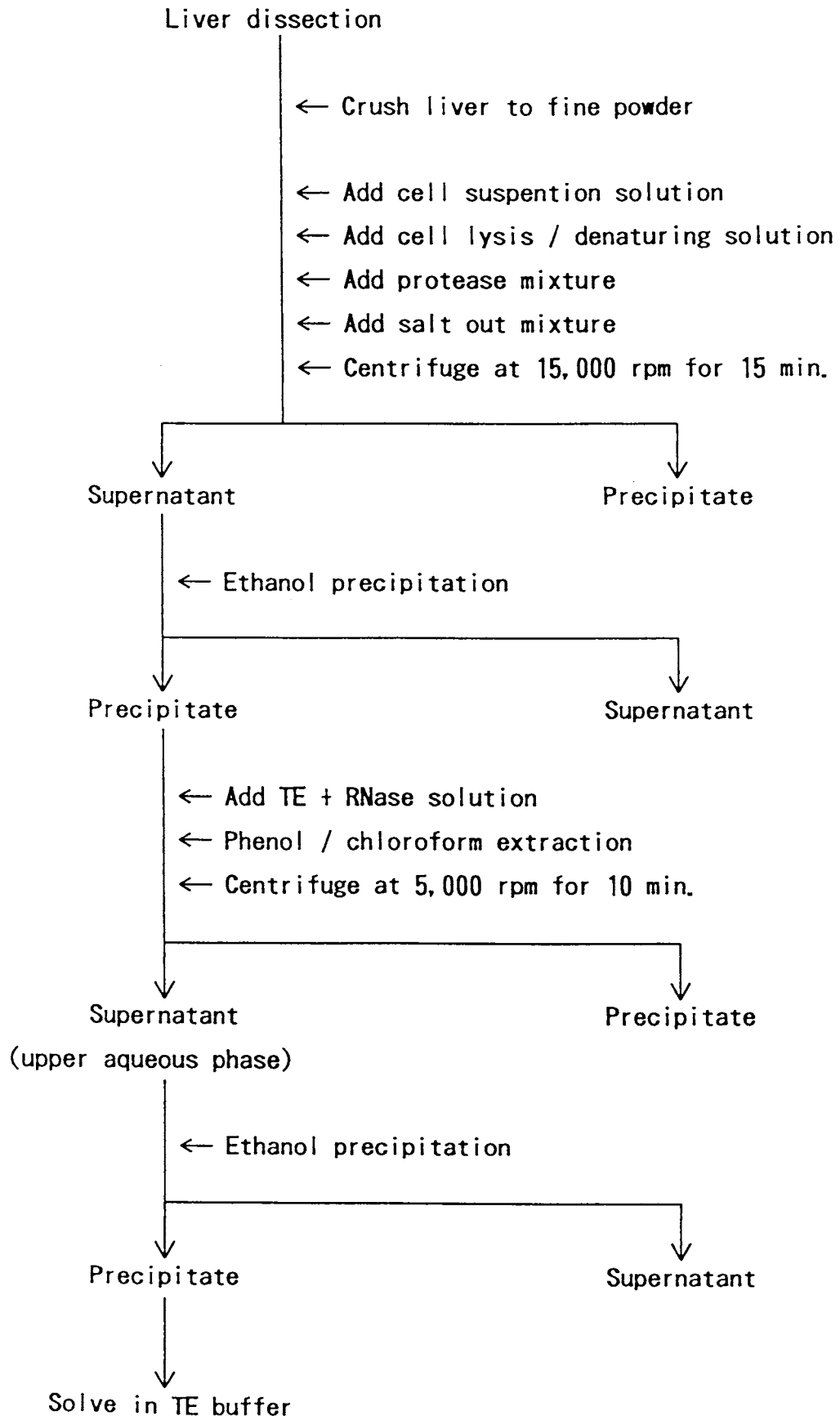
図 15 サケ系列のカルシトニン遺伝子の変化予想図。

図 16 爬虫類の系統進化。

図 17 カルシトニンの分子進化の模式図。

☒ 1

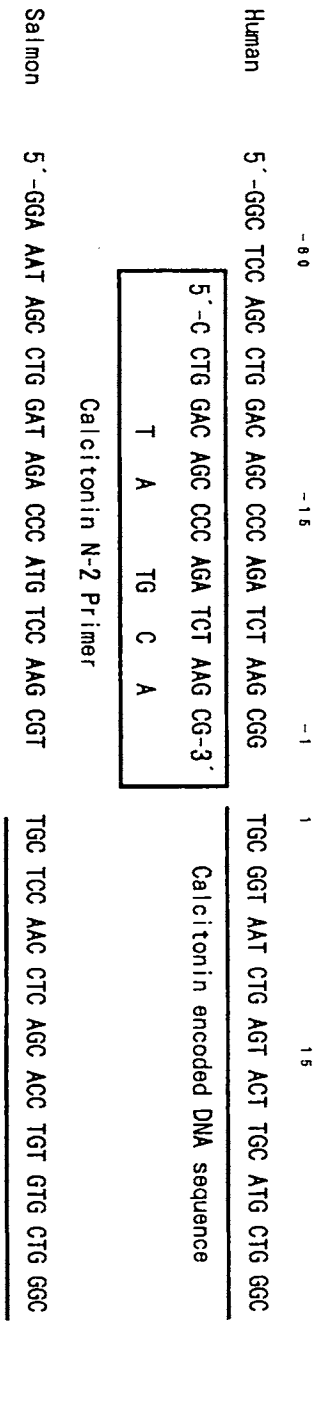
Protocol of genomic DNA extraction



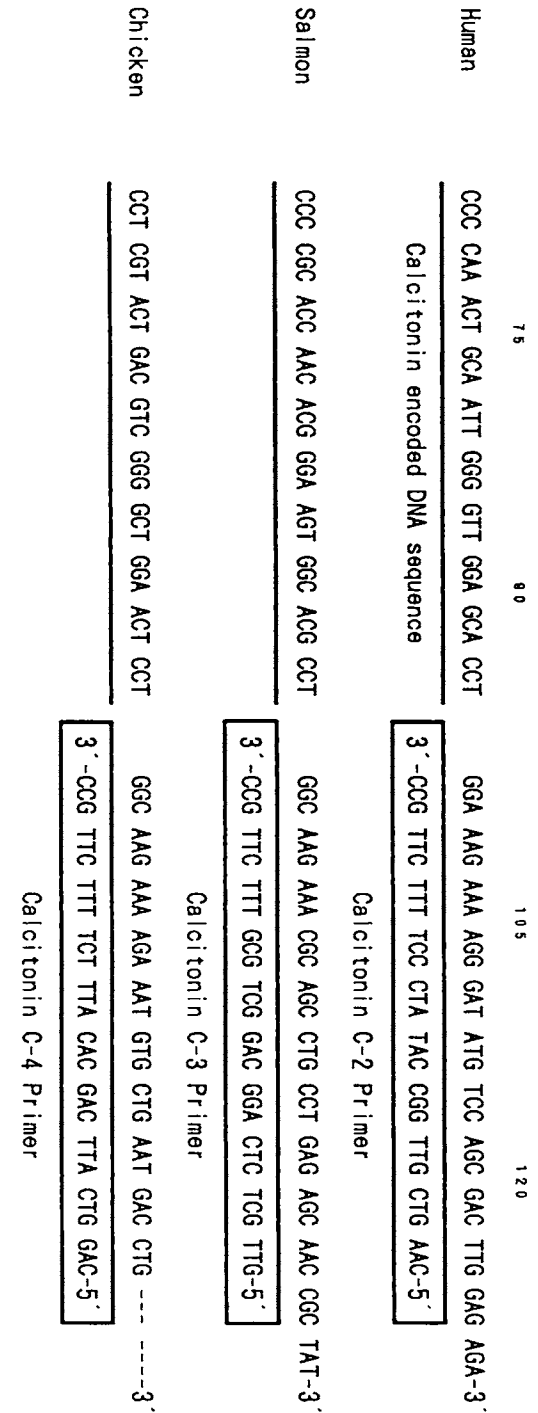


2

N末端プライマー



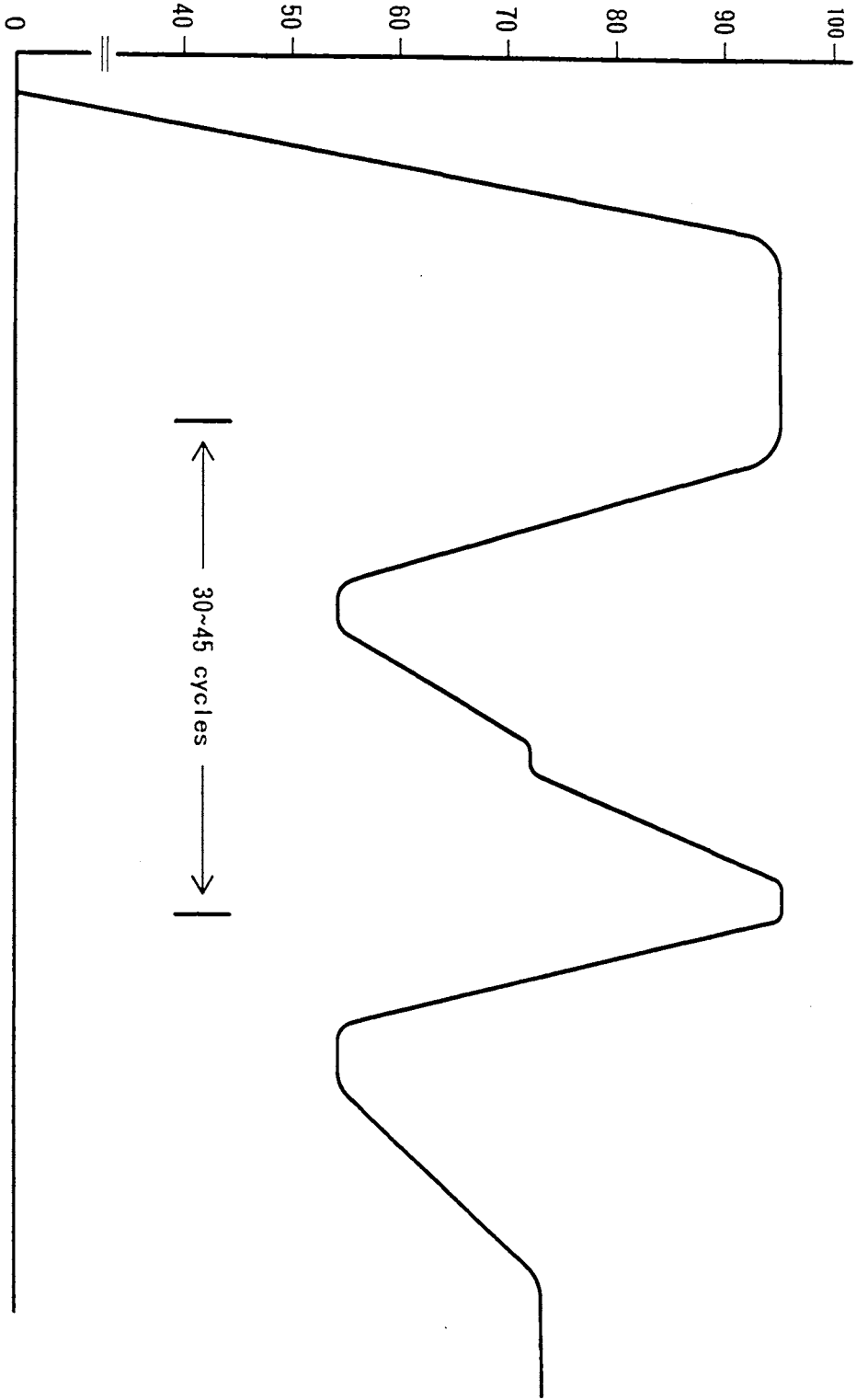
C末端プライマー





3

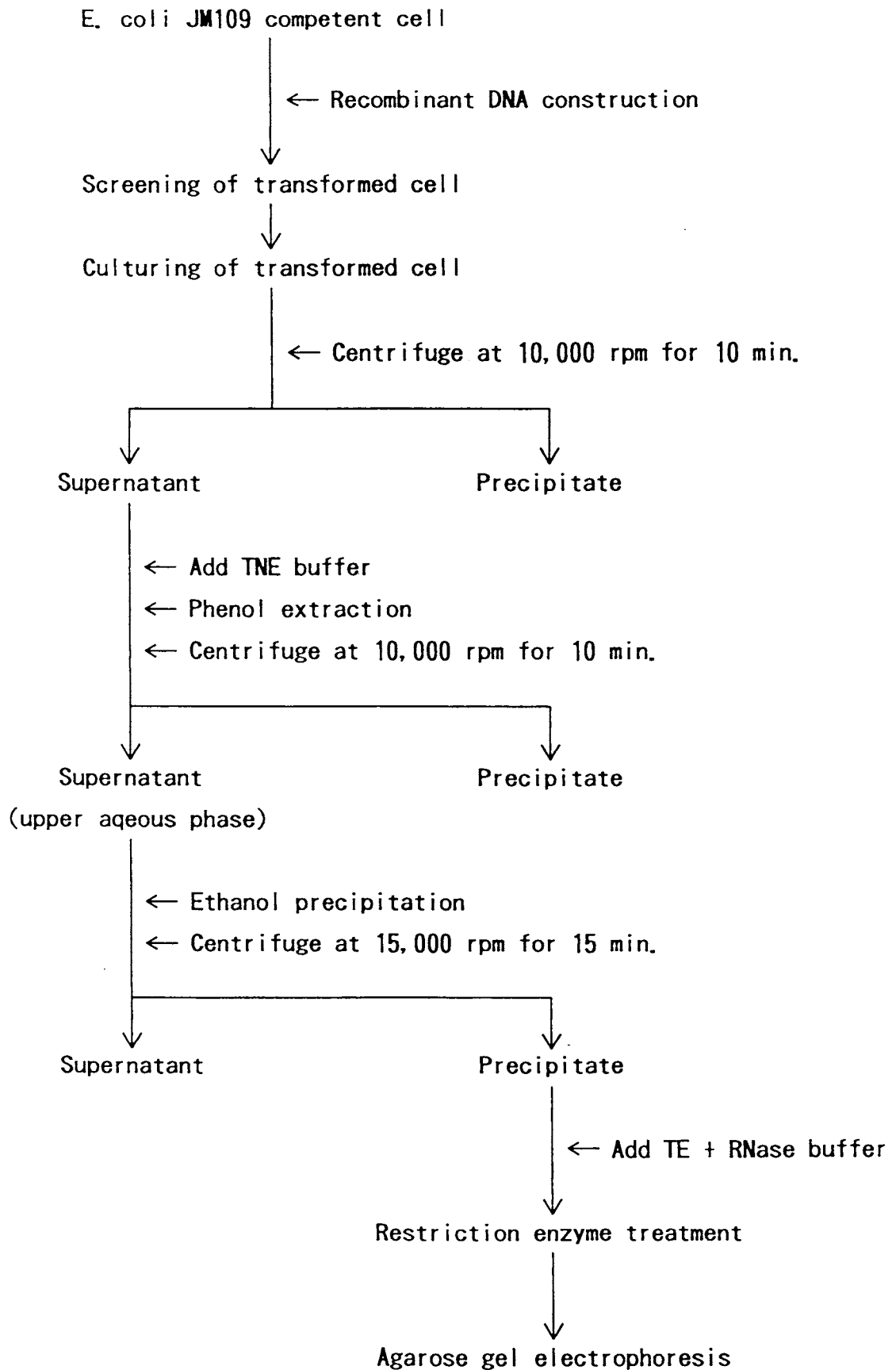
Temperature (°C)



Time (second)

☒ 4

Protocol of Transformation and Clone Screening



Protocol of plasmid DNA isolation

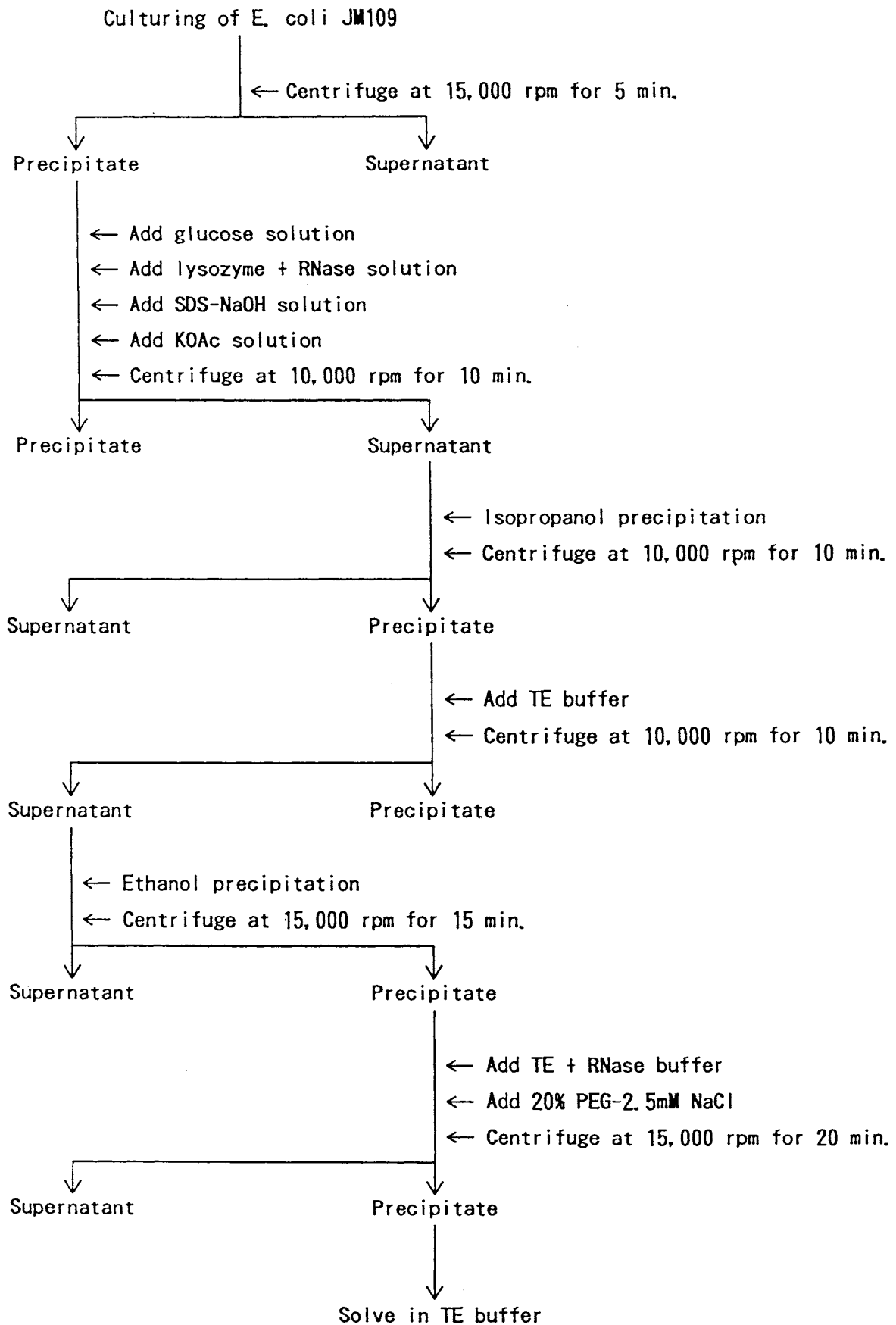
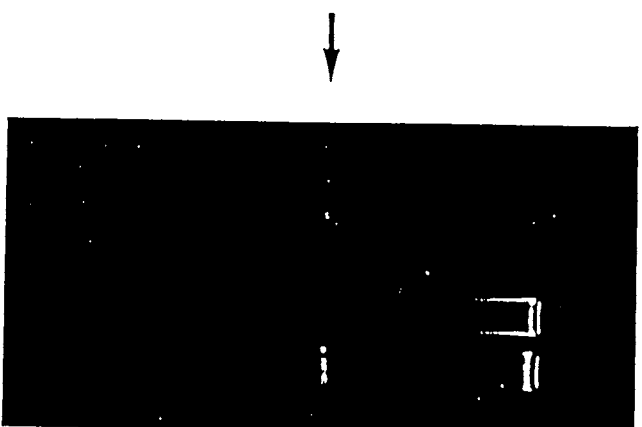


図 6

1 2 3 4



- 1 : ポジティブコントロール
- 2 : ネガティブコントロール
- 3 : メガネカイマソPCR産物
(C-2 プライマー使用)
- 4 : メガネカイマソPCR産物
(Mix プライマー使用)

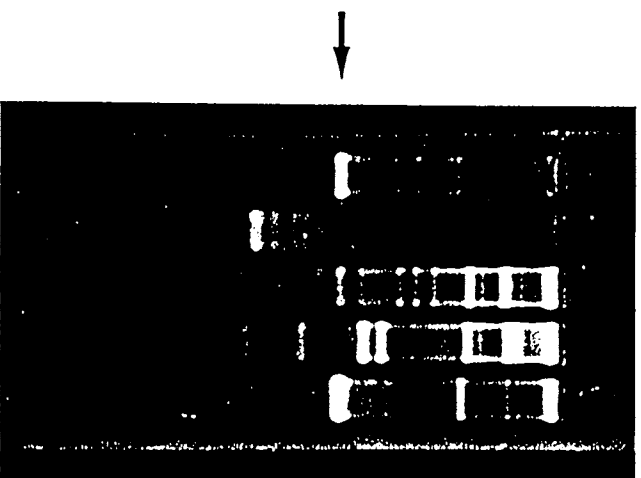
図 7

Chicken 5'-TGT GCC AGT CTG AGT ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAG AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'

Crocodile 5'-TGT GCC AGT CTG AGT ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAG AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'

図 8

1 2 3 4 5



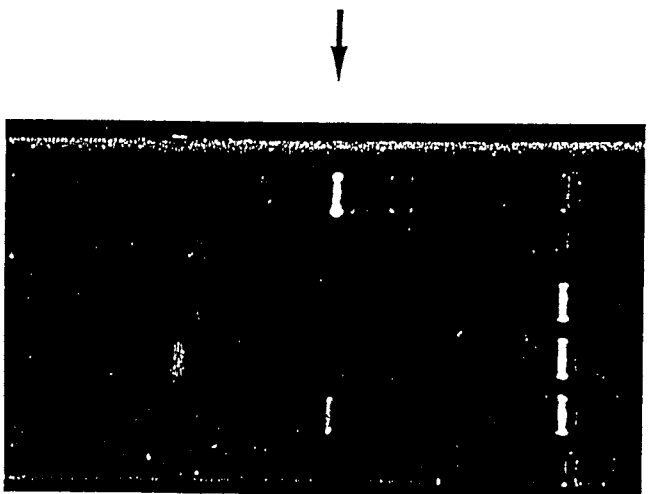
- 1 : ポジティブコントロール
- 2 : ネガティブコントロール
- 3 : アオダイショウPCR産物
(C-2 プライマー使用)
- 4 : アオダイショウPCR産物
(C-3 プライマー使用)
- 5 : アオダイショウPCR産物
(C-4 プライマー使用)

図 9

Chicken 5'-TGT GCC AGT CTG AGT ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'

Snake 5'-TGT GCC AAC CTG AGC ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAG TTG CAA ACG TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGG ACG CCT-3'

図 10 1 2 3 4 5



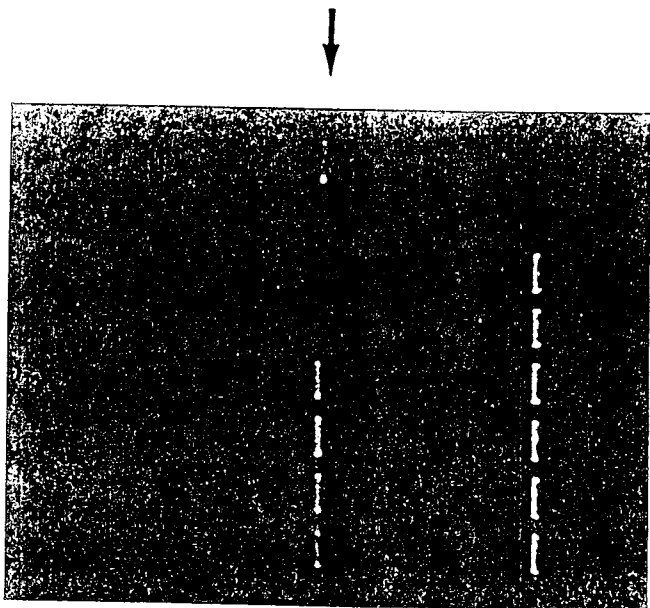
- 1 : ポジティブコントロール
- 2 : ネガティブコントロール
- 3 : カナヘビPCR産物
(C-2 プライマー使用)
- 4 : カナヘビPCR産物
(C-3 プライマー使用)
- 5 : カナヘビPCR産物
(C-4 プライマー使用)

図 11

Chicken 5'-TGT GCC AGT CTG AGT ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'

Lizard 5'-TGT GCC AAC CTG AGC ACT TGT GTG TTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'

☒ 12 1 2 3 4 5 6 7 8



- 1 : ポジティブコントロール
- 2 : ネガティブコントロール
- 3 : クサガメ PCR産物 (MgCl₂ : 3.5mM)
- 4 : クサガメ PCR産物 (MgCl₂ : 4.5mM)
- 5 : クサガメ PCR産物 (MgCl₂ : 5.5mM)
- 6 : クサガメ PCR産物 (MgCl₂ : 6.5mM)
- 7 : クサガメ PCR産物 (MgCl₂ : 7.5mM)
- 8 : クサガメ PCR産物 (MgCl₂ : 8.5mM)

☒ 13

Chicken 5'-TGT GCC AGT CTG AGT ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAG AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'

Turtle 5'-TGT GCC AGT CTG AGC ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAG AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'

14

	5	10	15	20	25	30
Chicken	5'-TGT GCC AGT CTG AGT ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'					
	Cys-Ala-Ser-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH ₂					
Crocodile	5'-TGT GCC AGT CTG AGT ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'					
	Cys-Ala-Ser-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH ₂					
Lizard	5'-TGT GCC AAC CTG AGC ACT TGT GTG TTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'					
	Cys-Ala-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH ₂					
Snake	5'-TGT GCC AAC CTG AGC ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAG TTG CAA ACG TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGG ACG CCT-3'					
	Cys-Ala-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH ₂					
Turtle	5'-TGT GCC AGT CTG AGC ACT TGT GTG CTG GGC AAA CTG TCT CAA GAA TTG CAC AAA TTG CAA ACT TAC CCT CGT ACT GAC GTC GGG GCT GGA ACT CCT-3'					
	Cys-Ala-Ser-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH ₂					

図 15

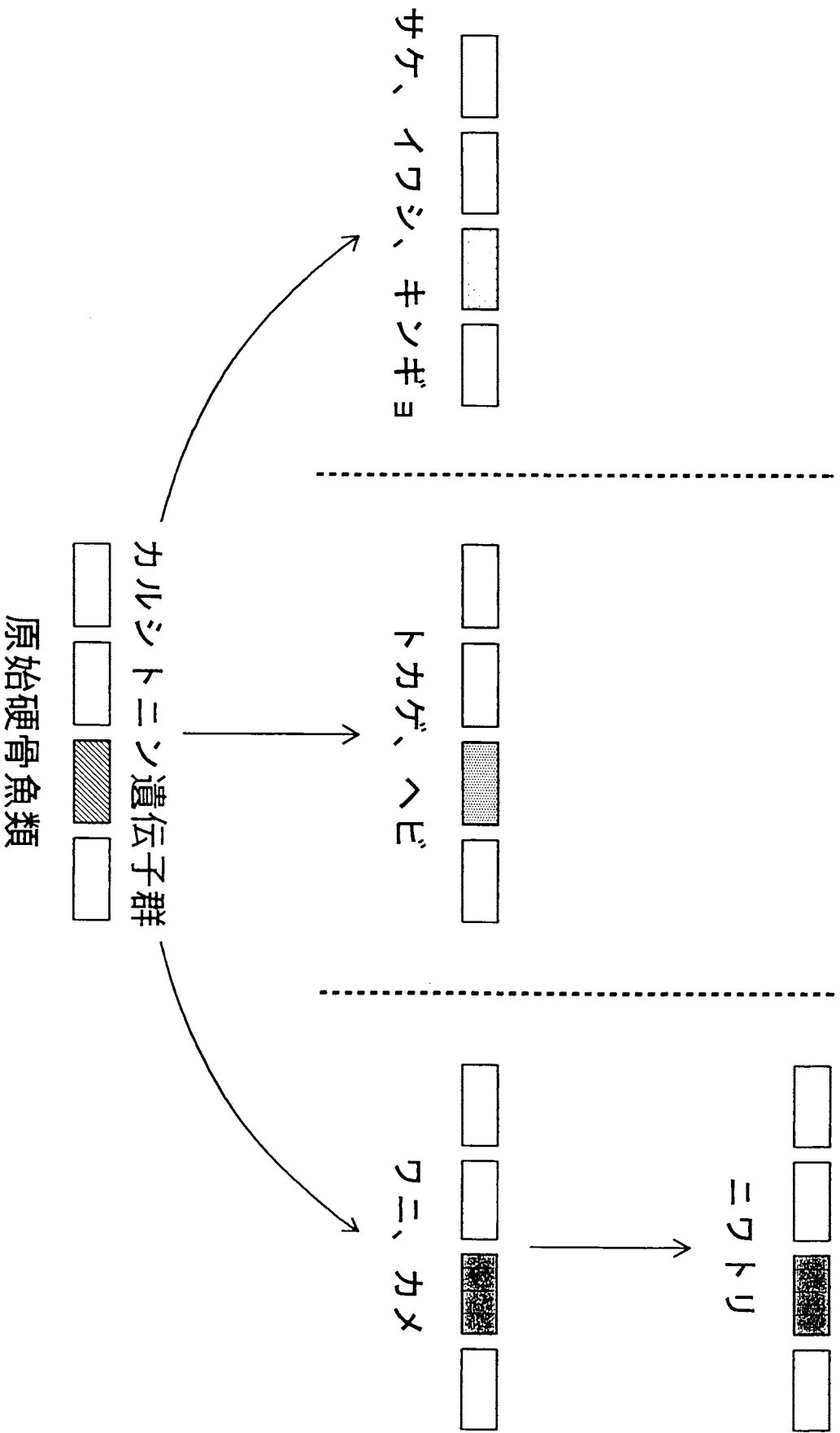


図 16

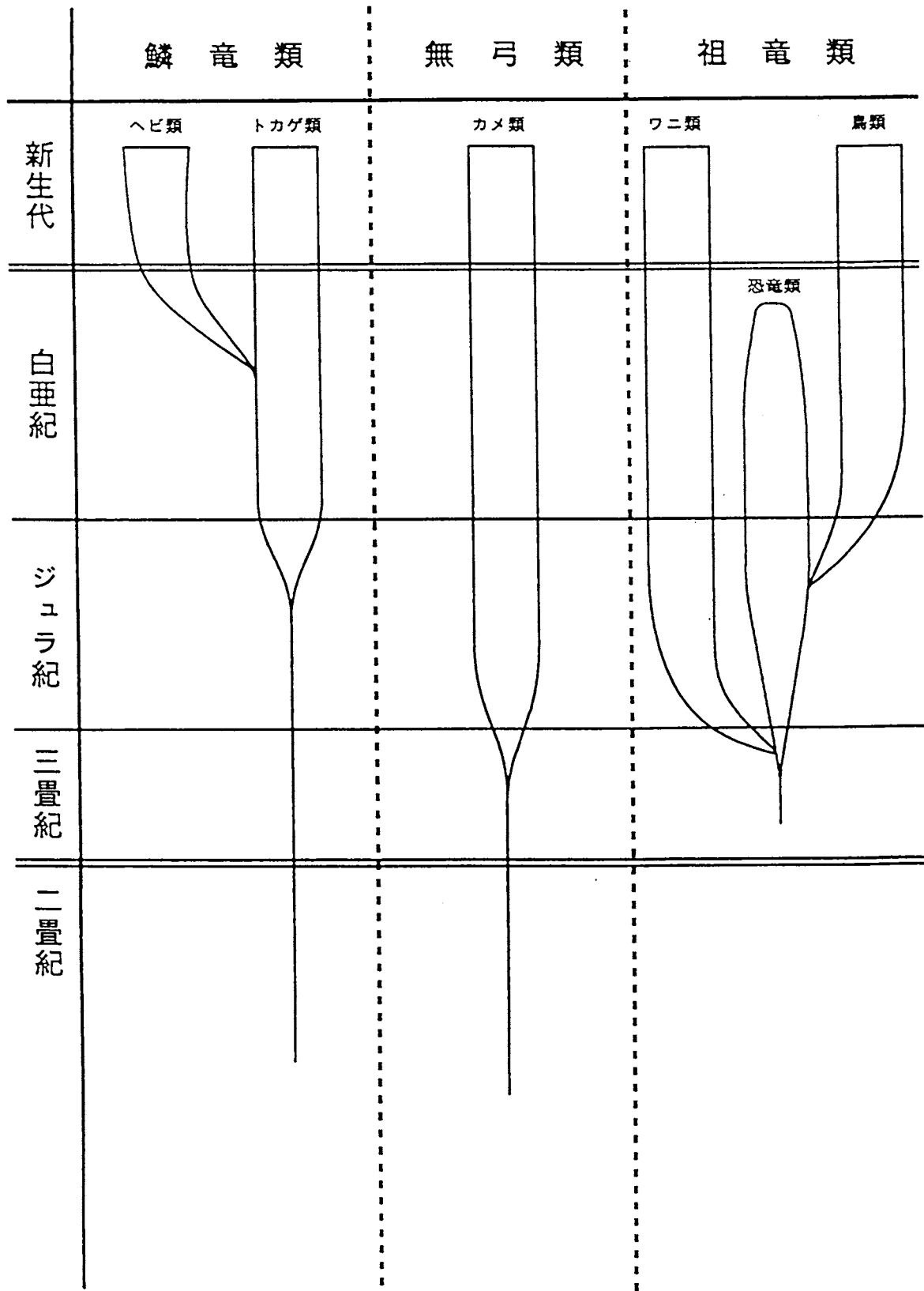


図 17

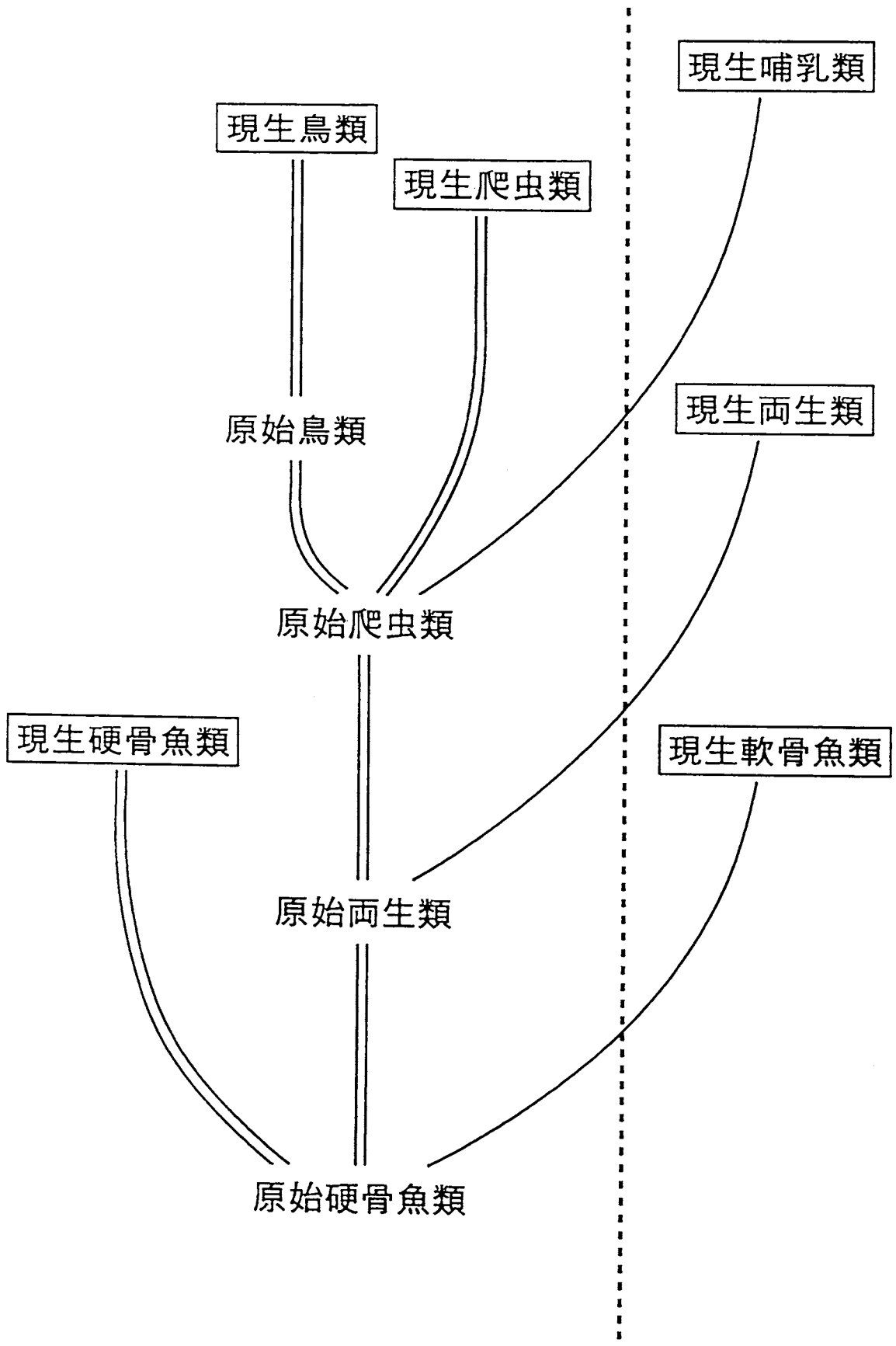


表 1

各種カルシトニンのアミノ酸配列及びその相同性による分類

ヒト系列	
	1 5 10 15 20 25 30
Human	:C-G-N-L-S-T-C-M-L-G-T-Y-T-Q-D-F-N-K-F-H-T-F-P-Q-T-A-I-G-V-G-A-P-NH ₂
Rat	:C-G-N-L-S-T-C-M-L-G-T-Y-T-Q-D-L-N-K-F-H-T-F-P-Q-T-S-I-G-V-G-A-P-NH ₂
Rabbit	:C-G-N-L-S-T-C-M-L-G-T-Y-T-Q-D-L-N-K-F-H-T-F-P-Q-T-A-I-G-V-V-A-P-NH ₂

ブタ系列	
	1 5 10 15 20 25 30
Porcine	:C-S-N-L-S-T-C-V-L-S-A-Y-W-R-N-L-N-N-F-H-R-F-S-G-M-G-F-G-P-E-T-P-NH ₂
Bovine	:C-S-N-L-S-T-C-V-L-S-A-Y-W-K-D-L-N-N-T-H-R-F-S-G-M-G-F-G-P-E-T-P-NH ₂
Ovine	:C-S-N-L-S-T-C-V-L-S-A-Y-W-K-D-L-N-N-Y-H-R-Y-S-G-M-G-F-G-P-E-T-P-NH ₂
Dog	:C-S-N-L-S-T-C-V-L-G-T-Y-S-K-D-L-N-N-F-H-T-F-S-G-I-G-F-G-A-E-T-P-NH ₂

サケ系列	
	1 5 10 15 20 25 30
Salmon	:C-S-N-L-S-T-C-V-L-G-K-L-S-Q-E-L-H-K-L-Q-T-Y-P-R-T-N-T-G-S-G-T-P-NH ₂
Sardine	:C-S-N-L-S-T-C-A-L-G-K-L-S-Q-E-L-H-K-L-Q-S-Y-P-R-T-N-V-G-A-G-T-P-NH ₂
Eel	:C-S-N-L-S-T-C-V-L-G-K-L-S-Q-E-L-H-K-L-Q-T-Y-P-R-T-D-V-G-A-G-T-P-NH ₂
Goldfish	:C-S-S-L-S-T-C-V-L-G-K-L-S-Q-E-L-H-K-L-Q-T-Y-P-R-T-N-V-G-A-G-T-P-NH ₂
Chicken	:C-A-S-L-S-T-C-V-L-G-K-L-S-Q-E-L-H-K-L-Q-T-Y-P-R-T-D-V-G-A-G-T-P-NH ₂

軟骨魚類系列	
	1 5 10 15 20 25 30
Ray	:C-T-S-L-S-T-C-V-V-G-K-L-S-Q-Q-L-H-K-L-Q-N-I-Q-R-T-D-V-G-A-A-T-P-NH ₂

PCR反応に用いた試薬の主な組成

Components		Volume(μl)
Genomic DNA	0.3~1.0 μg	1.0~4.0
10x PCR buffer ¹		2.0
MgCl ₂ ²	1.5~9.5 mM	2.0~7.6
10x dNTPs ³	each of 125~500 μM	1.0~4.0
N-Primer	0.5 μM	0.5
C-Primer	0.5 μM	0.5
Taq polymerase	1.0 unit	0.2
H ₂ O		up to 20
Oil		15.0
Total		35.0

※ 1 : 100 mM Tris-HCl (pH8.8), 500 mM KCl,

1% Triton X-100

2 : 25 mM MgCl₂

3 : 2.5 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP

メガネカイマンにおけるPCR法のインキュベーション組成と反応条件

(A) インキュベーション組成

Components	Volume(μl)	
	1	2
Composition No.		
Genomic DNA	4.0	4.0
10x PCR buffer	2.0	2.0
MgCl ₂	2.0	2.0
	(2.5mM)	(2.5mM)
10x dNTPs	4.0	4.0
	(500μM)	(500μM)
N-2 Primer	0.5	0.5
C-Primer	0.5	0.5
	(C-2)	(C-384)
Taq polymerase	0.2	0.2
H ₂ O	8.8	8.8
Oil	15.0	15.0
Total	35.0	35.0

(B) 反応条件

温度	時間	サイクル数
95°C	2 min	1 cycle
95°C	1 min) 45 cycles
50°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	1 cycle

表 4

アオダイショウにおけるPCR法のインキュベーション組成と反応条件

(A) インキュベーション組成

Components	Volume(μl)		
	1	2	3
Composition No.	1	2	3
Genomic DNA	3.0	3.0	3.0
10x PCR buffer	2.0	2.0	2.0
MgCl ₂	2.0	2.0	2.0
	(2.5mM)	(2.5mM)	(2.5mM)
10x dNTPs	2.0	2.0	2.0
	(250μM)	(250μM)	(250μM)
N-2 Primer	0.5	0.5	0.5
C-Primer	0.5	0.5	0.5
	(C-2)	(C-3)	(C-4)
Taq polymerase	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	11.8	11.8	11.8
Oil	15.0	15.0	15.0
Total	35.0	35.0	35.0

(B) 反応条件

温度	時間	サイクル数
95°C	2 min	1 cycle
95°C	30 sec) 45 cycles
47°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	1 cycle

表 5

カナヘビにおけるPCR法のインキュベーション組成と反応条件

(A) インキュベーション組成

Components	Volume (μl)		
	1	2	3
Composition No.	1	2	3
Genomic DNA	1.0	1.0	1.0
10x PCR buffer	2.0	2.0	2.0
MgCl ₂	2.8	2.8	2.8
	(3.5mM)	(3.5mM)	(3.5mM)
10x dNTPs	2.0	2.0	2.0
	(250μM)	(250μM)	(250μM)
N-2 Primer	0.5	0.5	0.5
C-Primer	0.5	0.5	0.5
	(C-2)	(C-3)	(C-4)
Taq polymerase	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	11.0	11.0	11.0
Oil	15.0	15.0	15.0
Total	35.0	35.0	35.0

(B) 反応条件

温度	時間	サイクル数
95°C	1 min	1 cycle
95°C	30 sec) 30 cycles
50°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1 cycle

表 6

クサガメにおけるPCR法のインキュベーション組成と反応条件 (その1)

(A) インキュベーション組成

Components	Volume (μl)		
	1	2	3
Composition No.	1	2	3
Genomic DNA	1.0	1.0	1.0
10x PCR buffer	2.0	2.0	2.0
MgCl ₂	2.8	2.8	2.8
	(3.5mM)	(3.5mM)	(3.5mM)
10x dNTPs	1.0	1.0	1.0
	(125μM)	(125μM)	(125μM)
N-2 Primer	0.5	0.5	0.5
C-Primer	0.5	0.5	0.5
	(C-2)	(C-3)	(C-4)
Taq polymerase	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	12.0	12.0	12.0
Oil	15.0	15.0	15.0
Total	35.0	35.0	35.0

(B) 反応条件

温度	時間	サイクル数
95°C	1 min	1 cycle
95°C	30 sec) 35 cycles
50°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1 cycle

表 7

クサガメにおけるPCR法のインキュベーション組成
と反応条件（その2）

(A) インキュベーション組成

Components	Volume(μ l)					
	1	2	3	4	5	6
Genomic DNA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
10x PCR buffer	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
MgCl ₂	2.8	3.6	4.4	5.2	6.0	6.6
	(3.5mM)	(4.5mM)	(5.5mM)	(6.5mM)	(7.5mM)	(8.5mM)
10x dNTPs	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	(125 μ M)	(125 μ M)	(125 μ M)	(125 μ M)	(125 μ M)	(125 μ M)
N-2 Primer	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
C-4 Primer	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Taq polymerase	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	12.0	11.2	10.4	9.6	8.8	8.0
Oil	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Total	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0

(B) 反応条件

温度	時間	サイクル数
95°C	1 min	1 cycle
95°C 55°C 72°C	30 sec 30 sec 1 min) 35 cycles
72°C	5 min	

表 8

本研究で行ったシーケンス反応の順番と各サンプルのシーケンスしたクローン数

サンプル	実施日	シーケンスしたクローン数
メガネカイマン	95. 11. 7	6
アオダイショウ	95. 11. 14	4
カナヘビ	95. 12. 8	4
クサガメ	96. 1. 12	4