

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07126

研究課題名(和文) 硬骨を持たない原始的脊椎動物ヤツメウナギにおける新規カルシウム代謝機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of novel calcium regulatory system in primitive vertebrate, Japanese lamprey, *Lethenteron japonicum*

研究代表者

関口 俊男 (Sekiguchi, Toshio)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：40378568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物において血中カルシウム濃度は、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(カルシトニンとスタニオカルシン)と血中カルシウム上昇ホルモン(副甲状腺ホルモンやカルシトリオール(活性型ビタミンD))により調節されている。我々は、硬骨や鱗のない円口類ヤツメウナギにおける血中カルシウム調節ホルモンの役割を検討した。まずカルシトニンと受容体を同定した。さらに淡水順応したヤツメウナギの希釈海水移行による血漿カルシトニン濃度上昇と、イオン調節に重要な鰓における受容体mRNAの発現上昇を認めた。またスタニオカルシンを新たに同定し、脊椎動物の祖先から存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Vertebrates possess bones and scales as calcium reservoirs. Blood calcium levels are regulated by hypocalcemic hormones including calcitonin and stanniocalcin and hypercalcemic hormones comprising parathyroid hormone and calcitriol(1,25-dihydroxyvitamin D3). We investigated the role of hormones involved in the regulation of blood calcium levels in the Japanese lamprey, *Lethenteron japonicum*, which has no bones and scales. Calcitonin and its receptor were identified. In addition, transfer of lamprey from freshwater to 1/3 seawater results in an increase in plasma calcitonin concentration and expression of its receptor mRNA in the gill. We also newly identified stanniocalcin.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：カルシトニン ヤツメウナギ 円口類 比較内分泌学

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物においてカルシウム代謝は、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カルシトリオール(1,25ジヒドロキシビタミンD₃))により調節されている。円口類は、顎を持たない原始的な脊椎動物である。さらに硬骨や鱗を持たないため、カルシウム代謝についても異なる機構を持っていると予想される。円口類ヤツメウナギの多くは、外界のイオン濃度変化に対し、体液中の濃度を一定に保つことができる。そして血中カルシウムイオン調節能の存在も知られているが、その調節機構については十分に解明されていない。そこで我々のグループはカワヤツメ(*Lethenteron japonicum*)のカルシウム調節機構を研究する過程で、カワヤツメゲノムデータベースから、血中カルシウム低下ホルモンのカルシトニンを同定した。

2. 研究の目的

我々は、**原始的な脊椎動物であり硬骨や鱗のない円口類カワヤツメにおける血中カルシウム調節ホルモンの役割を明らかにする目的**で、以下の研究を行った。

1) カルシトニンに着目し、血中カルシウムイオン調節ホルモンとしての役割を検討した。

2) カルシトニン以外のカルシウム調節ホルモンを探索した。

3. 研究の方法

1) カルシトニン受容体の同定と発現解析

カワヤツメゲノムデータベースから、フグカルシトニン受容体を問いかけ配列として、相同性検索を行った。候補配列は、分子系統解析により、カルシトニン受容体であるかどうかを検討した。さらにカワヤツメ組織(脳、鰓、心臓、腸、肝臓、腎臓、生殖腺)を採取し、RNAを抽出した。逆転写反応によりcDNAを得て、PCR法によりカルシトニン受容体 mRNA の組織発現分布を検討した。

2) 海水移行による血中ヤツメウナギカルシトニン濃度の測定とカルシトニン受容体の発現変動の解析

淡水に馴致したカワヤツメを、1/3 海水に移行し、24 時間後に採血、血漿中のカルシウム濃度を測定すると共に、ELISA 法により血漿カルシトニン濃度を測定した。

さらに上記の条件で、浸透圧調節やイオン調節に重要な役割を持つ鰓と腎臓を採取し、RNAを抽出、cDNAを逆転写し、定量PCRにより受容体遺伝子の変動を測定した。

3) スタニオカルシンの同定

カワヤツメゲノムデータベースから、ギンザケスタニオカルシンを問いかけ配列にして、相同性検索した。抽出した候補遺伝子の推定タンパクを用いた分子系統解析を行い、スタニオカルシンであるか否かを検討した。また配列解析で、スタニオカルシンに特徴的な配列の有無を確認した。

4. 研究成果

1) カルシトニン受容体の同定と発現解析

カワヤツメゲノムデータベースを用いた相同性検索の結果、カルシトニン受容体候補を2つ同定した。分子系統解析により、2つのヤツメウナギカルシトニン受容体(カルシトニン受容体1と2)は、顎口類におけるカルシトニン受容体とカルシトニン受容体様受容体(カルシトニン受容体のパラログ遺伝子)両方の祖先的な遺伝子であることが明らかになった。一方、カワヤツメ組織(脳、鰓、心臓、腸、肝臓、腎臓、生殖腺)におけるカルシトニン受容体の発現解析の結果、カルシトニン受容体が全ての組織で発現していることを確認した。

2) 海水移行による血中ヤツメウナギカルシトニン濃度の測定とカルシトニン受容体の発現変動の解析

1/3 海水移行後に、カルシウム濃度を測定した結果、有意な血中カルシウム濃度の上昇が認められた。さらにこの条件下で、血中カルシトニン濃度の有意な上昇も認められた。一方、受容体遺伝子については、カルシトニン受容体1が鰓で有意に上昇することが明らかにされた。

3) スタニオカルシンの同定

スタニオカルシンをカワヤツメゲノムより同定した。顎口類のスタニオカルシン遺伝子は、2種類存在しており、お互いにパラログな関係を持つ。分子系統解析の結果、カワヤツメスタニオカルシン遺伝子は、タイプ1のグループに属することが明らかになった。また配列比較の結果、ヤツメウナギスタニオカルシンは、分子内でS-S結合を形成する10個のシステイン残基とともに、分子間でホモダイマーを形成するために必要なシステイン残基を1つ持っていた。これらは顎口類のスタニオカルシン1同様、顎口類タイプ1タンパク質で保存されている特徴であり、このことからヤツメウナ

ギのスタニオカルシンがタイプ1であることが強く示唆される。

以上のことから、

カルシトニンが血中カルシウム濃度の上昇に伴い分泌されること、受容体も同じく発現上昇することが明らかになった。このことは、カルシトニンが血中カルシウム調節に関与していることを示唆している。

さらにヤツメウナギで初めて、スタニオカルシンの遺伝子を同定した。円口類では既に我々のグループがヌタウナギ、*Eptatretus burgeri* においてスタニオカルシンを同定している。分子系統解析により、このスタニオカルシンは、タイプ2に属することが明らかになった。このことから、円口類の共通祖先の段階で、スタニオカルシンが既に2種類存在し、ヤツメウナギはタイプ2をヌタウナギはタイプ1を失った可能性がある。今後は、今回解析した以外の種のヤツメウナギやヌタウナギからもスタニオカルシンを同定し検証する必要がある。

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 17 件)

1. **Sekiguchi, T.**, Shiraishi, A., Satake, H., Kuwasako, K., Takahashi, H., Sato, M., Urata, M., Wada, S., Endo, M., Ikari, T., Hattori, A., Srivastav, A.K. and **Suzuki, N.**: Calcitonin-typical suppression of osteoclastic activity by amphioxus calcitonin superfamily peptides and insights into the evolutionary conservation and diversity of their structures. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 246: 294-299 (2017). 査読有
2. **Sekiguchi, T.**, **Kuraku, S.**, Tatsumi, K., Shimasaki, Y., Oshima, Y. and **Suzuki, N.**: Identification and molecular characterization of the stanniocalcin family gene from the inshore hagfish, *Eptatretus burgeri*. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 62: 93-98 (2017). (筆頭著者兼責任著者)
3. Kuwasako, K., Kitamura, K., Nagata, S., **Sekiguchi, T.**, Danfeng, J., Murakami, M., Hattori, Y., Kato, J.: β -arrestins negatively control human adrenomedullin type 1-receptor internalization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487:438-443 (2017). 査読有
4. Sato, M., Yachiguchi, K., Motohashi, K., Yaguchi, Y., Tabuchi, Y., Kitani, Y., Ikari, T., Ogiso, S., **Sekiguchi, T.**, Hai, T.N., Huong, D.T.T., Hoang, N.V., Mishima, H., **Hattori, A.** and **Suzuki, N.**: Sodium fluoride influences calcium metabolism resulting from the suppression of osteoclasts in the scales of nibbler fish, *Girella punctata*. *Fisheries Sci.*, 83:543-550 (2017). 査読有
5. Kase, Y., Ogiso, S., Ikari, T., **Sekiguchi, T.**, Sasayama, Y., Kitani, Y., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Kambegawa, A., Tabuchi, Y., **Hattori, A.**, and **Suzuki, N.**: Immunoreactive calcitonin cells in the nervous system of polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 62: 381-385 (2017).
6. Kase, Y., Ikari, T., **Sekiguchi, T.**, Sato, M., Ogiso, S., Kawada, T., Matsubara, S., Satake, H., Sasayama, Y., Endo, M., Kitamura, K., **Hattori, A.**, Watanabe, T.X., Maruyama, Y., Watanabe, Y., Funahashi, H., Kambegawa, A., and **Suzuki, N.**: Sardine procalcitonin amino-terminal cleavage peptide has a different action from calcitonin and promotes osteoblastic activity in the scales of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 211: 77-83 (2017). 査読有
7. Imamichi, Y., **Sekiguchi, T.**, Kitano, T., Kajitani, T., Okada, R., Inaoka, Y., Miyamoto, K., Uwada, J., Islam Khan, M.R., Islam, M.T., Yuhki, K., Kashiwagi, H., Ushikubi, F., **Suzuki, N.**, Taniguchi, T., and Yazawa, T.: Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary. *Sci. Rep.*, 7: 8374 (2017). 査読有
8. **Suzuki, N.**, Nakano, J., Kawabe, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Tang, N., **Sekiguchi, T.**, Tabuchi, Y., Ikegame, M.,

- Shimizu, N., Mishima, H., **Hattori, A.**, Srivastav, A.K. and Kitani, Y.: Benz[*a*]anthracene decreases plasma calcium levels resulting from influence of scale osteoclastic and osteoblastic activities in goldfish. *Int. J. Zool. Inv.*, 3: 72-81 (2017). 査読有
9. Hanmoto, T., Tabuchi, Y., Ikegame, M., Kondo, T., Kitamura, K., Endo, M., Kobayashi, I., Mishima, H., **Sekiguchi, T.**, Urata, M., Seki, A., Yano, S., **Hattori, A.**, and **Suzuki, N.**: Effects of low-intensity pulsed ultrasound on osteoclasts: analysis with goldfish scales as a model of bone. *Biomed. Res.*, 38: 71-77 (2017). 査読有
10. Qiu, X., Undap, S.L., Honda, M., **Sekiguchi, T.**, **Suzuki, N.**, Shimasaki, Y., Ando, H., Sato-Okoshi, W., Wada, T., Sunobe, T., Takeda, S., Munehara, H., Yokoyama H., Momoshima, N. and Oshima, Y.: Pollution of radiocesium and radiosilver in wharf roach (*Ligia sp.*) by the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. *J. Radioanal Nucl. Chem.*, 311: 121-126 (2017). 査読有
11. **Sekiguchi, T.**, Kuwasako, K., Ogasawara, M., Takahashi, H., Matsubara, S., Osugi, T., Muramatsu, I., Sasayama, Y., **Suzuki, N.**, and Satake, H.: Evidence for conservation of the calcitonin superfamily and activity-regulating mechanisms in the basal chordate *Branchiostoma floridae*: insight into the molecular and functional evolution in chordates. *J. Biol. Chem.*, 291: 2345-2356 (2016). 査読有(筆頭著者兼責任著者)
12. Sato, M., Hanmoto, T., Yachiguchi, K., Tabuchi, Y., Kondo, T., Endo, M., Kitani, Y., **Sekiguchi, T.**, Urata, M., Hai, T.N., Srivastav, A.K., Mishima, H., **Hattori, A.** and **Suzuki, N.**: Sodium fluoride induces hypercalcemia resulting from the upregulation of both osteoblastic and osteoclastic activities in goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 189: 54-60 (2016). 査読有
13. **Suzuki, N.**, Sato, M., Nassar, F. H., Abdel-gawad, F. Kh., Bassem, S.M., Yachiguchi, K., Tabuchi, Y., Endo, M., **Sekiguchi, T.**, Urata, M., **Hattori, A.**, Mishima, H., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Hong, C.-S., Makino, F., Tang, N., Toriba, A. and Hayakawa, K.: Seawater polluted with highly concentrated polycyclic aromatic hydrocarbons suppresses osteoblastic activity in the scales of goldfish, *Carassius auratus*. *Zool. Sci.*, 33: 407-413 (2016). 査読有
14. **Suzuki, N.**, Hanmoto, T., Yano, S., Furusawa, Y., Ikegame, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kitamura, K., Endo, M., Yamamoto, T., **Sekiguchi, T.**, Urata, M., Mikuni-Takagaki, Y. and **Hattori, A.**: Low-intensity pulsed ultrasound induces apoptosis in osteoclasts: Fish scales are a suitable model for analysis of bone metabolism by ultrasound. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 195: 26-31 (2016). 査読有
15. Kuwasako, K., **Sekiguchi, T.**, Nagata, S., Jiang, D., Hayashi, H., Murakami, M., Hattori, Y., Kitamura, K. and Kato, J.: Inhibitory effects of two G protein-coupled receptor kinases on the cell surface expression and signaling of the human adrenomedullin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 470: 894-899 (2016). 査読有
16. **Suzuki, N.**, Ogiso, S., Yachiguchi, K., Kawabe, K., Makino, F., Toriba, A., Kiyomoto, M., **Sekiguchi, T.**, Tabuchi, Y., Kondo, T., Kitamura, K., Hong, C.-S., Srivastav, A.K., Oshima, Y., Hattori, A., Hayakawa, K.: Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons influence spicule formation in the early development of sea urchins (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 171: 55-60 (2015). 査読有

17. **Suzuki, N.**, Somei, M., Seki, A., **Sekiguchi, T.**, Tabuchi, Y., Mishima, H., Kase, Y., Kaminishi, A., Yachiguchi, K., Kitamura, K., Oshima, Y., Hayakawa, K., Yano, S. and **Hattori, A.**: Novel tryptophan derivatives as potentially effective therapeutic drugs to treat bone diseases. *Am. J. Life Sci.*, 3: 31-38 (2015). 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. **Sekiguchi, T.**: Evolution of calcitonin gene-related peptide family from invertebrate to vertebrates. Biological Science seminars, The University of Auckland, Auckland, New Zealand (2018.2.26) 招待講演
2. **Sekiguchi, T.**: Ecotoxicological analysis of the influence of marine pollutants on marine animals. 3rd International Symposium “International Collaboration Research Base for Reaction of Atmosphere-Marine-Ecosystem Caused by Aerosol”, Hotel Noto Kinpura, Ishikawa, Japan (2017.10.10) 招待講演
3. 関口俊男・半本泰三・谷口詩穂・谷内口孝治・鈴木信雄, 円口類カワヤツメ (*Lethenteron japonicum*) におけるカルシトニンの分子構造解析. 日本動物学会第 88 回富山大会, 富山県民会館, 富山県 (2017.9.21-23) .
4. **Sekiguchi, T.**: Influence of polycyclic aromatic hydrocarbons on the early development of sea urchins (*Hemicentrotus pulcherrimus*). Joint International Symposium Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Ishikawa, Japan, (2017.2.28-3.3) 招待講演
5. **Sekiguchi, T.**: Evolutionary aspect of calcium homeostasis in cyclostomes. The 22nd International Congress of Zoology, Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan, (2016.11.18) 招待講演

6. 関口俊男・半本泰三・谷口詩穂・谷内口孝治・鈴木信雄, 円口類カワヤツメにおけるカルシトニン及びカルシトニン受容体の分子構造解析. 平成 28 年度動物学会中部支部大会, 静岡大学, 静岡県 (2016. 9.10-11).

[図書] (計 2 件)

1. 鈴木信雄, 関口俊男, 服部淳彦, 2016, 第 9 章血液中のカルシウムを調節するしくみ, 「ホメオスタシスと適応」, 裳華房, 東京, pp139-157
2. **Suzuki, N.**, Ikari, T., Sato, M., Toriba, A., **Sekiguchi, T.**, Kitani, Y., Ogiso, S., Yachiguchi, K., **Hattori, A.**, Oshima, Y. and Hayakawa, K., 2018, Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and marine invertebrates. In “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Environmental Behavior and Toxicity in East Asia” Ed. By K. Hayakawa, Springer, Heidelberg, Germany, 245-259.

[産業財産権]

出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関口俊男 (Sekiguchi Toshio)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・
助教
研究者番号: 40378568

(2) 研究分担者

鈴木信雄 (Suzuki Nobuo)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・
教授
研究者番号: 60242476

研究分担者

服部淳彦 (Hattori Atsuhiko)
東京医科歯科大学・教養部・教授
研究者番号: 70183910

(3) 連携研究者

工樂樹洋 (Kuraku Shigehiro)
国立研究開発法人理化学研究所・ライフ
サイエンス技術基盤研究センター・ユニット
リーダー
研究者番号: 40391940

(4) 研究協力者

()