

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770069

研究課題名（和文） ペプチド受容体—受容体修飾蛋白の共進化機構解明：ナメクジウオカルシトニンの研究

 研究課題名（英文） Study of calcitonin (CT) family in an amphioxus, *Branchiostoma floridae*: Coevolution among CT peptide, CT receptor, and receptor activity-modifying protein.

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：40379568

## 研究成果の概要（和文）：

脊椎動物に近縁なナメクジウオを用い脊椎動物 Calcitonin (CT) family の多様化の起源を研究した。まず CT、CT 受容体 (CTR)、受容体修飾蛋白 (RAMP) を同定し、それぞれ脊椎動物と相同であることを確認した。さらに CTR と RAMP の細胞株発現系による解析の結果、CT ペプチドのリガンド活性には、CTR と RAMP の共発現が必要であること、RAMP には、CTR を細胞膜に移行する活性があることを明らかにした。このことから、脊椎動物とナメクジウオの共通祖先において、CT ペプチド、CTR、RAMP が既に存在していることを示した。

## 研究成果の概要（英文）：

Calcitonin (CT) family shows high molecular and functional diversification in vertebrates. To elucidate the origin of CT family, CT peptide, CT receptor (CTR), and receptor activity-modifying protein (RAMP) were identified from an amphioxus, *Branchiostoma floridae*, which is close animal of vertebrates. Furthermore, analysis of CTR and RAMP expressed in mammalian cell line demonstrated that co-expression of CTR and RAMP is required for ligand activity of CT peptide, and that RAMP is necessary for cell-surface translocation of CTR. These results let us conclusion that CT peptide, CTR, and RAMP have already existed in the common ancestor between vertebrates and amphioxus.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：比較内分泌学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：Calcitonin、Calcitonin receptor、RAMP、ナメクジウオ

## 1. 研究開始当初の背景

Calcitonin (CT) ファミリーは、脊椎動物において、神経・内分泌・循環器系に関わる多

様な機能を持ったペプチドファミリーである。その機能の多様化は、受容体(CTR) 及びそれを調整する受容体修飾蛋白(Receptor

Activity-Modifying Protein, RAMP)が、それぞれ複数のファミリーを持ち、多様な組み合わせを形成することで成立している。

原索動物は、ホヤ及びナメクジウオを含む動物群である。そして原索動物は、脊椎動物に近縁な無脊椎動物であり、これまで無脊椎動物から脊椎動物への進化を研究するモデルとして利用されていた。このような背景から、脊椎動物 CT ファミリーの起源を研究する上でも原索動物が有効だと予想された。さらに、私の先行研究より、ホヤ（ナメクジウオよりも脊椎動物に近縁だと考えられている原索動物）において、CT 様ペプチドを無脊椎動物で始めて同定し、原索動物においても CT ファミリーが存在することをつきとめている。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、CT family ペプチドに加え CTR や RAMP の共進化を理解する最適なモデルとして、原始的な原索動物であるフロリダナメクジウオを用い、1)脊椎動物 CT family ペプチドの多様化機構、2)CTR 及び RAMP の分子機能について起源を明らかにすることで、ペプチド-受容体-修飾蛋白の共進化機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 相同性検索による CT family の同定と単離

フロリダナメクジウオゲノム情報から、フグとヒトの CT、CTR、RAMP を問いかけ配列として、相同性検索を行った。さらに、同定された配列情報をもとに、ナメクジウオ成体の cDNA から、CT、CTR、RAMP を単離した。

### (1) CT ペプチドの局在解析

*In situ* hybridization 解析により、CT ペプチド mRNA がナメクジウオの組織の細胞で発現しているのかを検討した。

### (3) CTR と RAMP に対する CT ペプチドのリガンド活性の測定

哺乳類細胞株 COS7 細胞に CTR と RAMP を発現させた。この発現体に合成 CT ペプチドを添加し、受容体活性の指標として、セカンドメッセンジャーである cAMP の細胞内における蓄積を測定した。

### (4) RAMP の細胞膜移行活性測定

ナメクジウオの CTR を単独で発現させた細胞は、CT ペプチドと反応しなかった。この原

因が、細胞膜に存在している CTR が CT ペプチドと結合しないためなのか、そもそも CTR が細胞膜に発現しないためなのかを検討するために、CTR の細胞外領域にタグを付けたベクターを COS7 細胞に導入した。CTR とタグの融合蛋白が発現した COS7 細胞を集め、蛍光抗体で染色した。この際、界面活性剤を用いないことで、抗体は細胞外に出現したタグとしか結合できない。この細胞外のタグを認識した蛍光シグナルを FACS により検出した。

## 4. 研究成果

(1) 相同性による CT family の検索及び、遺伝子の単離の結果、3種類のCT、1種類のCTR、4種類の RAMP を単離し、塩基配列を解読することができた。さらに、これらの配列を脊椎動物の CT family と比較し、系統解析を行った結果、いずれも**脊椎動物の CT ファミリーと近縁であり、脊椎動物と原索動物の共通祖先に CT ファミリーが存在していることが示唆された**。また、CT 遺伝子の染色体上の配置を、ゲノムブラウザーの情報より検討した結果、3つのCTペプチド遺伝子がタンデムに並んでいることをつきとめ、もともと1つの遺伝子が遺伝子重複により3つに増えたことが示唆された。

(2) CT ペプチドの局在解析の結果、3つのCT全てが、ナメクジウオ脳胞の異なる領域に局在することを明らかにした。さらに、CTのタイプ2遺伝子は、消化管の中間部分の細胞に発現が認められた。一方タイプ3のCT遺伝子は、消化管の後方部分に発現が検出された。このように**ナメクジウオのCTペプチド遺伝子は、中枢神経及び消化管で発現することを明らかにした**。

(3) CT ペプチドの CTR と RAMP に対するリガンド活性測定の結果、CTR と RAMP が共発現している細胞で、合成 CT ペプチド濃度依存的な cAMP 濃度の上昇が認められた。さらに**CTR 単独では、CT ペプチドとの反応が認められないことが明らかになった**。

(4) RAMP の細胞膜移行活性測定の結果、CTR 単独を発現させた細胞では、蛍光が検出されず、CTR と RAMP を共発現させることによって、蛍光が認められた。このことから、**ナメクジウオ CTR の細胞膜移行には、RAMP が必要であることを明らかにした**。

以上のことから、脊椎動物と原索動物の共通祖先で、CT ファミリーペプチド、CTR、RAMP が既に存在していることをつきとめた (図 1)。

脊椎動物では、CTR が二つに重複し、RAMP を増やすことで、CT ペプチドの多様化を可能にしたと考えられる(図 1)。そしてこのような、遺伝子の多様化は、脊椎動物の複雑な内分泌

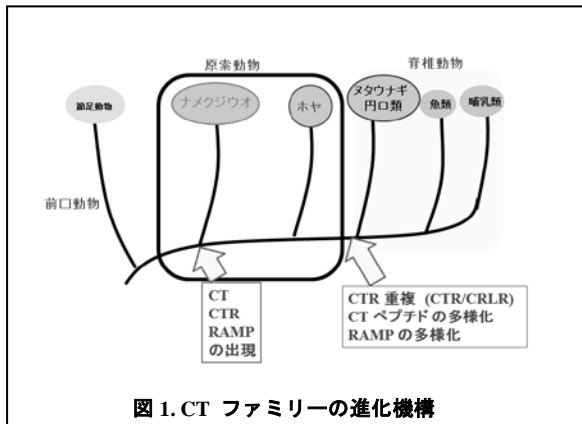


図 1. CT ファミリーの進化機構

系の成立に寄与していると考えられる。

上記の研究については、現在投稿準備中である。

今後は、原索動物における CT ファミリーの生理的な役割を研究し、無脊椎動物から脊椎動物への CT ファミリーの進化を生理機能レベル示すことを目標とする。一方、CT ファミリーの分子進化については、最も原始的な脊椎動物の 1 つであるヌタウナギを用い、脊椎動物での CT ファミリーの多様化機構についてのさらなる研究を行う予定である。

##### 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 10 件)

- (1) Sekiguchi, T. (18名中6番目) : Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales. *Zool Sci.*, 30: 217-223(2013)査読有り
- (2) Sekiguchi, T. (他 2 名): Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, *Ciona intestinalis*: the evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family. *J. Endocrinol.*, 213: 99-106. (2012)査読あり
- (3) Suzuki, N., Sekiguchi, T. (他 18 名) : Cloning of two members of the calcitonin-family receptors from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in

osmoregulation. *Gene*, 499: 326-331

(2012)査読あり

- (4) Sekiguchi, T. (17 名中 6 番目) : Determination of calcium sensing receptor in the scales of goldfish and induction of its mRNA expression by acceleration loading. *Biol. Sci. Space*, 26: 26-31 (2012) 査読あり

- (5) Satake, H., Aoyama, M., Sekiguchi, T., Kawada, T. Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein Pept. Lett.*, 23 (2012)査読あり

- (6) Satake, H., Sekiguchi, T.: Toll-like receptors of deuterostome invertebrates. *Front Immunol.*, 3:34 (2012)査読有り

- (7) Kawada, T., Ogasawara, M., Sekiguchi, T. (他 4 名): Peptidomic analysis of the central nervous system of the protochordate, *Ciona intestinalis*: homologs and prototypes of vertebrate peptides and novel peptides. *Endocrinology*, 152: 2416-2427 (2011) 査読あり

- (8) Sekiguchi, T. (23 名中 16 番目) : Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Env. Sci. Poll. Res.*, in press 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 関口俊男, 高橋弘樹, 小笠原道生, 桑迫健二, 笹山雄一, 佐竹炎, 鈴木信雄: 脊索動物における Calcitonin (CT) /CT gene-related peptide family の分子進化. ポスター発表, 第 37 回日本比較内分泌学会大会, 福井大学, 福井県 (2012,12/1)
- (2) 関口俊男: 原索動物をモデルとしたペプチド・ホルモン研究. 招待講演, 第 37 回日本比較内分泌学会サテライト企画 第 3 回ペプチド・ホルモン研究会, 福井大学, 福井県 (2012, 11/29)

- (3) **関口俊男**、高橋弘樹、小笠原道生、鈴木信雄、笹山雄一、佐竹炎:脊索動物における Calcitonin/CGRP family の起源及び多様化機構の解析. ポスター発表, 第 36 回比較内分泌学会, 都道府県会館, 東京都 (2011, 11/23, 24)
- (4) **関口俊男**、佐々木尚子、楠本正一、佐竹炎: カタユウレイボヤ Toll-like receptor リガンドにより誘起される生体防御機構の解析. ポスター発表, 第 82 回日本動物学会, 旭川、大雪アリーナ, 北海道 (2011,9/21)
- (5) **関口俊男**、高橋弘樹、小笠原道生、桑迫健二、鈴木信雄、笹山雄一、佐竹炎: ナメクジウオにおけるカルシトニン受容体と受容体共役蛋白 (RAMP) の分子機能. 口頭発表, 日本動物学会第 83 回大会, 大阪大学, 大阪府 (2012, 9/13)

## 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

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし