

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15688

研究課題名(和文)カルシトニン中枢神経ホルモンとして出現したか

研究課題名(英文)Did calcitonine appear as a central nerve hormone?

研究代表者

宇田川 信之(Udagawa, Nobuyuki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70245801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の成果として、*in vitro*でのカルシトニン作用とペプチド構造の相関、さらに生物種の進化におけるカルシトニンペプチドの位置づけを明らかにした。すなわち、カモノハシとオポッサムのカルシトニンは、哺乳類であるヒトのカルシトニンよりも、魚類のサケのカルシトニンと同様の強い活性を持つことが、カルシトニンペプチドのアルファヘリックスの含有率に相関していた。また、生物進化の上では哺乳類に属しているにもかかわらず、カルシトニンペプチドの分子進化は、ヒトやブタなどの哺乳類型よりも、むしろサケ型に分類された。

研究成果の概要(英文)：Calcitonin peptides of non-mammalian species exhibit stronger activity than those of mammals. We herein determined whether platypus and opossum calcitonins exhibit similar biological activities to those of non-mammalian calcitonins using an assay of actin ring formation in mouse osteoclasts. Consistent with the strong similarities in their primary amino acid sequences, platypus and opossum calcitonins disrupted actin rings with similar efficacies to that of salmon calcitonin. Human calcitonin exhibited the weakest inhibitory potency and required a 100-fold higher concentration than that of salmon calcitonin. Platypus and opossum calcitonins also induced cAMP production in osteoclast cultures with the same efficacies as that of salmon calcitonin. These results suggest that platypus and opossum calcitonins are classified into the salmon-type group, in terms of the biological activities and amino acid sequences.

研究分野：口腔生化学

キーワード：カルシトニン 破骨細胞 骨吸収 カモノハシ オポッサム

1. 研究開始当初の背景

カルシトニン(CT)は哺乳類では甲状腺から、鳥類と魚類では鰹後腺から分泌される。鰹後腺由来カルシトニンの活性は、甲状腺由来のそれよりも100倍ほど高いが、その生理的意義は不明である。カモノハシは卵を産み孵化させて飼育する卵生哺乳類である。最近、カモノハシのゲノム解析が終了し、カモノハシカルシトニンのアミノ酸配列が明らかとなった。哺乳類であるにもかかわらず、鰹後腺由来カルシトニンと同等の高い活性を有する可能性が示唆された。

生殖および分泌器官

	卵生/胎生	分泌器官	生物種	活性(U/mg)
哺乳類	胎生	甲状腺	ヒト	70
	胎生	甲状腺	ウシ	60
	胎生	甲状腺	ブタ	120
	胎生 (有袋類)	甲状腺	オポッサム	?
	卵生	甲状腺? 鰹後腺?	カモノハシ	?
魚類・鳥類	卵生	鰹後腺	サケ	2,700
	卵生	鰹後腺	ウナギ	4,000
	卵生	鰹後腺	ニワトリ	4,500

2. 研究の目的

カモノハシおよびオポッサムのカルシトニンの生物活性を破骨細胞のアクチンリング形成アッセイ系で測定し、ヒト(哺乳類)およびサケ(魚類)のと比較により活性の強さを決定する。また、卵生発育を調節する中枢性ホルモンの可能性を検討するため、他の有袋類や卵生哺乳類との分子系統解析に基づきホルモンの発生の位置づけを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) カモノハシおよびオポッサムのカルシトニンの生物活性の測定

カルシトニンは破骨細胞のアクチンリング(明帯形成)を速やかに破壊することが知られている。マウス初代培養骨芽細胞とマウス骨髓細胞の共培養に活性型ビタミンDおよびPGE2を添加して、多核の破骨細胞を分化誘導した。この破骨細胞を単離し播種しなおした培養に、用量を振った各動物種の合成カルシトニンを添加して、30分後のアクチンリングの破壊率を測定した。

(2) カモノハシおよびオポッサムのカルシトニンの細胞内シグナルの活性化の測定

カルシトニンは破骨細胞の細胞表面のカルシトニン受容体に結合した後、Gたんぱく質を介した細胞内シグナルを活性化させる。アクチンリングの破壊に関しては、カルシトニン受容体によるサイクリックAMPの産生亢進が必要である。そこで、上述の単離破骨細胞を用いた培養に、用量を振った各動物種の合成カルシトニンを添加して10分後の細胞内サイクリックAMPの産生量を、ELISA法を用いて測定した。

細胞を用いた培養に、用量を振った各動物種の合成カルシトニンを添加して10分後の細胞内サイクリックAMPの産生量を、ELISA法を用いて測定した。

(3) カルシトニンの構造活性相関の解析

カルシトニンのペプチド断片のエクス線解析やNMR解析から、カルシトニンは溶液中でヘリックス構造をとることが報告されている。それぞれの生物種のカルシトニンを円二色性偏向分散計で解析した。また、アミノ酸一次配列から予想される疎水性・親水性の立体構造に関して解析した。

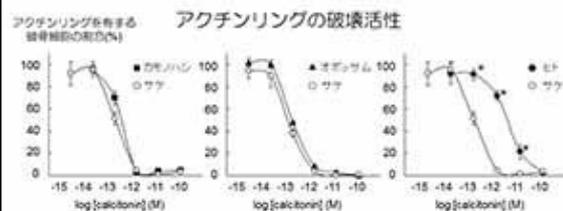
(4) 分子系統樹解析によるカルシトニンの生物進化における分類の試み

近年様々な生物種のゲノム解析プロジェクトの進展により、カモノハシやオポッサムの仲間の遺伝子配列が明らかとなってきている。これらのアミノ酸配列を公共データベースから抽出し整形し、MEGA7(配列アラインメント作成および系統樹作成・数理的比較解析ソフト)を用いて、分子系統樹の作成とそれぞれのカルシトニンの分子進化の距離を多数回シミュレーションにより解析した。

4. 研究成果

(1) カルシトニンの生物活性の測定

サケカルシトニンを基準にカモノハシ・オポッサム・ヒトそれぞれのカルシトニンのアクチンリング破壊活性を測定比較した。その結果、カモノハシおよびオポッサムカルシトニンはサケカルシトニンと同等の強いアクチンリング破壊活性を示した。(下図参照)

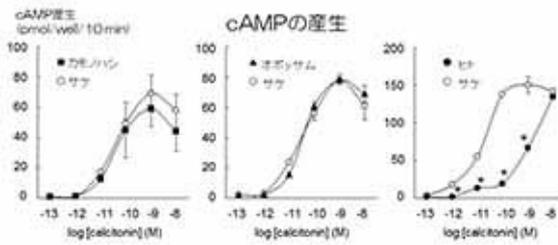


一方、これまでの報告の通り、ヒトカルシトニンはアクチンリングの破壊に対してサケカルシトニンの約100倍高い濃度を必要とした。以上の結果から、アクチンリング破壊によるカルシトニンの生物活性は、サケ=カモノハシ=オポッサム>ヒトであることが判明した。

(2) 細胞内シグナルの活性化の測定

サケカルシトニンを基準にカモノハシ・オポッサム・ヒトそれぞれのカルシトニンのサイクリックAMPを測定比較した。その結果、カモノハシおよびオポッサムカルシトニンはサケカルシトニンと同等の強いサイクリ

ック AMP 産生能を示した。(下図参照)



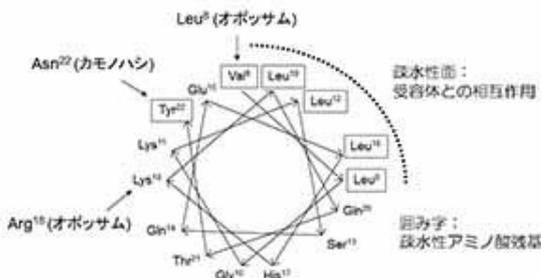
一方、これまでの報告の通り、ヒトカルシトニンでは破骨細胞に対するサイクリック AMP 産生誘導に関してサケカルシトニンの約 100 倍高い濃度を必要とした。以上の結果から、カルシトニンによる破骨細胞内のサイクリック AMP 産生誘導能は、サケ=カモノハシ=オポッサム>ヒトであることが判明した。

(3) 構造活性相関の解析

カモノハシ・オポッサム・サケ・ヒトそれぞれのカルシトニンを溶液状態で円二色性偏向分散計を用いてヘリックスおよびシートの割合を解析した。200nm から 250nm で楕円性の測定結果、いずれのカルシトニンも 209nm および 220nm において顕著な負のピークが見られた。このことより、ヘリックスが存在することが示唆された。また、その強度からヘリックスの存在割合を予測すると、カモノハシとオポッサムのカルシトニンはサケ(47%)に近い値(50%および36%)をとることが分かった。一方、ヒトカルシトニンは15%と低い値であった。これらの結果から、カモノハシやオポッサムのカルシトニンはサケカルシトニンと同程度の割合でヘリックスを含んでいることが示唆された。

カルシトニンのアミノ酸一次配列から予想されるヘリックスについて、8番目から22番目までのアミノ酸残基をサケカルシトニンを元に平面に投影した図を作成した。(下図参照)

サケCTのαヘリックス領域のアミノ酸配列との比較

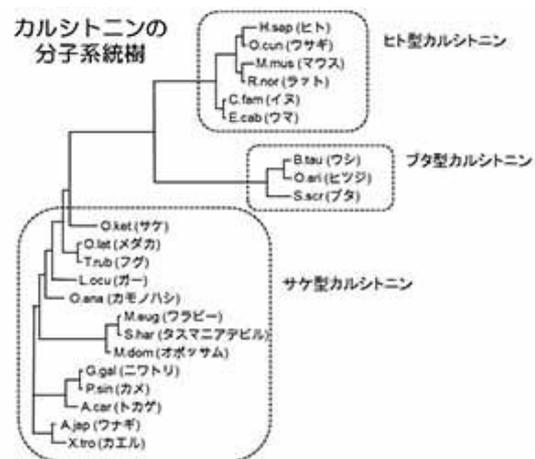


図の右上半分の点線で示した面は、Leu を主とする疎水性アミノ酸残基が集まっている

ことから疎水性が強い領域であることが分かった。さらにカモノハシの8番目のアミノ酸残基サケと異なるものの性質は疎水性である。一方、オポッサムの18番目やカモノハシの22番目の変異は、この疎水性領域に含まれないことが分かった。ヒトカルシトニンはこの領域のアミノ酸の相同性が非常に低く、疎水性が弱いことがわかっている。これらの結果から、カモノハシやオポッサムのカルシトニンはサケカルシトニンと同様に、ヘリックスを多く含んでおり、その表面にはカルシトニン受容体との結合に必要と考えられる疎水性面が存在することが明らかとなった。

(4) 分子系統所解析

ゲノム解析完了している生物種の公共データベースからカルシトニン遺伝子を抽出しカルシトニン前駆体ペプチドに翻訳した後、カルシトニン配列を整形して、MEGA7で解析した。作成した分子系統樹を下記に示す。



驚いたことに、オポッサムと同じ有袋類であるワラビーやタスマニアデビルのカルシトニンはオポッサムとともに、哺乳類であるヒト型やバタ型ではなく、サケ型に分類されることが明らかとなった。また、カモノハシのカルシトニンもサケ型に分類された。他の多くの遺伝子の解析から、カモノハシやオポッサムは哺乳類の所属する系統に含まれることが分かっている。この解析結果から、カルシトニンは進化の過程で、哺乳類が分枝する以前の遺伝子を維持していることが強く示唆された。

以上の研究成果から、カモノハシやオポッサムなど進化的に分枝したばかりの哺乳類のカルシトニンは、サケと同様に強い生物学的活性を持ち、そのペプチドの構造の類似性や分子系統樹からも、非哺乳類型であることが明らかとなった。この強い活性は、有袋類全般にも共通することが示唆される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Yamashita T, Udagawa N, Thirukonda GJ, Uehara S, Yamauchi H, Suzuki N, Li F, Kobayashi Y, Takahashi N: Platypus and opossum calcitonins exhibit strong activities, even though they belong to mammals. Gen Comp Endocrinol 2017, Vol. 246, pp. 270-278, 2017, DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.01.001, 査読有

Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K, Udagawa N, Kobayashi Y: The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. J Bone Miner Metab Vol. 34, pp. 395-405, 2016, DOI: 10.1007/s00774-015-0683-1, 査読有

[学会発表](計2件)

山下照仁, 宇田川信之, 上原俊介, 山内広世, 鈴木信雄, 李峰, 小林泰浩, 高橋直之, 哺乳動物の中にも強いカルシトニン活性を持つ生物がいる, 第82回松本歯科大学学会総会 2016年7月9日 松本歯科大学(塩尻市)

山下照仁, 山内広世, 上原俊介, 高橋直之, 宇田川信之, カモノハシカルシトニンは哺乳類由来でも強力な作用を持つ, 第33回日本骨代謝学会学術集会 2015年7月23日 京王プラザホテル(新宿区)

[その他]

松本歯科大学総合歯科医学研究所ホームページ
http://www.mdu.ac.jp/laboratory/research_contents/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801

(2)研究分担者

山下 照仁 (YAMASHITA, Teruhito)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授
研究者番号: 90302893

小林 泰浩 (KOBAYASHI, Yasuhiro)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号: 20264252

上原 俊介 (UEHARA, Shunsuke)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 90434480

(3)研究協力者

山内 広世 (YAMAUCHI, Hirose)
岡部 幸司 (OKABE, Koji)
高橋 直之 (TAKAHASHI, Naoyuki)
Thirukonda GJ (THIRUKONDA, Gnanasagar)