

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07469

研究課題名(和文)ヌタウナギにおける脳下垂体-甲状腺系の分子機構および内分泌系遺伝子の包括的解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms underlying the pituitary-thyroid axis in the hagfish

研究代表者

鈴木 雅一 (Suzuki, Masakazu)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：60280913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNA-Seq解析等により得られた分子生物学的データに基づき、ヌタウナギにおける脳下垂体-甲状腺系(甲状腺ホルモンの合成・調節機構)の分子機構を推察した。まず、糖タンパク質ホルモンが下垂体から分泌され、甲状腺濾胞に発現する受容体に結合する。次に、濾胞細胞内で、Nkx2-1/4等の働きにより、甲状腺ホルモン合成関連遺伝子の発現が活性化する。HIPは甲状腺ホルモン合成の前駆体として機能し、甲状腺ペルオキシダーゼ等の働きにより、甲状腺ホルモンが合成される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、最も原始的な脊椎動物の一群である無顎類の中でも、甲状腺ホルモン前駆体として、ヤツメウナギ類から哺乳類へと引き継がれるサイログロブリンとヌタウナギに認められるヨウ素化タンパク質(HIP)が使用されていることが推察され、脊椎動物が進化する初期段階で少なくとも2種類の甲状腺ホルモン前駆体が選択された証拠の一端が得られた。また、本研究では、HIPを中心とした下垂体-甲状腺系の分子機構や無脊椎動物から脊椎動物に及ぶ下垂体-甲状腺/生殖腺系の進化様式のシナリオを推察したが、これらは脊椎動物の内分泌系の進化を理解する上で意義深く、比較内分泌学あるいは基礎内分泌学において重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we proposed a model for thyroid hormone synthesis and its regulatory mechanism in the hagfish. Initially, glycoprotein hormones are secreted from the pituitary, and bind to their receptors on the thyroid follicular epithelial cells. This binding enhances the gene expression of transcription factors, which increase the expression of a unique hagfish iodinated protein (HIP), thyroid peroxidase, etc. HIP works as a precursor to produce thyroid hormones. Thyroid peroxidase incorporates iodide into tyrosyl residues within HIP, and further catalyzes the oxidative coupling of iodotyrosines, followed by storage of the iodinated HIP in the colloid. Thyroid hormones are released after endocytosis of the colloid in time of need.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：下垂体 甲状腺 ホルモン合成 ヌタウナギ クロヌタウナギ 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺は正常な成長、成熟、基礎代謝等に不可欠な甲状腺ホルモンを産生する脊椎動物の内分泌器官である。哺乳類では、甲状腺ホルモンの合成経路が分子レベルで知られており、例えば、サイログロブリンはヨウ素と結合して甲状腺ホルモンの前駆体として機能する。通常、他の脊椎動物でも同様の分子機構により甲状腺ホルモンが合成されると考えられており、最も原始的な脊椎動物とされる円口類(無顎類)のヤツメウナギ類でもサイログロブリン等の分子が存在する。一方、同じ円口類に属するヌタウナギ類では、サイログロブリンとは異なる別のヨウ素化タンパク質(HIP)の存在が示唆されている(Ohmiya Y et al., Eur Biochem 182: 11-18, 1989)のみで、甲状腺ホルモンの合成に関係する他の分子の報告はない。現在でもHIPの実体は不明である。また、甲状腺ホルモンの合成・分泌の制御は、脳下垂体由来の糖タンパク質である甲状腺刺激ホルモン(TSH)により行なわれるとされる。脳下垂体では、通常、3種類の糖タンパク質ホルモン[TSHと生殖腺刺激ホルモン(卵胞刺激ホルモンと黄体形成ホルモン)]が合成されるが、ヌタウナギでは1種類のホルモンしか見出されていない。これまでのところ、このホルモンが生殖腺刺激ホルモンとして機能することが報告されている(Nozaki M & Sower SA, Hagfish Biology, pp. 227-256, 2016)が、TSHに関する報告はない。

2. 研究の目的

私達は、動物における多様な内分泌現象、ならびにその進化様式について分子・遺伝子レベルで解析し、体系化することを目指して研究を進めている。本研究では、最も原始的な脊椎動物の一群である無顎類・ヌタウナギにおける新規の甲状腺ホルモン合成機構、並びに下垂体-甲状腺系の分子機構を明らかにする。そして、これらの結果等を総合して、無脊椎動物から脊椎動物に及ぶ下垂体-甲状腺/生殖腺系の進化様式のシナリオを推察する。

3. 研究の方法

クロヌタウナギ(*Eptatretus atami*)については、長谷川久志氏ならびに長谷川一孝氏(静岡県焼津市)により焼津沖の駿河湾において水深300mから400mで採集され、その後、静岡大学農学部附属地域フィールド科学教育研究センター用宗フィールドにおいて飼育した個体を使用した。ヌタウナギ(*Eptatretus burgeri*)は、東京大学三崎臨海実験場により三浦半島沿岸で採集された個体、および島根大学隠岐臨海実験所により隠岐の島沿岸で採集された個体を用いた。ヌタウナギの下垂体は、山口陽子先生(島根大学)から提供して頂いた。クロヌタウナギの甲状腺組織から全RNAを抽出し、次世代シーケンサー(MiSeqシステム)を用いてトラスクリプトーム解析を行った。また、GenBank(NIH)等で公開されているDNA等の情報を用いてバイオインフォマティクス解析を行った。さらに、タンパク質のコード領域の全長が決定できない際には、cDNAクローニングを行った。甲状腺ホルモンの合成に関係した分子については、RT-PCRによりmRNAの組織分布を調べた。タンパク質レベルでの解析では、特異的な抗ペプチド抗体を作製して(蛋白精製工業)、免疫染色とウェスタンブロット解析を行った。HIPと甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)については、Rosetta-gami B(DE3)/pET32a vector系(Merck)を用いて、組換えタンパク質を合成した。

4. 研究成果

クロヌタウナギから甲状腺組織を摘出して、全RNAを抽出し、次世代シーケンサー(MiSeqシステム)を用いてトラスクリプトーム解析を行った。本解析により、甲状腺で発現する分子群およびそれらのmRNAの配列に関する膨大な情報が得られた。この情報を基に、甲状腺ホルモン前駆体候補分子を同定すると共に、甲状腺ホルモン合成に関与する候補分子のリストを作成した。さらに、いくつかの重要な分子については、RACE(Rapid amplifications of cDNA ends)法等により正確な配列を決定した。また、甲状腺ホルモンの合成に関連すると考えられる分子について、RT-PCR法により組織分布を解析した。甲状腺ホルモン前駆体候補分子であるHIPについては、甲状腺でのみ発現が検出された。

タンパク質レベルでの解析を行うために、HIP、TPO、デュアルオキシダーゼに関して、抗ペプチド抗体を外注して作製した。クロヌタウナギから甲状腺組織を摘出して、タンパク質を調製し、ウェスタンブロット解析を行った。甲状腺ホルモン前駆体候補タンパク質に関しては、理論上の分子質量は43.1kDaであったが、主要なバンドは89.0kDaと81.2kDaに検出された。TPOに関しては2種類得られていたが、分子系統解析により、一方がTPOであり、他方がペルオキシダシンであることが示唆された。理論上の分子質量は、TPOは81.6kDaで、ペルオキシダシンは100.1kDaであったが、双方を検出できる抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った結果では、主要なバンドは67.8kDa、45.8kDa、および27.2kDaに検出された。デュアルオキシダーゼに関しては、理論上の分子質量174.5kDaに近い位置に、主要なバンドが検出された。これらの結果から、HIPについては糖鎖が結合している可能性や2量体を形成している可能性が考えられ、TPOについては複数個所で切断されている可能性が考えられた。デュアルオキシダーゼについては、分子質量

にほぼ変化がないかたちで、合成されていると考えられる。

甲状腺に特異的に発現する HIP が、甲状腺ホルモン前駆体として機能することを証明するには、HIP と TP0 を *in vitro* で作用させ、甲状腺ホルモンが合成されることを示す必要がある。この実験を行うために、HIP と TP0 のタンパク質を大腸菌の発現ベクター系を利用して合成することを試みた。組換え HIP については、ウェスタンブロット解析したところ、想定される分子質量(61kDa)の約 2 倍の位置にバンドが検出され、2 量体を形成していると考えられた。TP0 は、多くが封入体を形成し不溶化したが、可溶画分においてもネイティブな位置にバンドが検出された。可溶化した TP0 画分は、取り込まれたヘムの色と考えられる赤褐色を呈し、連続スペクトルの測定では、結合したヘムに由来する 410nm 付近にピークが観察された。グアイアコールを基質とした活性試験では、微量ではあるが経時的に 470nm での吸収が増大した。以上の結果から、可溶化した組換え TP0 は正常にヘムと結合しており酵素活性をもつと考えられた。TP0 の His タグ精製の結果、微量の TP0 が精製され、グアイアコール活性を示した。しかしながら、タンパク質量が非常に少なかったため、ホルモン合成反応を行うには至らなかった。

甲状腺ホルモンの同定については、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いたアッセイ系の確立に取り組んだ。また、ヌタウナギの下垂体 - 甲状腺/生殖腺系の情報伝達機構に関しては、下垂体糖タンパク質ホルモンをゲノムデータ(Ensembl) から同定した。さらに、Trinity による *de novo* assembly により、ヌタウナギ精巢 SRA (NCBI: ERX2120221, ERX2120222) から糖タンパク質ホルモン受容体、クロヌタウナギ甲状腺における RNA-Seq データから別の受容体を同定した。そして、分子系統解析並びに RT-PCR による発現解析を行った。これらの結果から、ヌタウナギ類における、下垂体ホルモンと受容体との関係性、さらにはこれらの分子による生体調節機構について考察した。

HIP にヨウ素が結合しているか分析を進めた。HIP 特異的抗体を用いた、クロヌタウナギ甲状腺からの HIP の精製実験により、夾雑タンパク質が少ない精製 HIP 画分を得た。精製 HIP 画分に対する、HIP 特異的抗体と抗甲状腺ホルモン(L-サイロキシン)抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、両者において同様のバンドパターンが得られた。この結果は、HIP に甲状腺ホルモン前駆体構造が含まれていることを示唆しており、機能面からも HIP が甲状腺ホルモン前駆体タンパク質である可能性が高いと考えられる。しかしながら、精製 HIP に含有されるヨウ素の分析、並びに HIP のアクチナーゼ処理溶液に含まれる甲状腺ホルモンの分析においては、ポジティブなデータが得られなかったことから、HIP におけるヨウ素結合率および甲状腺ホルモン前駆体構造の含有率は低い可能性が推察された。また、脊椎動物におけるシンテニー解析の結果からも、ヌタウナギはサイログロブリン遺伝子を欠失しており、HIP 遺伝子を特異的に獲得したと考えられた。HIP 内のチロシン残基近傍には、サイログロブリンと同様に特定の酸性または塩基性アミノ酸残基が存在しており、甲状腺ホルモン合成時のチロシン残基の配向性に関与していると推察された。

本研究で得られた分子生物学的データに基づいて、ヌタウナギにおける下垂体 - 甲状腺系の分子機構について推察した。また、初期の脊椎動物における下垂体 - 甲状腺系の獲得と進化について考察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村松万里、小林哲也、内田勝久、安東宏徳、持田弘、岡田令子、鈴木雅一
2. 発表標題 ヌタウナギにおける2種類の下垂体糖タンパク質ホルモン受容体をコードする候補遺伝子の同定
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村松万里、鈴木雅一
2. 発表標題 軟骨魚類の下垂体糖タンパク質ホルモン遺伝子とその受容体遺伝子に関する研究
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村松万里、道羅英夫、伊藤彰将、河岸洋和、岡田令子、小林哲也、内田勝久、鈴木雅一
2. 発表標題 クロヌタウナギ甲状腺からのヨード化タンパク質の精製並びにその特性に関する分子生物学的解析
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村松万里、道羅英夫、伊藤彰将、河岸洋和、岡田令子、小林哲也、内田勝久、鈴木雅一
2. 発表標題 クロヌタウナギの甲状腺で発現するペルオキシダーゼに関する分子生物学的研究
3. 学会等名 令和3年度日本動物学会中部支部大会富山大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

令和3年度日本動物学会中部支部大会富山大会優秀発表賞 受賞
村松万里、道羅英夫、伊藤彰将、河岸洋和、岡田令子、小林哲也、内田勝久、鈴木雅一、クロヌタウナギの甲状腺で発現するペルオキシダーゼに関する分子生物学的研究、令和3年度日本動物学会中部支部大会富山大会、2021年12月、オンライン

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
研究協力者	小林 哲也 (Kobayashi Tetsuya) (00195794)	埼玉大学・大学院理工学研究科・教授 (12401)	
研究協力者	内田 勝久 (Uchida Katsuhisa) (50360508)	宮崎大学・農学部附属フィールド科学教育研究センター・教授 (17601)	

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
---------	---------