

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570075

研究課題名(和文) 鰓後腺と副甲状腺に特徴的な機能分子と内分泌腺の形成・進化に関する分子生物学的研究

研究課題名(英文) Functional molecules characteristic of the ultimobranchial gland and parathyroid gland

研究代表者

鈴木 雅一 (Masakazu, Suzuki)

静岡大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60280913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：鰓後腺：クラスタリン遺伝子変異メダカを3系統作出し、F5(mut/wt)および、F6(mut/wt)を飼育している。また、F5(mut/wt)同士を交配後、遺伝子型を解析して、F6のmut/mut個体およびwt/wt個体を選別して飼育することにより、研究基盤を整えた。

副甲状腺：両生類の副甲状腺に特徴的なmRNAをcDNAクローニングにより解析し、カルシウム感受性受容体およびGCMを同定した。副甲状腺特徴的な未知のPT1 cDNAには、コーディング領域がないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Ultimobranchial gland: Medaka (*Oryzias latipes*) mutants were generated by targeting induced lesions in genomes (Tilling), and 3 mutants were selected to analyze the function of clusterin. Background mutations were removed by backcrossing with d-rR WT medaka. Currently, F6 hetero-mutants are reared with F6 incrossed homo-mutants, providing a basis for the detailed phenotype analysis.

Parathyroid gland: By cDNA cloning, calcium-sensing receptor and GCM transcription factor were identified in the bullfrog parathyroid gland. Although novel PT1 cDNA was found to be expressed in the parathyroid gland, it had no coding region.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：鰓後腺 副甲状腺

1. 研究開始当初の背景

カルシウムイオンは細胞内情報伝達、骨や歯の形成など生命活動の様々な局面で重要な役割を担っている。甲状腺傍濾胞細胞(C細胞)や副甲状腺はカルシウム代謝に関わる内分泌腺である。C細胞から分泌されるカルシトニン血清カルシウム値の低下や骨量の増加などを引き起こすホルモンであり、副甲状腺ホルモンは、血清カルシウム値を上昇させるなどの生理機能を有する。そして、いずれのホルモンも治療薬として使用されている。

鰓後腺：哺乳類ではC細胞は甲状腺内に分散しているが、魚類など他の脊椎動物では鰓後腺を形成する。しかしながら、カルシトニン遺伝子が特定の内分泌細胞だけで著しく活性化される分子機構やカルシトニン細胞が形成される分子機構はほとんど知られていない。私は、分泌タンパク質・クラスタリンが魚類の鰓後腺で比較的多く発現していることを発見した(未発表)。この分子については、哺乳類では細胞の凝集、癌化など多様な機能が報告されているが、この分子の主たる機能は謎とされ、魚類に関してはゼブラフィッシュの脈絡叢に発現しているという報告はあるが、機能は不明なままである。

副甲状腺：副甲状腺ホルモンについても、ホルモン遺伝子が副甲状腺細胞だけで著しく活性化される分子機構や副甲状腺細胞が形成される分子機構について不明の点が多い。両生類の副甲状腺についても、細胞特徴的に発現する因子に関する知見がほとんどない。水生のアフリカツメガエルで、ゲノムデータを利用して副甲状腺ホルモンが初めて報告されたが、カルシウムを貯蔵する傍脊椎石灰嚢を持つ種では副甲状腺ホルモンさえも同定されていない。また、両生類では副甲状腺ホルモンの機能解析は明確にはなされていない。

2. 研究の目的

鰓後腺：鰓後腺におけるクラスタリンの機能を解析するため、逆遺伝学的アプローチの1つである TILLING(targetting induced lesion in genome)法により、クラスタリン遺伝子の変異個体を得、内分泌腺の形成や表現型に対する影響を解析するための基盤を整える。その際、遺伝子型決定に用いる High resolution melting curve analysis (HRM) 法より簡便なプロトコルを工夫する。さらに、鰓後腺に特徴的な転写因子 Nkx2-1 に関して、哺乳類の Nkx2-1 と同様にシスエレメントに結合できるか明らかにする。

副甲状腺：傍脊椎石灰嚢を持ち、カルシウム代謝が活発に行われていると予想されるウシガエルについて副甲状腺に特徴的な分子を明らかにする。そして、これまで形態学的あるいは生理学的に副甲状腺とされてきた両生類の器官が副甲状腺であることを、特徴的因子が発現していることにより分子生物学的に証明する。

3. 研究の方法

鰓後腺：HRM 法と塩基配列の解析により、TILLING メダカ(基礎生物学研究所・バイオリソース研究室)におけるクラスタリン遺伝子の突然変異箇所を同定した。そして、突然変異個体の精子から人工授精により個体を起こして、飼育した。バックグラウンド変異の除去は、d-rR 系統の野生型メダカと掛け合わせるにより行った。また、EMSA(electrophoretic mobility shift assay)法により、サイログロブリン遺伝子上流に位置するシスエレメントへの Nkx2-1 の結合能を解析した。

副甲状腺：ウシガエル副甲状腺の cDNA ライブラリーを合成して、SSH(suppression subtractive hybridization) 法や EST (expressed sequence tag) 解析により、未知の因子の同定を行った。また、副甲状腺に特徴的な転写因子 Gcm2 の cDNA クローニング

を行った。

4. 研究成果

總後腺

メダカ TILLING ライブラリーのスクリーニングを行い、クラスタリン遺伝子のエクソン 3 からエクソン 4 を含む領域において 5760 個体中、16 個体で塩基置換を検出した。そのうち 8 箇所がアミノ酸が置換されていると予想され、保存性の高いアミノ酸が置換されている遺伝子変異メダカ、3 個体を人工授精により得、飼育した。現在までに、クラスタリン遺伝子変異メダカを 3 系統作出し、F5(mut/wt) および、F6(mut/wt) を飼育している。また、F5(mut/wt) 同士を交配後、遺伝子型を解析して、F6 の mut/mut 個体および wt/wt 個体を選別して飼育することにより、研究基盤を整えた。

従来の変異個体の遺伝子型決定方法は煩雑であったが、操作方法を工夫するなどして、簡便な遺伝子型決定方法を開発した。

さらに、EMSA 法により、ラット Nkx2-1 がサイログロブリン遺伝子上流のシスエレメントに特異的に結合することを確認すると共に、ニジマス Nkx2-1 もまたサイログロブリン遺伝子上流のシスエレメントに特異的に結合することを示した。

副甲状腺

SSH 法による解析：600 個の副甲状腺特徴的 cDNA クローンを得、pt1~pt600 と名付けた。pt1~pt120 までの cDNA クローンを配列解析し、46 個の cDNA クローンの配列を決定した。しかしその中に副甲状腺ホルモンは含まれていなかった。そこで、脂肪体由来 cDNA プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、副甲状腺特徴的 cDNA クローンを 576 個から 71 個に絞り込んだ。71 個の cDNA クローンを配列解析し、39 個の塩基配列を決定したが、副甲状腺ホルモン、副甲状

腺に特徴的な因子は同定できなかったため、さらに皮膚、平滑筋由来の cDNA プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、42 個に副甲状腺特徴的 cDNA クローンを絞りこんだ。42 個の cDNA クローンの中から、塩基配列の類似性に基づいて 18 個の cDNA クローンを選び、14 組の特異プライマーを作製した。作製したプライマーを用い、副甲状腺、皮膚、平滑筋、脂肪体由来の cDNA をテンプレートとして PCR を行った。その結果、副甲状腺で比較的強いバンドが検出された pt41、pt46、pt211、pt368 について、ウシガエル副甲状腺由来 cDNA ライブラリーからスクリーニングを試み、pt41、pt211、pt368 の全長配列をクローニングした。配列解析の結果、pt41 は G タンパク質、pt211 と pt368 は機能未知のタンパク質であり、副甲状腺ホルモンは得られなかった。

EST 解析：ウシガエル副甲状腺由来 cDNA ライブラリーを用いて形成させたブランクから、50 個の cDNA をクローニングし ptest1~ptest50 と名付けた。配列解析を行い、48 個の塩基配列を決定した。相同性検索の結果 48 個の cDNA クローンの中には副甲状腺ホルモンは同定されなかったが、互いに相同性のある cDNA クローンの組み合わせが 3 組 (ptest33・35、ptest4・15・17・31・46 および pt73・ptest2) 認められた。これらに対してプライマーを作製し、RT-PCR を行い組織分布を調べた結果、ptest33・35 では副甲状腺、皮膚、脂肪体、筋肉、pt4-46 では副甲状腺と膵臓、ptest73・ptest2 では全ての組織でバンドが検出された。ptest33・35、ptest4・15・17・31・46 は副甲状腺での発現が強く、特徴的な因子の塩基配列をコードしている可能性が示唆されたが、コーディング領域がないことが判明した。

Gcm2：PCR により増幅した DNA の配列解析の結果、Gcm2 の部分配列が得られた。また副甲状腺では発現していないとされる Gcm1 の

部分配列も同時に得られた。しかし、ウシガエル副甲状腺由来 cDNA ライブラリーから精製した cDNA をテンプレートとした PCR により、バンドが検出できなかったため、Gcm1 の全長スクリーニングは断念した。Gcm2 に関して、ウシガエル副甲状腺由来 cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。約 150,000 プラークに対し 3 個の陽性反応が検出され、配列解析によりウシガエル Gcm2 の全長配列を決定した。ウシガエル Gcm2 は、poly(A) 部分を除く全長が 2,006 塩基から構成されていて、予想されるアミノ酸配列は 476 残基だった。そして、マウス Gcm2 と 50.1%、ニワトリ Gcm2 と 56.2%、アフリカツメガエル Gcm2 と 72.7%、ゼブラフィッシュ Gcm2 と 59.9%の相同性を示した。

本研究によりウシガエルの副甲状腺からは Gcm2 だけでなく Gcm1 の部分配列もクローニングすることができた。Gcm2 は哺乳類では副甲状腺の発生に必須である。Gcm1 は副甲状腺では遺伝子発現していないとされるが、胸腺の副甲状腺ホルモン産生細胞では発現しているという報告がある。これらの結果を考慮すると、両生類では、Gcm1 と Gcm2 が副甲状腺細胞の分化に関与している可能性がある。

ウシガエル副甲状腺由来 cDNA ライブラリーから Gcm1 と Gcm2 の全長配列のスクリーニングを計画していたが、Gcm1 は発現量が少ない事が判明したため全長スクリーニングは断念した。本研究で用いたウシガエル副甲状腺由来 cDNA ライブラリーの作製には、7 月、8 月、10 月、11 月に採取した副甲状腺を用いたが、Gcm1 は季節により発現量が異なるのかもしれない。また、ウシガエル 1 個体に 4 個ある副甲状腺のうち、Gcm1 と Gcm2 を共に発現する細胞や Gcm2 だけを発現する細胞があるのかもしれない。

カルシウム感知受容体 (CaSR) : Gcm2 の cDNA クローニングを行う過程で、CaSR cDNA の部

分配列もクローニングされた。CaSR は G タンパク質共役型受容体のひとつであり 7 回膜貫通構造を持つ膜タンパク質である。哺乳類では、副甲状腺、腎臓のネフロン、尿細管、ヘンレ締結、集合管、腸管上皮、甲状腺 C 細胞などで遺伝子発現が認められる。CaSR は細胞外のカルシウム濃度をモニターする形質膜上のセンサーであり、カルシウムイオンと結合すると、G タンパク質を介してプロテインキナーゼ C を活性化させ、シグナル伝達の起点となる。その後、組織・細胞により多様な効果が発現するが、副甲状腺の場合はホルモン分泌が低下するとされる。本研究により、部分配列のデータではあるが、使用した組織で CaSR の存在が示唆された。

以上のように、副甲状腺の分子マーカーである Gcm2 と CaSR がクローニングできたことから、本研究で使用した組織が副甲状腺であることが分子レベルで初めて裏付けられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1 . Yuta Kanie, Ikuyo Hara, Joh Sakamoto, Shinichi Chisada, Hiroe Ishikawa, Masayoshi Nakamoto, Yasutoshi Yoshiura, Yoshihito Taniguchi, Kiyoshi Naruse, Masakazu Suzuki and Yasuhiro Kamei. Easy and fast genotyping method for point mutants using high-resolution melting curve analysis. 18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting. 2012 年 9 月 22 日、京都

2 . 坂本丞、上前洋二、片桐信人、日高美江、諏佐崇生、山口洋生、加藤幸雄、田中滋康、鈴木雅一 . 硬骨魚類の甲状腺における Nkx2 .

1の機能解析.第36回日本比較内分泌学会大会、2011年11月23日、東京・都道府県会館
3.坂本丞、山口洋生、土岐晋吾、日高美江、田中滋康、鈴木雅一.魚類におけるカルシトニン伝子発現調節機構の解析.平成23年度日本動物学会中部支部大会.2011年7月31日、福井

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

鈴木 雅一 (SUZUKI, Masakazu)

静岡大学・理学研究科・准教授

研究者番号:60280913

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

成瀬 清 (NARUSE, Kiyoshi)

基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・准教授

研究者番号:50208089

連携研究者

亀井 保博 (KAMEI, Yasuhiro)

基礎生物学研究所・生物機能解析センター・准教授

研究者番号:70372563