

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 28 年 4 月 28 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 静岡大学大学院理学研究科
職 名 教授
研究代表者 鈴木 雅一

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:13002)

1. 共同研究課題名	「代謝シグナル機能研究プロジェクト」 ヌタウナギ甲状腺高ヨウ素・高ホルモンタンパク質の同定と比較生化学的研究			
2. 共同研究目的	深海棲円口類ヌタウナギは脊椎動物で唯一、サイログロブリン(Tg)以外の高ヨウ素・高ホルモンタンパク質(HIP)を母体として多量のサイロキシン(TH)を合成する。淡水棲円口類ヤツメウナギは Tg を母体として少量の TH を合成する。HIP を同定し、Tg との構造比較から進化的意義を考察する。			
3. 共同研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 鈴木雅一	静岡大学大学院理学研究科	教授	HIP 遺伝子クローニング	
(分担研究者) 小林 哲也 村松 康行 近藤 洋一 窪川 かおる 世儀 直也	埼玉大学 理学部 学習院大学 理学部 群馬大学 東京大学 大学院理学研究科 静岡大学 大学院理学研究科	教授 教授 名誉教授 特任教授 修士1年	HIP の精製と同定 タンパク質含有ヨウ素の分析と比較 計画立案とHIP の同定 無脊椎動物でのデータ解析と比較 RNA の解析と免疫染色	
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	シグナル伝達	氏 名	岡島史和

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

これまでに、cDNA の解析により、HIP と酷似したアミノ酸組成を持つ 44kDa のタンパク質 (HIP 関連タンパク質) を同定した。しかしながら、特異抗体を作製してウェスタンブロットを行ったところ、約 71~95kDa の位置にバンドが検出された。したがって、HIP 関連タンパク質は HIP の一部である可能性が高い。

- 1) 次世代シーケンサー (MiSeq; イルミナ) と cDNA ライブラリーを利用して、HIP を含む甲状腺特徴的分子のアミノ酸配列を決定する。昨年の研究により、HIP 関連タンパク質に関しては、中央部分の配列が繰り返されたより大きな分子の存在が示唆されたので、この点を考慮しながら HIP cDNA 全長の塩基配列を決定する。
- 2) HIP と甲状腺ホルモン合成に関わる他の分子について、免疫染色により、細胞での局在を解析し比較する。
- 3) 約 71~95kDa の甲状腺タンパク質のヨウ素含量を測定することで、HIP とヨウ素化との関連を推察する。
- 4) HIP の生化学的単離精製を進め、精製 HIP のアミノ酸配列を決定する。そして、HIP の構造特性を確認する。
- 5) HIP と Tg の構造を比較して、甲状腺ホルモン母体としての意義を考察する。さらに、甲状腺の起源とされるナメクジウオの内柱で発現する遺伝子のデータ等と比較することにより、甲状腺の進化プロセスについて考察する。

7. 共同研究の成果

クロマタウナギ HIP 関連タンパク質の cDNA の全長を決定する試みを行ったが、より長鎖の cDNA は得られなかった。したがって、cDNA からの解析では、HIP 関連タンパク質はアミノ酸 401~474 残基から構成され、選択的スプライシングにより少なくとも 4 種類のアイソフォームが存在するという結果になった。これまでの研究により、クロマタウナギの甲状腺でも、ナトリウム・ヨード共輸送体 (NIS)、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、デュアルオキシダーゼ 2、甲状腺刺激ホルモン受容体、Na, K-ATP アーゼ、並びに転写因子 Pax2/5/8 の mRNA がヒトと同様に発現していることが示唆された。このうち、NIS、TPO、Pax について解析を進めた。ウナギ NIS はアミノ酸 591 残基から成り、一般的な脊椎動物の NIS と同様に、13 か所の膜貫通部位と 3 か所の N-グリコシル化部位が認められた。ウナギ TPO としてはアミノ酸 727 残基と 886 残基の 2 種類の分子が得られたが、いずれにも予想膜貫通部位が認められなかった。哺乳類の TPO 分子は膜タンパク質であるが、ウナギ TPO は異なるかもしれない。ウナギの Pax については、アミノ酸 348 残基と 430 残基の 2 種類の分子が得られた。通常 Pax8 には、ペアドメイン、オクタペプチド、ホメオドメインが認められるが、ウナギの分子はいずれもペアドメインを部分的に欠損していたので、この領域の配列を再確認する必要がある。通常脊椎動物には、Pax2、Pax5、Pax8 という類似した異なる分子が存在しているが、分子系統解析により、ウナギの Pax は Pax2、Pax5、Pax8 のいずれにも属さないことから、ウナギの Pax は祖先的分子 (Pax2/5/8) に位置づけられる可能性がある。以上の結果等から、ウナギにおける甲状腺ホルモン合成機構のモデルを作成した。他の脊椎動物との大きな違いはヨード化タンパク質にあり、サイログロブリン以外の因子については概ね無顎類ですでに機能していた可能性がある。さらに、TPO と Pax2/5/8 はナメクジウオの内柱でも発現しており、その起源は無脊椎動物にまで遡る。今後は、HIP 関連タンパク質が実際にヨード化されてホルモン前駆体として機能するか検証することなどが必要である。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

1. Naoya Segi, Chiaki Toyama, Tetsuya Kobayashi, Yasuyuki Muramatsu, Masumi Nozaki, Yoshihiro Ohmiya, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Tomohiro Suzuki, Hideo Dohra, Kaoru Kubokawa, Yoichi Kondo and Masakazu Suzuki

Identification of molecules involved in thyroid hormone synthesis from the brown hagfish, *Paramyxine atami*
第 40 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 37 回大会・合同大会 (広島市、2015 年 12 月)

次の実績がありましたら提出願います。

1. 共同研究に関連した受賞がありましたらご記入ください。

受賞者氏名	賞名	受賞年月	受賞対象の研究課題名

2. 共同研究に関連した博士学位の取得がありましたらご記入ください。

年度	氏名	大学・研究科名

3. 共同研究が大型プロジェクトの発案、大型プロジェクトの運営、継続、ネットワークの構築等に役だったことがありましたらご記入ください。

--

共同研究活動が発展して獲得に至った大型競争的資金の情報をご記入ください。

プロジェクト名	期間	受入金額 千円	支出機関 (例：文科省)	プロジェクトの概要

研究代表者名：鈴木 雅一 _____