

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 26 年 4 月 24 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  
勤務先所在地 422-8529  
静岡県静岡市駿河区大谷 836  
電 話 番 号 054-238-4769  
ファックス番号 054-238-0986  
E - メ - ル sbmsuzu@ipc.shizuoka.ac.jp

下記により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 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 鈴木雅一	48 歳	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	53 歳	埼玉大学 理学部	教授	HIP の同定と Tg との比較
村松 康行	64 歳	学習院大学 理学部	教授	海棲生物甲状腺タンパク質含有ヨウ素の分析と比較 計画立案と HIP 同定
近藤 洋一	83 歳	群馬大学	名誉教授	
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。

<p>6. 共同研究計画</p> <p>A. ヌタウナギ甲状腺試料の採取: 新潟大学佐渡臨海実験所と共同で漁業組合からクロヌタウナギ250匹を購入、臨海実験所で甲状腺の抽出を行う。</p> <p>B. 実験計画:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) EST がコードする新規タンパク質の特異抗体に対する甲状腺組織の免疫反応性により、その DNA が HIP 遺伝子由来であることを確認する。</li><li>2) ヨウ素含量と抗原性を指標として HIP の生化学的単離精製を進め、ヨウ素化と分子性状の関連を調べる。</li><li>3) HIP と Tg の構造等を比較し、甲状腺ホルモン母体としての意義を考察する。</li></ol>
<p>7. 共同研究の成果</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) クロヌタウナギを試料に、微量の抽出液からの HIP 単離法確立を目指した。近縁種ヌタウナギに関する近藤らの知見に従い、ヨウ素タンパク質分画を分離し、特性を解析した結果、A) 分子サイズ数万—10 数万の範囲に複数種の HIP が存在する、B) それらの分布は還元剤処理にほとんど影響されず、少なくとも HIP 主分画は低 Cys 含量との先行知見とも符合するなど、Tg とは異なる性質が推定された。また、クロヌタウナギ甲状腺の濾胞上皮細胞は TH 抗体により染色され、その反応は TH により吸収された。そこで、抽出試料を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、複数の陽性反応が観察された。</li><li>2) HIP をコードしていると考えられる 5 種類の EST の内、EST①の解析を進めた。EST①は 1,701 塩基より成り、401 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていた。そして、そのアミノ酸組成は、先行研究で報告した HIP のアミノ酸組成と酷似していた。興味深いことに、アミノ酸配列内に 50 残基からなる繰り返し配列が 2 つ、15 残基からなる繰り返し配列が 5 つ存在し、どちらの配列にも Tyr 残基が 2 個含まれていた。甲状腺ホルモンの合成には Tyr 残基が 2 個必要であることから、それぞれの繰り返し配列が HIP の機能単位である可能性がある。さらに、RT-PCR により、甲状腺組織で mRNA の発現が検出され、EST①がコードするタンパク質の一部に対応する抗ペプチド抗体を用いた免疫組織学的解析により、甲状腺濾胞上皮細胞および濾胞腔内のコロイドで免疫陽性シグナルが観察された。また、EST①がコードするタンパク質の分子質量は約 44 kDa と予想されたが、ウェスタンブロット解析の結果、免疫陽性のバンドが約 64、50、45 kDa の位置に検出され、HIP のアイソフォームの存在が示唆された。ウェスタンブロットの結果や EST①の 5' 非翻訳領域に終止コドンがないことなどから、EST①よりも長い mRNA が発現している可能性が高い。今後より長い mRNA の解析が必要である</li><li>3) 考察: ヌタウナギでは、Tg 以外の TH 母体タンパク質が複数のアイソフォームとして存在すると考えられる。そして、EST①がコードしているタンパク質は、アミノ酸組成、組織細胞局在、分子質量から、アイソフォームの一つあるいは一部である可能性がある。したがって、分離を進めている HIP の解析に成果 2 の特異抗体を用いた解析も加えて、より詳細に解析を進める必要がある。そして、結果を纏め、無脊椎動物から脊椎動物への TH 合成機構の進化を追及したい。</li></ol>
<p>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。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 世儀直也、遠山知亜紀、小林哲也(分担研究者)、村松康行(分担研究者)、野崎真澄、近江谷克裕、佐藤幸市、岡島史和(担当教員)、近藤洋一(分担研究者)、鈴木雅一(分担代表者) クロヌタウナギの甲状腺に発現する新規ヨード化タンパク質の分子生物学的解析。第 38 回日本比較内分泌学会大会、2013 年 10 月、宮崎・宮崎市民プラザ</li><li>2. 世儀直也、遠山知亜紀、小林哲也(分担研究者)、村松康行(分担研究者)、野崎真澄、近江谷克裕、佐藤幸市、岡島史和(担当教員)、近藤洋一(分担研究者)、鈴木雅一(分担代表者) クロヌタウナギにおける新規ヨード化タンパク質候補分子の同定および分子組織学的解析 平成 25 年度日本動物学会中部支部大会 2014 年 3 月、東岡崎・自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター</li></ol>