

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 27 年 4 月 30 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26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	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、甲状腺未同定タンパク質(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サイログロブリン(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 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 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 遺伝子のクローニング	
(分担研究者) 小林 哲也 村松 康行 近藤 洋一 世儀 直也	埼玉大学 理学部 学習院大学理学部 群馬大学 静岡大学大学院理学研究科	教授 教授 名誉教授 修士1年	HIP の精製と同定 海棲生物タンパク質含有ヨウ素の分析と 比較 計画立案とHIP 同定 RNA の解析、ウェスタンブロットイング、 および免疫染色	
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。

(課題番号: 13002)

6. 共同研究計画

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摘出を行う。

B. 実験計画:

- 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。
- 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。
- 3) HIP と T_g 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。

7. 共同研究の成果

- 1) 抗体反応の特異性向上を目指して、アフィニティー精製抗体による甲状腺タンパク質のウェスタンブロット解析を行い、95kDaと80kDaの特異抗原を検出した。cDNA解析に基づく推定HIPペプチドは43kDaであるので、はるかに大きい上記特異抗原の分子質量を説明するには、A)糖鎖による修飾 and/or B)未発見鎖鎖抗原存在の可能性検討が必要となった。A)に関して、ペプチド-N-グリコシダーゼF処理では、分子質量は変化しなかった。一方、次世代シーケンサー(MiSeq; イルミナ)を用いた甲状腺組織のトランスクリプトーム解析では、344,732個の転写産物および280,011個の遺伝子が検出され、HIPに関して、分子内の一部の配列が反復した、より大きな分子の存在が示唆された。今後更なる配列解析を通して、HIP cDNAの全長を決定する必要がある。また、トランスクリプトーム解析の結果、クロヌタウナギの甲状腺でも、甲状腺ペルオキシダーゼ、ナトリウム・ヨード共輸送体、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。しかしながら、サイログロブリン、Nkx2-1、ペンドリン(PDS/SLC-26A4) (濾胞への推定ヨウ素イオン運搬機構)の mRNA は確認されなかった。
- 2) 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、T_g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。同様に、これらの反応はTH処理により吸収された。さらに、アフィニティー精製した抗HIP抗体を用いて分離したタンパク質のウェスタンブロット解析を行った結果、1)と同様に主に2本の特異的な反応(約80~95kDa)が検出された。この陽性反応が観察された位置は、ヨウ素含量が高い画分と一致していた。
- 3) 考察: ヌタウナギでは、T_g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、約71~95kDaの位置で検出されたタンパク質が探し求めている intact なHIPである可能性が高い。したがって、検出されたタンパク質の生化学的単離精製をさらに進め、より詳細な解析を行う必要がある。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

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 (分担研究者), Chiaki Toyama, Tetsuya Kobayashi (分担研究者), Yasuyuki Muramatsu (分担研究者), Masumi Nozak, Yoshihiro Ohmiya, Koichi Sato, Fumikazu Okajima (担当教員), Tomohiro Suzuki, Hideo Dohra, Yoichi Kondo (分担研究者), Masakazu Suzuki (研究代表者) Molecular cloning of cDNA encoding Na⁺/I⁻ symporter from the brown hagfish, *Paramyxine atami*.
第39回日本比較内分泌学会大会、2014年11月、岡崎コンファレンスセンター、岡崎