

# 学 位 論 文 要 旨

学位請求論文題名：

Structure and biological activities of calcitonin and procalcitonin amino-terminal cleavage peptide

金沢大学大学院自然科学研究科

自然システム学専攻

加瀬 陽一

(学籍番号：1424062013)

## Abstract

The structure and biological activities of calcitonin and the preprocalcitonin amino-terminal cleavage peptide were examined. In brief, full length sequence of the sardine procalcitonin that composed of procalcitonin amino-terminal cleavage peptide (N-proCT) (53 amino acids), calcitonin (CT) (32 amino acids), and procalcitonin carboxyl-terminal cleavage peptide (C-proCT) (18 amino acids) was determined. Using a bioassay with goldfish scales, N-proCT ( $10^{-7}$  M) was shown to activate osteoblastic marker enzyme activity and promote the mRNA expressions of osteoblastic markers.

From Brockmann bodies of the medaka (*Oryzias latipes*), CT-like substances that reacted to anti-CT antibodies were separated using reversed-phase HPLC. The identified CT-like substance had bioactivity in rats.

Immunoreactive calcitonin-producing cells (iCT) were found in the nervous system of the polychaete with immunohistochemistry. It was found that iCT-producing cells were located bilaterally in each segment of the ventral nerve cord. This suggests that iCT-producing cells have some functional role in the nervous system.

Taking the above results into consideration, CT presents in invertebrates as well as in vertebrates and has some functions. CT has been changed to have a new role in regulating calcium in vertebrates with bone; however, it is thought that CT is originally produced in the nervous system and acts locally as a neurohormone. Ectopic iCT found in Brockmann bodies of medaka is possibly a CT remnant originally produced in the nervous system. In addition, N-proCT was thought to play a physiological role in acting on osteoblasts and regulating bone metabolism, not only in sardines but also in other vertebrates.

## 1. 研究の背景と目的

脊椎動物において、カルシウム (Ca) は様々な生理現象に関わる重要な元素である。このため、水生/陸棲に関わらず脊椎動物の血漿中の Ca 濃度はほぼ一定 (10 mg/100 ml) に保たれている。また、血漿中に比べて細胞内の Ca 濃度は1万分の1程度であり、この細胞内外の Ca 濃度の差が存在することが神経活動において重要な意義を持つ。血漿中の Ca 濃度を調節するために、内分泌系は非常に重要な役割を果たしている。本研究では、カルシウム濃度を調節するホルモンであるカルシトニン (CT) に注目した。CT は 32 個のアミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、哺乳類では破骨細胞の活動を抑制しその結果として血中のカルシウム濃度を低下させる。

CT は哺乳類では甲状腺の C 細胞で、哺乳類以外の脊椎動物では鰹後腺で産生・分泌される。CT の生合成では、まずプレプロカルシトニンが産生され、N 末端側のシグナル配列が切れてプロカルシトニンになる。プロカルシトニンはさらにプロセッシングを

受けて、プロカルシトニン N 末端ペプチド (N-proCT) 、CT 及びプロカルシトニン C 末端ペプチド (C-proCT) の 3 つのペプチドに分かれることが様々な動物で知られている。哺乳類の C 細胞を培養したところ、細胞抽出物と培地の両方で CT と N-proCT が同等のモル数検出されたことが報告されていることから、CT と同様に N-proCT にも何らかの生物学的活性があることが示唆される。しかしながら、N-proCT は骨芽細胞の増殖を促進するという報告と促進しないという報告の両方が存在し、N-proCT に生物学的活性があるかどうかについては、現在まで一致した見解が得られていない。

このような背景を基盤として本研究では、マイワシ (*Sardinops melanostictus*) の CT 前駆体の配列を決定し、次に、合成した N-proCT の骨芽細胞及び破骨細胞に対する生物学的活性の有無をキンギョのウロコを用いたアッセイ系により検討することとした。

また、CT は脊椎動物の腸、生殖腺、肺及び脳など様々な器官で見つかっており、CT 抗体に反応する CT 様物質は、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類及び魚類といったいくつかの綱の脊椎動物の中樞神経から見つかっている。さらに哺乳類及び魚類では CT レセプターも脳で見つかっている。これらの事実は CT がカルシウム代謝を調節するだけでなく神経生理学的な機能も有することを示唆しており、実際に CT は哺乳類で鎮痛作用を示すことが知られている。さらに無脊椎動物においても、脊索動物の一種のカタユウレイボヤで CT が見つかっており、幼生では神経複合体で発現していたと報告されている。このことから、CT は無脊椎動物の神経系においても何らかの役割を果たしていることが示唆される。

これらの事実を踏まえ、本研究では脊椎動物のメダカ (*Oryzias latipes*) を対象に異所性の CT 様物質の生化学的特徴や生物学的活性について検討し、また無脊椎動物のアオゴカイ (*Perinereis aibuhitensis*) を対象に、神経系に存在する CT 様物質の体内分布や生化学的特徴について検討した。

## 2. 研究内容

### 2-1) マイワシの N-proCT の一次構造解明と生物学的活性の検討

マイワシの鰓後腺からプレプロカルシトニン mRNA のクローニングを行い、その配列を決定した。また、合成した N-proCT の生物学的活性をキンギョのウロコを用いたアッセイ系により検討した。

#### 【実験方法】

マイワシ (*Sardinops melanostictus*) から採取した鰓後腺から RNA を抽出し、RACE 法でプレプロカルシトニン RNA 全長の配列を決定した。この配列に基づいて合成した CT 及び N-proCT を、以下に述べるキンギョのウロコを用いたアッセイに供した。

キンギョ (*Carassius auratus*) からウロコを採取し、CT 及び N-proCT (それぞれ  $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  M) を添加した L-15 培地で 6 時間培養 (曝露) を行った。その後、破骨細胞のマーカ酵素として、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 活性を、骨芽細胞のマーカ酵素として、アルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性を測定した。

次に、CT 及び N-proCT (いずれも  $10^{-7}$  M) を添加した L-15 培地で同様にウロコを 6 時間培養した後、total RNA isolation kit を用いて Total RNA を抽出し、RT-PCR により、骨芽細胞活性マーカーである 1 型コラーゲン及びオステオカルシンの mRNA 発現量の変化を調べた。

### 【実験結果及び考察】

マイワシのプロカルシトニン (N-proCT (53 アミノ酸残基)、CT (32 アミノ酸残基) 及び C 末端ペプチド (18 アミノ酸残基) から構成されることが明らかになった。

合成したマイワシの CT 及び N-proCT をキンギョのウロコを用いたアッセイで調べた結果、CT は  $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  M の濃度で ALP 活性を変化させなかったが、N-proCT は  $10^{-7}$  M の濃度で ALP 活性を統計学的に有意に上昇させた (Fig. 1)。

一方、CT は  $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  M の濃度で TRAP 活性を濃度依存的に低下させたが、N-proCT は  $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  M の濃度で TRAP 活性を変化させなかった (Fig. 2)。

また、キンギョのウロコを用いたアッセイに  $10^{-7}$  M の濃度の CT 及び N-proCT を加えた結果、CT では変化が見られなかったが、N-proCT では骨芽細胞活性マーカーである 1 型コラーゲン及びオステオカルシンの mRNA 発現量が増加した (Fig. 3)。

N-proCT はマイワシのみならず他の脊椎動物においても骨芽細胞に作用して骨代謝を調節する生理的機能を有している可能性があると考えられる。

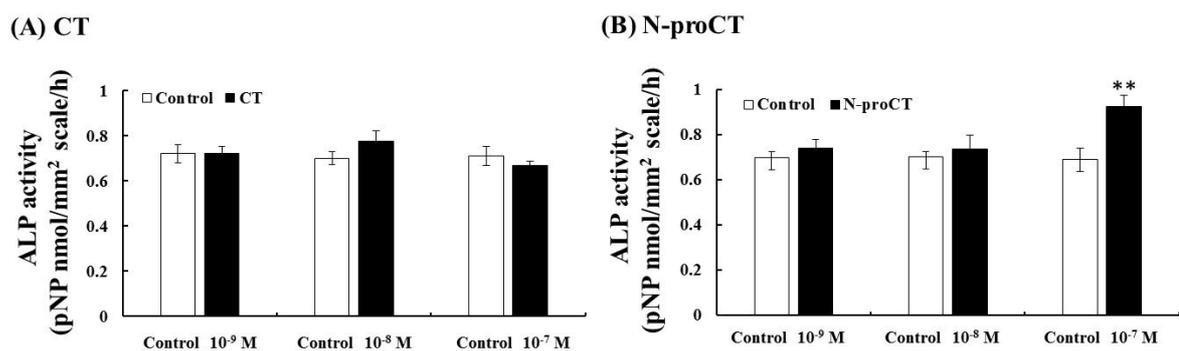


Fig. 1. Effects of sardine CT (A) and sardine N-proCT (B) on ALP activities in cultured scales incubated for 6 hours

\*\* indicates a statistically significant difference at  $p < 0.01$  from the values of control scales ( $n = 8$ ).

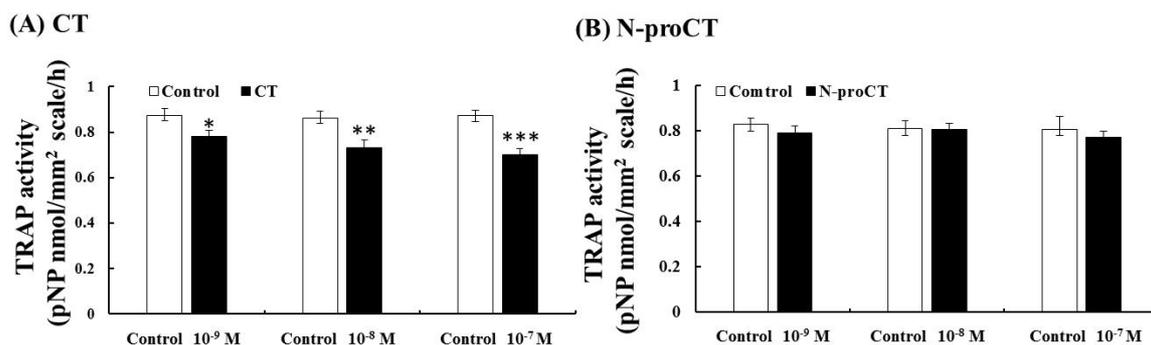


Fig. 2. Effects of sardine CT (A) and sardine N-proCT (B) on TRAP activities in cultured scales incubated for 6 hours  
 \*, \*\*, and \*\*\* indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively, from the values of control scales ( $n = 8$ ).

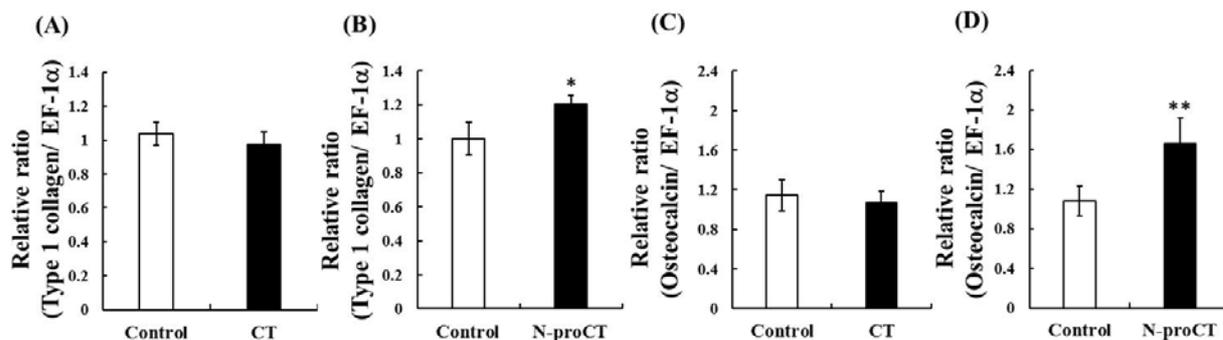


Fig. 3. Effects of sardine CT and sardine N-proCT on type 1 collagen (A: CT; B: N-proCT) and osteocalcin (C: CT; D: N-proCT) mRNA expressions in cultured scales incubated for 6 h  
 \* and \*\* indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.  
 $n = 9$  samples; one sample from one fish.

## 2-2) メダカブロックマン小体に存在するCT様物質の生化学的特徴と生物学的活性

メダカ (*Oryzias latipes*) のブロックマン小体の抽出物からCT様物質を分離し、分子量等の生化学的特性やラットアッセイ系における血清Ca濃度低下作用について検討した。

### 【実験方法】

約500匹のメダカ (*Oryzias latipes*) から抽出したブロックマン小体を、蒸留水中で煮沸しプロテアーゼを失活させた後、最終濃度が1Mになるよう酢酸を加えた。これを4°Cでホモジナイズした後、4°Cで10分間、25,000 × gで遠心分離し、上清をブロックマン

小体の粗抽出物とした。ODS-120T カラム (東ソー) を用いた逆相 HPLC (アセトニトリル濃度 20%~80%のグラディエント溶出法) により、粗抽出物から CT 様物質を分離し、抗サケ CT 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で CT 様物質を含むフラクションを特定した。次に SDS-PAGE により CT 様物質の分子量を推定し、さらに CT 様物質をラットに投与し、投与前、投与の 0.5、1、2 及び 3 時間後に採血を行い、血清中の Ca 及び無機リン濃度を測定した。

### 【実験結果及び考察】

メダカのプロックマン小体の粗抽出物は逆相 HPLC で 20 フラクションに分けられた (Fig.4)。ウエスタンブロッティングの結果、アセトニトリル濃度 30-33%、39-42%、42-45%及び 45-48%にそれぞれ溶出したフラクション 7、10、11 及び 12 に抗サケ CT 抗体に対する免疫陽性反応が認められた。SDS-PAGE の結果から、フラクション 7 と 11 に含まれるそれぞれ 2 つの免疫反応陽性物質の分子量は、25 kDa と 28 kDa、及び 10 kDa と 21 kDa とそれぞれ推定された。またフラクション 10 及び 12 の免疫反応陽性物質の分子量はそれぞれ 20 kDa 及び 11 kDa と推定された (Fig. 5)。

ラットバイオアッセイにおける血清中の Ca 及び無機リン濃度の変化を Fig. 6 及び Fig. 7 にそれぞれ示す。フラクション 10 のみで投与後 0.5 時間及び 1 時間の時点で統計学的に有意な血清 Ca 濃度の低下が認められた (それぞれ  $p < 0.001$  及び  $p < 0.001$ )。さらにフラクション 10 の投与で投与後 3 時間まで血清中の無機リン濃度の低下も認められた。

以上の結果を踏まえ、メダカのプロックマン小体の CT 様物質は、分子量が約 20 kDa の物質であると結論された。

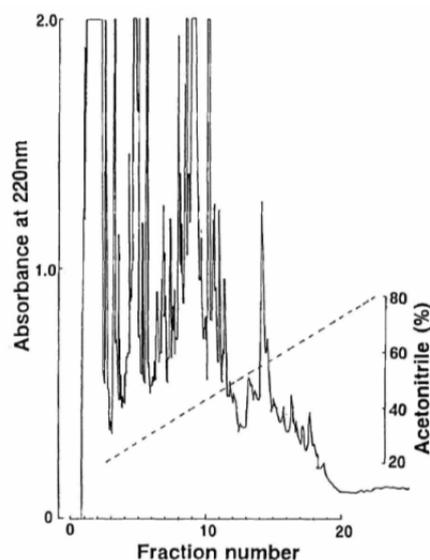


Fig. 4 Reversed-phase HPLC on an ODS-120T column.  
Sample: crude extract of medaka Brockmann bodies; flow rate, 1 ml/min; fraction size, 3 m/tube.  
Solvent system: linear-gradient elution from 20% to 80% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% TFA for 60 min.

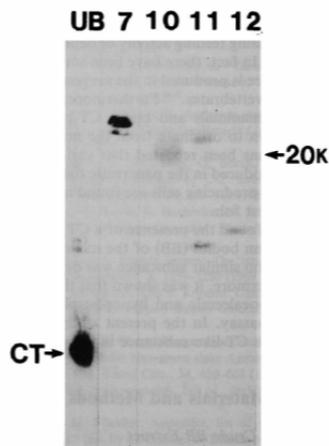


Fig. 5. Molecular weights of immunoreactive calcitonin (CT) in medaka Brockmann body extract. The positive fractions (Nos. 7, 10, 11, and 12) from Western blotting with anti-calcitonin antiserum and extracts of the ultimobranchial glands of stingrays are compared. The arrows show immunoreactive CT of 20 kDa in Fraction 10 and stingray CT.

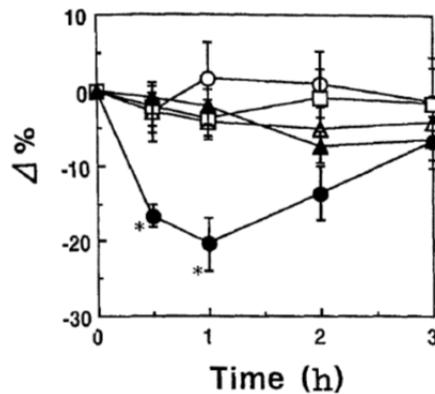


Fig. 6. Changes in serum calcium (Ca) levels in rats after the administration of Fraction 7 (○), 10 (●), 11 (△), 12 (□), or the vehicle (▲). The vertical bars show the SE.  $n = 5$  for each fraction;  $n = 6$  for the vehicle. \*Significantly different from the value for the vehicle only ( $p < 0.001$ )

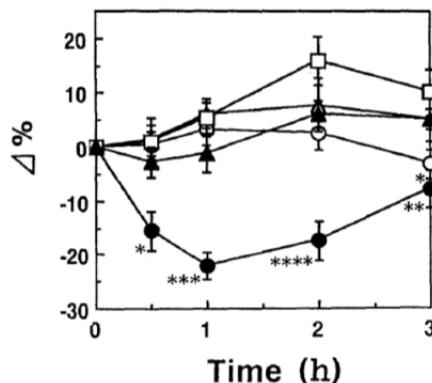


Fig. 7. Changes in serum inorganic phosphorus (Pi) levels in rats after the administration of Fraction 7 (○), 10 (●), 11 (△), 12 (□), or the vehicle (▲). The vertical bars show the SE.  $n = 5$  for each fraction;  $n = 6$  for the vehicle. Significantly different from the value for the vehicle: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$

### 2-3) アオゴカイの神経系に存在する CT 免疫反応陽性細胞

アオゴカイの神経系に存在する CT 免疫反応陽性細胞の分布を観察し、また CT 様物質の分子量を調べた。

#### 【実験方法】

釣り餌として市販されているアオゴカイ (*Perinereis aibuhitensis*) を購入し、エアレーションした海水中で3日間飼育して実験に用いた。麻酔したアオゴカイを12分割し酢酸抜き Bouin 液で固定し、一般的な方法で厚さ 10 $\mu$ m の連続パラフィン切片を作製した。

脱パラフィン処理した切片を抗サケ CT 抗体 (1/100,000 希釈) とインキュベートした後、ビオチン化抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (1/2,000 希釈) とインキュベートした。その後、アビジン-ビオチン kit を用いて CT 免疫陽性細胞を検出した。

また、アオゴカイの脳神経節から Fig. 8. に示す方法で粗抽出物を得て、これを SDS-PAGE にかけた後、抗サケ CT 抗体を用いたウエスタンブロッティング法で CT 様物質を検出し、その分子量を推定した。

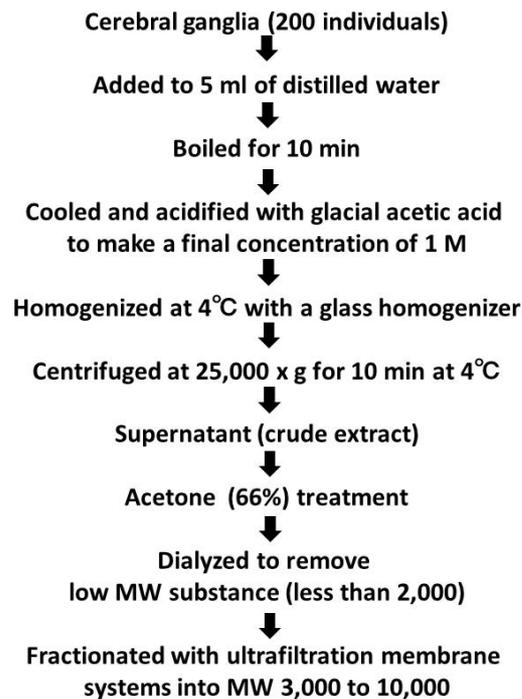


Fig. 8. The procedure for preparing and fractionating crude extracts from cerebral ganglia in the polychaete *Perinereis aibuhitensis*

Cerebral ganglia were collected from 200 individuals. These ganglia were homogenized and centrifuged. The separated supernatants were treated with 66% acetone and then dialyzed to remove low molecular weight (MW) substances (less than 2,000). Thereafter, the sample was fractionated with an ultrafiltration membrane system into MWs of 3,000 to 10,000.

### 【実験結果及び考察】

アオゴカイの神経系における CT 免疫陽性細胞の分布を Fig.9 に示す。

多数の CT 免疫陽性細胞 (53-70 個) が頭部の脳神経節に存在していた (Figs. 10A 及び 10B)。他に、食道下神経節には4-6 個、腹神経索には体節毎に4 個の CT 様物質産生細胞の存在が確認された。CT 様物質産生細胞は腹神経索内で体節毎に左右対称に存在していることから (Fig. 10C)、神経系において何らかの機能的な役割を有することが示唆された。

さらに、SDS-PAGE の結果、その物質の分子量は硬骨魚の CT と同様の約 3.5 kDa であると推定された。

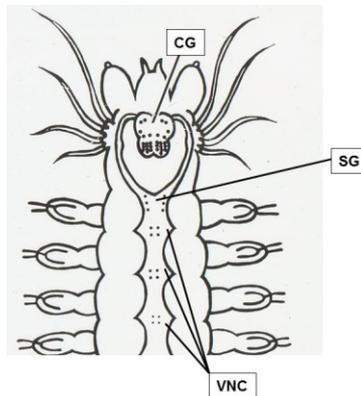


Fig. 9. Schematic drawings showing the distribution and number of immunoreactive calcitonin cells (black spots) in the polychaete *Perinereis aibuhitensis*. The size of the black spots indicates the strength of the positive reaction. CG: cerebral ganglion; SG: subpharyngeal ganglion; VNC: ventral nerve cord

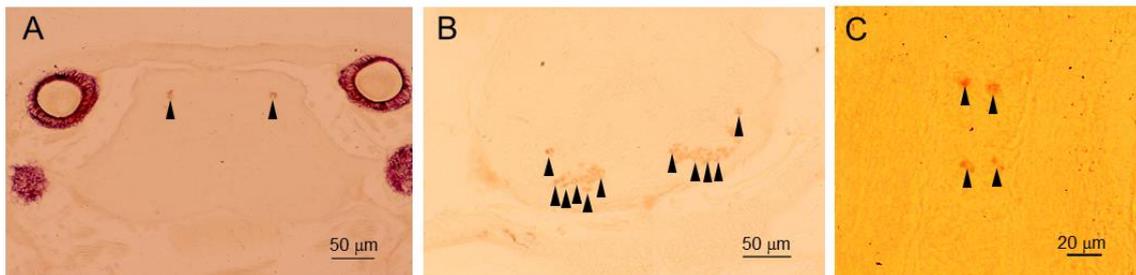


Fig. 10. Immunoreactive calcitonin (iCT) cells in the polychaete *Perinereis aibuhitensis*. A: cerebral ganglion (anterior region); B: cerebral ganglion (posterior region); C: ventral nerve cord. Arrowheads indicate iCT cells.

### 3. まとめ

1. キンギョのウロコを用いたバイオアッセイにより、マイワシの N-proCT は骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を上昇させること及び、骨形成マーカーである 1 型コラーゲン及びオステオカルシンの mRNA の発現を上げる生物学的活性を有していることを示した。
2. 逆相の HPLC を用いて、メダカのプロックマン小体の抽出物から、抗サケ CT 抗体に反応する分子量約 20 kDa の CT 様物質を分離した。さらにこの物質がラットの血清 Ca 濃度を低下させる活性を有することがわかった。この物質は CT の前駆体である可能性が高いと考えられた。
3. 抗サケ CT 抗体を用いた免疫組織化学的手法により、アオゴカイの脳神経節だけでなく、食道下神経節及び腹神経索に CT 様物質産生細胞を見出した。CT 様物質産生細胞は腹神経索内で体節毎に左右対称に存在していることから、神経系において何らかの機能的な役割を有することが示唆された。また、CT 様物質の分子量が硬骨魚の CT と同様の約 3.5 kDa であることも判明した。

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

Structure and biological activities of calcitonin and procalcitonin amino-terminal cleavage peptide カルシトニンとアミノ末端プロカルシトニンの構造と生物活性

2. 論文提出者 (1) 所 属 自然システム学専攻専攻

(2) 氏 名 加瀬 陽一

3. 審査結果の要旨（600～650字）

マイワシ (*Sardinops melanostictus*) の鰓後腺からカルシトニン前駆体 mRNA のクローニングを行い、その配列を解析した結果、カルシトニン前駆体は N 末端プロカルシトニン(N-proCT) (53 アミノ酸残基)、カルシトニン (32 アミノ酸残基) 及び C 末端プロカルシトニン (18 アミノ酸残基) から構成されることがわかった。さらにキングヨウのウロコを用いたバイオアッセイにより、N-proCT は生物活性を有していることも判明した。即ち、N-proCT が骨形成マーカーであるアルカリフォスタターゼ活性を上昇させること、骨形成マーカーである 1 型コラーゲン及びオステオカルシンの mRNA の発現を上げることが証明した。次に、異所性のカルシトニンとして、メダカ (*Oryzias latipes*) のブロックマン小体とアオゴカイ (*Perinereis aiuhitensis*) の脳・神経系を用いて解析した。その結果、カルシトニンは無脊椎動物にも存在するペプチドであり、神経系に存在して局所において神経ホルモンとして機能していたと考えられ、メダカのブロックマン小体で見つかったカルシトニン様物質は、神経系で産生されていたカルシトニンに由来する可能性があることもわかった。これらの内容は、国際誌に、参考論文 2 報 (First author 1 報、Second author 1 報) としてまとめられており、博士 (理学) の学位に値すると判断された。

4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) 合 格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博 士 (理学)