

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Molecular evolution of the natriuretic peptide family  
(ナトリウム利尿ペプチドファミリーの分子進化)

氏名 川越 暁

### 序論

脊椎動物は、淡水、海水、そして陸上と、多様な環境で生活をしているが、それぞれの生活環境に適応するために様々な戦略をとっている。外界のイオンや水分、そして乾燥に対して、体内の水分や浸透圧を調節することも、それぞれの環境に適応するための最も重要な戦略のひとつである。海水という高い浸透圧環境への適応に関して、最も原始的な脊椎動物と考えられている円口類のメクラウナギ類は、血漿イオン濃度と浸透圧を生活の場である海水に合わせている（順応型）。軟骨魚類になると、血漿中のイオン濃度は海水の約 2 分の 1 に保っているが、尿素を蓄積させて血漿浸透圧を海水とほぼ等張に保っている（半調節型）。硬骨魚類・四肢動物になると、血漿イオン濃度と浸透圧を常に海水の約 3 分の 1 に保つシステムを獲得している（完全調節型）。このように、脊椎動物は進化の過程で体内のイオン環境を外界と独立させ、体液の恒常性を維持するシステムを獲得していったと考えられている。

心房性ナトリウム利尿ペプチド (Atrial natriuretic peptide, ANP) は、1983 年にラットの心臓で初めて発見された新しい体液調節ホルモンである。その後、四肢動物では B 型 NP (B-type NP, BNP) と C 型 NP (C-type NP, CNP) が、硬骨魚類の真骨類では心室型 NP (Ventricular NP, VNP) と CNP が同定され、NP は 3 種のペプチドからなるファミリーを構成することがわかった。ANP, BNP, VNP は心臓から分泌される循環ホルモンで、CNP は主に脳で産生される傍分泌ホルモンである。いっぽう、軟骨魚類の板鰓類では心臓と脳から CNP のみが単離され、CNP が循環ホルモンとしても機能しているため、CNP しかないと予想される。図 1 に示すように、NP は Cys による分子内環状構造を形成しするが、CNP には C-末端側のテール配列が存在しない。

哺乳類において、これら 3 種類の NP は、体液調節に関わる腸、腎臓、副腎、脳などに作用して、水やイオンの排出を促進するホルモンであることがわかっている。いっぽう、魚類である真骨類では、NP はナトリウムを特異的に排出させるホルモンで、海水適応に重要であることがわかっている。さらに、淡水と海水に適応できる広塩性魚のウナギでは、CNP がナトリウムの取り込みを促進することにより淡水環境への適応を促進するホルモンであることがわかってきた。これらの事実は、元来イオンの排出に関わる機能を果たしていた NP が、進化にともなう多様化により広塩性魚類で新たな機能を獲得したと考えられる。

私は、修士課程において、RNase H を用いて特定の mRNA のみを除き、微量に発現している同族分子の mRNA を同定する方法を開発した。その方法を用いて、板鰓類には CNP しか存在しないことをほぼ確定することができた。このことから、CNP は NP ファミリーの祖先型で、板鰓類では NP 分子の多様化は起こっていないと考えられる。ここで、NP の多様化と血漿のイオン濃度の調節能に関して、相関関係がみられる。すなわち、「半調節型」の軟骨魚類から「完全調節型」の硬骨魚類に至る進化の過程で、NP ファミリー分子の多様化が起こってきたように思われる。私は、イオン調節に重要な役割を果たしている NP ファミリーの多様化と、脊椎動物の進化にともなう血漿イオン調節能の獲得に関係があるのではないかと考えた。

そこで本研究では、NP ファミリーの分子進化を明らかにすることを目的として、脊椎動物の進化において重要な位置を占める種において、RACE 法を用い NP cDNA のクローニングを行った。PCR に用いたプライマーは、全ての NP cDNA を増幅する 5 種類の縮重プライマーを設計した。

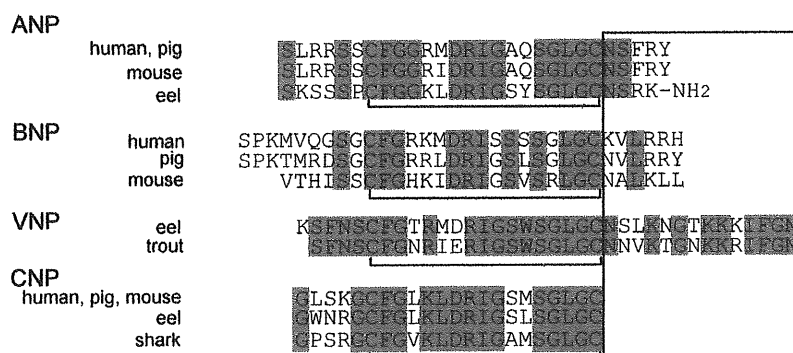


図1 ナトリウム利尿ペプチドのアミノ酸配列。それぞれのNPで保存されているアミノ酸を影で示した。システインによるジスルフィド結合を実線で示した。テール配列を枠で囲った。

### NP の祖先分子を探る

まず、NP ファミリーの祖先分子を明らかにするため、最も原始的な脊椎動物に属する円口類のヌタウナギ(*Eptatretus burgeri*)から NP 遺伝子をクローン化した。すると、脳

と心臓双方より、CNP ではなく、ユニークなアミノ酸配列をもつ hfNP が同定された。大量に発現している hfNP の mRNA を RNase H 法を用いて除き、他の NP を探したが、3'の非翻訳領域が短い hfNP の mRNA が取れただけであった。hfNP の環状構造内は比較的 CNP と類似しているが、CNP にはないテール配列をもっていた。従って、NP は元々 CNP ではなく、hfNP のような構造をとっていた可能性が示唆された。hfNP のプロセグメントには furin によるプロセシングシグナルが存在し、そこで切断された成熟型ペプチドがヌタウナギの血液中を循環していることをアフィニティー精製と質量分析により証明した。hfNP の構造は、大西洋産メクラウナギ (*Myxine glutinosa*)、クロメクラウナギ (*Paramyxine atami*)、ニュージーランド産メクラウナギ (*Eptatretus cirrhatius*) など、系統が異なるメクラウナギ類で構造が広く保存されていた。

さらに、円口類のもうひとつのグループであるヤツメウナギ類に属するフクロヤツメ (*Geotria australis*) 及びカワヤツメ (*Lethenteron Japonica*) で NP を探索したが、いずれからでも hfNP ではなく、CNP が同定された。CNP のプロセグメントにも furin によるプロセシングシグナルが存在し、そこで切れる成熟型 CNP を含む配列で、特に保存性が高かった。hfNP の C 末端のテール配列は Arg ではじまり、1 塩基置換でストップコドンに変わりうる。hfNP と CNP にみられる共通の特徴から、これらは共通の遺伝子から分岐した可能性が高い。この考えは、NJ 法による分子系統解析により支持される。

### NP 分子の多様化の過程を解明する

次に、軟骨魚類から硬骨魚類に至る NP の多様化のプロセスを追った。軟骨魚類のうち、板鰓類に CNP のみが存在することは明らかであるが、もともとあった他の NP 遺伝子が偽遺伝子化してしまった可能性も考えられる。近年、真骨類に 4 種類の CNP が存在し、そのうち少なくとも 3 種類が板鰓類に存在する可能性が示唆されている (井上ら、2003)。板鰓類で同定されている CNP は、アミノ酸配列の類似性から、真骨類の CNP-3 であると考えられる。そこで、より原始的な軟骨魚類に属する全頭類のゾウゲンザメを用い、NP の同定を行ったところ、2 種類の CNP を同定した。これら 2 種の CNP は共に板鰓類の CNP との保存性が高く、軟骨魚類のなかで独自に遺伝子重複によりできたものであろう。従って、軟骨魚類には CNP-3 のみが存在すると考えられる。

そこで、NP が硬骨魚類でどのように多様化してきたのかについて、硬骨魚類の中で真骨類よりも古く分岐した軟質類に属するチョウザメ (*Acipenser transmontanus*) を用いて調べた。チョウザメは、淡水と海水双方によく適応する広塩性魚類である。その結果、ANP、VNP、CNP の他に、四肢動物にしか存在しないと考えられていた BNP を同定することができた。これまでは、BNP と VNP は元々相同な分子で、それぞれ四肢動物と真骨類の系統に分岐した後に独自の配列をとるようになったという考えが主流であった。しかし、チョウザメで VNP と BNP が共存することを発見したことにより、これら二つの遺伝子はもともと独立したものであることがわかった。さらに、フグのゲノムデ

データベースを検索することにより、真骨類にも BNP が存在することを明らかにした。その結果、NP ファミリーは、これまで考えられてきた 3 種類ではなく、少なくとも 4 種類の分子から構成されていることが証明された。

### NP ファミリーの分子進化に関する一考察

本研究により、脊椎動物における NP ファミリーの分子進化に関して、円口類から硬骨魚類にいたる全ての脊椎動物をカバーすることができた (図 2)。NP の種類は、硬骨魚類になって多様化した。それはこれまで考えられてきたよりもはるかに複雑なものであることが明らかとなった。井上ら (2003) により、真骨類には 4 種の CNP (CNP-1~4) が存在することが示されたが、hfNP とヤツメウナギの CNP は CNP-4 型である。いっぽう、軟骨魚類の CNP は CNP-3 型である。CNP-3 と CNP-4 はエキソン・イントロン構造が類似しているため、軟骨魚類で CNP-3 はゲノム重複で生じたと考えられる。これは私の仕事ではないが、カエルでは CNP-3 と CNP-4 の 2 種があることがわかっている。硬骨魚類では、さらに CNP が重複され、CNP-3 から ANP、BNP、VNP がタンデムに重複された可能性が示唆されている。このように、図 2 a の段階であった NP ファミリーの分子進化のプロセスが、本研究により図 2 b のような考え方を提示できるようになった。また、比較的単純な浸透圧調節を行うメクラウナギや軟骨魚類には 1 種類の NP のみが存在し、硬骨魚類や四肢動物では更に多様化して定着した。本研究では、多様化した NP 分子がどのような役割を担っているのか明らかにはできないが、新たに様々な種で同定した NP を用いて、近い将来 NP の多様な機能やその進化のプロセスが明らかとなってくることが期待できる。

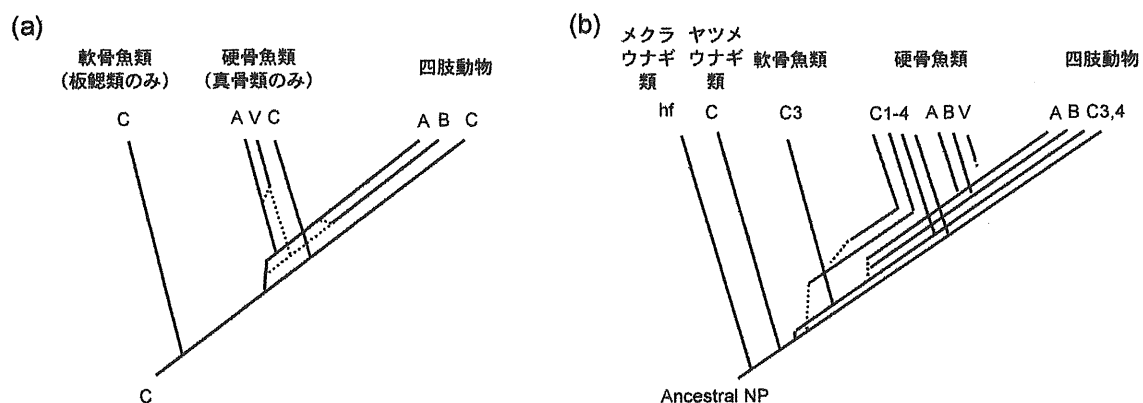


図2 ナトリウム利尿ペプチドファミリーの分子進化。(a) これまでに明らかにされていたNPを元に考えられていたプロセス。(b) 本研究及び井上ら (2003) のデータを元に新たに考えられたプロセス。点線は、まだはっきりとは明らかになっていない過程を示す。