

## 論文内容の要旨

### A novel adrenomedullin family in teleost fish: Molecular evolution and physiological function

( 硬骨魚真骨類における新規アドレノメデュリンファミリーの分子進化および生理学的研究 )

氏 名      御 興 真 穂

#### 【目的】

硬骨魚真骨類は水中に生活するため、鰓や表皮を介して環境水と接しているが、その生息環境が淡水であるか海水であるかにかかわらず、常に体液浸透圧を海水の約3分の1に保っている。そのため真骨類はユニークな浸透圧調節を行っており、これまでに様々なホルモンが関わっていることが報告されているが、この調節に必須であるものはまだ見つかっていない。真骨類の浸透圧調節にはこれまで、プロラクチン、コルチゾル、成長ホルモン、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、グアニリンなどのホルモンの関与が報告されているものの、それらの作用は哺乳類におけるバゾプレシンのように、遺伝子が欠損すると水分の調節に深刻な異常をもたらすほどのものではない。そこで私は、真骨類の浸透圧調節に必須となる新しいホルモンを見つけたいと考えた。

アドレノメデュリン(AM)は、1993年にヒトの副腎髄質由来の褐色細胞腫から単離された新しいホルモンであり、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)ファミリーの一員であるとされていた。AMは哺乳類において実に多様な機能をもつことが明らかになっているが、中でも強力な血管拡張・降圧作用という循環調節作用、利尿・ナトリウム利尿作用という体液調節作用をもつホルモンである。このように重要な機能をもつにもかかわらず、これまで哺乳類以外の動物におけるAMの研究例はない。そこで本研究では、このホルモンが硬骨魚真骨類において体液調節に重要な役割を果たすのではないかと考え、AMの同定と機能の解析を試みた。修士課程においてトラフグを用いてAMを同定したところ、AMは真骨類において5種類に多様化したファミリーをつくっていることが明らかになった。また、この発見をも

とに哺乳類で新しいホルモンである AM2 を同定し、哺乳類においても AM が多様化していることを明らかにした。そこで博士課程では、CGRP ファミリー全体の多様化の歴史を脊椎動物において解析するとともに、真骨類における AM ファミリーの生理作用を、体液調節作用および血圧調節作用を中心に解明することを目的とした。

【結果】

1. カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)ファミリーの分子進化

様々な動物種のゲノム情報を比較するという比較ゲノム学的手法により、AM が属する CGRP ファミリー全体の多様化の歴史を探った。哺乳類の CGRP ファミリーには AM のほか、CGRP とアミリンが属しているが、これらの遺伝子を真骨類で同定し、ゲノム上の位置を決定した。魚種は近年ゲノムデータベースが整備され、ゲノム上への遺伝子のマッピング技術が確立されたメダカを用いた。その結果、メダカにおいて AM を 5 種類(ヒトでは 2 種類)、CGRP を 2 種類(ヒトでは 2 種類)、アミリンを 1 種類(ヒトでは 1 種類)同定した。同定した各遺伝子をゲノム上にマッピングし、その周辺に存在する遺伝子をヒトと比較したところ、メダカ AM1/CGRP1 および AM4/CGRP2 の周辺遺伝子がともにヒト AM/CGRP- $\alpha$  の周辺で保存されていることがわかった。また、メダカ AM2 および AM3 はヒト AM2 と、メダカアミリンはヒトアミリンと周辺遺伝子のシンテニーが一致した(図 1)。すなわち、メダカ AM1/AM4 とヒト AM1、メダカ AM2/AM3 とヒト AM2 とはそれぞれオーソログであり、AM1/AM4 および AM2/AM3 は真骨類に特異的に起こったゲノム重複によって倍加したことがわかった。

CGRP は真骨類・哺乳類(ヒトやラット)ともに 2 種類存在するが、真骨類の CGRP1、CGRP2 が異なる染色体上に位置するのに対し、ヒトでは同一染色体上に近接して縦列に存在する。したがって、真骨類 CGRP はゲノムの倍加によって増えたが、ヒト CGRP は遺伝子の縦列重複によって増えたものである。また、メダカ AM5 遺伝子の周辺遺伝子はヒト AM1、AM2 のいずれとも一致せず、どちらのオーソログでもなかった。そのため、AM5 遺伝子の起源は古く、硬骨魚類と哺乳類を含む四足類とが分岐する以前から存在していたと考え、

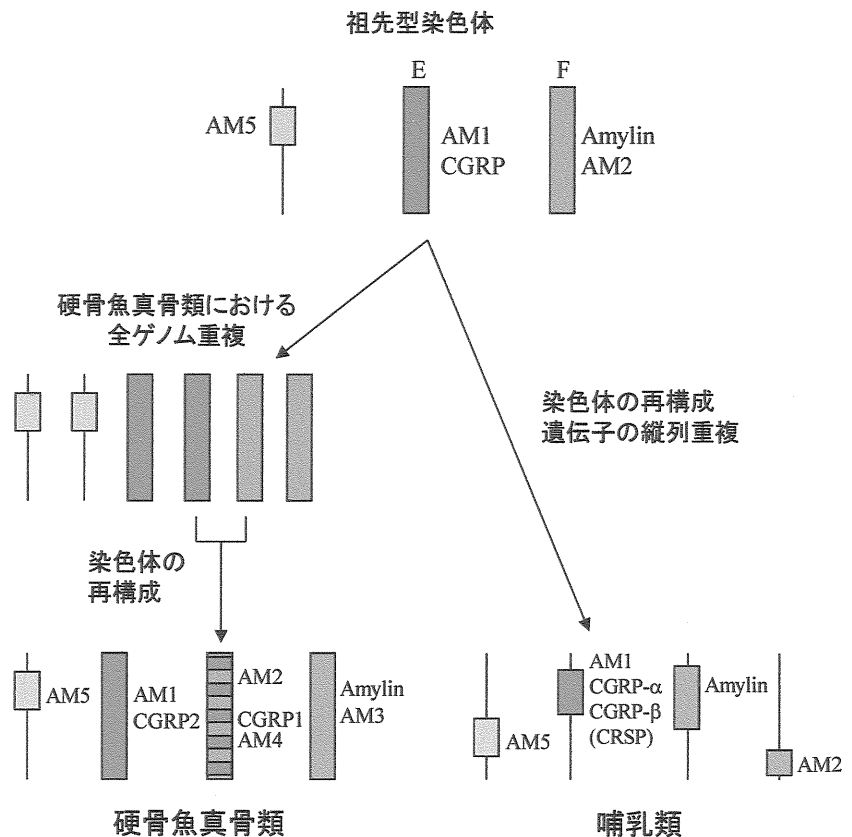


図 1 脊椎動物 CGRP ファミリーの分子進化モデル

哺乳類のゲノムデータベースで検索した結果、複数の種において AM5 遺伝子を発見することができた。これらのことから、AM ファミリーは哺乳類では3種類、硬骨魚類では5種類からなることが明らかとなった。

## 2. 異なる浸透圧環境への移行による AM ファミリー遺伝子の発現変化

真骨類 AM ファミリーの浸透圧調節への関与を調べるため、トラフグを異なる浸透圧環境に移行させ、その際の AM 遺伝子の発現変化をみた。そのため、まず様々な塩分濃度(淡水、10%海水、150%海水)に対するトラフグの適応性を調べたところ、淡水移行群では血漿浸透圧が下がり続けたため適応できなかったが、10%海水(体液浸透圧の約3分の1)と150%海水(体液浸透圧の約5倍)には適応した。淡水移行群において AM1 遺伝子は発現の増加が、AM2 遺伝子は発現の減少が認められた。AM1 遺伝子のこの増加は淡水適応に関する作用というよりも、適応できない環境下でのストレス応答や生体防御反応によるものと考えられる。実際、10%海水移行群では、AM 遺伝子の発現変化はみられなかった。また、150%海水移行群においても、AM 遺伝子の発現は変化しなかった。このように、遺伝子の発現レベルでは AM ファミリーが浸透圧調節作用に関与していることは明白ではなかった。また、環境浸透圧を変化させた際の血漿 AM 濃度の変化を調べるため抗体作成を試みたが、AM1、2ともに極めて免疫性が低く、測定に適した抗体が得られなかった。そこで、次に *in vivo* での AM の投与による循環・体液調節への影響をみることにした。

## 3. 硬骨魚真骨類における AM ファミリーの生理作用

生体内に AM を投与し、循環・体液調節への作用を調べる実験を行った。分子進化の解析によって明らかとなった祖先型3タイプを代表するものとして AM1、AM2、AM5 を選び、投与を行った。トラフグは血管へのカニューレ挿入など生理実験に必要な手術に適さなかったため、すでに当研究室において個体レベルでの生理作用を調べる手法が確立しているウナギを実験動物として用いた。ウナギで新たに同定した AM1、AM2、AM5 のアミノ酸配列からペプチドを合成し、淡水に馴致したウナギに投与した。背側大動脈の血管、食道、膀胱にそれぞれカニューレを挿入し、血圧、飲水量、尿量を測定した。投与法は血管に挿入したカニューレからホルモンを投与する末梢投与、および頭蓋骨に固定した脳室内カニューレから投与する中枢投与の2種類を行った。その結果、AM2 と AM5 が強力な血圧降下作用を示した(図2A)。これらのホルモンによる降圧作用は、最大用量においてこれまでに知られた降圧ホルモンである ANP よりも強かった。また、ヒト AM2 を投与したところ、ウナギ AM2 と同程度に血圧を低下させた。哺乳類では最も強力な効果をもつヒト AM1 は血圧を変化させなかった。こうした血圧の変化は心臓から鰓に向かう腹側大動脈、および鰓から全身の血管に向かう背側大動脈の両方で測定したが、AM サブファミリーによる降圧作用は背側大動脈の方が強力であった。さらに、中枢投与により、AM2 は血圧を上昇させた。これは交感神経系の刺激によるものと思われる。中枢投与した AM5 は血圧を低下させたが、その作用は末梢投与時よりも弱かった。これらのことから、AM2、AM5 は哺乳類 AM と同様に、血管を拡張させることによって血圧を下げていると考えられる。また、AM2、AM5 は、ウナギの飲水を強力に

促進させた(図 2B)。少量ずつの投与により血圧を一定に保った条件においても、これらのホルモンは既知の飲水促進ホルモンであるアンジオテンシン II よりも強力に飲水を促進させることが明らかとなった。AM1 の投与によって飲水量は変化しなかった。中枢投与においては、どのホルモンも飲水を変化させなかったため、AM2、AM5 の飲水促進作用は血液中から血液脳関門のない脳内の領域を介して働いていると考えられる。さらに AM ファミリーの尿に対する調節を調べたところ、AM2 が抗利尿作用を示した。これらのことから、AM ファミリーは海水適応に関わっていることが示唆される。

#### 【まとめ】

比較ゲノム学の手法を活用することにより、脊椎動物における CGRP ファミリーの分子進化の歴史を解明した。真骨類における 5 種の AM の発見を起点として、条鰭類と肉鰭類の分岐以前に CGRP、AM1、AM2、AM5、アミリンが存在していたこと、および真骨類ではこれらが全ゲノム重複による倍加と淘汰を経て多様化したことを明らかにするとともに、哺乳類で AM2 と AM5 を発見した。

トラフグの異なる浸透圧環境への移行実験により、トラフグが適応できない淡水への移行によって AM1、AM2 遺伝子の発現が変動することがわかったが、適応できる環境では変化がみられなかった。遺伝子レベルでの調節を検出できなかったため、ウナギを用いた *in vivo* の生理実験を行い、真骨類において AM1 よりも AM2 と AM5 が既知のホルモン以上に強力な循環調節作用および体液調節作用を示すことを明らかにした。これまでに知られている真骨類の AM 受容体への親和力は AM1 が最も強いこと、哺乳類においては AM1 が AM2 や AM5 よりも強力な作用を示すことから、真骨類における AM2/AM5 に特異的な新しい受容体の存在が示唆される。

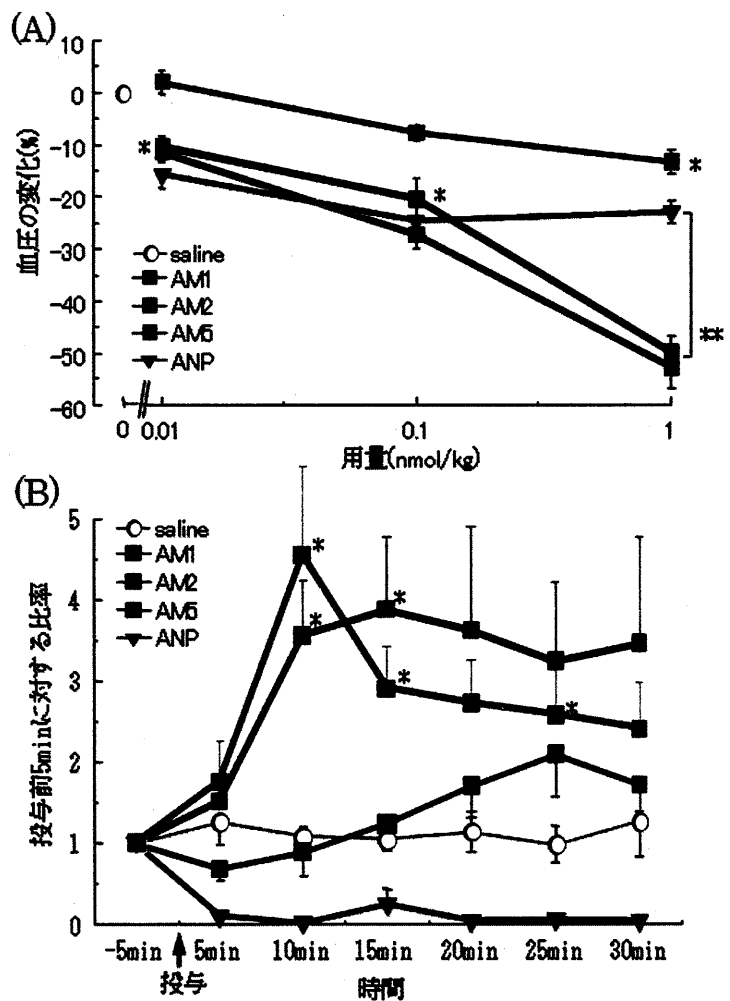


図2 ウナギの血中に AM ファミリーを投与した際の変化。(A)血圧変化、(B)飲水量の変化 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$