シリーズ 新しい内分泌現象

ホヤの神経ペプチド・ペプチドホルモンの研究で
わかったこととその意義

佐 竹 炎 ((財) サントリー生物有機科学研究所)

E-mail: satake@sunbor.or.jp

1. はじめに—何で「ホヤ」??—

我々の内分泌系や神経系はどのように成り立ってきたのか? この内分泌学、神経科学、進化生物学における本質的な問いに答えるにはいくつかのアプローチが考えられるが、筆者らは原索動物の一種、ホヤに着目している。ホヤの代表種であるカタユウレイボヤ(図1: 左)は、浅瀬に生息する固着性の海洋生物で、ほとんどの運動能力を放棄しており(筆者はこれまでに哺乳類から昆虫、軟体動物、環形動物、ユムシなど、メジャーな生物から「ゲテモノ」と称されるマニアックな生物まで扱ってきたが、消化管に筋肉を持たない生物はホヤが初めてだった)、海水中で沈降してくるプランクトンをろ過摂食して成長し、配偶子を放出して子孫を残すというサイクルを繰り返す、単純でゆったりとした(少なくとも、見かけ上は)生活を送る。原索動物は脊椎動物の共通祖先から最も遅く分岐し

た(図1: 右)と考えられていることから、ホヤは脊椎動物の神経系や内分泌系の「プロトタイプ」を維持していると予想される。また、カタユウレイボヤでは、現在までにゲノムやESTの情報が完備され、DNAマイクロアレイ法やトランスジェニック体作製法が確立されているため、分子生物学的実験やゲノム科学的実験をやり易い。それに加え、入手と飼育が容易であり、成体の体長が10~15センチで半透明な体であることから、蛍光標識されたタンパクなどの動態をリアルタイムで追跡することが可能であり、卵巣、精巣、消化管、中枢神経の摘出と生理活性検出実験が容易な大きさであるという長所がある。したがって、内分泌学や比較内分泌学、特に、生殖や摂食機構の研究対象として大変優れた性質を有していると筆者らは考えた。一方、ホヤは、脊椎動物と異なり骨格を有しておらず、ホルモンを標的器官に送達する循環器系が未

図1 カタユウレイボヤ成体の模式図(左)と系統分類図(右)

発達である。さらに、ホヤには下垂体に相当する明確な器官がこれまで確認されていないことから、下垂体を中心とする内分泌系の起源や誕生を考える上でも、重要な位置を占めると考えられる。このような研究上の長所や重要性があるにもかかわらず、筆者らが研究に着手する前は、ホヤを対象としたホルモンペプチドや神経ペプチドの研究はほとんどなく、CCK/gastrin 同族体の発見、Sherwoodらによるスボヤからの GnRH、インシュリン様ペプチド、PACAP の発見、寺門らによるホヤ GnRH による放卵誘導の検出、津田らによる光刺激の GnRH ニューロン興奮作用の発見などに留まっていた¹⁾。

このような背景から、筆者らは (1) カタユウレイボヤに存在する低分子伝達物質とペプチド性伝達物質、および、これらの受容体を全て同定し、(2) それらの生殖系や消化器系における生理機能を明らかにして、我々の神経系や内分泌系のプロトタイプを突き止め、脊椎動物の内分泌系や神経系の機能の進化・多様化の起点を見極めること、さらに、(3) 新たなモデル生物としてカタユウレイボヤを確立し、複雑な哺乳類の内分泌系を解明することを目指して研究に取り組んでいる。本稿では、本学会で特に関心が高いことが予想されるホヤから発見されたペプチドや受容体について、分子種や機能を紹介するとともに、ホヤならではの研究の展望と期待を述べたい。

2. 質量分析とゲノムデータベース検索によるペプチドの検出

ペプチド、あるいは、その遺伝子の同定手法は主に2つ考えられる。一つは、ゲノム/EST データベース上での遺伝子やペプチドの相同性検索である。この方法は、比較的長いアミノ酸配列 (20 残基以上) を有し、既知のペプチドファミリーと相同性が高い場合や、コンセンサス配列を有している場合に有効である。筆者らも、後述するように、相同性検索によってカタユウレイボヤからカルシトニンを発見することができた。反面、アミノ

酸配列が15残基以下の短いペプチドや新規ペプチドは相同性検索では原則として検出が難しい。前駆体は長いアミノ酸配列を有するが、ペプチド領域を除くと配列保存性が低いため、同様に相同性検索は困難である。さらに、配列相同性に頼らず、ペプチド遺伝子の特徴を有する遺伝子をゲノムやESTにおいて情報生物学的に予測し、検索する方法も考えられるが、最終的には膨大な配列データを自分の目で確認することになり、期待するよりも良い結果が得られない。そこで、脳や分泌器官のペプチド画分を質量分析によりペプチドミクスの解析する方法が考えられる。この方法で留意すべき点は、得られた質量分析値が、生理的に有意なペプチドに由来するのか、それとも、実験操作中に生じたタンパクの分解物に由来するかを区別することである。特に、C末がアミド化されていないペプチドの判別には、この区別が大変重要である。一般に、生理活性ペプチドの前駆体は、(1) N末に疎水性の高いシグナルペプチドを有する、(2) 2つの塩基性アミノ酸が連続して、もしくは偶数個 (0~4個) アミノ酸を挟んでいるプロセッシング配列 (Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Xaa-Xaa-Arg など) が成熟ペプチド配列の前後の少なくとも一方に存在しているという特徴を有する。

当研究所の川田は、カタユウレイボヤの中樞神経である神経複合体からペプチド画分を熱水やメタノールで抽出し、ゲルろ過後、システインのメチル化処理を施したものを LC-MALDI TOF/TOF MS で解析した後、得られたアミノ酸配列を MASCOT を用いてホヤゲノム/EST データベースと照合し、検出されたアミノ酸配列がペプチド由来かタンパク由来かを判定するという手順で、これまでに34個のペプチドおよびそれらの遺伝子を同定することができた (投稿論文準備中)。得られたペプチドは、3つに分類できる。一つ目は、脊椎動物の神経ペプチドやホルモンペプチドの同族体もしくはプロトタイプであり、タキキニン、ガラニン/ガラニン様ペプ

チド、GnRH、ニューロテンシン、ニューロペプチドY、カルシトニンなどである。二つ目は、脊椎動物の神経ペプチドやホルモンペプチドの同族体であるものの、ホヤ特異的に多様化したとみなせるもので、バソプレッシン、GnRH-X、RFアミドペプチドといったペプチドがあげられる。三つ目は、これまでの生物からも発見されていないペプチド群であり、それらの中には、C末に特徴的なコンセンサス配列を有するものが存在した。これらの結果で特に興味深いのは、これまで昆虫、軟体動物、環形動物、線虫などの無脊椎動物（これまでに同定されている無脊椎動物由来の神経ペプチドやホルモンの大部分は原口動物由来である¹⁾）では発見されていない、もしくは、存在しないと考えられていたタキキニン、ガラニン／ガラニン様ペプチド、ニューロテンシン、カルシトニンをホヤが有していることが明らかになったことであり²⁾、筆者らが研究開始時に想定した「ホヤは脊椎動物のホルモンペプチドや神経ペプチドの同族体やプロトタイプを多く有している」という仮説が立証されたことである。また、新規ペプチドはもちろん、相同性検索では検出できなかったペプチド同族体を質量分析で数多く同定できたことは、この研究戦略が有効であったことを物語っている。さらに、同族体もしくはプロトタイプと確認されたもののほとんどは、脊椎動物で摂食、生殖、浸透圧調節に関与していることがわかっているものであることも述べておきたい。これは、固着性の海洋生物であるホヤの特徴を反映しているものと考えられる。以降の章では、発表済みの成果を中心に各ペプチドや受容体について紹介していきたい。

3. タキキニン

3.1 タキキニンとは？

タキキニン (TK) は哺乳類で痛覚伝達、炎症促進、中枢神経興奮、血管拡張など、極めて多様な生物現象に関与している脳腸ペプチドであり、視床下部を含む中枢神経や消化管

の末梢神経の他、生殖線、血球、甲状腺などにも発現している³⁾。本誌読者は、TKファミリーの一種、Neurokinin B (NKB) によるGnRHニューロンの制御機構⁴⁾を最近の話題として目にしておられるかもしれない。ほぼ全てのTKにPhe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH₂というコンセンサス配列がC末に保存されていることが特徴である³⁾。これまでに哺乳類からSubstance P (SP)、Neurokinin A (NKA)、NKB、Hemokinin/Endokinin (HK/EK) の4種類のタキキニンが同定されている(表1)。他の脊椎動物でもSP、NKA、NKBの同族体が単離されている³⁾。HK/EKは哺乳類以外からの単離の報告はない。SP、NKA、NKB、およびHK/EKは、図2に示すように3種類の遺伝子にコードされている³⁾。TAC1 (PPTA) 遺伝子はSPとNKAを別々のエキソンにコードしており、splicing variantsによりSPのみを生成するもの、SPとNKA双方を生成するものが存在する。NKBはTAC3 (PPTB) 遺伝子にコードされており、splicing variantは存在しない。TAC4 (PPTC) はHK/EKをコードする遺伝子であり、ヒトでは4種類のsplicing variantsを生じる。TAC1遺伝子やTAC3遺伝子がフグのゲノム上に存在しており、少なくともSP、NKA、NKB遺伝子は脊椎動物全体で保存されていると考えられる。また、種々のカエルの皮膚からは、同種のSP、NKA、NKBと異なるタキキニンペプチドが多数単離されている³⁾。これらは、伝達物質ではなく、病原菌や外敵から身を守る抗菌物質や防御物質として機能していると考えられる。

TKの受容体はClass AのGPCRに属し、哺乳類にはNK1、NK2、NK3の3種類が存在している³⁾。NK1はSPとHK/EKに、NK2はNKAに、NK3はNKBにそれぞれ緩やかな、しかし、明確な選択性を示し、細胞内カルシウム動員とcAMP生成の双方を促進する³⁾。細胞内カルシウム動員とcAMP生成には、それぞれ異なる活性コンフォメーションを形成すると考えられている³⁾。

原口動物から単離されたTKファミリーは二種に分類される^{3, 5)}。一つは脊椎動物のTKと同様のC末コンセンサス配列を持つ無脊椎動物タキニン (Inv-TK) であり、タコや蚊の唾液腺から単離されている (表1)。Inv-TKは、脊椎動物の消化管に典型的なTK様活性を示す。しかし、唾液腺のみに発現しており神経や消化管には存在しないこと、および、生成する動物個体に対して一切の生理作用を示さないことから、Inv-TKは神経ペプチドとして機能しているのではなく、捕食時に獲物に作用する毒性因子として機能すると考えられる^{3, 5)}。Inv-TKは、前駆体で1コピーだけペプチド配列がコードされている (図2)。一方、原口動物の神経系や消化器系からは、タキニン保存配列と類似した配列、-Phe-Xaa1-Gly-Xaa2-Arg-NH₂ (Xaa1とXaa2は種々のアミノ酸) を有するペプチド、タキニン関連ペプチド (TKRP) が数多く単離されている^{3, 5)}。TKRPは由来動物の神経系

や消化器系にTK様作用を示すので、原口動物におけるTKの機能的相当物と考えられる。TKRP前駆体は通常5~10個のTKRPをコードしているが (図2)、その構成は種による多様性が高い^{3, 5)}。このような前駆体構成は、脊椎動物のTKの前駆体と明らかに異なる特徴である。

TKRPの受容体はショウジョウバエ、ユムシ、マダコから単離されている。これらは、TK受容体と同様にClass AのGPCRであり、リガンドと結合することにより細胞内カルシウムを動員することが知られている^{3, 5)}。しかし、TKRPの受容体はNK1-3に見られるようなリガンド選択性を持たず、複数のTKRPとほぼ同等の結合親和性を示すという点がTK受容体と異なる薬理学的性質である^{3, 5)}。

一方、原索動物や棘皮動物などの新口無脊椎動物からのTKやTKRPおよびこれらの受容体の存在は、筆者らがカタウレイボヤからCi-TKを発見するまで報告されていなかった

表1 主なタキニンやタキニン関連ペプチド

Species	Peptide	Sequence
脊索動物門のタキニン		
Mammals	Substance P Neurokinin A Neurokinin B Endokinin A/B Endokinin C Endokinin D	RPKPQQFFGLM-NH ₂ HKTDSEFVGLM-NH ₂ DMHDFVGLM-NH ₂ GKASQFFGLM-NH ₂ KKAYQLEHTFQGLL-NH ₂ VGAYQLEHTFQGLL-NH ₂
Frog (<i>Bufo marinus</i>)	Bufokinin	KRPDQFYGLM-NH ₂
Dogfish (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	Scyliorhinin	AKFDKFYGLM-NH ₂
Ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)	Ci-TK-I Ci-TK-II	HVRHFFYGLM-NH ₂ ASFTGLM-NH ₂
カエル皮膚由来のタキニン		
<i>Physalaemus biligonigerus</i>	Physalaemin	pEADPNKFYGLM-NH ₂
<i>Agalychris callidryas</i>	AC-AR-1	GPPDPDRFYPGM-NH ₂
原口動物唾液腺由来のタキニン		
Octopus (<i>Eledone aldovrandi</i>) (<i>Octopus vulgaris</i>)	Eledoisin Oct-TK-I	pEPSKDAFIGLM-NH ₂ KPPSSSEFIGLM-NH ₂
原口動物唾液腺由来のタキニン関連ペプチド		
Cockroach	Lem-TRP-1	APSGFLGYR-NH ₂
Fruitfly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	DTK-1	APTSSFIGMR-NH ₂
Echiuroid (<i>Urechis unicinctus</i>)	Uru-TK I	LRQSQFVGAR-NH ₂

ホヤ由来のものは太字で示す

た。

3.2 ホヤのタキニンと受容体の構造と機能

このような状況における筆者の最初の疑問は、脳腸ペプチドとしての真のタキニン
は脊椎動物で誕生したのか、それとも、新口
無脊椎動物ですでに存在していたのかという

ことだった。そこで、質量分析とゲノムデー
タベース解析を行ってみたところ、カタユウ
レイボヤから、TKコンセンサス配列を有す
るペプチド、Ci-TK-Iと-II、および、その遺
伝子を同定した⁶⁾。Ci-TKのアミノ酸配列は
Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH₂、すなわち、脊椎

A. human tachykinin precursors

B. chordate tachykinin precursor

C. frog skin tachykinin precursors

D. invertebrate tachykinin precursors

E. invertebrate tachykinin-related peptide precursors

図2 主なタキニンやタキニン関連ペプチドの前駆体

動物型のTKモチーフを保存していた(表1)。また、その前駆体の構成はCi-TK-Iと-II配列をコードするという、 γ -TAC1のそれと酷似していた(図2)。さらに、Ci-TKは、原口動物由来のTKRPには見られず、脊椎動物TKに典型的なモルモットの回腸収縮活性を示す。以上より、Ci-TKは脊椎動物型のタキキニンの構造と薬理学的性質を有することが明らかになった⁶⁾。これは無脊椎動物からの初めての脊椎動物型タキキニンの発見であり、従来の仮説を覆し、脊椎動物型タキキニンは少なくとも脊椎動物と原索動物の共通祖先で誕生していたことが示された。一方、脊椎動物のTAC1は別々のエキソンにSPとNKAをコードし、選択的スプライシングによりSPのみ、またはSPとNKAをコードする転写物を生成するのに対し、Ci-TK-Iと-IIは一つのエキソンにコードされていて(図2)、splicing variantによる選択的ペプチド生成を行わない^{1, 2, 6)}。したがって、脊椎動物のTK遺伝子は、最初にはCi-TK遺伝子様の原始遺伝子から、進化の過程で選択的スプライシング機構によるTKペプチドの選択的生成を獲得したと推察される。Ci-TK遺伝子はカタユウレイボヤ成体の神経複合体、内柱、消化管で発現が認められた(内柱は哺乳類の甲状腺を含む咽頭器官に相当する)。このことから、原索動物と脊椎動物の共通祖先において、タキキニンは脳腸ペプチドとしてのみならず、ホルモ的な制御因子としての生理的役割をすでに獲得していたことが推定される。

カタユウレイボヤでは、Ci-TK-Rが唯一のCi-TK受容体として存在している⁶⁾。分子系統樹解析からCi-TK-RはNK1、NK2、NK3と共通の祖先から分岐したClass A GPCRであること、および、*Xenopus* oocyteに発現させると、Ci-TKと反応して細胞内カルシウム動員を誘導することが示された⁶⁾。また、SPとNKAはCi-TKとほぼ同等にCi-TK-Rを活性化するのに対し、NKBはCi-TK-Rを全く活性化しないという、「all or nothing」なりガンド選択性を示す⁶⁾。この知見から、Ci-

TK-R様受容体プロトタイプからNK1、NK2、NK3に遺伝子重複により誕生し、緩やかなリガンド選択性を獲得したと考えられる。したがって、上述したTKリガンドの分子・機能の進化と歩調を合わせるにより、ペプチドと受容体が「共進化」していったことが推察される。

3.3 ホヤで発見した新たな生理機能：プロテアーゼ活性化を介した卵細胞成長機構

次のステップとして、筆者らはカタユウレイボヤにおけるCi-TK-Iの生理機能の解明を目指した。上述したように、タキキニンは哺乳類において多彩な生理作用を有することが知られているが、卵巣における作用は、受容体が発現しているにもかかわらず、不明のままであった。その理由として、TKは血管拡張作用を有するので、卵巣内を網羅している毛細血管への影響による二次的な作用との区別が困難であったことに加え、哺乳類の複雑な性周期、成長可能な各成長段階の卵細胞を実験試料として確保することが困難なことなどが挙げられる^{7, 8)}。一方、カタユウレイボヤは卵巣内に各成長段階の卵細胞を常に大量に蓄えており、人工海水中で1週間程度の卵細胞の培養が可能であり、さらに、明確な毛細血管が卵巣内に発達していない。また、筆者らはCi-TK-Rが神経複合体、消化管に加えて卵巣に多量に発現していることをRT-PCRで確認していた⁶⁾。したがって、Ci-TK-Rの卵巣内における局在を確認できれば、Ci-TK-Iの卵巣または卵細胞における生理機能の解明が可能であると予測した。そこで、当研究所の青山は、免疫染色によりCi-TK-Rが卵黄形成期後期(Stage-II)のtest cellに特異的に存在していることをまず明らかにし⁹⁾、Ci-TK-Iの卵巣における標的を絞った。次に、Ci-TK-Iで処理したホヤ卵巣では、未処理のものと比較すると、カテプシンD、カルボキシペプチダーゼB1、キモトリプシンといったプロテアーゼの遺伝子発現が顕著に上昇することをマイクロアレイと

リアルタイムPCRで明らかにした⁹⁾。さらに上記プロテアーゼの酵素活性も上昇することを見出した⁹⁾。カテプシンDは魚類や鳥類で卵黄タンパクのプロセッシングに¹⁰⁾、カルボキシペプチダーゼB1は哺乳類卵細胞の透明帯形成タンパクのプロセッシングにそれぞれ関与すること¹¹⁾が示唆されている。また、キモトリプシンはショウジョウバエやヒトデ卵細胞の成長を促進する可能性が報告されている^{12, 13)}。これらの知見から、Ci-TK-Iによるプロテアーゼ活性化は、ホヤ卵細胞の成長促進に重要であると考えた。この仮説を検証するために、慶応大学の岡・堀田との共同研究を通じて、カタユウレイボヤのStage-II卵細胞をCi-TK-Iで16時間処理後、濾胞の成長やミトコンドリア局在変動を指標に、共焦点蛍光レーザー顕微鏡を用いてCi-TK-Iの影響を観察した。その結果、50%以上のStage-II卵細胞がStage-IIIへ成長することを実証した⁹⁾。また、この成長促進作用は、Ci-TK-Rの合成アゴニストでも同様に検出できたのに対し、Ci-TK-Rのアнтаゴニストでは完全に阻害されたことから、Ci-TK-Iの作用の特異性が裏付けられた⁹⁾。さらに、Ci-TK-I存在下でカテプシンD、カルボキシペプチダーゼB1、キモトリプシンの各プロテアーゼに対する阻害剤を加えても、Stage-II卵細胞の成長は完全に抑制された。興味深いことに、上記のプロテアーゼ阻害剤のうち1種類を加えただけで卵細胞成長が完全に抑制されることから、同プロテアーゼが協調して作用しなけ

れば、卵細胞が成長できないことが示された。これらの成果から、Ci-TK-Iの卵巣における作用は、Stage-II卵細胞のtest cellに作用してカテプシンD、カルボキシペプチダーゼB1、キモトリプシンの遺伝子発現と酵素活性を上昇させ、Stage-IIIへの成長を誘導することであると結論した(図3)。この成果は、全生物を通じて初めてのタキキニンの卵巣における生理機能の解明であり、タキキニンの新たな生物学的意義と新規卵細胞成長機構の発見である。なお、本成果は、アメリカ内分泌学会の機関誌Endocrine News (Jun, 2008)や読売新聞、産経新聞、日経産業新聞、京都新聞などでも報道され、予想以上の社会的関心を集めた。現在、このタキキニンによる卵細胞成長機構が脊椎動物でも保存されているかを検討している。詳細はまだこの場で明らかにできないが、これまで、マウス二次卵胞の顆粒膜細胞に哺乳類のタキキニン受容体であるNK1, 2, 3全てとカテプシンDが特異的に共局在していることや、奈良女子大の安田との共同研究でマウス卵胞をタキキニン受容体アンタゴニストで処理すると、成長が抑制されることが判明している。この結果から、タキキニンによるプロテアーゼを介した卵細胞成長機構は、哺乳類でも保存されている可能性が示唆された。ホヤでも哺乳類でも、上記プロテアーゼの作用機序はまだ未解明であるものの、Ci-TK-Iの発見を出発とする一連の研究は、哺乳類等を直接用いては困難な内分泌学的・神経内分泌学的機能解析において、カ

図3 Ci-TK-Iによる卵細胞成長機構概略図

タウレイボヤが優れた新規モデル生物としてのポテンシャルを有することを示している。哺乳類で、この「ホヤ発」のタキキニンによる卵細胞成長機構の存在が確立できれば、従来とは異なった不妊症の予防や治療、および、家畜やペットの優良種の効率的な繁殖へ展開できると期待している。また、同卵細胞成長機構が魚類、両生類、鳥類でも保存されているかどうかについても大変興味を持っている。うまくいけば、この卵細胞成長機構の進化・多様化の道筋が明らかになるとともに、有用種の養殖や増産などへの応用に展開できるかもしれない。生憎、人手と技術の双方が不足しているので実施の目処は全く立っていないが、もし、何らかのアイデアやご提案があれば、是非ご一報ください。

4. ギナドトロピン放出刺激ホルモン(GnRH)

4.1 GnRHとは？

GnRHは視床下部から分泌され、脳下垂体からの濾胞刺激ホルモン(FSH)と黄体形成ホルモン(LH)の放出を促進し、生殖細胞の成熟を誘導するペプチドホルモンである¹⁴⁾。脊椎動物のGnRHは10残基で構成され、1番

目から4番目までの配列、6番目のグリシン、9番目のプロリン、10番目のグリシン、C末アミド化は高度に保存されている(表2)。これまで、脊椎動物、ホヤ、軟体動物(マダコ、アメフラシ)で同定されており、幅広い生物種に分布していると考えられる^{14, 15)}。しかし、その分布やサブタイプの存在はかなり複雑である。脊椎動物では、基本的に哺乳類まで保存されているGnRH-1と-2に加え、一部の硬骨魚類特有のサブタイプ、GnRH-3の3種類のGnRHが存在している。詳細は本誌既刊号の大久保の記事を参照されたい¹⁶⁾。円口類では、I-GnRH-IIが他の脊椎動物のGnRHと同様に6番目のグリシンを保存しているが、I-GnRH-IとI-GnRH-IIIには保存されていない¹⁷⁾。6番目のグリシンは受容体と結合後の活性化に必要な立体構造を形成するために必要だと考えられていることから¹⁴⁾、これらは、魚類のGnRHのorthologではなく、円口類特有に生じたパラログであると考えられる。軟体動物から同定されたGnRHは脊椎動物GnRHの1番目と2番目に相当する位置にアミノ酸2残基が挿入されており、12残基から構成されるが、上述の脊椎動物GnRHの

表2 主なGnRHの配列

Peptide	Sequence	Species
GnRH-I	pQHWSYGLRPG-amide	Human (<i>Homo sapiens</i>)
GnRH-II	pQHWSHGWYPG-amide	Human (<i>Homo sapiens</i>)
GnRH-III	pQHWSYGWLPG-amide	Fish (<i>Salmo salar</i>)
IGnRH-I	pQHYSLEWKPG-amide	Sea lamprey (<i>Petromyzon marinus</i>)
IGnRH-II	pQHWSHGWFPG-amide	Sea lamprey (<i>Petromyzon marinus</i>)
IGnRH-III	pQHWSHDWKPG-amide	Sea lamprey (<i>Petromyzon marinus</i>)
t-GnRH-1	pQHWSDYFKPG-amide	Ascidian (<i>Chelyosoma productum</i>)
t-GnRH-2	pQHWSLCHAPG-amide	Ascidian (<i>Chelyosoma productum</i>)
t-GnRH-3	pQHWSYEFMPG-amide	Ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)
t-GnRH-4	pQHWSNQLTPG-amide	Ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)
t-GnRH-5	pQHWSYGYMPG-amide	Ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)
t-GnRH-6	pQHWSKGYSPG-amide	Ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)
t-GnRH-7	pQHWSYALSPG-amide	Ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)
t-GnRH-8	pQHWSLALSPG-amide	Ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)
t-GnRH-9	pQHWSNKLAPG-amide	Ascidian (<i>Ciona savignyi</i>)
Ci-GnRH-X	pQHWSNWWIPGAPGYNG-amide	Ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)
oct-GnRH	pQNYHFSNGWHPG-amide	Octopus (<i>Octopus vulgaris</i>)
ap-GnRH	pQNYHFSNGWYA-amide	Sea hare (<i>Aplysia californica</i>)

ホヤ由来のものは太字で示す

共通配列をよく保存している^{14, 15)}。脊椎動物および原口動物から発見されているGnRHの前駆体は、GnRH配列を一つだけコードしている(図4)。

GnRHの受容体(GnRHR)はClass Aに属するGPCRであり、主なセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウムを発生させる^{14~17)}。脊椎動物は少なくとも1種類のGnRHRを有する。哺乳類のGnRHR1はC末が短いのに対し、それ以外の脊椎動物のGnRHR1は長いC末を有する。GnRHR2の動物種分布はやや複雑である。ヒト、チンパンジー、ヒツジ、ウシではGnRHR2が欠損もしくはナンセンス変異などで不活性化されているのに対し、サル、ブタ、爬虫類、両生類では機能するGnRHR2が確認されている^{14~16)}。マウスや魚類ではGnRHR2遺伝子そのものが存在しないが、魚類では、GnRHR1やGnRHR2と別系統に分類されるGnRHR3が確認されている^{14~16)}。また、GnRHR1はGnRH-1と-2に高い反応性を示すのに対し、GnRHR2はGnRH-2に特異的に反応する^{14~16)}。原口動物では、マダコからoct-GnRHRがクローニングされ、脊椎動物のGnRHRと同様に細胞内カルシウムをセカンドメッセンジャーとして動員することが知られている¹⁵⁾。最近、ナメクジウオから4種類のGnRHRが発見された¹⁸⁾。分子系統樹解析の結果、2つのGnRHRは脊椎動物型、残りの2つはマダコのGnRHRや昆虫などの脂質代謝ホルモン受容体とサブグループを形成する「原口動物型」であることが示され、頭索動物から脊椎動物に進化する過程で「原口動物型」が失われたのではないかと推測されている¹⁸⁾。なお、ナメクジウオから哺乳類のGnRH-1と同配列を有するペプチドを単離したと最近報告されたが¹⁹⁾、ゲノム中にこの配列が存在しないことから、何らかのミスだと考えられる(この論文の著者らは配列が短いためにゲノムデータベースで探索できないと述べているが、10残基程度でも完全に配列が合っていれば、通常のBLAST検索

A. human GnRH precursor

B. ascidian GnRH precursor

C. invertebrate GnRH precursor

図4 主なGnRHの前駆体

を用いてデータベース上で検出できる。また、同論文の実験項において、単離における実験法に単純な記述ミスとは思えない矛盾がある)。

4.2 ホヤから発見されたGnRH

ホヤにおけるGnRH研究は、やや玉石混交の様相を呈しているものの、比較的歴史が古く、また幅広い。1997年に、Sherwoodらが無脊椎動物のGnRHとして初めての例となる2種類のGnRH、t-GnRH1とt-GnRH2をスボヤから発見している²⁰⁾。2000年には、カタユウレイボヤからヒトGnRHと全く同じ配列を有するGnRHの発見が報告されているが²¹⁾、この配列がカタユウレイボヤゲノム上に存在しないことから、この結果は実験中の混入物によるものと現在はみなされている。その後、Sherwoodのグループにより、真のカタユウレイボヤ由来のGnRHが6種類(t-GnRH-3~t-GnRH-8)同定された²²⁾。これらは脊椎動物のGnRHと同様、10残基からなり、C末はアミド化されている(表2)。

特に、N末とC末が大変よく保存されており、原口動物から発見されているGnRHよりも脊椎動物に近い配列を保存している。反面、受容体を活性化するための構造変換に重要な6番目のグリシンを保存しているのはt-GnRH-6のみであり、この点は、円口類で発見されたGnRHサブタイプと同様の多様化とみなせるかもしれない。最も驚くべきことは、他に例を見ない3つのGnRHが1つの遺伝子にコードされているという前駆体構造である²²⁾。すなわち、t-GnRH-3、t-GnRH-5、t-GnRH-6はci-gnrh-1遺伝子に、t-GnRH-4、7、8はci-gnrh-2遺伝子にコードされている(図4)。同様の遺伝子構造は、近縁種のユウレイボヤでも確認されている²²⁾。したがって、このようなGnRHのバリエーションの多さと、それに相関する独特の前駆体構成は、少なくとも一部のホヤ類で独自に多様化したものと推定される。この前駆体構成が、他のホヤ類や脊索を有するもう一種の動物門、頭索動物に属するナメクジウオでも保存されているのか、興味深いところである。さらに、川田らは、カタユウレイボヤから大変ユニークなGnRH様ペプチド、Ci-GnRH-Xを発見した²³⁾。このペプチドは、他のGnRHと異なり、16残基からなり、N末ではGnRHコンセンサス配列が保存されていて、C末はアミド化されているものの、他の部分はこのペプチドとも相同性を示さない(表2)。一方、Ci-GnRH-Xの前駆体は、Ci-GnRH-Xを一つだけコードしており、他のGnRH前駆体と同様の構成を有している(図4)。このようなGnRH様ペプチドは他の生物では発見されていないことから、Ci-GnRH-XはGnRHの祖先遺伝子からホヤ特異的に誕生したペプチドであると考えられる。

ci-gnrh-1遺伝子は成体の神経複合体に存在する多数の神経細胞に発現し、それにコードされるt-GnRH-3, 5, 6も質量分析によって確認された²³⁾。一方、ci-gnrh-2遺伝子の発現は成体の神経複合体ではほとんど確認できず、コードされているt-GnRH-4, 7, 8も質量

分析で検出されなかった²³⁾。全てのt-GnRHは質量分析において同等の検出感度を示すことを、合成ペプチドを用いた予備実験で明らかにしていることから、成体の神経複合体で主に機能しているのはt-GnRH-3, 5, 6であると結論した。また、ci-gnrh-X遺伝子も成体の神経細胞に発現しており、その大部分はci-gnrh-1遺伝子が発現している神経細胞と同じであることを二重*in situ* hybridizationで突き止めている²³⁾。このような共発現から、t-GnRH-3, 5, 6とCi-GnRH-Xは協調して何らかの作用を示すことが示唆された。以上のように、ホヤでは他に例を見ないGnRH分子の多様化が生じていることが明らかになった。

4.3 ホヤのGnRHRの分子種と機能の多様性

上述したように、ホヤに多数のGnRHバリエーションが存在することから、受容体の種類、リガンド選択性、および生理機能もそれに応じて複雑になっていることは容易に予想される。これまでに他の生物と共通するものとホヤ特異的なものの両面が多角的に明らかにされている。まず、Sherwoodらや日下部らにより、カタユウレイボヤには4種類のGnRH受容体、Ci-GnRHR1, 2, 3, 4が存在することが明らかになった^{24, 25)}。分子系統樹解析から、Ci-GnRHR2, 3, 4はカタユウレイボヤに特異的に生じたパラログであり、脊椎動物のGnRH受容体サブタイプに相当するものではないと結論されている^{24, 25)}。さらに、これらの受容体は、前述したカタユウレイボヤのGnRH、t-GnRH3~8と選択的に反応することが明らかになっている²⁴⁾。Ci-GnRHR1は、t-GnRH6と反応して細胞内カルシウムを動員するだけでなく、cAMPの生成も促進する。また、t-GnRH6より10倍程度弱いものの、t-GnRH7, 8もcAMPの生成を誘導する。Ci-GnRHR2は、cAMP生成のみを促進する受容体であり、t-GnRH7, 8, 6の順序で強く反応する。Ci-GnRHR3は、t-GnRH3, 5のみと特異的に反応し、cAMP生成のみを促進する。また、細胞内カルシウ

ム動員を誘導する t-GnRH6 のみが 6 番目にグリシンを有することから、t-GnRH6 と Ci-GnRHR1 の組み合わせが多く、多くの生物種で保存されているシグナル伝達機構であると同時に、他のリガンドと受容体パラログがホヤ特有の GnRH 制御機構を多様化していると考えられる。

一方、当研究所の酒井は、t-GnRH6 は細胞内カルシウム動員を介してカルシウム依存性プロテインキナーゼ C (PKC)- α とカルシウム非依存性 PKC- ζ を、t-GnRH5 は Ci-GnRHR1 を介して既知のセカンドメッセンジャー発生を経ずに PKC- ζ を活性化し、ERK1/2 のリン酸化を誘導することを明らかにしている²⁶⁾。さらに、Ci-GnRH-X は t-GnRH と異なる独特の作用を示すことが川田らにより明らかになった。すなわち、Ci-GnRH-X は受容体を活性化するのではなく、t-GnRH6 の Ci-GnRHR1 への作用、並びに、t-GnRH3,5 の Ci-GnRHR3 への作用を穏やかに阻害すること、すなわち、Ci-GnRH-X は内因性の抑制因子であることが判明した²³⁾。これは、GnRH 受容体に対する内因性抑制因子の初めての発見例である。

他の 3 種の受容体と異なり、Ci-GnRHR4 はどの t-GnRH や Ci-GnRH-X とも結合せず、オーファン受容体もしくは無機能の受容体と考えられていた²⁴⁾。しかし、RT-PCR による組織発現分布では、Ci-GnRHR4 は多くの組織で発現しており、しかも、その発現分布は Ci-GnRHR1 と酷似していた²⁴⁾。この結果から、Ci-GnRHR4 は無機能受容体ではなく、Ci-GnRHR1 と機能的に関連していることが推定された。そこで筆者らが着目したのは、GPCR ヘテロダイマーだった。近年、ある GPCR が別の GPCR とヘテロダイマーを形成し、モノマーやホモダイマーと異なるリガンドとの結合親和性、シグナル伝達、インターナリゼーションを獲得することが明らかになっている²⁷⁾。このことから、Ci-GnRHR4 は Ci-GnRHR1 とヘテロダイマーを形成し、Ci-GnRHR1 の機能を制御するとい

う役割を担っているのではないかと推定した。そこで、酒井は、Ci-GnRHR1 と Ci-GnRHR4 の特異的抗体を作製し、免疫染色により Ci-GnRHR1 と Ci-GnRHR4 が卵細胞に存在する test cell に共存すること、および、ホヤ卵巣の膜タンパク画分を対象に免疫共沈を行い、Ci-GnRHR1 と Ci-GnRHR4 がホヤ生体内でヘテロダイマーを形成することを実証した²⁶⁾。また、Ci-GnRHR1 と Ci-GnRHR4 を HEK293MSR 細胞に共発現させ、免疫共沈と FRET 法を行い、Ci-GnRHR1 と Ci-GnRHR4 がヘテロダイマーを形成する証拠を肉付けした。次に、Ci-GnRHR1 と Ci-GnRHR4 を共発現させると、Ci-GnRHR1 単独発現と比較して、リガンドとの結合親和性に変化がみられないものの、t-GnRH6 の細胞内カルシウム動員の感度が 10 倍上昇すること、t-GnRH6 による PKC- α と PKC- ζ を介した ERK1/2 リン酸化、および t-GnRH5 による PKC- ζ を介した ERK1/2 リン酸化が数倍上昇することを明らかにしている²⁶⁾。以上の結果から、Ci-GnRHR4 は Ci-GnRHR1 のヘテロダイマーのパートナーとしての機能していることが結論付けられた (図 5)。この成果は、GnRH 受容体がヘテロダイマーを形成する最初の例であるとともに、GnRH 受容体とホヤ特異的な GnRH 受容体様オーファン受容体パラログが、ヘテロダイマーの形成を経て、高保存性の GnRH のシグナル伝達をリガンド選択的に制御するという、全く新規の機能の多様化メカニズムの報告である。さらに、これまでリガンドが発見されていないと考えられていた「オーファン受容体」の少なくとも一部は、リガンドと結合して機能するのではなく、Ci-GnRHR4 のように GPCR ヘテロダイマーのユニットとして機能するという新たな生物学的役割が明らかにされた²⁶⁾。この知見は、今後の GPCR 研究において一石を投じられる。事実、哺乳類ではメラトニン受容体や β -アラニン受容体は、各々のオーファン受容体パラログとヘテロダイマーを形成して、機能を制御してい

図5 Ci-GnRHR1 & Ci-GnRHR4ヘテロダイマーによるリガンド選択的なシグナル伝達調節機構
t-GnRH5とt-GnRH6がCi-GnRHR1を介して引き起こすそれぞれのシグナル伝達経路(細胞内カルシウム動員、PKCサブタイプ活性化、ERK1/2リン酸化を、Ci-GnRHR4とヘテロダイマーを形成することにより増強する。

る例が報告されている^{27, 28)}。すなわち、種特異的なオーファン受容体パラログによるヘテロダイマー形成は、多くの生物に保存されている「共通の」シグナル伝達機構に、種特異的な制御を与え、機能の多様性を創出しているという、これまでの遺伝子の分子進化と一線を画す新たな次元の生物の多様性獲得の仕組みが見え始めた。現在、どのGPCRがどのGPCRとヘテロダイマーを形成するか、あるいは、どのGPCRヘテロダイマーがどんな機能変換を起こすかという一般法則は不明であるため、ゲノム配列、配列相同性、遺伝子発現だけ眺めていてもGPCRヘテロダイマーの同定や機能解析は見当すらつかない状態である。したがって、その存在の重要性が認識されていても、多くの研究者はなかなか手を付けたがらないのが現状である。しかし、勇気と知恵を持って真摯に取り組むことにより、これまでに見えなかったGPCRの機能制御やそれが導く進化・多様化の世界が、GPCRヘテロダイマー研究の先に用意されているかもしれないと筆者らは考えている。

現在、酒井はCi-GnRHR2とCi-GnRHR4のヘテロダイマー形成とその機能変換についても検討中である。また、ホヤ生体内でのヘテロダイマー形成とその挙動をリアルタイムで解析するために、蛍光標識したCi-GnRHR1とCi-GnRHR4を導入したトランスジェニックホヤの作製にも筑波大の笹倉と共に着手している。これらの研究とともに、Ci-GnRHR1 & Ci-GnRHR4ヘテロダイマーの生殖行動などにおける生物学的意義やヘテロダイマーの組み合わせの法則の解明など、取り組むべき課題は大変多い。しかしながら、今までに明らかになった成果だけでも、リガンドと受容体の分子種と機能の拡大、内因性抑制因子の創出、および種特異的パラログとのヘテロダイマー形成を通じて、ホヤが予想以上に精密なGnRH制御機構を進化の過程で確立したことを明快に物語っており、生物の多様化の巧みさと奥深さをあらためて認識できたように思える。

5. バソプレッシン

5.1 バソプレッシンとは？

バソプレッシンとオキシトシンは9残基からなる神経葉ペプチドホルモンであり、前者は8番目のアミノ酸が塩基性、後者は中性アミノ酸が位置することで区別される²⁹⁾。その前駆体構造も大変類似しており、シグナルペプチド、一つのペプチド配列、システインを14個含有するという特徴的な配列を有するニューロフィジンという結合タンパク領域からなる(図6)。ニューロフィジンは、プロホルモン段階でペプチド部分と結合して複合体を形成し、小胞体からゴルジ体への輸送を誘導する²⁹⁾。逆に、この複合体形成が阻害されると、正常な輸送が妨げられ、尿崩症といった疾病の原因になることが知られている。哺乳類では、両者とも脳下垂体後葉から分泌されるホルモンとして機能し、バソプレッシンは浸透圧調節や飲水行動など、オキシトシンは乳汁分泌や子宮収縮といった出産・産卵行動を制御するほか、近年、脳内で記憶や学

習に関与する神経ペプチドとしての役割が近年注目されている^{29~31)}。哺乳類以外の脊椎動物バソプレッシンとオキシトシンの同族体では、前者がバソトシン、後者は、四肢動物ではメソトシン、硬骨魚類ではイソトシンと呼ばれており、上記と同一の前駆体構造が保存されており、浸透圧調節や飲水行動の制御が報告されている^{29~31)}。軟骨魚類でも種々のバソトシンやイソトシンの発見が報告されている^{29, 32)}。一方、円口類ではバソトシンのみが存在していると考えられている^{29, 32)}。したがって、バソプレッシンファミリーとオキシトシンファミリーは、円口類から軟骨魚類への進化の過程で祖先遺伝子から分岐したと推測される。

無脊椎動物でも、表3のように、昆虫の一部や線虫では存在しないものの、軟体動物(モノアラガイ、アメフラシ、タコ)、環形動物(ミミズ、ヒル)、昆虫(アカコガネムシ)といっ

た原口動物で同族ペプチドが発見されており^{15, 29)}、シマミミズやヒルに環形動物のバソプレッシン／オキシトシン同族体であるアネトシンを投与すると、環帯に存在する受容体に反応し、産卵行動を引き起こす^{33~35)}。これらの生物種のペプチドの前駆体もバソプレッシンやオキシトシンと同様の構成を完全に保存していることから(図6)、バソプレッシン／オキシトシンファミリーは無脊椎動物と脊椎動物の共通祖先生物で出現し、一部の昆虫や線虫などでは消失したが、その基本的な構成と産卵行動を誘導するという生理機能が維持されていることが示されている。バソプレッシンとオキシトシンは別々の受容体と選択的に反応する。両者の受容体ともClass Aに属するGPCRである。バソプレッシン受容体はV1a、V1b、V2の3種のサブタイプ、オキシトシン受容体はOTRの一種が確認されている^{15, 29)}。V2を除く受容体

oxytocin precursor

vasopressin precursor

SOP precursor

Ci-VP precursor

図6 主なオキシトシン／バソプレッシンファミリーペプチドの前駆体

は細胞内カルシウムをセカンドメッセンジャーとして発生させるのに対し、V2はcAMPを生成する^{15, 29)}。他の脊椎動物でも、これらに相当するサブタイプが順次確認されている^{29, 30)}。原口動物では、モノアラガイ、シマミミズ、マダコ、ヒルから同族体が同定されており、これらは全て細胞内カルシウムを動員することが確認されている^{15, 29)}。

一方、ホヤ、ナメクジウオ、ウニといった新口無脊椎動物からは近年まで報告がなかったが、川田らがカタユウレイボヤからバソプレッシン同族体、Ci-VP³⁶⁾を同定して以降、シロボヤ³⁷⁾、ナメクジウオ³²⁾、ウニ³⁸⁾のバソプレッシン／オキシトシンファミリーペプチドが相次いで報告された。ナメクジウオとウニの同ファミリーペプチドは他の生物種と同様、9残基からなり(表3)、ニューロフィジン領域の14個のシステインも完全に保存されていた^{32, 38)}。一般的に短いアミノ酸配列を有するペプチドやその遺伝子の相同性検索は困難であると前述したが、バソプレッシン／オキシトシンファミリーペプチド前駆体はペプチド配列とニューロフィジン領域の14個のシステインがよく保存されていることから、データベースに配列が登録されていれば通常のBLAST検索で容易に検出できる。筆者らもそれを期待してカタユウレイボヤデータベースで種々のバソプレッシン／オキシトシンファミリーペプチド遺伝子をqueryに用いて検索を試みたが、検出には至らなかった。そのため、線虫やショウジョウバエを含む一部の原口動物のように、当時はバソプレッシン／オキシトシンファミリーがホヤには存在しないのではないかと考えた。しかし、質量分析で得られた結果を突破口にしたCi-VPの発見から、相同性検索で検出できなかった理由が判明した。すなわち、予想をはるかに越えたホヤ特異的な配列の多様性、言い換えれば、それまでの高保存性の「コンセンサス」配列の崩壊が明らかになった。

5.2 ホヤから得られたバソプレッシン／オキシトシンファミリーと受容体

川田らは、質量分析によるペプチドミクスにより、13アミノ酸から構成されるペプチド、Ci-VPを同定した³⁶⁾。このペプチドでは、1番目と6番目に存在するシステインと、その間に存在するアミノ酸配列はバソプレッシン／オキシトシンファミリーペプチドに特徴的なものであった(表3)。しかし、それ以降の配列は、他のバソプレッシン／オキシトシンファミリーペプチドと異なる。特に、C末が4残基ほど延長されていることと、アミド化されていないことが大きな特徴と言える(表3)。さらに、ニューロフィジン領域では、14個のシステインが完全に保存されておらず、10個のシステインが存在していた(図6)。余談だが、このようなコンセンサス配列の変化により、Ci-VP遺伝子をホヤゲノム／EST上で相同性検索で検出できなかったことも納得した。事実、Ci-VP遺伝子をqueryにしてDDBJデータベースで検索しても、他のバソプレッシン／オキシトシンファミリーを検出できなかった。原口動物と脊椎動物で保存されているのだから、原索動物でも保存されている」という思い込みの甘さを、Ci-VPの発見を通じて認識させられた。さて、Ci-VPと同様のペプチド配列や前駆体構成は近縁種であるユウレイボヤでも確認できた³⁶⁾。以上のような、9残基を超える配列、非アミド化C末、および14個に満たないニューロフィジン領域内のシステインは全生物を通じて初めての例である。また、浮穴らは、シロボヤからSOPを同定した³⁷⁾。SOPはCi-VPよりさらに長く、16残基からなるが、C末はアミド化されている(表3)。また、SOP前駆体のニューロフィジン領域では14個のシステインが保存されている³⁷⁾。すなわち、シロボヤでも、カタユウレイボヤやユウレイボヤほどではないが、やはりホヤ特有の配列の多様性が認められた。その生物学的意義は不明だが、ホヤでは遺伝子の進化や多様化のスピードが速いという事実と関係があるかもしれな

表3 主なオキシトシン／バソプレッシンファミリーペプチドの配列

Peptide	Sequence	Species
原索動物、頭索動物、棘皮動物		
Ci-VP	CFFRDCSNMDWYR	ascidian (<i>Ciona intestinalis</i>)
SOP	CYISDCPNSRFWSTa	ascidian (<i>Styela plicata</i>)
[Ile ⁴]-vasotocin	CYIINCPRGa	amphioxus (<i>Branchiostoma floridae</i>)
echinotocin	CFISNCPKGa	sea urchin (<i>Stringylocentrotus purpuratus</i>)
脊椎動物		
oxytocin	CYIQNCPLGa	mammal
mesotocin	CYIQNCPIGa	non-mammalian tetrapod, etc.
isotocin	CYISNCPIGa	lungfish
valitocin	CYIQNCPVGa	dogfish (<i>Squalus acanthias</i>)
aspartocin	CYINNCPLGa	dogfish (<i>Squalus acanthias</i>)
Arg-vasopressin	CYFQNCPRGa	mammal
Lys-vasopressin	CYFQNCPKGa	mammal
vasotocin	CYIQNCPRGa	other vertebrates
原口動物		
Lys-conopressin	CFIRNCPKGa	Sea Snail (<i>Lymnaea stagnail</i>)など多数
annetocin	CFVRNCPTGa	Earthworm (<i>Eisenia foetida</i>)
octopressin	CFWTSCPIGa	Octopus (<i>Octopus vulgaris</i>)
inotocin	CLITNCPRGa	Red flour beetle (<i>Tribolium castaneum</i>)

'a'はC末アミド。ホヤ由来のものは太字で示す。

い。

in situ in situ hybridizationや免疫染色の結果、Ci-VPやSOPは神経複合体中の神経細胞に発現していたことから、ホヤではバソプレッシン／オキシトシンファミリーは専ら神経ペプチドとして機能していることが示された^{36, 37)}。現在、笹倉との共同研究により、川田はCi-VPプロモーターに蛍光タンパクを接続したトランスジェニックホヤを作製し、末梢神経を含めた神経支配の全容を解明しつつある。

川田らは、Ci-VPの受容体Ci-VP-Rも同定している³⁶⁾。Ci-VP-Rは既知の他のバソプレッシン／オキシトシンファミリーペプチドの受容体と最も高い相同性を示した³⁶⁾。また、Ci-VP-Rをアフリカツメガエルの卵細胞に発現させたところ、Ci-VPと強く反応した。一方、分子系統樹解析では、動物種の分類系統樹と整合せず、他のバソプレッシン／オキシトシンファミリーペプチドとは反応しなかった³⁶⁾。これらの結果は、Ci-VP-Rは他のバソプレッシン／オキシトシンファミリーペ

プチド受容体と共通の祖先から進化しているが、Ci-VPのユニークな配列の誕生に合わせて、Ci-VP-Rも配列が変化した、すなわち共進化したためだと推定される。特に、リガンド結合に重要だと示唆されている第二細胞外ループでCi-VP-Rと他の同族受容体との配列の違いが大きいことは³⁶⁾、このことを裏付けている。

Ci-VP-Rは神経複合体のほか、卵巣、精巣、心臓などに分布しており、Ci-VPは中枢神経制御、生殖行動、循環器系制御など、幅広い生理機能を有していることが示唆された³⁶⁾。また、浮穴らは、SOPの遺伝子発現が高張海水中で数倍に上昇すること、および、SOPが脊椎動物の口吻部に相当する入水孔に対し顕著な収縮活性を示すことを報告している³⁷⁾。これらの結果から、ホヤにおけるバソプレッシン／オキシトシンファミリーペプチドの役割の一つは浸透圧調節であると考えられ、脊椎動物のバソプレッシンファミリーの機能と良く似ている。したがって、バソプレッシン

ファミリーによる浸透圧制御は、少なくとも原索動物と脊椎動物の共通祖先生物で原型が確立されていたと考えられる。

6. カルシトニン

6.1 カルシトニンとは？

カルシトニン (CT) は、主として哺乳類においては甲状腺で、魚類などにおいては鰹後腺から分泌されるホルモンであり、骨やウロコのカルシウム代謝やイオン調節に関わっていることが知られている^{39~41)}。CTの活性には、N末端7残基目までのアミノ酸配列、特に1残基目と7残基目のシステインのジスルフィド結合による環状構造及び、C末端のアミド化修飾が重要であることが知られている^{39, 40)}。さらに、脊椎動物CTは、CGRP, Adrenomedullin, Amylin, CRSPと共にCT/CGRPファミリーを形成しており(表4)、これらは配列や基本構造の類似性、ゲノム上の配置、レセプターの共有から、同じ起源から派生してきたと考えられる^{39, 40, 42, 43)}。Adrenomedullinの分子進化は竹井らにより詳細に検討されている⁴³⁾。CRSPは南野らにより発見され、哺乳類のローラシア獣目(ブタ、ウシ、イヌ、ウマ)に特異的に出現しており、ヒト、マウス、ラットなどの他の哺乳類や非哺乳類の脊椎動物には存在しないことが明らかになっている⁴³⁾。これらについては、竹井と尾崎・南野らによりわかりやすくまとめられた記事がそれぞれ本誌既刊号にも掲載されているので、一読をお薦めしたい^{44, 45)}。CT/CGRP

ファミリーペプチドの受容体には、Class B GPCRに属するCalcionin receptor (CTR)とCalcitonin receptor-like receptor (CRLR)が存在し、そのリガンド選択は、複数のReceptor Activity Modifying Protein (RAMP)との共役によって調節されており⁴⁶⁾、複雑なシグナル伝達系を構築している(表5)。このように、CT/CGRPファミリーは、他のホルモン・神経ペプチドと比較して、脊椎動物門の中で分子の進化・多様化が著しいと言える。一方、無脊椎動物では、哺乳類のCT/CGRPファミリーペプチドの抗体を用いた組織免疫染色やイムノアッセイで同ファミリーペプチドの存在が示唆されていたが、実際に単離された例はなく、そもそも、免疫交差性が確認されていないなど、問題の多いものがほとんどであった。また、CTが骨やウロコのカルシウム代謝を制御するという代表的な生理作用を考慮すると、これらの組織を持たない無脊椎動物にCT/CGRPファミリーが存在しないと思われることも否定できない。しかしながら、CT/CGRPファミリーがどのような進化的経路で生じてきたのか、大変興味深いのも事実である。そこで、筆者らはカタユウレイボヤのCT/CGRPファミリーペプチドを探索した。

6.2 ホヤのカルシトニンと受容体

当研究所の関口は、まず、Salmon CTと配列類似性をもつ遺伝子を、カタユウレイボヤのゲノム/EST 情報から検索した。その結

表4 哺乳類のCT/CGRPファミリーペプチドとCi-CT

Peptide	Sequence
哺乳類 CT/CGRP family peptide	
Human CT	<u>CGNLST</u> CMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIQVGVGAP-NH ₂
Human CGRP	ACDTATC V THRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-NH ₂
Human Adrenomedullin	YRQSMNNFQGLRSFG CR FGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPPQGY-NH ₂
Human Amylin	K CNTATC ATQRLANFLVHSSNNFQAILSSSTNVGSNTY-NH ₂
Pig CRSP	SCNTAT C MTHRLVGLLSRSGSMVRSNNLPTKMGFKVFG-NH ₂
ホヤ由来	
Ci-CT	CDGVSTCWL HELGN S VHATAGG KQ NVGF G P-NH ₂

システインで環状化される領域に下線を付している。Ci-CTは太字で表している。

表5 哺乳類のCT/CGRPファミリーペプチドと受容体の選択性

Ligand	Receptor	RAMP
Calcitonin	CTR	---
CRSP	CTR	---
CGRP and Amylin	CTR	RAMP1
Amylin	CTR	RAMP3
CGRP	CRLR	RAMP1
Adrenomedullin and CGRP	CRLR	RAMP2

果、Ci-CT 遺伝子を同定した⁴⁷⁾。Ci-CT は、30アミノ酸残基のペプチドで(表4)、アミノ酸配列全体では最も高い配列相同性をCTに示した⁴⁷⁾。さらに、Cys1-Cys7の領域、C末のProアミドをはじめ、CTの活性に必須のアミノ酸をいくつか保存していた。しかし、その配列相同性は高々40%であり、Ci-CTが脊椎動物のCTと同族であるという結論にはまだ不十分であるように感じた。そこで、CD法によりCi-CTの二次構造形成をSalmon CTと分光学的に比較検討したところ、Ci-CTはやや弱いながらも脊椎動物CTと同様の二次構造を形成することが明らかになった⁴⁷⁾。さらに、Ci-CTが脊椎動物のCT受容体と特異的に反応することや、金沢大の鈴木・笹山との共同研究によりCT特異的なキングョのウロコにおける破骨細胞の活性を抑制する作用を示すことが明らかになった⁴⁷⁾。これらの結果から、Ci-CTは脊椎動物のCTの基本的性質を有すること、すなわち、カタユウレイボヤにCTが存在することが明らかになった。脊椎動物のCT遺伝子はsplicing variantを発生させ、CTをコードするmRNAとCGRPをコードするmRNAを生成する^{39, 40)}。一方、図7に示すように、エキソン/イントロン構造解析から、Ci-CT遺伝子はsplicing variantを経た他のファミリーペプチドを生成しないことがわかった⁴⁷⁾。また、カタユウレイボヤゲノムにはCi-CT以外のCT/CGRPファミリー遺伝子を検出できないことから、Ci-CTはカタユウレイボヤにおける唯一のCT/CGRPファミリーペプチドであると考えられる。以上の結果から、CT/

CGRPファミリーペプチドは少なくとも原索動物と脊椎動物の共通祖先でCi-CT様の遺伝子として誕生し、脊椎動物への進化の過程でスプライシングバリエーションの獲得や遺伝子重複、さらには、種特異的なパラログの生成によるファミリー遺伝子の増幅を経て、現在に至っているという進化経路が推定される。

Ci-CT遺伝子は内柱、消化管、血球、神経腺(非神経組織)で強く発現する一方、神経細胞での発現は全く見られなかった⁴⁷⁾。この発現分布は、脊椎動物で確認されているCTの発現分布よりも幅広く、他のファミリーペプチドの発現分布の一部と重複している。これらの結果から、Ci-CTはホルモンとして専ら機能していること、および、Ci-CT一種でCT/CGRPファミリーの生理機能を複数担っていることが示唆され、CT/CGRPファミリーによる内分泌系の基礎がすでに出来上がっていたことを物語っている。以上の成果は、無脊椎動物における初めてのCT/CGRPファミリーペプチドの発見であり、これまでの常識を覆すとともに、同ファミリーペプチドの分子並びに機能の起源や多様化を探る上で、新たな展開を期待させるものである。

A. CT/CGRP family peptides in mammals

B. CT/CGRP family peptide in *Ciona intestinalis*

図7 哺乳類のCT/CGRPファミリーとCi-CT遺伝子

関口らは、CTRやCRLRと高い相同性を示すCi-CTRも同定した⁴⁷⁾。系統解析の結果から、CTRとCRLRが脊椎動物において分岐する以前の共通祖先遺伝子に由来することが示唆された⁴⁷⁾。Ci-CTRの発現をRT-PCRで検討した結果、神経複合体、消化管、咽頭、内柱に強い発現が認められた⁴⁷⁾。一方、RAMPに相当する遺伝子はカタウレイボヤゲノムに存在しないことが判明した。このことは、Ci-CTとCi-CTRが唯一のCT/CGRPファミリーのリガンド—受容体ペアであること、および、脊椎動物ではCTがCTRに結合し活性化する際にRAMPを必要としないことと合致する。残念ながら、HEK293MSR、COS7、*Xenopus* oocyteにCi-CTRを導入しても、タンパクレベルでの発現が認められなかったため、Ci-CTRがCi-CTの真のリガンドである確証はまだ得られていない。また、Ci-CTのホヤにおける生理作用もいまだに明らかにできていないが、Ci-CTやCi-CTRの発現組織から判断すると、摂食行動や浸透圧調節に関与している可能性が大きいと考えられる。今後、Ci-CTRの発現系の構築とCi-CTの生理機能特定に一層注力していきたい。さらに、関口は、ナメクジウオから3種のCT/CGRPファミリーペプチド、1種の受容体候補、および、3種のRAMP遺伝子をクローニングし、これらのペプチドの化学合成も完了させ、ペプチド—受容体選択性と発現分布の同定に取り組んでいる。脊索動物の共通先祖と考えられるナメクジウオのCT/CGRPファミリーを同定できれば、同ファミリーの分子や機能の進化をさらに掘り下げて追求できるものと期待している。

7. その他のペプチド

ここまでは、生理活性もしくはリガンド—受容体反応が明らかになっているペプチドと受容体について紹介した。以降に、現在調査中のものも含めて、配列のみが明らかにされているペプチドも簡単に紹介したい。

7.1 Cionin

Cioninは、カタウレイボヤから初めて単離精製されたペプチドである⁴⁸⁾。脊椎動物のCholecystokinin (CCK)とgastrinとともに、C末端4アミノ酸残基(Trp-Met-Asp-Phe-NH₂)が保存されていると共に、CCKに特徴的な7残基目の硫酸化チロシンと、gastrinに特徴的な6残基目の硫酸化チロシンを有しているという配列上の特徴から⁴⁹⁾、cioninはCCKとgastrinの「hybrid」ペプチドであり、脊椎動物CCK/gastrin familyペプチドの祖先遺伝子であることが示唆される。CCK/gastrin familyに属するペプチドでは、cioninが無脊椎動物で唯一同定されたペプチドである⁴⁸⁾。

また、受容体についても、脊椎動物のCKR1とCKR2に35～40%のアミノ酸配列類似性を示すCioRがクローニングされていて、系統解析の結果からも脊椎動物CKR1とCKR2の共通祖先であることが支持されているが、CioRがcioninと反応するという報告はない⁵⁰⁾。現在までに、関口はCioRと同一のCioR1とそのパラログであるCioR2をクローニングし、HEK293MSR細胞に発現させ、双方の受容体に濃度依存的に反応して細胞内カルシウムを動員すること、および、硫酸化チロシンが活性発揮に必須であることを見出している(投稿論文作成中)。

カタウレイボヤにおけるcioninの生理作用も明らかになっていないが、cionin投与によって、ブタやウシの胆嚢筋収縮やイヌ胃底部ソマトスタチン細胞からのソマトスタチン放出を促進し⁵¹⁾、またラット胃還流系を用いた実験によって、ヒスタミン放出や胃酸分泌を刺激するというCCKやgastrinと同様の活性が検出されること⁵²⁾、および、これらの活性はCKR1やCKR2の競合的阻害剤の存在下で消失することから、哺乳類のCKRへの作用が示唆されている。

Cionin遺伝子は神経複合体と消化管で発現していることが報告されており⁴⁸⁾、CCKと同様に脳腸ペプチドとして作用していることが示唆される。関口は、*in situ* hybridiza-

tionと免疫染色により cionin 遺伝子は幼若体から成体に至るまで中枢神経複合体の複数のニューロンで存在していること、および、そのうちのいくつかは入水孔や出水孔に軸索を投射していることを突き止めており(投稿論文準備中)、少なくとも入水孔や出水孔に作用して、摂食や浸透圧調節に関与している可能性が示唆されている。今後、生理学的解析とともに、CioRsの発現分布を明らかにすることを通じて、ホヤにおける cionin の生理機能を明らかにすることにより、脊椎動物の CCK/gastrin family の機能の進化の道筋が確立されると期待される。

7.2 インシュリン様ペプチドスーパーファミリー

インシュリン、インシュリン様成長因子(IGF)、およびリラキシンは互いに緩やかなアミノ酸配列2つのジスルフィド結合でA鎖とB鎖が連結された構造を有するという共通の特徴を有する⁵³⁾。インシュリンは主に膵臓のβ細胞から分泌され、血糖値の低下を促進する。IGFは種々の組織で発現し、細胞の成長・分化やアポトーシスの制御因子として多様な生理機能に関与している⁵⁴⁾。リラキシンは、分娩時の恥骨結合、子宮頸部の弛緩、妊娠期における生殖器官の成長や再構成に重要な役割を果たしている⁵⁵⁾。このように、配列や構造上の類似点に比して、生理機能が大きく異なっているのが、このスーパーファミリーの特徴といえる。無脊椎動物では、三田、吉国らがイトマキヒトデから発見した生殖巣刺激物質(GSS)が、濾胞細胞の1-メチルアデニンの生成を促進し、卵成熟や排卵を誘導する^{56, 57)}。GSSはリラキシンググループに属することから、このグループは古くから存在し、様々な生物で産卵・出産で主要な役割を担っていることが推察される。昆虫にも、種々のインシュリン様ペプチド、特に、カイコのボンビキシンと、ショウジョウバエのDILPがよく研究されている。詳細は、溝口と岡本による本誌既刊号の記事を参照され

たい⁵⁸⁾。

ホヤ類でもいくつかの種類で同スーパーファミリーペプチドが単離同定されている。Sherwoodらは、スボヤからヒトインシュリンと64%の相同性を有するペプチドを単離している⁵⁹⁾。カタユウレイボヤからは、これまでに3種類のインシュリン様ペプチド(Ci-INS-L1, 2, 3)がゲノム中に存在することが確認されている⁶⁰⁾。Olinskiらは、遺伝子の分子系統解析を行い、Ci-INS-L1はリラキシンに、Ci-INS-L2はインシュリンに、Ci-INS-L3はIGFに属することを示唆している⁶⁰⁾。今後、これらの受容体や生理作用が明らかになれば、インシュリンスーパーファミリーの進化や多様化の全容の解明に大きく前進することだろう。

7.3 Corticotropin-releasing factor (CRF) 様ペプチド

CRFは41残基からなる視床下部ホルモンの一種である^{61, 62)}。近年は、哺乳類、両生類、魚類における摂食行動の制御機構が精力的に研究されている⁶²⁾。これまで、有顎類以上の脊椎動物から単離されており、CRF/urocortinファミリーを形成していることがわかっていくものの、無脊椎動物においてはその存在が疑問視されていた。しかし、Lovejoyらにより、CRF/urocortin共通モチーフであるLSLDVP配列を有するペプチドをコードする遺伝子が存在することが明らかになった⁶³⁾。組織発現分布や生理作用、および受容体については全く不明のままである。

8. おわりに—まとめと展望—

2003年ごろにホヤのペプチドと受容体の研究を開始してから約7年が経った。その間、本稿では詳しく述べなかったが、様々な実験系の確立や試行錯誤を経ながら、「ホヤの神経系・内分泌系」という舞台上演じる主要な「役者」達の顔と、それらが演じる「ストーリー」も徐々に見え始めた。そして、ホヤという舞台の裏に潜んでいる進化の痕跡と感じら

れるものの一端も垣間見えているように思える。

ここまで読んでくださった読者はお気づきのことと思うが、我々や他グループが同定したペプチドには、脊椎動物の下垂体ホルモンの同族体が一つも含まれていない。このことは、ホヤには下垂体に相当する器官が存在しない、および、開放血管系のホヤでは脊椎動物のような内分泌系が未発達であると考えられていることと整合性が取れている。また、ほとんどのペプチド遺伝子はホヤ中枢神経で発現し、いくつかの軸索が末梢器官に伸びていることが確認されている。したがって、現時点では、ホヤではペプチド性分子による末梢器官の制御は神経細胞による直接支配が主であり、下垂体を中心とした内分泌系は脊椎動物で獲得されたと考えてよいだろう。一方、カルシトニン是非神経組織だけに発現し、タキキニンやcionin、そして、本稿では詳細を述べなかったが、ニューロテンシンは中枢神経とともに、腸、内柱、あるいは卵巣の非神経細胞で発現していることから、傍分泌や狭い範囲での内分泌機構はすでに確立されていたことが窺える。これらのペプチドの生理機能と発生学的な知見を合わせると、内分泌系がどのように確立されてきたかという「形態機能進化」という、分子進化からさらに一歩踏み込んだ研究に展開できるのではないかと期待している。

冒頭で述べたように、ホヤは固着性生物であるがゆえ、際立った運動能力、変色機能、変態、劇的な環境ストレスへの適応等の能力は持たず、摂食→成長→配偶子形成・放出(もちろん、このサイクル中で随時浸透圧調節もしていることだろう)という、生き物が子孫を残すことのみにほぼ特化しているため、ある生物の際立った能力や行動に着眼している研究者から見れば、「面白みのない生物」とみなされ、神経系や内分泌系の研究が進んでいなかった。しかし、摂食→成長→配偶子形成・放出という生き物の基本的かつ必須の活動のみで現代まで世界中で繁栄していることは、

驚くべきことではないだろうか？また、このようなホヤの生活史を鑑みると、これまで得られてきたホヤ由来のペプチドの多くは摂食、浸透圧調節、生殖に関与しているものの同族体やプロトタイプであることや、Ci-TKの研究で明らかになったように、卵巣という生殖器官でのタキキニンの新たな役割を見出したことは大変理にかなっており、筆者らの仮説や研究目的が、あながち的外れではなかったことを裏付けている。加えて、筆者らが当初予測していたように、ホヤが脊椎動物の神経ペプチドやホルモンペプチドの同族体を多種保存していることも立証された。一方、これまで様々な分野でモデル生物として利用されてきた線虫やショウジョウバエなどの無脊椎動物に存在するペプチドは、脊椎動物のペプチドと配列があまりに異なるため、神経系や内分泌系のモデル生物として活用することはできなかった。このような背景から、脊椎動物の神経系や内分泌系の進化の原点という位置をホヤが占めるという観点と同時に、脊椎動物の内分泌系や神経系全体の新規単純化モデル生物としての科学における役割が重要になるだろう。何が共通していて、どのように種特異的な多様化、そして高度化されていったのかという「Comparative to general」に応える一般解と特殊解を導き出すことに、筆者らの研究が少しでも貢献できることを信じて、本学会員を中心に報告される様々な生き物の研究成果を随時参照しながら、ホヤを対象とした研究を深化・熟成していきたい。

謝 辞

本研究は、文部科学省、JSPS、JST、サントリホールディングスの支援により実施致しました。また、本文中で述べた共同研究者の皆様と、折に触れ様々な面でご教示・ご支援くださった、佐藤矩行先生、竹井祥郎先生、津田基之先生、寺門潔先生、筒井和義先生、南野直人先生に御礼申し上げます。最後に、本稿の執筆の場をご提供くださった高橋明義先生に感謝致します。

文 献

- 1) Satake H, Kawada T, 2006. Neuropeptides, hormones, and their receptors in ascidians-Emerging model animals. In: Satake, H ed. Invertebrate Neuropeptides and Hormones: Basic Knowledge and Recent Advances, Transworld Research Network, Kerala, pp.253-276.
- 2) Kawada T, Sekiguchi T, Sakai T, Aoyama M, Satake H, 2010. Neuropeptides, hormone peptides, and their receptors in *Ciona intestinalis*: an update. *Zoolog Sci*, **27**, 134-153.
- 3) Satake H, Kawada T, 2006. Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors. *Curr Drug Targets*, **7**, 963-974.
- 4) Topaloglu AK, 2010. Neurokinin B signaling in puberty: human and animal studies. *Mol Cell Endocrinol*, **324**, 64-69.
- 5) Satake H, Kawada T, Nomoto K, Minakata H, 2003. Insight into Tachykinin-Related Peptides, Their Receptors, and Invertebrate Tachykinins: A Review. *Zoolog Sci*, **20**, 533-549.
- 6) Satake H, Ogasawara M, Kawada T, Masuda K, Aoyama M, Minakata H, Chiba T, Metoki H, Satou Y, Satoh N, 2004. Tachykinin and tachykinin receptor of an ascidian, *Ciona intestinalis*: Evolutionary origin of the vertebrate tachykinin family. *J Biol Chem*, **279**, 53798-53805.
- 7) Debeljuk L, 2006. Tachykinins and ovarian function in mammals. *Peptides*, **27**, 736-742.
- 8) Candenas L, Lecci A, Pinto FM, Patak E, Maggi CA, Pennefather JN, 2005. Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract. *Life Sci*, **76**, 835-862.
- 9) Aoyama M, Kawada T, Fujie M, Hotta K, Sakai T, Sekiguchi T, Oka K, Satoh N, Satake H, 2008. A novel biological role of tachykinins as an up-regulator of oocyte growth: identification of an evolutionary origin of tachykininergic functions in the ovary of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology*, **149**, 4346-4356.
- 10) Carnevali O, Cionna C, Tosti L, Lubzens E, Maradonna F, 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen Comp Endocrinol*, **146**, 195-203.
- 11) Litscher ES, Qi H, Wassarman PM, 1999. Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. *Biochemistry*, **38** 12280-12287.
- 12) Tanaka E, Takagi-Sawada M, Sawada H, 2000. Enzymatic properties of the proteasome purified from starfish oocytes and its catalytic subunits involved in oocyte maturation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **125**, 215-223.
- 13) Jakobsen RK, Ono S, Powers JC, DeLotto R, 2005. Fluorescently labeled inhibitors detect localized serine protease activities in *Drosophila melanogaster* pole cells, embryos, and ovarian egg chambers. *Histochem Cell Biol*, **123**, 51-60.
- 14) Millar RP, 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci*, **88**, 5-28.
- 15) Minakata H, 2010. Oxytocin/vasopressin and gonadotropin-releasing hormone from cephalopods to vertebrates. *Ann NY Acad Sci*, **1200**, 33-42.
- 16) 大久保範聡, 2007. ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 作用系の比較生物学. 比較に分泌学ニュース, **126**, 2-12.
- 17) Kavanaugh SI, Nozaki M, Sower SA, 2008. Origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in vertebrates: identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinology*, **149**, 3860-3869.
- 18) Tello JA, Sherwood NM, 2010. Amphioxus: beginning of vertebrate and end of invertebrate type GnRH receptor lineage. *Endocrinology*, **150**, 2847-2856.
- 19) Chambery A, Parente A, Topo E, Garcia-Fernández J, D'Aniello S, 2009. Characterization and putative role of a type I gonadotropin-releasing hormone in the cephalochordate amphioxus. *Endocrinology*, **150**, 812-820.
- 20) Powell JF, Reska-Skinner SM, Prakash MO, Fischer WH, Park M, Rivier JE, Craig AG, Mackie GO, Sherwood NM, 1996 Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 10461-10464.
- 21) Di Fiore MM, Rastogi RK, Cecilian F, Messi E, Botte V, Botte L, Pinelli C, D'Aniello B, D'Aniello A, 2000. Mammalian and chicken I forms of gonadotropin-releasing hormone in the gonads of a protochordate, *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 2343-2348.
- 22) Adams BA, Tello JA, Erchevyi J, Warby C,

- Hong DJ, Akinsanya KO, Mackie GO, Vale W, Rivier JE, Sherwood NM, 2003. Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology*, **144**, 1907-1919.
- 23) Kawada T, Aoyama M, Okada I, Sakai T, Sekiguchi T, Ogasawara M, Satake H, 2009. A novel inhibitory gonadotropin-releasing hormone-related neuropeptide in the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Peptides*, **30**, 2200-2205.
 - 24) Tello JA, Rivier JE, Sherwood NM, 2005. Tunicate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) peptides selectively activate *Ciona intestinalis* GnRH receptors and the green monkey type II GnRH receptor. *Endocrinology*, **146**, 4061-4073.
 - 25) Kusakabe T, Mishima S, Shimada I, Kitajima Y, Tsuda M, 2003. Structure, expression, and cluster organization of genes encoding gonadotropin-releasing hormone receptors found in the neural complex of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Gene*, **322**, 77-84.
 - 26) Sakai T, Aoyama M, Kusakabe T, Tsuda M, Satake H, 2010. Functional diversity of signaling pathways through G protein-coupled receptor heterodimerization with a species-specific orphan receptor subtype. *Mol Biol Evol*, **27**, 1097-1106.
 - 27) Satake H, Sakai T, 2008. Recent advances and perceptions in studies of heterodimerization between G protein-coupled receptors. *Protein Pept Lett*, **15**, 300-308.
 - 28) Levoe A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Jockers R, 2006. Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep*, **7**, 1094-1098.
 - 29) Kawada T, Sekiguchi T, Sugase K, Kanda A, Satake H, 2009 Evolutionary aspects of molecular forms and biological functions of oxytocin family peptides. In Jastrow H and Feuerbach D (eds), *Handbook of Oxytocin Research*, Nova Science Publishers Inc, NY, pp.59-85.
 - 30) Konno N, Hyodo S, Yamaguchi Y, Matsuda K, Uchiyama M, 2010. Vasotocin/V2-type receptor/aquaporin axis exists in African lungfish kidney but is functional only in terrestrial condition. *Endocrinology*, **151**, 1089-1096.
 - 31) Hasegawa T, Tanii H, Suzuki M, Tanaka S, 2003. Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin-dependent water-channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3. *Endocrinology*, **144**, 4087-4096.
 - 32) Gwee PC, Tay BH, Brenner S, Venkatesh B, 2009. Characterization of the neurohypophysial hormone gene loci in elephant shark and the Japanese lamprey: origin of the vertebrate neurohypophysial hormone genes. *BMC Evol Biol*, **9**, 47.
 - 33) Oumi T, Ukena K, Matsushima O, Ikeda T, Fujita T, Minakata H, Nomoto K. 1996. Annetocin, an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behavior in the earthworm, *Eisenia foetida*. *J Exp Zool*, **276**, 151-156.
 - 34) Satake H, Takuwa K, Minakata H, Matsushima O, 1999. Evidence for conservation of the vasopressin/oxytocin superfamily in Annelida. *J Biol Chem* **274**, 5605-5611.
 - 35) Kawada T, Kanda A, Minakata H, Matsushima O, Satake H, 2004. Identification of a novel receptor for an invertebrate oxytocin/vasopressin superfamily peptide: molecular and functional evolution of the oxytocin/vasopressin superfamily. *Biochem J*, **382**, 231-237.
 - 36) Kawada T, Sekiguchi T, Itoh Y, Ogasawara M, Satake H, 2008. Characterization of a novel vasopressin/oxytocin superfamily peptide and its receptor from an ascidian, *Ciona intestinalis*. *Peptides*, **29**, 1672-1678.
 - 37) Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Hikosaka A, 2008. Unique form and osmoregulatory function of a neurohypophysial hormone in a urochordate. *Endocrinology*, **149**, 5254-5261.
 - 38) Elphick MR, Rowe ML, 2009. NGFFamide and echinotocin: structurally unrelated myoactive neuropeptides derived from neurophysin-containing precursors in sea urchins. *J Exp Biol* **212**, 1067-1077.
 - 39) Wimalawansa SJ, 1997. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol*, **11**, 167-239.
 - 40) Hull KL, Fathimani K, Sharma P, Harvey S, 1998. Calcitropic peptides: neural perspectives. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **119**, 389-410.
 - 41) Suzuki N, Suzuki T, Kurokawa T, 2000. Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (seawater teleost). *Peptides*, **21**, 115-124.
 - 42) Katafuchi T, Yasue H, Osaki T, Minamino N,

2009. Calcitonin receptor-stimulating peptide: Its evolutionary and functional relationship with calcitonin/calcitonin gene-related peptide based on gene structure. *Peptides*, **30**, 1753-1762.
- 43) Ogoshi M, Inoue K, Naruse K, Takei Y, 2006. Evolutionary history of the calcitonin gene-related peptide family in vertebrates revealed by comparative genomic analyses. *Peptides*, **27**, 3154-8164.
- 44) 尾崎司, 片淵剛, 南野直人, 2009. 哺乳類におけるカルシトニン／カルシトニン遺伝子関連ペプチドファミリーの多様性獲得. 比較内分泌学, **36**, 4-12.
- 45) 竹井祥郎, 2010. 比較内分泌学からの発信. 比較内分泌学, **36**, 184-191.
- 46) Conner AC, Simms J, Hay DL, Mahmoud K, Howitt SG, Wheatley M, Poyner DR (2004) Heterodimers and family-B GPCRs: RAMPs, CGRP and adrenomedullin. *Biochem Soc Trans* **32**, 843-846.
- 47) Sekiguchi T, Suzuki N, Fujiwara N, Aoyama M, Kawada T, Sugase K, Murata Y, Sasayama Y, Ogasawara M, Satake H, 2009. Calcitonin in a protochordate, *Ciona intestinalis*: the prototype of the vertebrate Calcitonin/Calcitonin gene related peptide superfamily. *FEBS J*, **276**, 4437-4447.
- 48) Johnsen AH, Rehfeld JF, 1990. Cionin: a disulfotyrosyl hybrid of cholecystokinin and gastrin from the neural ganglion of the protochordate *Ciona intestinalis*. *J Biol Chem* **265**, 3054-3058.
- 49) Johnsen AH, 1998. Phylogeny of the cholecystokinin/gastrin family. *Front Neuroendocrinol*, **19**, 73-99.
- 50) Nilsson IB, Svensson SP, Monstein HJ, 2003. Molecular cloning of a putative *Ciona intestinalis* cionin receptor, a new member of the CCK/gastrin receptor family. *Gene*, **323**, 79-88.
- 51) Marvik R, Johnsen AH, Rehfeld JF, Sandvik A, Waldum HL, 1994. Effect of cionin on histamine and acid secretion by the perfused rat stomach. *Scand J Gastroenterol* **29**, 591-594.
- 52) Schjoldager B, Jorgensen JC, Johnsen AH, 1995. Stimulation of rainbow trout gallbladder contraction by cionin, an ancestral member of the CCK/gastrin family. *Gen Comp Endocrinol* **98**, 269-278.
- 53) Conlon JM, 2001. Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides*, **22**, 1183-1193.
- 54) Valentinis B, Baserga R, 2001. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol*, **54**, 133-137.
- 55) Schwabe C, Büllesbach EE, 2007. Relaxin, the relaxin-like factor and their receptors *Adv Exp Med Biol*, **612**, 14-25.
- 56) Mita M, Yoshikuni M, Ohno K, Shibata Y, Paul-Prasanth B, Pitchayawasin S, Isobe M, Nagahama Y. A relaxin-like peptide purified from radial nerves induces oocyte maturation and ovulation in the starfish, *Asterina pectinifera*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 9507-9512.
- 57) 吉国通庸, 2009. 棘皮動物の生殖を司る神経ペプチド. 比較内分泌学, **36**, 25-31.
- 58) 溝口明, 岡本直樹, 2010. 昆虫で発見されたIGF様ペプチド. 比較内分泌学, **36**, 197-203.
- 59) McRory JE, Sherwood NM, 1997. Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. *DNA Cell Biol*, **16**, 939-949.
- 60) Olinski RP, Dahlberg C, Thorndyke M, Hallböök F, 2006. Three insulin-relaxin-like genes in *Ciona intestinalis*. *Peptides*, **27**, 2535-2546.
- 61) Kageyama K, Suda T, 2009. Role and action in the pituitary corticotroph of corticotropin-releasing factor (CRF) in the hypothalamus. *Peptides*, **30**, 810-816.
- 62) Matsuda K, Morimoto N, Hashimoto K, Okada R, Mochida H, Uchiyama M, Kikuyama S, 2010. Changes in the distribution of corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the larval bullfrog brain and the involvement of CRF in the cessation of food intake during metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol*, **168**, 280-286.
- 63) Lovejoy DA, Barsyte-Lovejoy D, 2010 Characterization of a corticotropin-releasing factor (CRF)/diuretic hormone-like peptide from tunicates: insight into the origins of the vertebrate CRF family. *Gen Comp Endocrinol*, **165**, 330-336.