

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07125

研究課題名(和文)脊椎動物におけるリラキシンの生理的意義の解明

研究課題名(英文)Physiological roles of relaxin in vertebrates

研究代表者

日下部 誠 (Kusakabe, Makoto)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：40451893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：リラキシンは妊娠や分娩を助ける働きをするホルモンとして知られている。魚類を含む全ての脊椎動物においてもリラキシン遺伝子の存在が確認されているが、哺乳類以外のリラキシンの機能はよく分かっていない。そこで、比較内分泌学および進化学的観点からリラキシンの機能を解析し、真骨魚類のリラキシンの生理的意義を考察した。本研究では、イトヨの脳におけるリラキシン遺伝子の発現部位を組織学的に解析した。次に、脳におけるリラキシン発現制御機構を明らかにするために、量的形質遺伝子座(QTL)法を用いてリラキシン遺伝子の発現メカニズムを解析した。

研究成果の概要(英文)：Relaxin is known as a hormone that has roles to help pregnancy and childbirth. The existence of relaxin gene has been confirmed in all vertebrates including fish. However, the functions of relaxin other than mammals are not well understood. Therefore, the function of relaxin was analyzed and the physiological significance of relaxin of teleosts was examined upon the perspective of comparative endocrinology and evolution. The sites of expression of the relaxin genes in the brain of stickleback were histologically analyzed. In order to clarify the regulatory mechanism of relaxin expression in the brain, expression mechanism of relaxin gene was analyzed by quantitative trait locus method.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：リラキシン イトヨ 脳 量的形質遺伝子座解析 浸透圧調節

1. 研究開始当初の背景

リラキシンは、妊娠3ヶ月から産後2、3日まで卵巣、子宮、胎盤などから分泌されるペプチドホルモンで、関節を支えている靭帯を緩めることによって妊娠や分娩を助ける作用がある。近年、哺乳類ではリラキシンが浸透圧調節因子としても作用することが分かってきた(Geddes *et al.* 1994 *Endocrinology*, Sunn *et al.* 2002 *PNAS*, Conrad and Novak 2004 *Am J Physiol*)。そこで、真骨魚類のリラキシン(*rln*, *rln3a*, *rln3b*)においても浸透圧調節に関与しているかを検証するため、イトヨを用いてリラキシン遺伝子の発現解析を行った。イトヨには海水環境への適応可能な遡河型と海水では生存出来ない淡水型が存在する。遡河型と淡水型イトヨを飼育水(10%海水)から100%海水へ移行後、リラキシン遺伝子の発現応答を解析すると、遡河型イトヨの脳における *rln3b* の発現が淡水型に比べて有意に高いことが分かった(図1. Kusakabe *et al.* 2014 *Gen Comp Endocrinol*)。この結果は、真骨魚類においてリラキシンが浸透圧調節に何らかの役割を果たす可能性を支持するものであった。

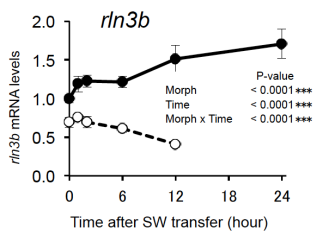


図1 イトヨの海水移行実験
海水移行後の*rln3b*遺伝子の発現変化
●が遡河型、○が淡水型を示す。
Kusakabe *et al.* (2014) *Gen Comp Endocrinol*

2. 研究の目的

先行研究により、真骨魚類のリラキシンが浸透圧調節に関与する可能性が見えてきた。そこで本研究では、真骨魚類リラキシンにおける浸透圧調節機能の解明するために、イトヨを用いて環境浸透圧の変化に対するリラキシン遺伝子の発現の制御機構を解析した。

3. 研究の方法

【1】リラキシン発現神経核の解析

真骨魚類のリラキシン遺伝子(*rln*, *rln3a*, *rln3b*)の組織別発現を解析すると、いずれも脳で最も強く発現していた(Hu *et al.* 2011 *Gen Comp Endocrinol*, Kusakabe *et al.* 2014 *Gen Comp Endocrinol*)。脳におけるリラキシンの機能を解析する上で、脳のどの神経核に発現しているかを的確に把握する必要がある。しかしながら、イトヨにおいては脳地図がないため、*in situ* hybridization法で得られたシグナルがどの神経核であるのか判断出来ない。そこで本研究ではイトヨの脳地図

の作製し、脳におけるリラキシン遺伝子の発現部位を確定した。

【2】リラキシンと浸透圧調節

種内に浸透圧調節能力に違いがある地域集団を持つイトヨをモデル生物として、リラキシンの浸透圧調節に対する機能を解明するために(1)淡水型と海水型イトヨの浸透圧調節の遺伝基盤の違いを量的形質遺伝子座(QTL)法により解析する。(2)得られたQTLに存在し、なおかつ環境浸透圧の変化に応答をする遺伝子リストを作成する。(1)と(2)にリラキシン遺伝子あるいは受容体などのリラキシン関連遺伝子が存在するかを解析する。ゲノミクスと生理学を統合したアプローチによりリラキシンが浸透圧調節にどのように関与するか解析した。

4. 研究成果

【1】リラキシン発現神経核の解析

Rln, *rln3a*, *rln3b* の発現を *in situ* hybridization法を用いて解析した(図2)。 *Rln3a*, *-3b* は中脳の lateral lemniscus および後脳の griseum centrale に、 *rln* は間脳の posterior tuberculum および中脳の lateral lemniscus に、特異的な発現が観察された。真骨魚類の griseum centrale は哺乳類の *rin3* を産生する nucleus incertus と相同の神経核と考えられていることから、真骨魚類のリラキシンも神経ペプチドとして働いていることが示唆された。

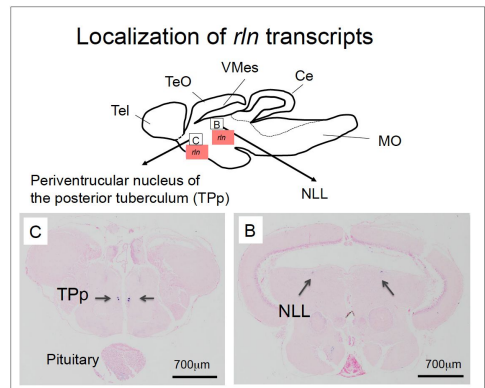
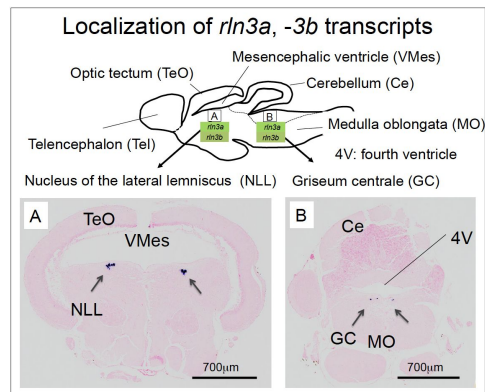


図2. イトヨ脳におけるリラキシン遺伝子の発現部位

【2】リラキシンと浸透圧調節

カナダ・リトルキャンベル川産イトヨの純系の遡河型と淡水型を交雑して得た雑種1世代目をさらに交雑して作出した雑種2世代目について海水移行実験を行い、体液浸透圧(血漿の Na^+ 値)を表現型としたQTL解析により血中のナトリウム量とリンクする遺伝子座が16番染色体であることを明らかにした(Kusakabe *et al.* 2017 *Molecular Ecology*)。次に16番染色体に存在する遺伝子で、なおかつ淡水型と遡河型イトヨの脳で発現する遺伝子プロファイルを作製した。その遺伝子プロファイルに淡水型と遡河型の間に有意に発現量に違いがあるリラキシン関連遺伝子を探索した。しかしながら、カナダ産および日本産の淡水型と遡河型イトヨの脳において発現量が有意に異なるリラキシン関連遺伝子は存在しなかった。

そこで全ゲノムスキャンを行い、遡河型と淡水型間で遺伝的分化を起こした領域を解析すると、いずれのリラキシン遺伝子も遡河型と淡水型間で高い遺伝的分化を示す領域には存在しないことが分かった(図3)。

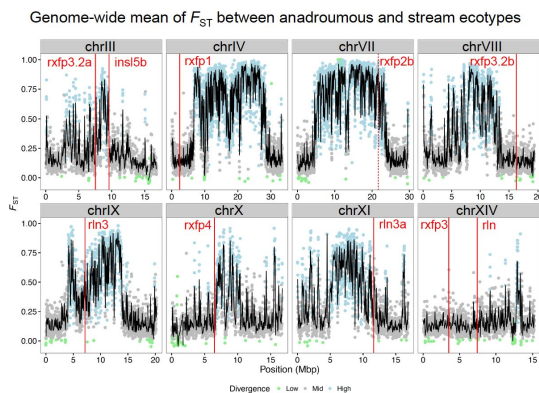


図3. 遡河型と淡水型間で遺伝的分化を起こした領域
*リラキシン関連遺伝子が存在する部位を赤線で示した。この解析はMark Ravinet博士の協力により行った。

【3】まとめ

イトヨには3種のリラキシン遺伝子(*rln*, *rln3a*, *rln3b*)が存在し、脳で強い発現を示した。遡河型と淡水型イトヨの脳におけるリラキシン遺伝子の発現を解析すると*rln*および*rln3b*が遡河型において有意に高い発現を示すが、このリラキシン遺伝子の発現の違いはシス領域に変異はあるが強い選択がかかっていない可能性、あるいは別の遺伝子座のトランス作用による可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計2件)

日下部誠, 石川麻乃, Mark Ravinet, 吉田恒太, 牧野能士, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 北野潤(2017) イトヨの海水適応に必須な遺伝子を遺伝学的視点から探る. **月刊海洋** (通巻557号, Volume 49, Issue 4 April Pages 187-195) [査読なし]

Kusakabe M, Ishikawa A, Ravinet M, Yoshida K, Makino T, Toyoda A, Fujiyama A, Kitano J. (2017) Genetic basis for variation in salinity tolerance between stickleback ecotypes. *Molecular Ecology* (Volume 26, Issue 1, Pages 304-319) [査読あり]

(学会発表)(計8件)

日下部誠, 石川麻乃, Mark Ravinet, 北野潤 イトヨにおける浸透圧調節に関わる遺伝基盤の解析 日本動物学会第88回大会 (2017)

Kusakabe M. Identification of genes essential to overcome salinity stress in threespine stickleback. Impacts of Water Quality and Climate Change on Marine Life, Marine Molecular Ecology, Gordon Research Conference (2017) [招待講演]

Kusakabe M, Yada T, Young G, McCormick SD. Transcript levels of cortisol signaling-related genes in the gills of Atlantic salmon (*Salmo Salar*) following seawater and freshwater acclimations. 18th International Congress of Comparative Endocrinology (2017)

日下部誠, 石川麻乃, Mark Ravinet, 北野潤, 椋田崇生 遡河型と淡水型イトヨ脳におけるリラキシン遺伝子発現量の違いの解析 第41回日本比較内分泌学会大会 (2016)

Kusakabe M, Ishikawa A, Ravinet M, Kitano J, Mukuda T. Expression and localization of relaxin related genes in the brain of threespine stickleback. 8th International Symposium on Fish Endocrinology (2016)

Kusakabe M, Ishikawa A, Ravinet M, Yoshida K, Makino T, Kitano J. Identification of genes responsible for adaptation to different salinities in threespine stickleback. 8th International Symposium on Fish Endocrinology (2016)

Kusakabe M, Mukuda T. Localization of

relaxin-3 genes in the brain of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). 第 40 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 37 回大会合同大会 (2015)

Kusakabe M, Ishikawa A, Yoshida K, Kitano J. Identification of genes that ensure the physiological isolation between anadromous and stream resident ecotypes. 8th International Conference on Stickleback Behavior Evolution (2015)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日下部 誠 (KUSAKABE, Makoto)
静岡大学・理学部・准教授
研究者番号： 40451893

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

椋田 崇生 (MUKUDA, Takao)
鳥取大学, 医学部, 講師
研究者番号： 60346335

北野 潤 (KITANO, Jun)
国立遺伝学研究所, 集団遺伝研究系, 教授
研究者番号： 80346105

(4)研究協力者

Mark Ravinet (RAVINET, Mark)
University of Oslo, Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis, Researcher