

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14766

研究課題名(和文)プロラクチン研究の新展開：その起源と多機能化をもたらした要因の解明

研究課題名(英文) A new development of prolactin research to understanding the origin and multi-functionalization

研究代表者

兵藤 晋 (HYODO, SUSUMU)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：40222244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、水電解質代謝や生殖活動を含めて300以上もの生物学的機能が知られる多機能ホルモン、プロラクチン(PRL)の起源と進化を理解することを目的としている。軟骨魚類においてすでにPRLとその受容体が存在することを明らかにし、その作用が脳下垂体における傍分泌作用であることも見出した。また、両生類のウシガエルでは、魚類PRLのオルソログであるPRL1Bが幼生期に、四肢動物PRLのオルソログであるPRL1Aが変態最盛期以降に高い発現を示し、分子進化と機能の進化との間の関連が示唆された。特異的な抗体やイムノアッセイなどの実験系も確立し、ノックアウト系統の作出も進めている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understanding origin and evolution of pituitary hormone, prolactin (PRL). Genome and transcriptome analyses revealed that PRL and its specific receptor exist in elasmobranchs, suggesting that duplication and subsequent diversification of the growth hormone/PRL family already occurred when the cartilaginous fish lineage diverged. The cells expressing PRL receptor located close to the PRL-producing cells in the rostral pars distalis of pituitary of juvenile bull shark, implying that one of the original functions of PRL is paracrine control of pituitary function. Meanwhile, in the bullfrog, PRL1B, which is the orthologue of fish PRL, showed high expression in the pituitary of pre-metamorphic tadpoles, while tetrapod-type PRL1A, which is duplicated from the PRL1B gene, was highly expressed in the metamorphic tadpole and adult pituitaries. These achievements offer new insights into molecular and functional evolution of multifunctional PRL in vertebrates.

研究分野：魚類生理学、比較内分泌学

キーワード：プロラクチン 軟骨魚類 両生類 脳下垂体 環境適応 変態

1. 研究開始当初の背景

プロラクチン (PRL) は、ウサギの乳汁分泌を刺激することから命名された脳下垂体前葉ホルモンであり、現在では水電解質代謝 (淡水適応) や生殖活動を含めて 300 以上もの生物学的機能を持つ多機能ホルモンとして知られている。PRL は、成長ホルモンやソマトラクチン、胎盤性ラクトゲンとともにファミリーを形成する。その分子進化は、川内らにより長年にわたって精力的に研究されてきた。しかしながら、軟骨魚類における PRL 同定の試みはいずれも失敗に終わり、PRL は硬骨魚類になって初めて出現した、比較的新しいホルモンではないかと考えられるようになっていた。ただし、Atlantic stingray の脳下垂体抽出物中にはイモリの water drive テスト (PRL のバイオアッセイ系) で活性を示す物質の存在が示唆されるなど、PRL の存在を示唆するデータも存在していた。一方で、軟骨魚類全頭類のゾウギンザメからは、PRL2 として知られる分子の存在が報告され、PRL の起源という大きな謎が残されたままであった。

そのような中、ゾウギンザメゲノムを元に、我々は 2015 年に世界で初めて、軟骨魚類にもプロラクチンが存在することを発見した。この発見は、古典的なホルモンである PRL に、2 つの新しい概念をもたらした。すなわち、1) PRL の起源が軟骨魚類まで遡ること、2) PRL には魚類型と四肢動物型という 2 つの PRL 分子 (遺伝子) が存在する、ということである。原始両生類において PRL 遺伝子は魚類型と四肢動物型という 2 つの遺伝子に重複し、爬虫類以降では魚類型 PRL 遺伝子は失われた。ところが、両生類は魚類型と四肢動物型の 2 つの PRL 遺伝子を現在でも保持していたのである (図 1)。魚類型と四肢動物型という 2 つの PRL 遺伝子の存在は、他に類を見ない PRL の多機能化とどのような関係があるのだろうか？



図 1: GH/PRL の進化: After Yamaguchi et al.

2. 研究の目的

以上の背景のもと、本研究では、以下の 2 つのことを目的とした。ひとつは、PRL の分子と機能の起源に関するものである。軟骨魚類から PRL を発見したものの、全頭類のゾウギンザメのみの成果であり、軟骨魚類のほとんどを占める板鰓類 (サメ・エイ) については PRL が存在するかどうか、全くわかっていなかった。円口類に関しては、すでにゲノム配列が公開されているウミヤツメでは成長ホルモンしか見つかっていない。円口類ではまだ PRL 遺伝子への重複と分化は起こっていないのだろうか？さらには、ゾウギンザメのゲノム中には PRL が存在したものの、PRL 受容体と考えられる遺伝子は見つけることができなかった。ホルモンが作用するためには特異的な受容体に結合することが必要であり、ゾウギンザメの PRL はどのような受容体に結合することでその機能を発揮するのだろうか？軟骨魚類では、リガンドは重複してすでに存在しているものの、受容体はまだ生じていないのだろうか？

もうひとつは、我々が「魚類型」と「四肢動物型」とよぶ、2 つの PRL 遺伝子の存在である。特に、原始両生類において PRL 遺伝子の重複が起こったと考えており、少なくとも複数種の両生類では両方の PRL 遺伝子を持つことを見出している。この 2 つの PRL は両生類において機能しているのだろうか？このような遺伝子重複が、PRL の多機能化と関連があるのだろうか？

3. 研究の方法

起源・進化については代表者の兵藤が、両生類研究は分担者の鈴木と岡田が主に担当し、連携しながら進めた。

起源と進化の研究は、主に軟骨魚類を対象に行った。他の脊椎動物での PRL の機能を考え、サメ類の中で唯一河川に遡上し淡水と海水の両環境で生息できるオオメジロザメ、飼育下での繁殖が可能で繁殖サイクルを追った解析が可能なトラザメ、飼育下でカニキュレーションなどの手術が可能でドチザメを用いた。トラザメとドチザメは漁協を通して購入し、大気海洋研究所に運搬して飼育実験を行った。オオメジロザメは大型で研究所では飼育実験が不可能なことから、美ら海水族館と共同で淡水移行実験を行った他、2016 年の 6 月から 8 月の各月に、浦内川で環境調査とともに刺し網による捕獲調査を行い、そこで捕獲されたオオメジロザメ幼魚の脳下垂体を採取した。遺伝子発現の解析を行う目的では、組織を素早く採取した後、液体窒素で凍結あるいはフィールドにおいては RNAlater を用いて RNA を安定化させ、凍結保存した。組織化学的解析のためには、組織を採取後、酢酸を加えないブアン氏液で固定し、パラフィン切片を作製した。In situ hybridization はすでに確立した手法で行った (Takabe et al., 2016)。ドチザメのカニ

レーションは、麻酔後腹部を切開し、背大動脈から分岐し胃の側面を走る動脈にポリエチレンチューブを挿入した。カニューレ内はヘパリン入りのサメリンガーで満たし、カニューレの先端が背大動脈まで到達しており、血液が吸い出せることを確認した。

一方、両生類の研究ではウシガエルを用いた。我々は、無尾両生類のアフリカツメガエルやネットイツメガエル、有尾類のアホロートルのゲノム中に2種類のPRL、すなわちPRL1AとPRL1B遺伝子が存在すること、シンテニー解析からPRL1Aが鳥類や哺乳類のPRLと、PRL1Bが魚類のPRLと相同な遺伝子であることを発見した(Yamaguchi et al., 2015)。それぞれのPRLの機能を調べるためには、大型で、変態過程など実験系として優れ、すでにPRL1Aに関する生理作用の研究が進んでいるウシガエルが最適だと判断した。また、ネットイツメガエルでCRISPR/Cas9システムを用いてノックアウトシステムの作出も試みた。

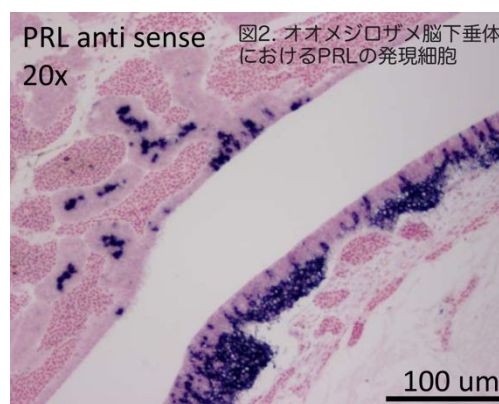
4. 研究成果

(1) 軟骨魚類におけるPRLならびにPRL受容体の存在

理化学研究所と共同で整備したオオメジロザメの脳下垂体、鰓、腎臓におけるRNA-seqデータベースを解析したところ、脳下垂体からPRLのリガンドだけでなく、PRL受容体と考えられる配列を見出すことができた。脳下垂体のcDNAプールからPRLならびに受容体のcDNAをクローニングし、分子系統学的解析によりそれぞれPRLとPRL受容体をコードすることを確認した。さらに、相同な分子がトラザメ脳下垂体でも発現していることも確認した。ゾウギンザメではPRL受容体と相同な分子は発見できず、PRLがどのような受容体と結合するのか、同じファミリーである成長ホルモン受容体と結合するのかなど、不明であった。今回軟骨魚類の大半を占める板鰓類からPRLとその受容体が見つかったことで、少なくとも軟骨魚類と硬骨魚類が分岐したときには、PRLとその受容体遺伝子が存在したことが明らかとなった。

オオメジロザメのさまざまな組織を調べたところ、PRLは脳下垂体のみで発現が認められた。PRL受容体も脳下垂体で発現が最も高く、弱いながらも腎臓でも発現が認められた。In situ hybridizationにより、PRL産生細胞は脳下垂体前葉端部に存在することがわかり、その数はゾウギンザメと比べて明らかに多かった(図2)。オオメジロザメ幼魚の脳下垂体には、脳室のような空洞が存在し、上皮細胞がその空洞を裏打ちしていた。PRL

産生細胞は上皮細胞とは異なるものの、この空洞に沿って存在する様子が観察され、一部は上皮細胞の間を割るようにして「室」と直に接する様子が観察された(図2)。ゾウギンザメでは、前葉端部には濾胞状の細胞集団が存在し、PRL産生細胞はその細胞集団の中に存在したが、オオメジロザメで見られた空洞とゾウギンザメの濾胞状構造の関係は現時点では不明である。また、PRL受容体mRNAを発現する細胞も、この空洞に沿って、PRL産生細胞の近傍に存在することがわかった。脳下垂体以外では受容体の強い発現が認められなかったことから、脳下垂体のこれらの細胞がPRLの主要なターゲットだと考えられる。PRL産生細胞と受容体発現細胞が近傍に存在することから、放出されたPRLは傍分泌的に作用すると考えられるが、脳下垂体内に広く存在する脳室様構造にいったん放出され、その後受容体発現細胞に作用する可能性もある。一方、腎臓ではこれまでのところ、受容体発現細胞の検出に成功していない。細胞あたりの発現量が低いと考えられ、検出感度をさらに上げる技術改善が必要だと考えている。



(2) 円口類におけるPRLの存在

軟骨魚類と同様、タンパク質分析ならびにcDNAクローニングのこれまでの試みは、円口類には成長ホルモンしか存在しないという結論を導き出していた。2013年に報告されたウミヤツメのゲノム配列にもPRLは存在せず、これまでの考えがサポートされた。しかしながら、理化学研究所の工樂博士との共同研究により、PRLと思われる遺伝子を持つヤツメウナギが1種いるという予備的な結果を得た。もしこの結果が正しければ、円口類ですでに成長ホルモンとPRLの遺伝子重複と分化が起こっており、その後ほとんどのヤツメウナギ類ではPRL遺伝子を失ったこととなり、極めて大きな発見となる。円口類は2回目の全ゲノム重複を経験したものの、多くの遺伝子を失ったために見かけ上2回目の全ゲノム重複を起こしていないように見

えることが提唱されており (Kuraku, 2011) PRL 遺伝子もそのうちのひとつなのかもしれない。

(3) ドチザメにおけるカニューレシオン手法と経時採血による解析手法の確立

ホルモン作用の解析に向けて、血管内にカニューレを挿入し、無麻酔下でホルモンの投与ならびに採血ができる系を、ドチザメを用いて確立した。背大動脈から分岐して胃の側面を走る動脈にカニューレ (ポリエチレンチューブ) を挿入した。この系を用いて、経時採血によるホルモン量の変動や、ホルモンの血管内への投与とその影響を調べることができるかどうか、ストレスとコルチコイドをモデルに調べた。その結果、日周変動のような頻繁な採血も問題なく、麻酔が不要なためにストレスによる影響を考慮しなくてもよい、優れた飼育実験系の確立に成功した。急性のストレス下で血中のコルチコイドの値が一過的に上昇する動きもとらえることができた。また、一定量のホルモンをカニューレから血液中に直接投与することも可能となり、投与後のコルチコイド濃度の経時的な変動をとらえることもできた。この研究成果は、現在原著論文にまとめている。

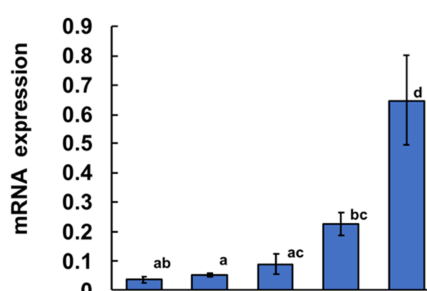
(4) ウシガエルにおける 2 種類の PRL

ウシガエルでは PRL1A のみがクローニングされており、今回新たに PRL1B cDNA のクローニングを幼生の下垂体を用いて行った。ウシガエル PRL1B cDNA は 222 残基のアミノ酸をコードしていた。得られた PRL1B の推定アミノ酸配列は、ウシガエルの PRL1A と 48% が一致し、ネッタイツメガエルとアフリカツメガエルの PRL1B との相同性はそれぞれ 63% と 62% であった。

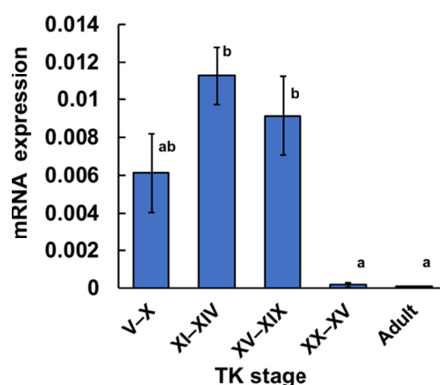
成体では PRL1A が脳下垂体前葉でのみ高レベルで発現しており、PRL1B の発現はいずれの組織でもみられなかった。一方、幼生では脳下垂体前葉において PRL1A と PRL1B の両方の mRNA が発現しており、その他の組織では、どちらの発現も検出されなかった。変態期の幼生と成体の脳下垂体における発現を調べたところ、PRL1A mRNA レベルは前変態期と変態始動期では低く、変態最盛期で上昇し、成体では顕著に高まっていた (図 3A)。対照的に、PRL1B mRNA は前変態期と変態始動期に高く、変態最盛期以降にはほとんど発現は認められなかった (図 3B)。我々はシンテニー解析から PRL1A を四肢動物型、PRL1B を魚類型と称してきた。今回ウシガエルにおける発現が、魚類型の PRL1B が水生生活を送る変態前に高く、四肢動物型の PRL1A が変態最盛期以降に高かったことは、それぞれのホルモンの機能と進化を考えると大変興味深い。無尾両生類にお

いて、PRL は古くは変態抑制ホルモンと考えられていた。しかしながら、幼生器官の発達を促したり変態の進行を抑制する一方で、成体器官の発達を促進することも知られている。このような一見矛盾する作用がどのような要因によるのかは不明であったが、変態の過程で PRL1B と PRL1A の発現パターンに大きな変化があることから、この 2 つの PRL が上記のような謎を解くことになるかもしれない。また、ネッタイツメガエルでは、PRL1A と 1B 両方の遺伝子の発現が成体の脳下垂体で検出されている。ウシガエルとツメガエルの違い、特に、成体の水への依存度という観点からとても興味深い。

A: PRL1A



B: PRL1B



(5) PRL 抗体の作製と組織学的解析、アッセイ系の確立

ウシガエル PRL1A と 1B のアミノ酸配列を元に、それぞれを特異的に検出でき、かつ抗原性に問題が無い部分を選択し、抗原ペプチドを作製した。コンジュゲート後、ウサギに免疫して抗血清を得た。さらに、抗原吸着カラムを用いて抗体をアフィニティ精製した。この抗体を用いてウシガエルの成体および前変態期幼生の脳下垂体の免疫組織化学染色を行ったところ、qPCR の結果と一致して、成体の下垂体では強い PRL1A シグナルが観察されたが、PRL1B のシグナルは認められなかった。幼生の下垂体では PRL1A と 1B の両方の免疫陽性反応が検出された。ともに脳下垂体前葉の細胞に存在し、類似した

分布を示したものの、同一細胞が2つのPRLを産生するのかどうかは、さらに検討が必要である。

今後、PRLの機能を調べるためには、血液中のPRL濃度を測定できるようにすることが重要である。そこで、上記の抗原ペプチドならびに精製抗体を用い、ユーロピウムで標識して競合法またはサンドイッチ法による免疫測定系の開発を進めている。標準曲線には問題なく描けており、これまで使用されてきたウシガエルPRLのRIA系に近い感度で測定できそうである。すでに幼生と成体の血液サンプリングはほぼ完了しており、今後測定を進めていく。

(6) ネットアイツメガエルにおけるゲノム編集

2種類のPRLの機能を遺伝学的に明らかにするため、CRISPR/Cas9システムによるノックアウトシステムの作出を進めた。PRL1A遺伝子は5エキソン/4イントロン、PRL1B遺伝子は4エキソン/3イントロンから構成されていた。立体構造に重要な3番目のシステインおよび受容体との結合に関わると考えられるプロリンを含む部分にガイドRNAを合成した。少なくとも新規のPRL1Bについては効率的に変異を起こすことも確認し、現在受精卵へのインジェクションを進めているところである。この実験系が完成すれば、「魚類型」と「四肢動物型」に機能分化が起こっているのか、その役割を直接的に検証できるようになる。

以上のとおり、数年前までは硬骨魚類で生じたと考えられていたPRLが軟骨魚類からその受容体とともに存在すること、主要な役割は脳下垂体での傍分泌作用であること、さらには円口類ですでにPRLが存在する可能性も示すことができた。一方両生類においては、シンテニー解析から「魚類型」としていたPRL1Bが変態前の幼生期に、「四肢動物型」としていたPRL1Aが変態最盛期以降に高い発現を示し、2つのPRLが水生期と陸生期それぞれに重要な役割を果たす可能性を示すことができた。抗体の作製、ホルモンのアッセイ系の確立もでき、ネットアイツメガエルではノックアウトシステムの作出も進んでいる。進化、機能の両面で発展させていくための道具を多数そろえることができた、意義の大きな萌芽研究となったと考えている。

これまで、成長ホルモンとPRLにはそれぞれひとつずつの受容体のみ存在すると考えられてきた。ごく最近、魚類で成長ホルモン受容体とPRL受容体の両方に相同性を示すPRL受容体様遺伝子「CRFA4」の存在が明らかになった。ただし、この遺伝子は魚類のみが有していて、四肢動物には存在しない

とされた(Ocampo Daza and Larhammar, 2018)。しかし最近、イモリではPRL受容体様遺伝子の存在が示唆され、PRL系はこれまで考えられていたものよりも極めて複雑であることがわかりつつある。変態、適応、行動、繁殖といったPRLの多様な機能との関わりなど、今後の発展が期待できる。

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11件)

Takagi W, Kajimura M, Tanaka H, Hasegawa K, Ogawa S, Hyodo S. Distributional shift of urea production site from the extraembryonic yolk sac membrane to the embryonic liver during the development of cloudy catshark. *Comp Biochem Physiol A*, 211, 7-16, 2017. 査読有 doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.05.019

Okamoto E, Kusakabe R, Kuraku S, Hyodo S, Robert-Moreno A, Onimaru K, Sharpe J, Kuratani S, Tanaka M. Migratory appendicular muscles precursor cells in the common ancestor to all vertebrates. *Nature Ecol Evol* 1, 1731-1736, 2017. 査読有 doi:10.1038/s41559-017-0330-4

鈴木雅一, 両生類の水代謝と環境適応におけるAQPの役割. *比較内分泌学*, 43, 84, 2017. 査読無 10.5983/nl2008jsce.43.84.

Hasegawa K, Kato A, Watanabe T, Takagi W, Romero MF, Bell JD, Toop T, Donald JA, Hyodo S. Sulfate transporters involved in sulfate secretion in the kidney are localized in the renal proximal tubule II of the elephant fish. *Am J Physiol*, 310, R66-R78, 2016. 査読有 doi: 10.1152/ajpregu.00477.2015

Okada R, Yamamoto K, Hasunuma I, Asahina J, Kikuyama S. Arginine vasotocin is the major adrenocorticotrophic hormone-releasing factor in the bullfrog. *Gen Comp Endocrinol*, 237, 121-130, 2016. 査読有 doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.08.014

Takabe S, Inokuchi M, Yamaguchi Y, Hyodo S. Distribution and dynamics of branchial ionocytes in houndshark reared in full-strength and diluted seawater environments. *Comp Biochem Physiol A*, 198, 22-32, 2016. 査読有 doi: 10.1016/j.cbpa.2016.03.019

山口陽子, 兵藤晋. プロラクチンの分子進化に関する新事実-サメでの発見と2種類の遺伝子. *比較内分泌学*, 42, 12-14, 2016. 査読無 doi.org/10.5983/nl2008jsce.42.12

岡田令子, 鈴木賢一. 両生類の変態: 分子から個体レベルの制御. *生物科学*, 67, 146-153, 2016. 査読無

www.ruralnet.or.jp/seibutsu/067_03.htm

〔学会発表〕(計37件)

兵藤晋, 広塩性オオメジロザメの生理生態学的研究, 第3回サメ類研究座談会, 2017年.

伊藤希実, 変態期のウシガエル幼生下垂体中の2種類のプロラクチン mRNA の発現様式, 平成29年度日本動物学会中部支部大会, 2017年.

工樂樹洋, ゲノムからみる脊椎動物内分泌系の進化: 大規模配列情報整備から分子探索まで, 第42回日本比較内分泌学会大会, 2017年.

山口和晃, 板鰓類の全ゲノムシーケンスから明らかとなった有顎脊椎動物ペプチドホルモンの起源と進化, 第42回日本比較内分泌学会大会, 2017年.

鈴木雅一, 両生類の水環境適応におけるアクアロリンの役割, 第88回日本動物学会, 2017年.

岡田令子, ニホンアマガエル凍結耐性におけるグルコースの役割, 第88回日本動物学会, 2017年.

兵藤晋, 海洋生物研究への招待: サメ類をモデルに, 第57回生命科学夏の学校, 2017年.

兵藤晋, 魚類の体液調節, 第35回内分泌代謝学サマーセミナー, 2017年.

Susumu Hyodo, Molecular and functional evolution of neurohypophysial hormone system: with special reference to a possible function of newly discovered V2b receptor in catshark. 18th International Congress of Comparative Endocrinology, 2017年.

阿達駿, ニホンアマガエルの凍結耐性に関わるグルコース輸送体 (GLUT) の機能, 日本動物学会中部支部大会, 2016年.

岡田令子, 変態に関わる下垂体ホルモンの放出制御因子, 第2回次世代両生類研究会, 2016年.

Reiko Okada, Arginine vasotocin, but not authentic corticotropin-releasing factor, acts as the major factor for inducing the corticotropin release from the bullfrog pituitary. 22nd International Congress of Zoology. 2016年.

鈴木雅一, 両生類の水代謝. 第41回日本比較内分泌学会大会. 2016年

今関到, 広塩性軟骨魚オオメジロザメの河川内生息環境と体液調節, 日本水産学会春季大会, 2016年

Susumu Hyodo, New insights into the molecular evolution of classical hormones: lessons from cartilaginous fish. The 8th congress of Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 2016.

Yoko Yamaguchi, Molecular evolution of prolactin: new insights from a recent study in cartilaginous fish. The 22nd International Congress of Zoology. 2016.

Norifumi Konno, The role of vasotocin V2a-type receptor in teleost: insights from studies using V2aR-knockout medaka. The 22nd International Congress of Zoology, 2016.

Susumu Hyodo, Environmental adaptation of marine organisms. NTU-UTOKYO Joint Conference, 2016.

位寄あゆこ, ストレス刺激がサメの接触に与える影響, 第41回日本比較内分泌学会, 2016年.

井上夏紀, トラザメの脳下垂体ならびに生殖器官における神経葉ホルモンの機能, 第41回日本比較内分泌学会, 2016年.

〔図書〕(計2件)

兵藤晋, 裳華房, ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ V: ホメオスタシスと適応, 2016, pp. 16-31 (体液調節機構の進化: 魚類.).

鈴木雅一, 裳華房, ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ V: ホメオスタシスと適応, 2016, pp. 106-121 (皮膚).

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://physiol.aori.u-tokyo.ac.jp/seiri/> (兵藤)

<https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=11026&l=0> (鈴木)

<https://www.shizuoka.ac.jp/bio-okada/> (岡田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵藤 晋 (HYODO SUSUMU)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号: 40222244

(2) 研究分担者

鈴木雅一 (SUZUKI MASAKAZU)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号: 60280913

岡田令子 (OKADA REIKO)

静岡大学・理学部・講師

研究者番号: 50386554