

令和元年6月10日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14989

研究課題名(和文) 成長ホルモン分泌促進因子としてのメラニン凝集ホルモンの潜在機能探究

研究課題名(英文) Potential functions of melanin-concentrating hormone as a growth hormone secretagogue

研究代表者

高橋 明義 (Takahashi, Akiyoshi)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：10183849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ニジマス下垂体における成長ホルモン(GH)の遺伝子発現が、給餌条件や季節にもよるが黒背地条件に比べて白背地条件でしばしば亢進すること、ならびに視床下部で産生されるメラニン凝集ホルモン(MCH)がGHの遺伝子発現を抑制することを明らかにした。MCHの遺伝子発現は黒背地に比べて白背地で亢進することから、白背地でのGH遺伝子発現亢進はMCH以外の因子の作用によるものと推察された。さらに、下垂体におけるソマトラクチンの遺伝子発現が背地色の明るさに応じて減少することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メラニン凝集ホルモン(MCH)は多機能ホルモンであり、まだ発見されていない未知の作用が潜んでいる可能性がある。本研究によってMCHニューロンと成長ホルモン(GH)産生細胞の関係の一端が明らかになり、GH分泌に関わる視床下部下垂体軸の機能の理解が進展した。魚類ではMCHの産生量は背地色などの光環境の影響を受ける。従って、本研究の成果は魚類の食欲と成長を支える光環境を検討し、増養殖技術に役立てるための基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed that the white background condition, compared with the black background condition, enhances expression of the growth hormone (GH) gene in the pituitary of rainbow trout depending on feeding conditions and seasons. We also found that the melanin-concentrating hormone (MCH) produced in the hypothalamus suppresses GH gene expression. Since gene expression of MCH is enhanced by the white background condition than by the black background, GH gene expression enhancement in the white background might be owing to the action of factors other than MCH. Furthermore, it became clear that the expression of somatolactin gene in the pituitary decreases according to the brightness of the background color.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：ニジマス 脳 下垂体 メラニン凝集ホルモン 成長ホルモン 背地色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

背地色は魚類の成長に影響をおよぼすことがある。サケ科のサクラマス (*Oncorhynchus masou*) では、白水槽で飼育した個体の方が黒水槽で飼育した個体よりも成長が早い (栗栖ら, 2011)。下垂体からの成長ホルモン (GH) の分泌は脳の視床下部により制御されている。GH の分泌は一般に GH 放出ホルモンによって促進されるが、魚類ではその活性が弱く、むしろ別の視床下部ホルモンの活性が高い (Canosa *et al.*, 2002)。サケ科魚類においては、有力な候補すら提示されていなかった。メラニン凝集ホルモン (MCH) は体色調節に加えて、食欲亢進作用を有する視床下部ホルモンであり、背地色によって遺伝子発現量が変化することが知られている (Takahashi *et al.*, 2004; Green *et al.*, 1991)。申請者らは、ニジマス (*O. mykiss*) の体色調節に関わる内分泌機能を研究している過程で、MCH 受容体遺伝子が下垂体で強く発現していることを見いだした。この発見により、MCH 受容体が GH 細胞で発現しているならば、MCH は GH の産生と分泌を調節するとの着想を得た。一方、下垂体では GH と祖先を同じくするプロラクチン (PRL) とソマトラクチン (SL) も産生される (川内, 1996)。また、GH は成長に直接的に効果を現すインスリン様成長因子 (IGF-I) の肝臓からの分泌を促進する (Duan, 1998)。したがって、MCH が GH の産生と分泌に影響するならば、背地色の違いは MCH のみならず GH、PRL、SL、IGF-I の遺伝子発現にも影響する可能性がある。MCH と GH 産生との関係を明らかにすることは、背地色が魚類の成長に影響するメカニズムの理解につながる。

2. 研究の目的

本研究はニジマスにおける MCH と GH 産生および IGF-I 産生の関係を明らかにすることを目的とした。そのために、(1) 背地色の違いが MCH 遺伝子、GH 遺伝子、および GH 関連遺伝子の発現量に及ぼす影響、(2) 下垂体での MCH 受容体発現細胞の同定、および (3) GH 遺伝子発現に対する MCH の効果の検証を行なった。

3. 研究の方法

(1) 背地色の違いが MCH 遺伝子、GH 遺伝子、および GH 関連遺伝子の発現量に及ぼす影響

白背地と黒背地で一定期間飼育したニジマス下垂体中における GH 遺伝子発現量、ならびに脳 (視床下部を含む脳全体) における MCH 遺伝子発現量を測定した。ニジマスにおける GH の分泌は栄養状態の影響を受け、無給餌飼育により高くなることが知られていることから、白および黒背地飼育は給餌飼育と無給餌飼育の両方で実施した。以上の白および黒背地飼育は、研究期間中に数回繰り返して行い、再現性を確認した。季節の影響も考慮して、飼育実験の時期は、日長が短日から長日に向かう春季、および長日から短日に向かう秋季とした。遺伝子発現量は定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) 法によって測定した。背地色の明暗が GH および GH 関連遺伝子の発現量に及ぼす影響を検証するために黒、濃灰、薄灰、白、および青の背地色においてニジマスを 59 日間飼育した。その後、定量 RT-PCR によって下垂体の GH、PRL、SL 遺伝子の発現量を測定した。

(2) 下垂体での MCH 受容体発現細胞の同定

白背地水槽内で 7 日以上飼育したニジマスの下垂体を用いて *in situ* hybridization (ISH) により下垂体内の MCH-R1 mRNA の局在解析を行った。さらに免疫組織化学染色法により下垂体内の MCH 産生細胞の軸索の分布を調べた。

(3) GH 遺伝子発現に対する MCH の効果

ニジマス腹腔内に MCH を投与し黒背地水槽飼育を行った。1 回目の試験では、1 $\mu\text{g/g}$ 体重の MCH を投与し、投与 1 日後、投与 3 日後に下垂体を採取した。2 回目の試験では、0.1 $\mu\text{g/g}$ 体重もしくは 1 $\mu\text{g/g}$ 体重の MCH を毎日投与し飼育 5 日目に下垂体を採取した。また、ニジマス下垂体を MCH 存在下 (0.01 μM 、0.1 μM 、1 μM) または非存在下 (対照群) で 3 日間培養した。これらの下垂体から RNA を抽出し、GH mRNA を定量した。

4. 研究成果

(1) 背地色の違いが MCH 遺伝子、GH 遺伝子、および GH 関連遺伝子の発現量に及ぼす影響

MCH mRNA 量は給餌条件や季節の違いに関係なく、3 日以上白背地飼育した個体の方が黒背地飼育した個体よりも多かった (図 1)。GH mRNA 量は 15 日間黒背地条件下で飼育したとき、無給餌飼育個体の方が給餌飼育個体よりも多かったが、白背地飼育条件下では給餌条件の違いによる差はなかった。また、秋季と冬季における背地色別飼育では、給餌飼育条件下で白背地群の方が黒背地群よりも GH mRNA 量が多かった (図 2)。一方、肝臓 IGF-I mRNA に、背地色に対応する変動は認められなかった。黒、濃灰、薄灰、白、および青の背地色において飼育したニジマスでは、体色は背地色の明度に応じて変化した。下垂体における GH 遺伝子と PRL 遺伝子の発現に背地色に対応する変動は認められなかった。しかし黒背地での SL 遺伝子の発現は白背地よりも高く、濃灰と薄灰ではその中間であった (図 3)。青背地では白背地と同様であった。遺伝子発現が背地色と明らかに連動するのは SL であることが判明した。

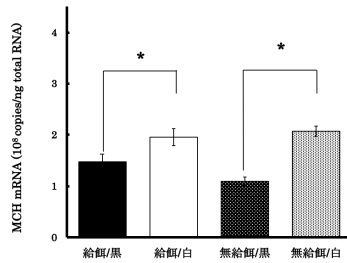


図 1. 15 日間背地色別飼育したニジマスの脳内 MCH mRNA 量
アスタリスクは有意差があることを示す (P<0.05)。

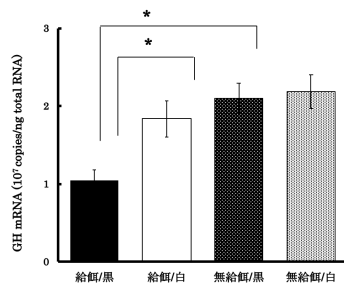


図 2. 15 日間背地色別飼育したニジマスの下垂体内 GH mRNA 量
アスタリスクは有意差があることを示す (P<0.05)。

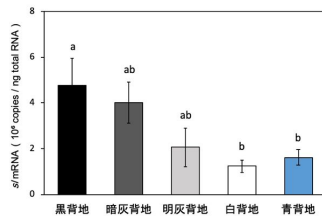


図 3. 45 日間背地色別飼育したニジマスの下垂体内 SL mRNA 量
グラフ内の英字が異なるものは有意差があることを示す (P<0.05)。

(2) 下垂体での MCH 受容体発現細胞の同定

MCH-R1 のプローブを用いた ISH では下垂体前葉付近において発色が認められた(図 4)。免疫組織化学染色において、前葉主部に GH、視床下部から中葉にかけて投射する MCH の軸索が確認された。MCH-R1 が下垂体前葉に局在していることから、MCH が直接的に GH の発現を亢進することが示唆された(図 5)。一方、MCH 免疫陽性繊維が下垂体の前葉から中葉にかけて広がっていることから、MCH が GH 以外のホルモン産生細胞に作用することも示唆された。

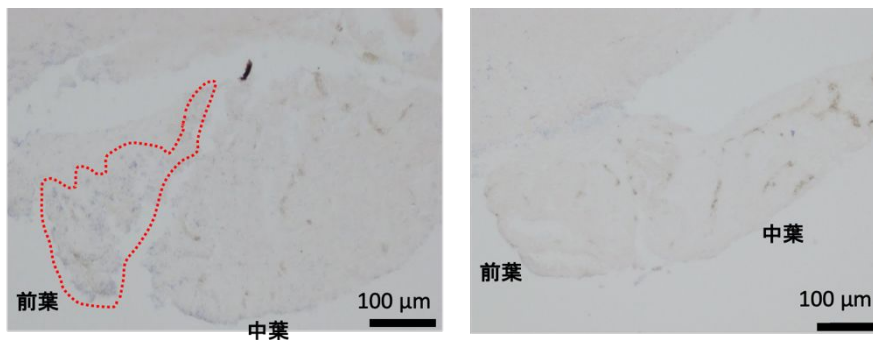


図 4. 下垂体における MCH-R1 mRNA の分布
左図はアンチセンスプローブを用いた結果で、赤い点線の内側が下垂体前葉主部を示す。右図はセンスプローブと反応させたネガティブコントロールの結果を示す。

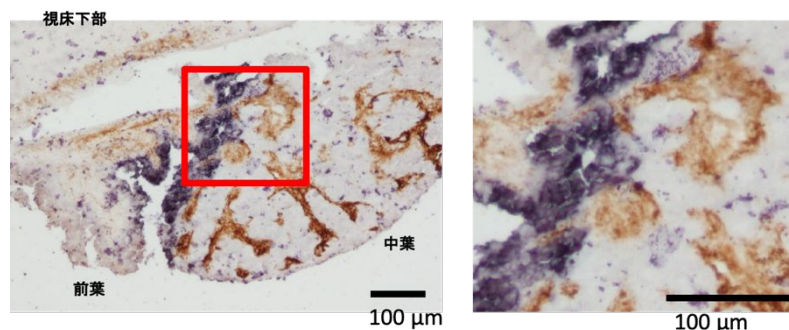


図5. 下垂体におけるMCHニューロンとGH産生細胞の分布
左図の中央の赤枠内を拡大したものを右図に示す。茶色の染色はMCH免疫陽性、紫色の染色はGH免疫陽性。

(3) GH 遺伝子発現に対するMCHの効果

MCHの腹腔内による下垂体GH mRNA含量の変動は認められなかった。一方、*in vitro*で下垂体にMCHを作用させた結果、下垂体GH mRNA含量は0.1 μM MCH区で有意に減少し、1 μM MCH区で対照区と同様であった(図6)。以上の結果はMCHがGH遺伝子の発現を抑制することを示唆する。

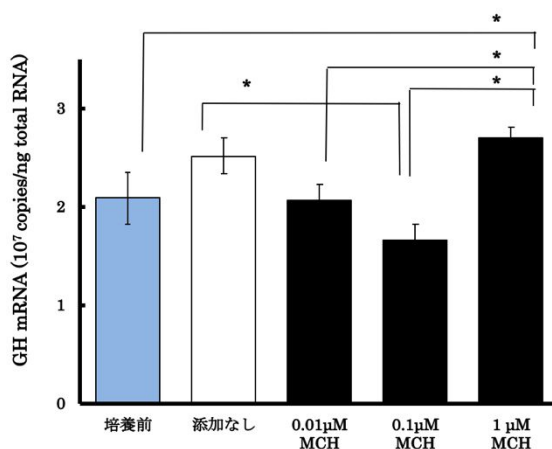


図6. MCHを添加して器官培養したニジマス下垂体内GH mRNA量
アスタリスクは有意差があることを示す(P<0.05)

以上、本研究によってニジマス下垂体における成長ホルモン(GH)の遺伝子発現が、給餌条件や季節にもよるが黒背地条件に比べて白背地条件でしばしば亢進すること、ならびに視床下部で産生されるメラニン凝集ホルモン(MCH)がGHの遺伝子発現を抑制することが明らかになった。哺乳類においてMCHは神経ペプチドとして摂食調節、エネルギー代謝調節、記憶・学習、睡眠・覚醒調節等さまざまな脳機能に関与する(Nahon, 2006; Adamantidis and de Lecea, 2009)。一方、魚類ではMCHは血中にホルモンとして分泌され体色調節に関わることが知られているが、脳における機能については哺乳類に比べて不明な点が多い。本研究によりMCHがGHを介して多様な機能を発揮することが示唆された。

MCHの遺伝子発現は黒背地に比べて白背地で亢進することから、白背地でのGH遺伝子発現亢進はMCH以外の因子の作用によるものと推察された。下垂体では背地色に応じて黒色素刺激ホルモン(-MSH)の産生も変化する(Kang and Kim, 2012)。-MSHは体色調節と摂食調節においてMCHと拮抗的に働く(Tritos and Maratos-Flier, 1999)。今後、GHの産生調節における-MSHの機能の解明が待たれる。

研究開始当初は予期していなかったことだが、下垂体におけるソマトラクチン(SL)の遺伝子発現が背地色の明るさに応じて減少することが明らかとなった。ニジマスにおいてSLはGHと共に脂質代謝にも関与する(Mercure *et al.*, 2001)。SLもまた背地色による成長の変化に関与する可能性がある。以上の成果は魚類の食欲と成長を支える光環境を検討し、増養殖技術に役立つ基盤となることを期待される。

<引用文献>

- Adamantidis A, de Lecea L (2009). A role for Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. *Peptides* 30, 2066-2070.
- Canosa LF, Xi WI, Peter RE. (2002). Regulation of expression of somatostatin genes by sex steroid hormones in goldfish forebrain. *Neuroendocrinology* 76, 8-17.
- Duan C. (1998). Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *Journal of Nutrition* 128, 306-314.
- Green JA, Baker BI, Kawauchi H. (1991). The effect of rearing rainbow trout on black or white backgrounds on their secretion of melanin-concentrating hormone and their sensitivity to stress. *Journal of Endocrinology* 128, 267-274.
- 川内浩司. (1996). 成長ホルモン・プロラクチンの分子進化, 『成長ホルモン・プロラクチンファミリー』(針谷敏夫, 川内浩司 編). 学術出版センター, 173-194.
- 栗栖亮, 石塚光, 小林勇喜, 山野目健, 水澤寛太, 千葉洋明, 高橋明義. (2011). サクラマスにおけるメラニン凝集ホルモン遺伝子発現に対する水槽色の効果. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会.
- Kang DY, Kim HC (2012). Relevance of environmental factors and physiological pigment hormones to blind-side hypermelanosis in the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 356, 14-21.
- Mercure F, Holloway AC, Tocher DR, Sheridan MA, Kraak Van der G, Leatherland JF (2001). Influence of plasma lipid changes in response to 17 α oestradiol stimulation on plasma growth hormone, somatostatin, and thyroid hormone levels in immature rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 59, 605-615.
- Nahon JL. (2006). The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *Comptes rendus biologies* 329, 623-638.
- Takahashi A, Tsuchiya K, Yamanome T, Amano K, Yasuda A, Yamamori K, Kawauchi H. (2004). Possible involvement of melanin - concentrating hormone in food intake in a teleost fish, *barfin flounder*. *Peptides* 25, 1613-1622.
- Tritos NA, Maratos-Flier E (1999). Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. *Neuropeptides* 33, 339-349.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- 高橋明義、魚類の潜在能力を呼びおこす“光”、月刊海洋、査読無、49巻、2017、243-248 .
- 高橋明義、(平成27年度水産学進歩賞)魚類の体色調節関連ホルモンの基礎と応用に関する研究、日本水産学会誌、査読無、82巻、2016、270-273 .
- 高橋明義、水澤寛太、古藤澄久、安藤忠、光環境が魚類の体色と成長に及ぼす効果、空気調和・衛生工学、査読無、90巻、2016、953-960 .

[学会発表](計5件)

- 高橋明義、笠木 聡、水澤寛太、清水大輔、有彩色光により促進される魚類成長に対する内分泌系の関与、第45回日本神経内分泌学会学術集会、2018 .
- Takahashi A, Shimizu D, Kasagi S, Mizusawa K, Andoh T, Fish growth under chromatic light, 8th Intercongress symposium of the Asia Oceania Society for Comparative Endocrinology, University of Sydney, 2018 .
- 高橋明義、光の色と魚の成長について、さんりく水産・海洋研究セミナー、2017 .
- 高橋明義、魚類からヒトへ～下垂体-;副腎軸機能に係る機能変遷、第44回日本神経内分泌学会学術集会、シンポジウム3:比較内分泌の視点から神経内分泌を考える、招待講演、2017 .
- 伊東快朔、水澤寛太、天野勝文、高橋明義、背景色がニジマスの成長ホルモンおよび体色調節ホルモン遺伝子の発現に与える影響、第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2016 .

[図書](計4件)

- 高橋明義 他、丸善出版、動物学の百科事典(担当:体色とホルモン 色彩世界に調和し生き抜く妙技) 2018、460-461 .
- 高橋明義 他、恒星社厚生閣、魚類学(担当:11章 内分泌系) 2017、111-120 .
- 高橋明義、伊藤道彦 他、裳華房、ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ 成長・成熟・性分化 継、2016、1-9 .
- 高橋明義、水澤寛太 他、裳華房、ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ 生体防御・社会性 守、2016、119-132 .

[産業財産権]

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kitasato-u.ac.jp/mb/study/course/lab/bunshi/>

講演会

高橋明義、緑色光と魚とホルモンと、ユニコムプラザさがみはら オーサーズカフェ（神奈川県相模原市） 2017年7月22日。

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：水澤 寛太

ローマ字氏名：Kanta Mizusawa

所属研究機関名：北里大学

部局名：海洋生命科学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70458743

研究分担者氏名：阿見彌 典子

ローマ字氏名：Noriko Amiya

所属研究機関名：北里大学

部局名：海洋生命科学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：20588503

研究分担者氏名：安東 宏徳

ローマ字氏名：Hironori Ando

所属研究機関名：新潟大学

部局名：自然科学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：60221743

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。