

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570054

研究課題名 (和文) ヌタウナギの生殖内分泌機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of reproductive endocrine system in hagfish

研究代表者

野崎 眞澄 (NOZAKI MASUMI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：70136232

研究成果の概要 (和文) : クロヌタウナギ(*Paramyxine atami*) の下垂体から生殖腺刺激ホルモン (GTH) の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖をコードする遺伝子を単離した。GTH $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の抗体を用いて下垂体を染色すると両者は同一細胞に局在した。下垂体の GTH 遺伝子発現量や GTH 蛋白質量は生殖腺の機能状態とよく相関した。クロヌタウナギの下垂体から精製した GTH を精巢に投与したところ、エストラジオール-17 $\beta$  の分泌量が用量依存的に増加した。これらの研究により、ヌタウナギが機能的な GTH を持つことが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : Hagfishes, which lack both jaws and vertebrae, are considered the most primitive vertebrate known, living or extinct. Hagfishes have long been the enigma of vertebrate evolution not only due to their evolutionary position but also due to our lack of knowledge on fundamental processes. Key elements of the reproductive endocrine system in hagfish have yet to be elucidated. Here we report the first identification of a gonadotropic hormone (GTH) from the pituitary of the hagfish *Paramyxine atami*. The hagfish GTH consists of two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , which are synthesized and colocalized in the same cells of the adenohypophysis. The cellular and transcriptional activities of hagfish GTH $\alpha$  and  $\beta$  were significantly correlated with the developmental stages of the gonad. The purified native GTH induced the release of gonadal sex steroids *in vitro*. From our phylogenetic analysis, we propose that ancestral thyrostimulin alpha subunit and beta subunit gave rise to GTH $\alpha$  and GTH $\beta$  of the vertebrate glycoprotein hormone family, respectively. We hypothesize that the identity of a single functional GTH of the hagfish provides critical evidence for the existence of a pituitary-gonadal system in the earliest divergent vertebrate that likely evolved from an ancestral, pre-vertebrate exclusively neuroendocrine mechanism by gradual emergence of a new control level, the pituitary, that is not found in the Protochordates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：比較内分泌

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、今からおよそ5億年前に顎のない原始的な魚類（無顎類）として地球上に出現して以来、様々な環境に適応して生息域を広げ、進化を遂げてきた。脊椎動物の適応と放散が成功した要因は、情報伝達系としての神経系と内分泌系、そして両者をつなぐ神経内分泌系の発達によるところが大きい。下垂体は内分泌系の中心器官であり、脳からの指令を腺下垂体ホルモンに変換して体組織に伝達する重要な器官である。それゆえ、脊椎動物の適応と放散は下垂体の進化と密接な関係にあるといえる。下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン（GTH）は、生殖腺の発達や配偶子の形成・成熟に関わるホルモンであり、有顎脊椎動物（顎口類）の生殖現象において中心的役割を担っている。しかし、脊椎動物の進化の最初期に出現した無顎類のヌタウナギにおいては、下垂体の構造もきわめて原始的で、前葉と中葉の区分すらない。また、これまで腺下垂体ホルモンの存在も疑問視されてきたため、ホルモンの単離や機能解析はまったくなされておらず、この動物の生殖現象と内分泌系による制御機構に関する知見はきわめて乏しい。申請者らは、長年に亘って無顎類の腺下垂体ホルモンに関する研究を進めてきた。その結果、ヌタウナギの下垂体は、従来考えられてきた以上に機能的であることが分かってきた。すなわち、申

請者らは、2006年、新潟県産のクロスタウナギ（*Paramyxine atami*）の下垂体からcDNAライブラリーを構築し、世界ではじめてGTHのα鎖とβ鎖をコードする遺伝子の単離に成功した。これらの遺伝子の分子系統解析の結果から、この分子は黄体形成ホルモン（LH）と濾胞刺激ホルモン（FSH）に分化している2種類のGTH分子にそれぞれ約40%の相同性を示すことから、脊椎動物のGTHの共通祖先分子であると考えられる。さらに、得られた遺伝子配列をもとに作成した抗血清による下垂体の免疫組織化学的な観察から、この分子は性成熟の進んだ個体で発現が高まることが示され、GTHがヌタウナギの生殖現象に大きく寄与している可能性が示唆されている。今後、ヌタウナギのGTHの機能を解析することで、脊椎動物の生殖内分泌機構の起源と進化を総括的に理解することが可能となることが強く期待される。

2. 研究の目的

本研究は、ヌタウナギの下垂体-生殖腺系について、下垂体におけるGTH産生細胞の同定、GTHと生殖腺との機能連関、下垂体からの天然型GTHの単離精製とその生物活性の検討、GTH分子族の分子進化、生殖腺における性ステロイドホルモン合成系の解析、性ステロイドホルモンの血中動態と生殖腺

の機能状態の関係などを解析することで、脊椎動物の生殖内分泌機構の起源と進化を総合的に理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) ヌタウナギ下垂体における GTH 産生細胞の同定

GTH 分子の塩基配列をもとに、cRNA 標識プローブを作成し、*in situ hybridization* 法を確立し、GTH の  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖の両方について、発現細胞の同定を行う。同時に、GTH の  $\alpha$  鎖抗体と  $\beta$  鎖抗体を用いての免疫組織化学によるタンパク質レベルでも発現細胞の同定を行い、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖が遺伝子レベルでもタンパク質レベルの両方について、同一細胞で産生されているかどうかを調べる。

#### 2) GTH の発現量と生殖腺の機能連関

下垂体における GTH の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により定量的に測定する。また、GTH の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のタンパク質量を免疫組織化学的に検出する。それらの値と生殖腺の発達段階を関連づけて調べる。

#### 3) ヌタウナギの性ステロイドホルモン測定系の確立、ならびに血中性ステロイドホルモン濃度と生殖腺の機能状態の関係

ヌタウナギ類の血中ステロイドホルモン含量は低く、従来のラジオイムノアッセイ (RIA) では、測定限界以下の値が多いことが報告されている。そこで、RIA よりも高感度な時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) により、ヌタウナギの血中エストラジオール 17 $\beta$  (E2) とテストステロン (T) の測定系を確立する。そして、それらの血中濃度を生殖腺の発達段階と関連づけて調べる。

#### 4) ヌタウナギにおける性ステロイドホルモン合成酵素群の解明

現在、ヌタウナギ類では、どのような性ステロイドホルモンが産生されているか不明である。また、性ステロイドホルモン合成酵素群についても情報がない。そこで、成熟個体より精巣を採取し、cDNA ライブラリーを構築した後、大規模シーケンスにより発現遺

伝子の網羅的探索を行い、ヌタウナギにおける性ステロイド代謝酵素遺伝子群の単離をめざす。次に、単離した遺伝子群に対し、Real-time PCR 法を取り入れ、成長段階や生殖腺の発達段階の違いによる遺伝子発現量の変動を測定し、ヌタウナギにおける性ステロイド合成経路の全貌を明らかにする。

#### 5) ヌタウナギ GTH 蛋白質の単離と生物活性の測定

既に述べたように、申請者らは GTH 遺伝子をクローニングしている。しかし、単離した遺伝子の転写産物であるホルモン分子が実際に GTH としての生理活性をもつかどうかを調べる必要がある。そこで、クロヌタウナギ下垂体より天然型 GTH を単離し、*in vitro* の精巣培養系に投与することにより、培養液中に分泌される性ステロイドホルモン量を測定する。

#### 6) 下垂体 GTH 族ホルモンの分子進化

下垂体 GTH 族ホルモンは、軟骨魚類や硬骨魚類で、すでに LH, FSH, TSH に分化しているが、ヌタウナギやヤツメウナギでの情報が欠如していたため、これまで GTH 分子族がどのように進化してきたのか不明であった。ヌタウナギの GTH の発見により GTH 分子族の進化の道筋を明らかにすることが可能となった。また、最近、ヒトゲノムから GTH 分子族ホルモンと相同な糖タンパク質が発見され、thyrostimulin と命名された。thyrostimulin と相同な遺伝子は、脊椎動物ばかりでなく、ホヤ、ナメクジウオ、線虫やウニなどの無脊椎動物にも広く存在することがわかり、GTH 分子族の祖先分子であると考えられるようになった。そこで、GTH 分子族ばかりでなく、thyrostimulin 分子族を加えて総合的に分子系統解析を行い、糖タンパク質ホルモンの分子進化の概要を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### 1) 下垂体における GTH 細胞の発現動態と生殖腺機能との相関性

免疫組織染色法により GTH 産生細胞の同

定をめざした。その結果、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖は同一の細胞で産生されていることが明らかになった。また、それらのGTH陽性細胞は、それまでクロスタウナギでGTH様物質の検出に用いられてきたヒツジLHB抗体陽性細胞とも一致した。さらに、cRNAプローブを用いた *in situ* hybridization により調べた結果、GTH $\alpha$  mRNA 発現シグナルはGTH産生細胞に一致して観察された。さらに、下垂体内のGTHの遺伝子発現量やGTH免疫陽性反応量は生殖腺の機能状態ともよく関連していた。これらの結果から、下垂体のGTHが生殖腺機能の調節に深く関与していることが示唆された。

#### 2) 天然型GTHの単離とその生物活性

ヌタウナギの下垂体は、結合組織のなかに埋まった薄い円盤状をしており、その直径は1~2mmほどしかない。約1000尾のクロスタウナギから集めた下垂体、合計3.56gから出発し、最終的に単離・精製された天然型GTHを得た。そのGTHをクロスタウナギの精巢を用いた器官培養系に0~5 mg/mlの様々な濃度条件下で投与し、培養液中に放出されたエストラジオール(E2)とテストステロン(T)濃度を測定した。その結果、GTH投与により、E2とTの放出量は用量・反応的に増加し、最高濃度の5 mg/mlで有意に増加した。本研究により、ヌタウナギが機能的なGTHをもつことが証明された。

#### 3) ヌタウナギの性ステロイドホルモン測定系の確立、ならびに血中性ステロイドホルモン濃度と生殖腺の機能状態の関係

脊椎動物の主要な性ステロイドホルモンである、エストラジール17 $\beta$ (E2)、プロジェステロン(P)、テストステロン(T)について、クロスタウナギの成熟個体から集めたプール血清を用いて、時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)により、標準曲線との平行性の検討を行った。その結果、上記、いずれの性ステロイドホルモンについても、標準曲線との有意な平行性が得られ、測定系が確立された。

申請者らのこれまでの研究で、クロスタウナギでは、全長38 cm以下では生殖腺の未熟

な幼弱個体であること、全長38 cm以上になると生殖腺の発達個体が出現するが、生殖腺機能に明瞭な季節性は観察されず、どの季節においても、全長38cm以上の成体では生殖腺の未熟な個体から発達した個体まで幅があることなどがわかっている。そこで、各種サイズのクロスタウナギから採血し、血中性ステロイド濃度を測定した。その結果、上記3種類の性ホルモンのうち、E2のみが雌雄ともに生殖腺の発達段階に伴い血中量が上昇した。以上の結果から、ヌタウナギ類の血液中に少なくともE2、T、Pが存在しており、E2が生殖腺や配偶子の分化過程に関与していると考えられる。TやPに関してはE2よりも分泌量をはるかに低いことや、生殖腺の発達と相関がみられなかったことなどから、TやPはE2の前駆体として機能している可能性が考えられた。

#### 4) 性ステロイドホルモン合成酵素群の探索

顎口類における性ステロイドホルモンの生合成過程とそれに関連する酵素群についてはよく調べられている。主要な酵素は、3種類のcytochrome P450酵素(CYP11A, CYP17, CYP19)と2種類のhydrosteroid dehydrogenases(3 $\beta$ -HSDと17 $\beta$ -HSD)である。このうち、CYP11Aはコレステロールからプレグネノロンへの変換酵素であり、ステロイドホルモン生合成の律速酵素として重要な役割を果たしている。

クロスタウナギの成熟個体より精巢を採取し、cDNAライブラリーを構築した後、大規模シーケンスにより発現遺伝子の網羅的探索を行った。その結果、ステロイドホルモン合成酵素の一つであるコレステロール側鎖切断酵素(CYP11A)と高い相同性をもつ遺伝子が単離された。しかし、他のステロイドホルモン合成酵素はクローニングに至らなかった。そこで、CYP11Aの発現動態を生殖腺の発達と関連づけて調べた。その結果、クロスタウナギ生殖腺におけるCYP11AのmRNA発現量は、雌雄とも生殖腺の発達段階とよく関連して上昇することが明らかとなった。また、ナメクジウオのCYP19抗体を

用いての免疫組織化学では、クロスタウナギの精巣ライディッヒ細胞と卵巣濾胞組織に明瞭な陽性反応が検出されたことから、スタウナギにおいてもこれらの組織でステロイド合成が行われていることが示唆された。

#### 5) GTH 分子族ホルモンの分子進化

スタウナギから哺乳類に至る各種動物の下垂体 GTH 族ホルモンと無脊椎動物から脊椎動物に至る各種動物の thyrostimulin 族タンパク質の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖、合計 80 検体を用いて、Maximum-likelihood methods により分子系統解析を行った。その結果、スタウナギの GTH $\alpha$  鎖ならびに  $\beta$  鎖遺伝子は、顎口類の GTH 分子族 (LH、FSH、TSH) に対し中立的であること、thyrostimulin 族とは別群になることなどがわかった。これらのことから、スタウナギは糖タンパク質ホルモンとして、祖先型 GTH 1 種類を持つことが明らかになった。

以上の結果から、下垂体と下垂体 GTH 族ホルモンの分子進化について、以下のシナリオが提案された。すなわち、最初期の脊椎動物は、神経下垂体と腺下垂体からなる下垂体を進化させるとともに、thyrostimulina 鎖と  $\beta$  鎖から遺伝子重複により thyrostimulin ユニットとは別に GTH $\alpha$  と GTH $\beta$  を分化させ、腺下垂体ホルモンとしての GTH を作り、視床下部-下垂体-生殖腺軸を確立させたものと考えられる。そして、無顎類から顎口類の進化段階で、第 2 の遺伝子重複により GTH から LH、FSH、TSH が分化した。

#### 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 9 件)

- ① 野崎眞澄: 最古の脊椎動物スタウナギの下垂体における生殖腺刺激ホルモンの進化的起源、生物の科学遺伝、査読なし、65(2):12-16 (2011).
- ② 内田勝久: 最も原始的な脊椎動物・スタウナギの下垂体から単離された生殖腺刺

激ホルモンとその進化的起源。比較内分泌学、査読なし、37(140):32-36(2011).

- ③ Uchida, K., Moriyama, S., Chiba, H., Shimotani, T., Honda, K., Miki, M., Takahashi, A., Sower, S.A., Nozaki, M.: Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有、107: 15832-15837 (2010).
- ④ Nozaki, M.: The hagfish pituitary gland and its putative adeno-hypophysial hormones. Zoological Science, 査読有、25: 1028-1036 (2008).
- ⑤ Nozaki, M., Ominato, K., Shimotani, T., Kawauchi, H., Youson, J.H., Sower, S.A.: Identity and distribution of immunoreactive adeno-hypophysial cells in the pituitary during the life cycle of sea lampreys, *Petromyzon marinus*. Gen. Comp. Endocrinol., 査読有、155: 403-412 (2008).
- ⑥ Moriyama, S., Oda, M., Tamazaki T., Yamaguchi K., Amiya, N., Takahashi, A., Amano, M., Goto, T., Nozaki, M., Meguro, H., Kawauchi, H.: Gene structure and functional characterization of growth hormone in dogfish, *Squalus acanthias*. Zoological Science, 査読有、25: 604-613 (2008).
- ⑦ Kavanaugh, S.I., Nozaki, M., Sower, S.A.: Origins of GnRH-II in vertebrates: Identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. Endocrinology, 査読有、149: 3860-3869 (2008).
- ⑧ Uchida, K., Moriyama, S., Breves, J.P., Fox, B.K., Pierce, A.L., Borski, R.J., Hirano, T., Gordon Grau, E.: cDNA cloning and isolation of somatolactin in Mozambique tilapia and effects of

seawater acclimation, confinement stress, and fasting on its pituitary expression. Gen. Comp. Endocrinol. 査読有、155: 403-412 (2008).

- ⑨ 野崎眞澄: スタウナギのゴナドトロピンの同定をめざして。比較内分泌学、査読無、34 (129): 70-76 (2008).

[学会発表] (計 11 件)

- ① Nozaki, M.: Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. 2nd JAMBIO Forum, Shimoda Marine Research Center, University of Tsukuba, Shimoda, January 21, 2011.
- ② 西山真樹・内田勝久・森山俊介・千葉洋明・下谷豊和・野崎眞澄: クロスタウナギの生殖腺における性ステロイド産生能の探索。第 35 回日本比較内分泌学会大会、2010 年 11 月 18-20 日、静岡。
- ③ 内田勝久・森山俊介・千葉洋明・高橋明義・Stacia A. Sower・野崎眞澄: 原始脊椎動物・スタウナギ類の糖タンパク質ホルモンとその進化。第 35 回日本比較内分泌学会大会、2010 年 11 月 18-20 日、静岡。
- ④ 野崎眞澄・本田香織・下谷豊和・内田勝久: スタウナギ下垂体の GTH 細胞に対するエストロジェンとテストステロン投与の効果。日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23-25 日、東京。
- ⑤ 内田勝久・森山俊介・千葉洋明・下谷豊和・野崎眞澄: クロスタウナギの下垂体から精製した糖タンパク質ホルモンの生理活性。日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23-25 日、東京。
- ⑥ 大杉知裕・内田勝久・野崎眞澄・筒井和義: スタウナギの新規 RFamide ペプチドの同定と生理作用の解析。日本動物学会第 80 回大会。2009 年 9 月 1-20 日、静岡。
- ⑦ 寺門潔・下谷豊和・野崎眞澄: ホヤ下垂体研究の現状—マボヤとカタユレイボヤの比較—。日本動物学会第 80 回大会。

2009 年 9 月 1-20 日、静岡。

- ⑧ 野崎眞澄・本田香織・三木誠・下谷豊和・内田勝久: クロスタウナギの腺下垂体細胞に対するエストロジェンとテストステロン投与の影響。日本動物学会第 80 回大会。2009 年 9 月 1-20 日、静岡。
- ⑨ 内田勝久・亀井宏泰・森山俊介・山田英佑・千葉洋明・野崎眞澄: クロスタウナギにおける組替え生殖腺刺激ホルモンの構築。日本動物学会第 80 回大会。2009 年 9 月 1-20 日、静岡。
- ⑩ 内田勝久・森山俊介・千葉洋明・下谷豊和・野崎眞澄: クロスタウナギにおける生殖腺刺激ホルモンの単離・精製と機能解析。第 33 回日本比較内分泌学会、広島、2008 年 12 月 5 日-6 日。
- ⑪ 内田勝久: 最古の脊椎動物の内分泌現象を求めて—新潟県産スタウナギのホルモン分子の単離を発端に—。第 34 回新潟大学理学部コロキウム、2008 年 11 月 26 日。

[その他]

ホームページ等

- (1) 新潟大学ホームページ

[http://www.niigata-u.ac.jp/research/10\\_research\\_010.html](http://www.niigata-u.ac.jp/research/10_research_010.html)

- (2) 筑波大学 JAMBIO ホームページ

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~jambio/ronbun.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野崎 眞澄 (NOZAKI MASUMI)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号: 70136232

### (2) 研究分担者

内田 勝久 (UCHIDA KATSUHISA)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号: 50360508

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: