

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570065

研究課題名（和文）

神経葉ホルモンの脳一行動制御機能の解析：広塩性両生魚と雄性胎生魚からの新しい展開

研究課題名（英文）

The possible principal function of neurohypophysial hormones

研究代表者

坂本 竜哉 (SAKAMOTO TATSUYA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：10294480

研究成果の概要（和文）：バソプレシン族は、脊椎動物を通して攻撃行動や体液調節に関わるとされているが、2つの作用の関連は不明である。そこで、水陸両生であり、攻撃行動も明確なトビハゼを用いて検討した。攻撃性が劣る個体や、陸上の個体では、バソトシンの発現が高まった。また、脳室内投与により、いずれの神経葉ホルモンも、イソトシン受容体を介し、水中への移動を誘起することも見出した。攻撃性が劣る個体の高いバソトシンの発現は、水中への逃避行動に関わるのかもしれない。他の種における作用からもこれらの機能の普遍性を示唆した。

研究成果の概要（英文）： Acclimation from marine to dilute environments constitutes among the most dramatic evolutionary transitions in the history of life. Such adaptations have evolved in multiple lineages, but studies of the mechanisms are limited to those using evolutionarily advanced Deuterostome (chordates) and Ecdysozoa (crustaceans). Here we examined the body-fluid homeostasis in the advanced Lophotrochozoa/mollusc, the other unexplored taxa, and its possible regulations by vasopressin/oxytocin superfamily peptides known to be implicated in fluid homeostasis in Chordata and Arthropoda. The hemolymph osmotic and ionic status in the euryhaline cephalopod (*Octopus ocellatus*) following transfer from normal seawater (30 ppt) to low (20 ppt) salinity indicate the hyperosmo- and hyperionoregulatory abilities for more than 1 week, as in crustaceans and teleost fish. While ventilation frequency decreased by 1 day, Na⁺/K⁺-ATPase activity, which has been implicated in ion transport generally, was induced in two of the eight posterior gills after 1 week. Furthermore, the octopuses were intravenously injected with 1 or 100 ng/g octopressin or cephalotocin, cephalopod vasopressin/oxytocin orthologs. After 1 day, octopressin, not cephalotocin, decreased the hemolymph osmolality and Ca concentrations as well as urinary Na concentrations. These data provide evidence for convergent evolution in the hyper-ionoregulatory mechanisms and the coordination by conserved molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

◆ 脳下垂体神経葉ホルモンはバソプレシン属とオキシトシン属に二分される。哺乳類では、バソプレシンが体液調節に、オキシトシンが生殖/保育、特に授乳や分娩に重要である。硬骨魚では少し構造が異なり、各々バソトシン (VT) とイソトシン (IT) となる。VT は体液/血圧調節に関与しているとされている。IT もウナギの飲水制御などが知られている。しかし、これらの報告の多くは断片的で統一的な見解はない。即ち VT と IT の明確な機能的差異は不明といってよい。さらに、神経葉ホルモン産生細胞は、**脳内**の様々な部位に投射し、社会性、攻撃、**性行動**などにも関与していることが、主に哺乳類で報告され続けて注目を浴びている (Maejima ら 2009 Cell Metab 等)。魚類でも、Goodson ら (2000 Nature) が、ハミングフィッシュの生殖行動における VT と IT 各々の独特の役割を報告し脚光を浴びた。しかし、これらの脳-行動制御の脊椎動物を通じた作用機序や普遍性は謎である。特に魚類では受容体の脳内分布も未解析で、哺乳類でも不明な点が多い作用機序はほとんどわかっていない。

◆ 一方、研究代表者は 10 年来、広塩性両生魚トビハゼが、淡水、海水に加え陸上にも適応できることに着目し、種々の体液調節関連ホルモン/神経ペプチドの適応過程の動態や (Sakamoto ら 2002 J Comp Physiol 等)、これらの脳室内投与の環境選択行動への影響を網羅的に解析してきた。そして、陸上に出ると、VT・IT の発現が高まり、他のホルモンより強力かつ速効的に、水中への移動が誘起されることを見いだした。即ち、**神経葉ホルモンの環境選択行動制御の発見**である。この作用機序を今回の申請計画でぜひ追究したい。

また、オスが胎盤様組織を形成し、体内受精から子育てまで行う「雄」性胎生魚ヨウジウオ、タツノオトシゴなどの特異な生殖様式を、哺乳類の場合と比較すれば、生殖の中から妊娠、出産や保育を抽出して検討できる有望なモデルになると着想し、5 年前から採集、飼育の確立に取り組んできた。関連ホルモンの cDNA 配列決定や妊娠期の動態解析も行っている。そして本申請で、哺乳類同様、保育に IT は重要かどうかを解明する段階となった。これは、魚類の保育における神経葉ホルモンの役割に加え、研究分担者の坂本浩隆も哺乳類で携わってきた母性、父性の検討にも繋がる世界的にも例のない研究である。

さらに研究代表者は近年、遺伝子基盤が最も整っている魚のメダカにより、種々のホルモンの作用機序を分子レベルで解明してい

る (Takagi ら 2010)。メダカはゼブラフィッシュに比べ広塩性 (Sakamoto ら 2001 Aquaculture) など環境適応能に優れ生殖行動の知見も蓄積されている。従って、上記の**広塩性両生魚トビハゼや雄性胎生魚ヨウジウオで見出す VT/IT の環境選択行動や生殖行動における機能を、分子レベルで解析し、かつ一般化できると考えられる。**

2. 研究の目的

(1) トビハゼの環境選択行動における VT・IT 制御を解明する目的で、トビハゼが淡水、海水あるいは陸上に適応する過程において、**脳**のこれらの発現を経時的に調べる。興味深いところで、VT/IT の神経回路を *in-situ* receptor binding による効率的な受容体分布の解析を中心に調べ、環境選択行動を制御する回路を解明する。標準となる VT・IT 免疫組織化学の脳地図はほぼ完成した。

(2) ヨウジウオの VT・IT と各種関連ホルモンの動態を、雄の妊娠期間に焦点を当て解析する。ステロイドホルモンやプロラクチンに関して予備的な結果を得ている。VT/IT の重要性が発見されたら、(1)と同様に、保育に関わる神経回路を特定する。育児嚢でのそれらの受容体も調べ直接作用も検討する。

(3) メダカにおいて、遺伝子情報を活用して VT・IT 受容体分子種の同定を効率的に行い、各々の脳内分布を調べる。(1)(2)の解析から明らかにした神経回路と比較し、それらに重要な受容体分子を特定する。メダカの海水/淡水移行や生殖行動にともなう動態を VT/IT とともに解析し、一般性を考察する。

また、ホルモン及び特定した受容体のアンタゴニストやアゴニストをトビハゼやヨウジウオの脳室内に注入して、行動レベルでの影響を解析する。

以上を通して、魚類の環境適応と保育における VT・IT の脳-行動制御を分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1) まず、脳における神経葉ホルモンの発現と攻撃行動との関連を調べた。トビハゼのバソトシンとイソトシンの前駆体 cDNA の塩基配列を決定し、その配列を基に real-time PCR によりこれらの mRNA 量を定量化した。1 匹分の陸上を設置した 1/3 海水の水槽中にオス 2 匹を入れた後、1 時間の行動を観察した。

攻撃行動のパラメーターとして、威嚇のための背鰭の拡張、開口、場所取り、追いか、噛みつき、体当たりの回数をカウントした。これらのパラメーターの合計が多い方を優位個体とし、少ない方を劣位個体とした。

次に、陸上適応にともなう神経葉ホルモンの発現を調べた。さらに、トビハゼの脳室内へ神経葉ホルモンを投与し、水陸選択への効果を調べた。

(2) トビハゼの脳におけるバソトシンとイソトシンの神経回路を解析した。トビハゼ脳をブアン固定し、パラフィン切片を作製した。最初に、H-E染色、Nissl染色により、脳の基本構造を把握した。続いて、バソトシンとイソトシンの二重免疫組織化学を行った。

(3) 広塩性のイイダコの体液調節を解析し、神経葉ホルモンに相同な頭足類のペプチド（セファロトシンとオクトプレシン）が及ぼす作用を検討した。

まず、自然海水で飼育したタコを汽水に移行した。

次に、セファロトシンとオクトプレシンを、タコの体液中に 10^{-6} 、 10^{-8} M になるように投与し効果を調べた。

4. 研究成果

(1) バソトシン mRNA 量は、優位個体よりも劣位個体が 130%高かった。一方、イソトシンの発現量には有意差はなかった。トビハゼにおいても、攻撃行動にバソトシンが関与していることが示された。

次に、トビハゼを陸上に移行すると、体液浸透圧の上昇に伴い、バソトシン mRNA 量は 350%、イソトシン mRNA 量は 140%まで増加することを明らかにした。さらに、バソトシンもイソトシンも、1 時間後には投与量に依存して水中での時間を延長し、水中への移動回数が減少した。すなわち水中にとどまらせた。これらの効果は、投与してから 8 時間後まで持続した。雌雄で差は見られなかった。また、イソトシン受容体のアンタゴニストを同時に投与すると、バソトシンとイソトシンのいずれの作用も抑制された。よって、この水陸選択行動にはバソトシンも結合するイソトシン受容体が重要だと思われる。

以上の結果を併せると、攻撃性が劣るトビハゼで誘導されているバソトシンは、脳内のイソトシン受容体を介し、水中への逃避を惹起しているのかもしれない。

(2) トビハゼの脳では、多くの脊椎動物と異なり、脳下垂体が視床下部にほぼ埋没していた。これは他のハゼ科でも報告されている。バソトシンとイソトシンは主として視索前

核の異なったニューロンに存在しており、バソトシンニューロンの方が多数存在する。これらは下垂体を中心に広い範囲に投射しており、繊維の投射の数もバソトシンの方が多。下垂体以外では、バソトシンニューロンの繊維は、視床下部の背側部や尾側部に多く分布し、終脳や延髄さらには脊髄にも投射していた。視床下部背側部は体液調節の中核と考えられており、バソトシンの一義的な作用とあっている。イソトシンニューロンの繊維も視床下部の尾側部に多く投射していた。やはり延髄への投射も見られた。

これらの結果より、バソトシンとイソトシンは視索前核の異なるニューロンで主に産生され特異的に制御されていること、それぞれ脳内の特異的な部位で働いている可能性が、トビハゼにおいても示された。トビハゼの水中への移動において、両ホルモンは脳室内投与で同様の効果を示すので、どちらのホルモンのニューロンも投射している視床下部の尾側部や延髄がこの行動に関与しているのかもしれない。別の部位への投射は、バソトシンは血圧・体液調節や攻撃行動に、イソトシンは飲水行動など、それぞれ特有の作用に関係していると思われる。

(3) 自然海水で飼育したタコを汽水に移すと、1 日目は汽水と同等まで下がるが、7 日目には汽水より高張に調節された。尿の浸透圧は、いずれの環境でも体液と等張であった。体液 Na 濃度は、汽水移行後も変化せず、よく調節されていた。尿の Na 濃度は常に体液のものよりも高かったが、汽水移行後は低下した。軟体動物でも尿により体液の塩濃度が調節される可能性を見出した。一方、体液の Ca 濃度は、常に環境水のものより高かったが、環境水の Ca 濃度の低下にともない減少した。尿の Ca 濃度は、体液のものよりも常に低いが、同様に汽水中で減少した。また、Na/K-ATP アーゼは、心臓から遠い鰓葉において、汽水移行後 7 日目に活性が高まった。これらの鰓葉において Na を汽水から取り込んでいる可能性も示された。一方、腎臓の Na/K-ATP アーゼ活性は変化しなかった。

オクトプレシンの投与により、1 日後の体液の浸透圧と Ca 濃度、尿の Na 濃度が低下した。体液 Na 濃度、尿の浸透圧と Ca 濃度には影響がなかった。一方、セファロトシン投与は、これらのいずれにも効果が見られなかった。また、オクトプレシンは、Na/K-ATP アーゼ活性には、鰓でも腎臓でも効果がなかった。なお、これらの効果には雌雄差は見られなかった。

以上の結果より、イイダコは、尿からの塩の排出と鰓における塩の輸送を制御することによって、体液を調節している可能性が示された。また、オクトプレシンはその体液調

節に関わっていることが明らかとなった。

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16件)

- ① The role of ‘mineralocorticoids’ in teleost fish: Relative importance of glucocorticoid signaling in the osmoregulation and central actions of mineralocorticoid receptor. H. Takahashi, T. Sakamoto, *Gen Comp Endocrinol.* 181 (2013) 223-228. 査読有
- ② In vitro effects of the prolactin, growth hormone and somatolactin on cell turnover in fish esophagus: possible mode of opposite osmoregulatory actions of prolactin and growth hormone. H. Takahashi, H. Kudose, C. Takagi, S. Moriyama, T. Sakamoto, *Prolactin.* (2013) 21-34. 査読有DOI: 10.5772/2950.
- ③ Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales. S. Yano, K. Kitamura, Y. Satoh, M. Nakano, A. Hattori, T. Sekiguchi, M. Ikegame, H. Nakashima, K. Omori, K. Hayakawa, A. Chiba, Y. Sasayama, S. Ejiri, Y. Mikuni-Takagaki, H. Mishima, H. Funahashi, T. Sakamoto, N. Suzuki, *Zool Sci.* 30 (2013) 217-223. 査読有
- ④ Rapid signaling of steroid hormones in the vertebrate nervous system. H. Sakamoto, H. Takahashi, K. Matsuda, M. Nishi, K. Takanami, M. Ogoshi, T. Sakamoto, M. Kawata, *Front Biosci.* 17 (2012) 996-1019. 査読有3970
- ⑤ Three-dimensional evaluation of the spinal local neural network revealed by the high-voltage electron microscopy: a double immunohistochemical study. T. Oti, K. Satoh, K. Saito, K. Murata, M. Kawata, T. Sakamoto, H. Sakamoto, *Histochem Cell Biol.* 138 (2012) 693-697. 査読有10.1007/s00418-012-0976-6
- ⑥ Growth, energetics and the cortisol-hepatic glucocorticoid receptor axis of medaka (*Oryzias latipes*) in various salinities. M. Ogoshi, K. Kato, H. Takahashi, T. Ikeuchi, T. Abe, T. Sakamoto, *Gen Comp Endocrinol.* 178 (2012) 175-179. 査読有10.1016/j.ygcen.2012.05.001 S0016-6480(12)00197-9
- ⑦ Cloning of two members of the calcitonin-family receptors from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in

- osmoregulation. N. Suzuki, T. Sekiguchi, H. Satake, K. Kato, Y. Nishiyama, H. Takahashi, J.A. Danks, T.J. Martin, A. Hattori, M. Nakano, M. Kakikawa, S. Yamada, M. Ogoshi, S. Hyodo, Y. Yamaguchi, V.S. Chowdhury, K. Hayakawa, H. Funahashi, T. Sakamoto, Y. Sasayama, *Gene.* 499 (2012) 326-331. 査読有S0378-1119(12)00340-X
- ⑧ Comparative and general aspects of calcium homeostasis and its hormonal regulations. N. Suzuki, T. Sakamoto, *Zool Sci. Virtual Issue, Evolution of calcium homeostasis and its hormonal regulation in vertebrates.* 査読有http://www.zoology.or.jp/news/index.asp?patten_cd=12&page_no=541
 - ⑨ Hemolymph osmotic, ionic status and branchial Na⁺/K⁺-ATPase activity under varying environmental conditions in the intertidal grapsid crab, *Gaetice depressus*. T. Nanba, H. Takahashi, T. Abe, W. Godo, M. Ogoshi, H. Sakamoto, N. Tsutsui, T. Sakamoto, *Int Aquat Res.* 4 (2012) 1-12. 査読有
 - ⑩ Prostaglandin e(2) increases both osteoblastic and osteoclastic activity in the scales and participates in calcium metabolism in goldfish. K. Omori, S. Wada, Y. Maruyama, A. Hattori, K. Kitamura, Y. Sato, M. Nara, H. Funahashi, K. Yachiguchi, K. Hayakawa, M. Endo, R. Kusakari, S. Yano, A.K. Srivastav, T. Kusui, S. Ejiri, W. Chen, Y. Tabuchi, Y. Furusawa, T. Kondo, Y. Sasayama, T. Nishiuchi, M. Nakano, T. Sakamoto, N. Suzuki, *Zool Sci.* 29 (2012) 499-504. 査読有Doi 10.2108/Zsj.29.499
 - ⑪ Morphological responses of mitochondria-rich cells to hypersaline environment in the australian mudskipper, *Periophthalmus minutus*. N. Itoki, T. Sakamoto, M. Hayashi, T. Takeda, A. Ishimatsu, *Zool Sci.* 29 (2012) 444-449. 査読有
 - ⑫ Corticosteroids stimulate the amphibious behavior in mudskipper: potential role of mineralocorticoid receptors in teleost fish. T. Sakamoto, C. Mori, S. Minami, H. Takahashi, T. Abe, D. Ojima, M. Ogoshi, H. Sakamoto, *Physiol Behav.* 104 (2011) 923-928. 査読有[BioMedLib, Top-1 Article Published in the 4 Domains]
 - ⑬ Dual in vitro effects of cortisol on cell turnover in the medaka esophagus via the glucocorticoid receptor. C. Takagi, H. Takahashi, H. Kudose, K. Kato, T. Sakamoto, *Life Sci.* 88 (2011) 239-245. 査読有

- ⑭ Embryonic development and larval behavior of the kissing loach (*Parabotia curta*): adaptations to an ephemeral, hypoxic environment. T. Abe, T. Sakamoto, Ichthyol Res. 58 (2011) 238-244. 査読有
- ⑮ Isolation and characterisation of prolactin-releasing peptide in chicks and its effect on prolactin release and feeding behaviour. T. Tachibana, S. Moriyama, A. Takahashi, A. Tsukada, A. Oda, S. Takeuchi, T. Sakamoto, J Neuroendocrinol. 23 (2011) 74-81. 査読有
- ⑯ Detection and activity of iodine-131 in brown algae collected in the Japanese coastal areas. T. Morita, K. Niwa, K. Fujimoto, H. Kasai, H. Yamada, K. Nishiutch, T. Sakamoto, W. Godo, S. Taino, Y. Hayashi, K. Takeno, T. Nishigaki, K. Fujiwara, H. Aratake, S. Kamonoshita, H. Hashimoto, T. Kobayashi, S. Otosaka, T. Imanaka, Sci Total Environ. 408 (2010) 3443-3447. 査読有13.

[学会発表] (計20件)

- ① Updated functions of glucocorticoid and mineralocorticoid in teleost fish. H. Takahashi, T. Sakamoto, 国際シンポジウム招待講演 Edwin W. Pauley Summer Program in Marine Biology “Integrative, Experimental and environmental physiology of marine organisms”, 2012.
- ② Mineralocorticoid may not be “mineralocorticoid” in fish. H. Takahashi, T. Sakamoto, 国際学会招待講演 7th Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Congress, 2012

年3月4日. [The most impressive researches]

③ Current studies at Ushimado Marine Institute. T. Sakamoto, 国際シンポジウム招待講演 Practical Environmental Education Program to Construct a Cyclical Environmental Society “Water environment specialists incubated from the sunny country”, 2011.

[図書] (計2件)

- ① Evolution of calcium homeostasis and its hormonal regulation in vertebrates. N. Suzuki, T. Sakamoto, Zool Sci. Virtual Issue Theme 2. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 竜哉 (SAKAMOTO TATSUYA)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：10294480

(2) 研究分担者

御輿 真穂 (OGOSHI MAHO)
岡山大学・自然科学研究科・助教
研究者番号：00527997
坂本 浩隆 (SAKAMOTO HIROTAKA)
岡山大学・自然科学研究科・准教授
研究者番号：20363971
高橋 英也 (TAKAHASHI HIDEYA)
岡山大学・理学部・助教
研究者番号：50627635