

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 31 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2010～2012

課題番号：22580322

研究課題名（和文） 鳥類下垂体転写因子によるホルモン遺伝子発現制御機構

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of hormone gene expression in the anterior pituitary gland in birds

研究代表者

神作宜男（Kansaku Norio）

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：60333142

研究成果の概要（和文）：鳥類のプロラクチン(PRL)遺伝子発現調節機構はほ乳類における機構を参考にして提案されてきたか、国内外の現在までの研究結果に、提案された調節機構では全く説明できない点が存在する。鳥類特有のPRL遺伝子発現に関する調節機構の解明は、PRLにより誘起される就巢行動の人為的なオンオフ制御に結びつけ、家禽においては産卵能力の向上を、野鳥においては種の保存に役立てる事ができる。本研究は鳥類における転写因子PREBのPRL遺伝子のクローニングを行い、その後PREB cDNAの配列をもとに、発生胚における下垂体を含めた複数の組織での発現をRT-PCRにより検討した。さらに、PREB遺伝子を二つにわけ、全体の増幅をPCRにより行い配列を決定し、変異が存在するかを検討した。その結果、ニワトリPREBはほ乳類のPREBと比較して70%ほどの類似性がある事が判明した。また組織間における発現量には大きな差がある事が判明した他に、下垂体における発現量は12日胚よりふ化後まで変化しない事が判明した。また、PREB遺伝子内にはエクソン、イントロンともに多くの変異が存在している事が判明した。これらの結果より、PREBはPRL遺伝子の初期活性化に関与している可能性が示された。また、多くの変異が存在している事から品種や系統により就巢行動発現頻度に差がある事から、基本的なレベルのPRL発現にPREBの変異は影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The regulatory mechanism of bird PRL in the anterior pituitary gland is unique and completely different to that of mammalian PRL. The aims of this study were cloning of chicken PREB and comparison of levels of mRNA expression in the various tissues during embryogenesis. Chicken PREB cDNA shows 70% similarity to human and rat PREB cDNAs. The levels of PREB mRNA showed tissue dependent manner. Interestingly, the changes of levels of PREB mRNA had not been observed in the anterior pituitary gland during embryogenesis. These results suggest that PREB protein participate regulation of various gene. Furthermore, PREB involves activation of PRL gene rather than increase of mRNA levels during late stage of embryogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：転写因子, 下垂体, PREB, PRL, 発生胚, Pit-1

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の下垂体において発現するプロラクチン (PRL) は魚類から哺乳類に至るまで存在する、ホルモンであり進化に伴い様々な生理作用を獲得してきた。鳥類における PRL の繁殖行動に対する作用は古くから知られており (Riddle et al, 1935)、実際に PRL あるいは PRL の生理的放出因子に対する抗体を注射すると就巢行動の中断あるいは停止が認められる (Sharp et al, 1989, Lea et al, 1991)。就巢行動の開始はニワトリやシチメンチョウでは産卵の停止を意味する事から産業的には望ましくないが、鳥類の PRL 遺伝子の構造解析はゲノム配列の違いからほ乳類の報告に大きく遅れたため (Kurima et al 1998, Ohkubo et al 2000, Kansaku et al 2005)、不明な点が非常に多く、さらなる遺伝子発現機構の解明が切に望まれている。このように、鳥類 PRL の研究は国内外で多くの研究者が取り組んでいるため、この PRL の研究は未だ進歩し続けている、古くて新しいテーマである。

PRL の遺伝子発現に関する研究はほ乳類において最初に精力的に行われ、中でも下垂体特異的転写因子 Pit-1 が PRL の遺伝子発現に重要であり、Pit-1 に変異が生じると PRL 遺伝子の発現が全く見られなくなることから、Pit-1 が最も重要であると長く考えられてきた (Ingraham et al, 1988)。ほ乳類において報告された結果から、鳥類においても Pit-1 が重要であると考えられ、シチメンチョウ PRL のプロモーター内の Pit-1 予想結合配列に変異を持つ多型は血中 PRL 濃度と相関があることを Guémené, D ら (2001) は報告した。また、申請者らはルシフェラーゼアッセイによりシチメンチョウプロモーターの Pit-1 予想結合配列内の変異により遺伝子発現量が有意に変化することも明らかにしている (Kansaku et al, 2008)。しかし、申請者らは「ルシフェラーゼアッセイの中で、Pit-1 予想結合配列内の変異が生じたプロモーターであっても発現活性が極端に低下しない」というほ乳類ではあり得ない結果も同時に報告した。

ほ乳類 PRL の分泌制御は抑制的であるのに対して、鳥類の分泌制御は放出因子に

よる刺激により制御されており、視床下部による分泌制御は全く異なる事が明らかにされている。従って、遺伝子発現についても異なる可能性が考えられる。ほ乳類では遺伝子発現に補助的に働く PRL 調節領域結合タンパク質 (PREB) が下垂体で発現しており (Fliss et al, 1999)、また Pit-1 と同様に POU ドメインを持つ mPOU の存在が近年明らかにされた (Fumoto et al, 2003, Toda et al, 2008)。鳥類 PRL の転写開始位置近傍には核内タンパク質と結合する領域が存在する (Weatherly et al, 2001) あるいは PREB の結合配列と非常に似ている配列が存在する (Hiyama et al, 2009)。これらの結果より、鳥類の PRL 発現ではほ乳類とは全く異なり Pit-1 以外の転写因子が重要ではないかと考えられるようになった。

2. 研究の目的

鳥類のプロラクチン(PRL)遺伝子発現調節機構はほ乳類における機構を参考にして提案されてきたが、国内外の現在までの研究結果に、提案された調節機構では全く説明できない点が存在する。鳥類特有の PRL 遺伝子発現調節機構には、ほ乳類で知られている Pit-1 以外の転写因子が深く関与しているのではないかと考えられる。本研究は鳥類では未同定の転写因子の PRL 遺伝子発現に関する調節機構の解明に取り組み、PRL により誘起される就巢行動の人為的なオンオフ制御に結びつけ、家禽においては産卵能力の向上を、野鳥においては種の保存に役立てようとする試みの第一歩である。

3. 研究の方法

1) ニワトリ PREBcDNA クローニングと遺伝子の構造解析

ニワトリ PREBcDNA 配列を明らかにするため、論文報告されているヒトおよびラット PREBcDNA の他に、データベース上に存在するゼブラフィッシュなどの配列を参考にして、プライマーを設計し、ニワトリ下垂体から抽出した RNA をもとに部分断片を PCR により増幅した。その後その配列をもとに全長 cDNA を RACE 法により得た。再度最適なプライマーを設計し、アミノ酸コード領域全体の増幅を行い、配列を再確認した。得られた配列と現在までに明らかになっている動物種との間の相同性を検討した。また、ゲノム DNA を用いて遺伝子全体を増幅し、イントロン-エクソン構造を同定した。

2) ニワトリ PREB mRNA の発現比較

ニワトリ発生胚および産卵しているニワトリより様々な組織を採取し RNA を抽出した後に RT-PCR により比較した。また下垂体については胚 12 日より孵化後 3 日までの組

織を用いて GAPDH や PRL とともに比較した。

3) ニワトリ PREB 遺伝子の多型解析

白色レグホーン、名古屋種、岐阜地鶏、ロードアイランドレッド、Geline (フランス地鶏) などの血液から DNA を抽出し、PREB 遺伝子を 3 つの領域に分けて PCR により増幅させた後に塩基配列を決定し、多型あるいは変異箇所を同定した。

4. 研究成果

1) ニワトリ PREBcDNA クローニングと遺伝子の構造解析

ニワトリの PREB は WD モチーフを持っており、全体で 411 個のアミノ酸からなる事が判明した (下図)。

cgttctggaa

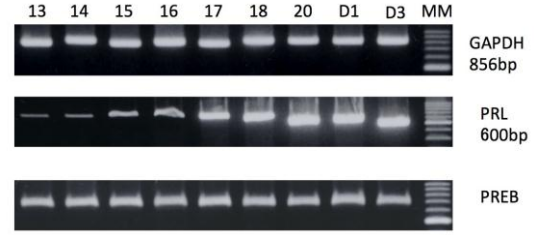
ATGGGGCCGCTCGACGAGCTGTACCGGGCCCTTCCGCTGTACACCGTGGCGCTGCACCOCGCGCGGCGTGCACATCACCGT
M A P R P T E L Y R A P F P L Y T V R L H P R R G L A I T A
GGAGCGGAGGCGGCCAAACCGGATCGCGAATGGAGTGCATCTCTGACGCTGGAGCAGATCGGGGGCGGTGAGCGCGCTCGCT
G G G G G A A K T G I G N G V H F L Q L E Q I G G R L S A S L
CTGACTGCGCAGCAGACGCGCCACCATGAGCATGGCGTGGCGGGGACTTCATGCGGCGGGGCGAGCAGCAGCTGCAC
L H C H D T E T R A T M S M A L S G D F I A A G Q D H S G H
ATCTTCCGCTCAGCTGCGGAGGGCGACGCGGAGCGAAGACGCCGCGAGGAGAGAGGCGCGCAGCGGAGGCGCGCCGCGG
I L R L S V R E G D A G G E D A A E E K G P R R R K G A G P
GGAGCGGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAGCGGAG
A E R G E T R S G G G E V T V E S L H R V R T D F S P D A L
CAGAGGCGGTCCGCTTCAGCGCGCGCAGCTGTGCTGCTCAGCGGGGCGGCGGAGCGGAGCTTCCTGCGGCTCGGAGTTCGCCAGCAT
Q K A V R F S A D G T L L V T G G A D G F L R L W E F P S M
AAGAGGCGCTGGAGTCAAGGCGCAGCAGGGGAGTGGAGCATACTCGGCGGCCAATAAGTGGTTCAGCGGCGGCGCGGAGC
K K A L E F F K A H D G E I E D I T L G P D N K V V T A G R D
CTGAGTGGCGGTGTGGCAGCGGACAGCTGGTACCGGGCGCAATGGAGCAGAACTGCCCGGACCCGAGCAGCAGGTCACCGC
L Q C R V W Q R D Q L V T G L Q W N E N L P G T P S T A Y R
TATCAGGCTGCCCTTCGCGGGCGTGCAGACGCTCGGGGCGCTCGCGCTTACACGGTGCAGGTCGCCCAAGCGGGAGCGCGCG
Y Q A C R F G A V D G G C G A L R L Y T V Q V P H K R E R
CGGCGCGCTGCTACTGACCAAGTGGCGGGGAGCCTTCCTCCGCTGCTGACGCGCGCTGCAGCGGCTGCAGGCTCATCTGCTCGCTC
P P P C Y L T R K W D G G T F L P L L T R P C G S E V I S C L
TCGCTCAGTATTCAAGCACCTTCCTGGGCTGGGACCGCTCAGCGCTCGCTGCTGACATGCCTCTTCCTGCTCAGGAGCTGTAC
S V S D S G T F L G L G T V T G S V A V H I A F S L Q R L Y
TACGTGAAGGAGCGCAGCAGCAGTGTGCTCAGCGTGTGGCTGTGGCTGAGAGCGAGCAGCGCGGAGCTGCTGGCGGGAGCAGG
Y V K E A H G I V V T D V A F V P E S E H G R E L L A G N E
GAGCGCTGCTCAGGCTGGCGCTGAGCAGCGTTCAGAGCTGCAGCTGCTGCCCGCGCATCGCTGCCGCTGCTGGCTGCTGCTG
A L L S V A V D S R C K L H L L P A R R S L P V W L L L L
CTGTGCGCGCGCTCATGTGGCAGCATGTGCTGCTGAGATGCTTCCCTGCTCTAGGcaaccctccggcaaccctgggg
L C A A L I V G S I V L L Q I A F P G F L *
gggagcgactggcttgggcactgtgaggagtggactcctggggtgagcgccgcatggcaatggcaagcagccgctggcaggc
ctggcctggagctccttggccttaccattaaaccagagtggaaasaaaaaaaaaaaaaa

また、他の動物における PREB との相同性は塩基配列及びアミノ酸配列でも 70%ほどであることが判明し、系統遺伝学的な解析を行った場合に、ニワトリ PREB の配列がほ乳類と両生類の間に位置する事から本研究で得られたクローンはニワトリ PREB である事が証明された (下表)。

	Chicken	Human	Dog	Bovine	Rat	Mouse	Zebrafish
Chicken		0.66	0.66	0.69	0.66	0.67	0.59
Human	0.68		0.94	0.93	0.9	0.89	0.6
Dog	0.67	0.92		0.94	0.89	0.88	0.61
Bovine	0.68	0.91	0.91		0.91	0.91	0.6
Rat	0.66	0.88	0.87	0.88		0.97	0.59
Mouse	0.65	0.88	0.86	0.86	0.95		0.59
Zebrafish	0.61	0.6	0.6	0.6	0.6	0.59	

2) ニワトリ PREB mRNA の発現比較

ニワトリの PREB は組織によって発現量が異なる事が明らかになった。その中でも PRL 遺伝子の発現との関係から胚発生期における発現量を検討したが、PRL 遺伝子と異なり、大きな変動は見られなかった (図)。



3) ニワトリ PREB 遺伝子の多型解析

ニワトリ PREB 遺伝子の変異-多型はエクソン 4, 6, 7, 8 及びイントロン 3, 4, 5, 6, 7, 8 において認められた。エクソンにおける変異の多くは同義置換であったが、エクソン 7 における変異はバリンからトレオニンに変化する非同義置換であった。

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 6 件)

Kansaku N, Guémené, D, Nakamura, A, Uchida, M. Sequence Characterization of K-gene Linked Region in Various Chicken Breeds The Journal of Poultry Science. 2011 48:181-188. (査読有)

Nakamura, A, Ishikawa, A, Nagao, K, Watanabe, H, Uchida, M, Kansaku, N. Characteristics of Reversion to Early Feathering Phenotype in the Late Feathering Line of Nagoya Breed Chickens The Journal of Poultry Science. 2011 48:155-161. (査読有)

Murase D, Taniuchi S, Takeuchi S, Adachi H, Kansaku N, Okazaki K, Ohkubo T. Role of chicken Pit-1 isoforms in activating growth hormone gene. Gen Comp Endocrinol. 2011 173:248-252. (査読有)

Ito T, Yoshizaki N, Tokumoto T, Ono H, Yoshimura T, Tsukada A, Kansaku N, Sasanami T. Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. Endocrinology. 2011 152:3952-3962. (査読有)

Hiyama G, Okabayashi H, Kansaku N, K Tanaka. Genetic variation in the growth hormone promoter region of Anas platyrhynchos, a duck native to Myanmar. Journal of Poultry Science. 2012, 49:245-248. (査読有)

Wakui S, Takahashi H, Shirai M, Jutabha P, Anzai N, Wempe M, Kansaku N, Hano H, Inomata T, Endou H, Atypical leydig cell hyperplasia in adult rats with low T and high LH induced by prenatal Di (n-butyl) Phthalate Exposure. Toxicologic Pathology. 2013 41:480-486. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

Cloning and characterization of prolactin regulatory element binding protein (PREB) in chicken and turkey. G. Hiyama, N. Kansaku, R. McQuaid, D. Zadworny. 10th International Symposium on Avian Endocrinology. June, 7, Gifu, Japan.

Expression of Exon-3 and Exon-4 skip splicing isoform of PRL mRNA in the bird anterior pituitary gland. N. Kansaku, G. Hiyama, D. Zadworny. 10th International Symposium on Avian Endocrinology. June, 7, Gifu, Japan.

Analysis of cell cycle regulation during quail embryo development. S. Mizushima, T. Sasanami, N. Kansaku, T. Ono, K. Shimada. 10th International Symposium on Avian Endocrinology. June, 7, Gifu, Japan.

神作宜男・品川遥 ブンチョウの歌学習に及ぼす生活音及び給餌環境の影響 日本家禽学会2012年度春季大会、2012年3月

Expression of Exon-3 Skip Splicing Form of PRL mRNA in the Chicken Anterior Pituitary Gland N. Kansaku, R. Suzuki, G. Hiyama, D. Zadworny. European Poultry Congress 2010 Aug. 26 Tours, France

In vitro Suppression of PRL Transcription and Translation in Turkey Embryonic Pituicytes by RNAi. G. Hiyama, R. McQuaid, I.J. Reddy, N. Kansaku, D. Zadworny. European Poultry Congress 2010 Aug. 26 Tours, France

Molecular cloning of Prolactin regulatory element binding protein (PREB) in the chicken and turkey Hiyama Gen, Kansaku N, Zadworny D. 第36会鳥類内分泌研究会 箱根湯本 2011年11月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神作宜男 (KANSAKU NORIO)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号：60333142

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：