

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 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：32669
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22780266
 研究課題名（和文）下垂体隆起葉の季節性機能の解明

 研究課題名（英文）Mechanisms Underlying The Seasonal Function In Pars Tuberalis

 研究代表者
 中尾 暢宏（NAKAO NOBUHIRO）

 研究者番号：60377794

研究成果の概要（和文）：温帯地域に生息する動物は、日長の変化に適応して季節的な繁殖を行っている。近年、日長の測時機構には下垂体の付け根に位置する下垂体隆起葉が重要である事が明らかになった。しかしながら、下垂体隆起葉の内分泌学的な機能は十分に明らかになっていない。下垂体隆起葉の内分泌機能を明らかにするために、下垂体隆起葉で季節・時刻依存的に発現変動する転写共役因子 Eyes absent 3（EYA3）の機能に着目したところ、EYA3 は転写共役因子としてだけでなく他の機能にも寄与している可能性が明らかになってきた。

研究成果の概要（英文）：Animals living outside the tropical region perform seasonal reproduction in accordance with changes in the photoperiod. Recent studies have demonstrated that pars tuberalis (located at the base of the anterior pituitary gland) plays an important role in photoperiodic time measurement. However, endocrine functions of the pars tuberalis have not been completely elucidated. To evaluate the potential role of the pars tuberalis in endocrine function, we observed the function of the Eyes absent 3 (EYA3) since EYA3 mRNA expression was previously observed in the pars tuberalis in a time-dependent manner. The function of EYA3 in the pars tuberalis may not only be coactivation of transcription but also contribution to several other functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：下垂体隆起葉、Eyes absent 3、甲状腺刺激ホルモン、光周性、ニホンウズラ

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

動物が季節的な繁殖活動（光周性）を行うためには、日長を測時し適切な時節を読み取らなければならない。この日長の測時機構には、下垂体隆起葉から合成・分泌される甲状腺刺激ホルモンがマスターコントロール因子として働いていることがニホンウズラを用いた研究から明らかになり、続いてヒツジやマウスにおいても季節を測時する仕組みに同じ分子が下垂体隆起葉で使われていることが明らかになった。しかしながら下垂体隆起葉は、日照情報を伝達する光周性に重要な部位で有るが詳細な内分泌学的機能は分かっていなかった。

2. 研究の目的

動物は、種を残すために自ら季節を読み取り春という食べ物が豊富な時期を測時して繁殖活動を行っている。この測時機構は、従来の常識では考えられない甲状腺刺激ホルモン（TSH）の新たな作用によるものである事が証明された。すなわち下垂体隆起葉から産生・分泌される TSH が脳内に作用し生殖腺を制御する機構である。このように内分泌機構には、よく分かっていない器官や作用が残されている。そこで、TSH と同様に下垂体隆起葉で時節・時刻依存的に発現変動する転写共役因子 Eyes absent 3 (EYA3) に着目し、EYA3 の機能解析から下垂体隆起葉の役割を解明し新しい視点から家畜、家禽の生殖内分泌に貢献する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1)EYA3 と転写共役因子複合体を形成する分子の同定

①短日条件下（6 時間明期、18 時間暗期）で飼育したニホンウズラを長日条件下（20 時間明期、4 時間暗期）に移行した際の明期開始

から 16、18、22 時間目の下垂体隆起葉よりタンパク質ライブラリー(AD)を作成した。このタンパク質ライブラリーとニホンウズラ EYA3 発現ベクター (BD) を用いて Yeast two-hybrid 法により EYA3 と複合体を形成するタンパク質の抽出を行った。

②*in situ* hybridization 法により EYA3 と複合体を形成する可能性のあるタンパク質のニホンウズラ脳における発現部位の同定を行った。

(2)EYA3 の経時的な細胞内局在の検討

短日条件下（6 時間明期、18 時間暗期）で飼育したニホンウズラを長日条件下（20 時間明期、4 時間暗期）に移行した際の明期開始 16 時間目から 28 時間目について 2 時間おきに脳をサンプリングし、Anti quail EYA3 抗体を用いて免疫組織化学法により下垂体隆起葉における EYA3 の経時的な細胞内局在の検討を行った。

(3)EYA3 による *TSHB* の転写調節機構の検討

ニホンウズラ *TSHB* の転写開始点を決定し *TSHB* の転写調節領域のクローニングを行った。*TSHB* の転写開始点から上流 242b までの転写調節領域を含むルシフェラーゼベクター (q*TSHB*-Luc) を作成した。ニホンウズラ EYA3、SIX homeobox 1 (SIX1)、thyrotrophic embryonic factor (TEF)、hepatic leukemia factor (HLF) に関して翻訳領域をクローニングしそれぞれの発現ベクターを作成した。これらのベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションルシフェラーゼアッセイにより EYA3 による *TSHB* の転写調節機構の検討を行った。

4. 研究成果

(1)EYA3 と転写共役因子複合体を形成する分子の同定

EYA3 は、転写共役因子であることから EYA3 の標的遺伝子を同定する事により下垂体隆起葉の季節性機能の解明に迫ることができる。最初に EYA3 は直接 DNA に結合できないため、EYA3 と複合体を形成する転写制御因子を Yeast two-hybrid 法を用いてスクリーニングを行った。101 個のポジティブクローンから DNA シークエンスにより重複する遺伝子を排除し、*in situ* hybridization による発現部位の同定より光周期におけるニホンウズラ下垂体隆起葉の EYA3 と複合体を形成する可能性のあるタンパク質を 7 遺伝子まで絞り込むことに成功した。この中には、カルシウム結合タンパク質、キナーゼ活性の制御タンパク質、ユビキチンに関するタンパク質、EYA3 ノックアウトマウス脳において mRNA の発現が減少しているタンパク質が含まれていたが、EYA ファミリーと複合体を形成すると知られている SIX ファミリーを始め転写制御因子は含まれず、EYA3 は転写制御機構に直接関わっていないと考えられた。

(2) EYA3 の経時的な細胞内局在の検討

上記の結果と EYA3 は、ホスファターゼとしての機能も報告されていることから、EYA3 の転写共役因子以外の機能が考えられた。そこで、光周期下のニホンウズラの下垂体隆起葉における EYA3 の経時的な細胞内局在を *EYA3* mRNA の発現ピークである明期開始 16 時間目から 12 時間にわたり免疫組織化学により検討したところ、EYA3 は核内よりも細胞質に多く局在している傾向があった (図 1)。

(3) EYA3 による *TSHB* の転写調節機構の検討

近年、哺乳類の EYA3 は下垂体隆起葉において *TSHB* の転写制御を行うカレンダー遺伝子として報告された。そこで、ニホンウズラ *TSHB* 遺伝子 (*qTSHB*) の転写開始点を決定しゲノミック DNA より *qTSHB* の転写調節領域 2650b をクローニングしヌクレオチド配列を

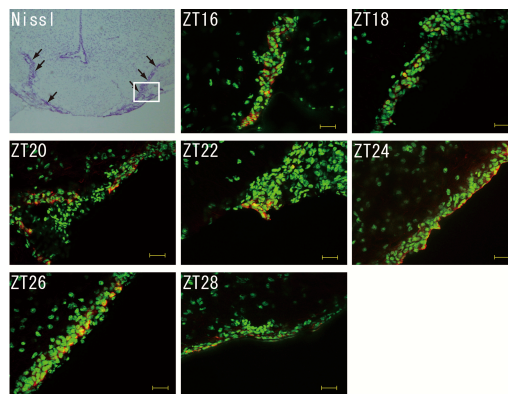


図 1. ニホンウズラを短日条件下から長日条件下に移行した際の下垂体隆起葉における EYA3 タンパク質の経時的な細胞内発現口で囲んだ領域を拡大して表示、ZT, Zeitgeber time (h) (明期開始を 0h とした時間) ; 緑色, SYTOX Green (核染色); 赤色, Anti quail EYA3; 黄色, SYTOX Green + Anti quail EYA3; 矢印, 下垂体隆起部; Nissl, Nissl 染色; Scale bars: 20 μm

決定した。*qTSHB* の転写開始点から上流 242b の配列には、SIX コンセンサス配列である So サイト、D box が存在し、*qTSHB* はヒツジおよびマウス間でそれぞれ 77% の相同性を有していた。そこで、*qTSHB*-Luc ベクターを HEK293 細胞に EYA3、SIX1、TEF、または HLF 発現ベクターと共にトランスフェクションし *qTSHB* の転写活性を調べたところ TEF または HLF により *qTSHB* の転写活性が増加し、それらの転写活性は SIX1 をコトランスフェクションしたときにさらに増加した (図 2)。

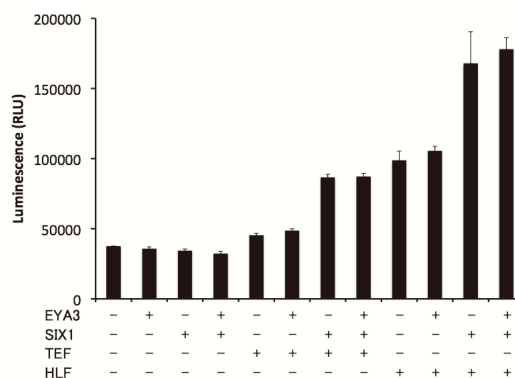


図 2. EYA3、SIX1、TEF および HLF 発現ベクターによるニホンウズラ *TSHB* (*qTSHB*-Luc) の転写活性の影響
EYA3, Eyes absent 3; SIX1, SIX homeobox 1; TEF, thyrotrophic embryonic factor; HLF, hepatic leukemia factor

しかし、ニホンウズラ EYA3 による転写活性は認められなくニホンウズラ下垂体隆起葉における EYA3 は、転写共役因子以外の役割があると考えられた (図 2)。

以上の知見より、ニホンウズラの光周性における下垂体隆起葉の EYA3 は、転写共役因子としてだけでなく他の機能にも寄与している可能性が明らかになった。今後、EYA3 と複合体を形成するタンパク質の詳細な機能解析を行う事で下垂体隆起葉の内分泌的機能の 1 つの解明に繋がると考えている。

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 2 件)

Yamamoto I, Nakao N, Kaiya H, Miyazato M, Tsushima N, Arai T, Tanaka T., Two chicken neuromedin U receptors: Characterization of primary structure, biological activity and tissue distribution. *General and Comparative Endocrinology*, 174, 116-123 (2011) (査読有)

DOI: 10.1016/j.ygcen.2011.08.004

Numao M, Sudo H, Yamamoto I, Nakao N, Kaiya H, Miyazato M, Tsushima N, Tanaka M. Molecular characterization of structure and tissue distribution of chicken neurotensin receptor. *General and Comparative Endocrinology*, 171, 33 - 38 (2011) (査読有)

DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.12.021

[学会発表] (計 1 件)

中尾暢宏, 須藤裕亮, 筒井千尋, 坂井貴文, 對馬宣道, 田中 実, ニワトリにおけるニューロメディン U mRNA の発現とその生理作用の検討. 第 36 回日本比較内分泌学会大会

およびシンポジウム, 2011/11/23, 24 都道府県会館 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 暢宏 (NAKAO NOBUHIRO)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・助教

研究者番号: 60377794

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: