

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770057

研究課題名(和文) 真骨魚類におけるリラキシンの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of relaxins in teleosts

研究代表者

日下部 誠 (Kusakabe, Makoto)

東京大学・大気海洋研究所・助教

研究者番号：40451893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：異なる塩分環境飼育したイトヨの脳内でのリラキシン関連ペプチド遺伝子発現の変化を解析した結果、リラキシン遺伝子が環境浸透圧の変化に応答することが分かった。特にrln3bに分類される遺伝子発現が海のイトヨにおいて環境浸透圧の上昇に伴って有意に増加した。また、リラキシンの受容体も海のイトヨと淡水のイトヨにおいて異なる発現パターンを示すことも明らかとなった。これらの結果は真骨魚類においてリラキシンが浸透圧調節に何らかの働きをしている可能性を支持する結果であった。

研究成果の概要(英文)：The results of the changes in relaxin-related peptide gene expression in the brain of the three-spined stickleback with different salinity environment showed that most of the relaxin-related peptides responded to changes in environmental salinity. A relaxin gene expression that is classified as rln3b in the brain of three-spined stickleback in particular has significantly increased with an increase of the environmental salinity. Further, the expression patterns of receptors of relaxin-related genes differ between seawater and freshwater type stickleback. These results support the possibility of osmoregulatory functions of relaxin-related peptides in teleost fish.

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：リラキシン ニューロペプチド 浸透圧調節 真骨魚類

1. 研究開始当初の背景

リラキシンは哺乳類において妊娠後期の血中で検出され、妊娠維持および分娩補助の役割を果たすホルモンとして知られている。近年、リラキシンは単一のホルモンではなく、リラキシン関連ペプチドとして、リラキシン (RLN)1/2、-3 とインスリン様ペプチド 3、-4、-5、-6 の 6 種類の存在が明らかになった。リラキシン関連ペプチドの中で妊娠維持および分娩補助の役割を持つのが RLN1/2 である。一方、RLN3 は 2002 年に哺乳類のゲノムデータベース検索によりその存在が初めて明らかとなった新しいリラキシンである。

魚類のゲノムデータベースの検索により、真骨魚類は 6 種のリラキシン関連ペプチド遺伝子 (*rln*, *rln3a*, *rln3b*, *insl3*, *insl5a*, *insl5b*) を持っていることが分かってきた。真骨魚類のリラキシンに着目すると *rln*, *rln3a*, *rln3b* という 3 種類のリラキシンが存在する。これらの遺伝子配列と哺乳類の RLN3 の遺伝子配列と比較すると高い相同性があることからリラキシンというホルモンの起源が RLN3 であることが示唆されている。

哺乳類では RLN3 は摂食、ストレス、浸透圧あるいは生殖などの生命活動を調節する重要なホルモンであることが分かってきた。しかしながら、機能が多岐にわたるため、核となる RLN3 の働きが明確に分かっていない。

2. 研究の目的

哺乳類以外の動物群でのリラキシン関連ペプチドの機能を探ることによって、RLN3 の根源的な機能を明らかに出来るのではないかと考え、真骨魚類を用いてリラキシン関連ペプチドの機能解析を目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

実験動物

実験にはゲノム情報が充実しており、様々な遺伝学的手法が確立しているイトヨを用いた。イトヨは、広塩性魚であることから浸透圧調節とリラキシンの関係について解析を進めることにも適している。カナダ・リトルキャンベル川から入手した海型イトヨと淡水型イトヨを実験室内で繁殖させ、実験に用いた。

リラキシン関連ペプチド遺伝子の発現組織

海型イトヨの成魚より、脳、下垂体、鰓、心臓、肝臓、頭腎、腎臓、胃、腸、脾臓、卵巣、精巣および筋肉を採取し、それぞれの組織でのリラキシン関連ペプチド遺伝子の発現を解析した。また、脳におけるリラキシン遺伝子の発現部位を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。

海型・淡水型イトヨの海水移行実験

イトヨのリラキシンの浸透圧調節に対する関与を検証するため、10%海水で飼育している海型および淡水型イトヨを 100%海水に移行し、24 時間までのリラキシンおよびそれらの受容体遺伝子の発現変化を解析した。

海型イトヨを用いたストレス実験

イトヨのリラキシンのストレスに対する関与を検証するため、10%海水で飼育している海型イトヨをネットに移行する群と通常通り飼育する群に分け、18 時間後のリラキシンおよびそれらの受容体遺伝子の発現変化を解析した。

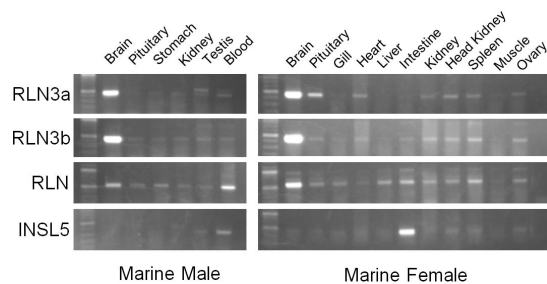
4. 研究成果

イトヨゲノムデータベースの検索

イトヨの Ensembl genome database ([http://asia.ensembl.org/Gasterosteus aculeatus/Info/Index](http://asia.ensembl.org/Gasterosteus_aculeatus/Info/Index)) を検索した結果、イトヨはリラキシンファミリー遺伝子として *rln*, *rln3a*, *rln3b*, *insl5b* の 4 種類、リラキシンファミリーペプチド受容体として *rxfp1*, *rxfp2b*, *rxfp3*, *rxfp3-2a*, *rxfp3-2b*, *rxfp4* の 6 種類の遺伝子がこれまでに同定されていることが分かった。

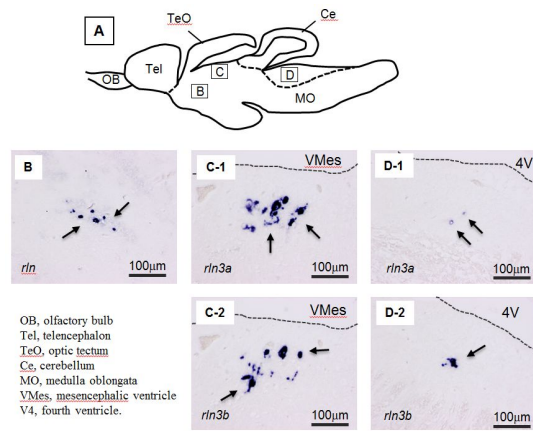
リラキシン関連ペプチド遺伝子の発現組織

リラキシンファミリーペプチド *rln*, *rln3a*, *rln3b*, *insl5b* の 4 種類の遺伝子発現組織を解析した結果、*rln*, *rln3a*, *rln3b* は脳で強く発現し、*insl5b* は腸で強く発現していることが明らかになった。



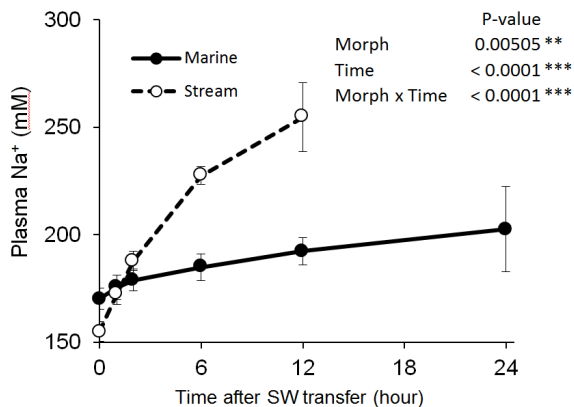
リラキシンファミリーペプチド受容体 *rxfp1*, *rxfp2b*, *rxfp3*, *rxfp3-2a*, *rxfp3-2b*, *rxfp4* についても同様に解析を進めたところ、*rxfp1*, *rxfp2b*, *rxfp3*, *rxfp3-2a*, *rxfp3-2b* が脳で強く発現していることが明らかになった。*rxfp4* については脳での発現しているものの、その発現量は極めて低いレベルであった。

脳における *rln*, *rln3a*, *rln3b* の発現部位を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析した結果、*rln* は間脳、*rln3a*, *rln3b* は中脳の視蓋直下および後脳に発現していることが確認された。

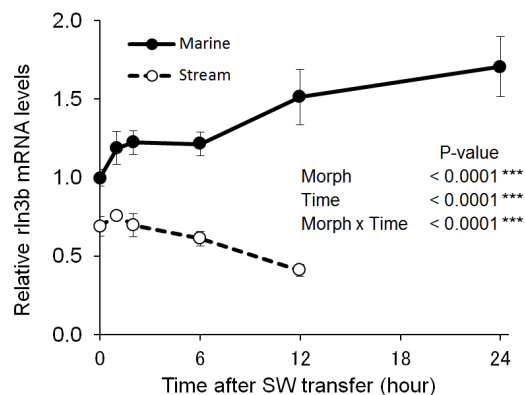


海型・淡水型イトヨの海水移行実験

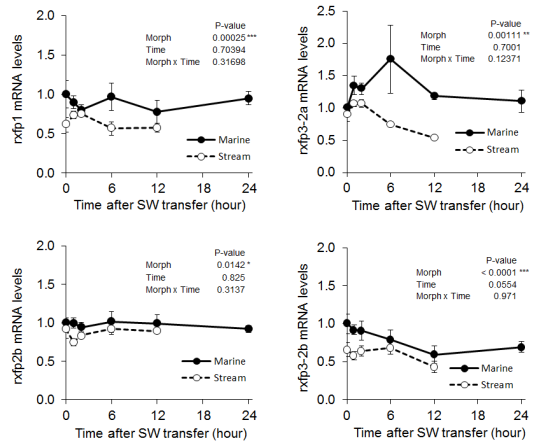
海型イトヨと淡水型イトヨを 100%海水に移行した結果、海水型イトヨは移行後 24 時間でもすべての魚が生存していた。淡水イトヨは100%海水に移行後12時間後には血中のナトリウム濃度が平均で 250mM を越え、移行後 24 時間まで生存した個体はいなかった。この実験から、海型イトヨと淡水型イトヨには浸透圧調節能の大きな違いがあることが明らかになった。



リラキシンファミリーペプチド *rln*, *rln3a*, *rln3b* の 3 種類の遺伝子発現変化を解析した結果、海水移行後に *rln*, *rln3a*, *rln3b* のすべて遺伝子が有意に変化し、特に *rln3b* は海型イトヨでは増加、淡水型イトヨでは減少した。

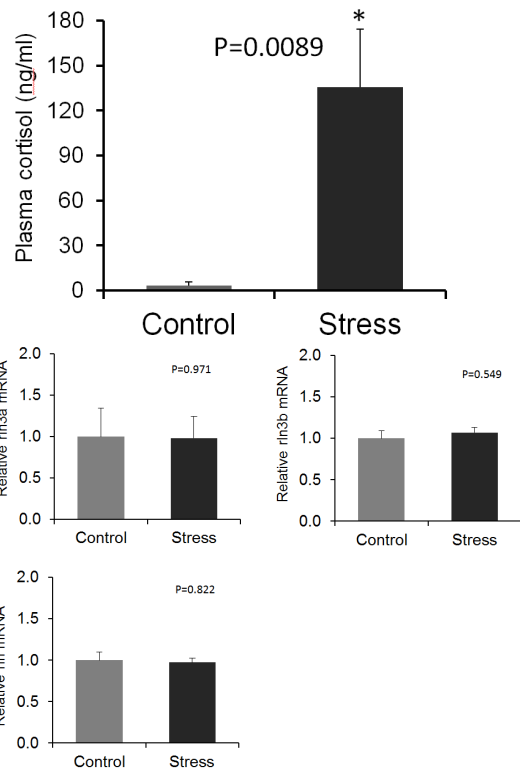


リラキシンファミリーペプチド受容体 *rxfp1*, *rxfp2b*, *rxfp3*, *rxfp3-2a*, *rxfp3-2b* についても同様に解析を進めた結果、*rxfp1*, *rxfp2b*, *rxfp3-2a*, *rxfp3-2b* については移行後の時間に関係なく海型イトヨと淡水型イトヨの間で遺伝子発現量に有意な差があった。



海型イトヨを用いたストレス実験

海型イトヨを 18 時間ネットに入れてストレスをかけた群と通常通り飼育したコントロール群において、血中のコルチゾル量を比較した結果、ストレス群の血中コルチゾル量は有意に増加した。



しかしながら、リラキシンおよびリラキシンファミリーペプチド受容体のいずれもストレスがかかることによって遺伝子の発現が増加しなかった(リラキシン遺伝子の結果のみを示す)。

以上の結果をまとめると、イトヨにおいてもこれまで報告のあるその他の真骨魚類と同様に複数のリラキシンファミリーペプチドおよびそれらの受容体を保持していることが明らかになった。

リラキシンおよびそれらの受容体の発現組織はほぼ脳に集中して発現しており、イトヨにおいてリラキシンはニューロペプチドとして働いている可能性が示唆された。In situ ハイブリダイゼーション法を用いてリラキシンの脳における発現部位を解析した結果、既に報告のあるニホンウナギの発現部位と同様な部位で発現していることが明らかになった。しかしながら、イトヨにおける脳地図が存在しないことから、イトヨの脳におけるリラキシン発現細胞が正確にどのような細胞であるかはまだ分かっていない。

海型イトヨと淡水型イトヨを海水移行した結果、海型と淡水型において浸透圧調節に大きな違いがあることが分かった。その時の脳でのリラキシンと受容体の遺伝子発現変化をみると、海型イトヨで *rln3b* が移行後に有意な増加を示し、またリラキシン受容体については海型イトヨで常にその発現が高いことが分かった。

海水移行がストレス反応を反映している可能性があるため、ネットを使ったストレス実験を行ったところ、18時間のストレス条件下ではリラキシンおよび受容体遺伝子の発現が有意に増加することはなかった。

これらの結果からイトヨにおいて、リラキシンが浸透圧調節に何らかの役割を果たしている可能性があることが示唆された。以上の結果は現在、論文としてまとめ、国際誌に投稿中である。今後は浸透圧以外の役割（生殖生理など）についても解析を進める計画である。それらの役割を総合的に解析し、最終的には脊椎動物における RLN3 の根源的な役割を明らかにしたい。

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0件)

[学会発表](計2件)

Makoto Kusakabe (研究代表者),
Asano Ishikawa (国立遺伝学研究所),
Jun Kitano (国立遺伝学研究所),
Possible osmoregulatory functions of relaxins in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) 口頭発表、
17th International Congress of

Comparative Endocrinology (ICCE 2013)、2013年7月15日~19日、スペイン・バルセロナ

日下部誠 (研究代表者)、石川麻乃 (国立遺伝学研究所)、北野潤 (国立遺伝学研究所)、海型・淡水型イトヨの脳におけるリラキシン遺伝子の発現解析 (口頭発表)、日本動物学会第84回大会、2014年9月25日~28日、岡山大学(津島キャンパス)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下部 誠 (KUSAKABE, Makoto)
研究者番号: 40451893

(2) 研究分担者

なし()

(3) 連携研究者

なし()