

令和元年6月18日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07420

研究課題名(和文)両生類の低温環境に対する適応の内分泌的調節機構

研究課題名(英文)Endocrine mechanisms of adaptation to low temperature in amphibians

研究代表者

岡田 令子 (Okada, Reiko)

静岡大学・理学部・講師

研究者番号：50386554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体ホルモン分泌調節に関わる視床下部因子の入れ替わりが、変温動物から恒温動物への進化に関連していると思定し研究を行った。哺乳類と異なり、両生類ではCRF、AVT及びTRHがそれぞれTSH、ACTH及びPRLの分泌調節に携ること、両生類でも低温下でTRHの分泌が上昇することを考え合わせ、両生類の調節様式が低温適応に適したものであると結論した。一方、凍結耐性のあるニホンアマガエルは凍結刺激がグルコース合成を高め、その輸送体を組織特異的に発現させることを示した。また水中で越冬するウシガエル幼生の下垂体にのみ新規PRLが発現することを発見し、低温順応と新規PRLとの関連の解明が待たれる段階に達した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部・下垂体の調節メカニズムについて、両生類では哺乳類と異なることの詳細を明らかにした。これは脊椎動物の進化の過程で、下垂体ホルモン産生細胞の視床下部因子に対する感受性が変化したことを示唆する知見であり、比較生物学的・進化学的に意義がある。また、一部の両生類に備わる凍結耐性機構の一端を明らかにし、脊椎動物の多様な生存戦略について考察した。

研究成果の概要(英文)：Using the bullfrog as a model, we studied the discrepancy of the role of hypophysiotropic hormones between poikilotherms and homeotherms. It was revealed that in the frog, the main hypophysiotropic hormones for TSH, ACTH, and PRL are CRF, AVT, and TRH, respectively. Considering that in the poikilothermic frog, TRH secretion is enhanced when subjected to a lower temperature, it was concluded that the hypophysiotropic system for metamorphosing amphibians is reasonable, and that the shift of the role of the hypophysiotropic system would have been one of the driving forces for the appearance of homeotherms. In addition, a novel type of PRL expressed only in the larval bullfrog pituitary is expected to be a clue for analyzing the tolerance mechanism in the larvae to a cold temperature. In another series of experiments, we have demonstrated that in the freeze-resistant Japanese tree frog, a cold temperature enhances synthesis of glucose and tissue-specific expression of glucose transporters.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：両生類 視床下部 下垂体 凍結耐性 アルギニンヴァソトシン プロラクチン グルコース

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳下垂体からの甲状腺刺激ホルモン (TSH) の放出は、間脳視床下部で合成される神経ペプチドによって促進される。両生類の TSH の放出は、哺乳類で知られる TSH 放出ホルモン (TRH) ではなく、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) によって強力に刺激される¹。また、TRH は哺乳類、両生類いずれでもプロラクチン (PRL) の主要な放出因子として機能することがわかっている²。哺乳類の体温維持に視床下部-下垂体-甲状腺 (HPT) 系による調節が重要な役割を果たしていること、両生類 PRL は低温刺激により分泌が高まる³ことから、脊椎動物が変温 (外温) 動物から恒温 (内温) 動物への進化を遂げた背景には、視床下部-下垂体調節系に関して大きな転換のあったことが考えられた。恒温動物が誕生した機構を解明するためには、哺乳類 (恒温動物) と両生類 (変温動物) で差異が存在することの意義を明らかにする必要があると考えられたが、そのために必要な知見は十分ではなかった。また、体内で熱を生み出すことができない両生類にとって重要な、寒冷環境に対する順応および凍結耐性の調節機構について十分な解明がなされているとは言えなかった。

2. 研究の目的

本研究は、変温動物である両生類がどのような機構により低温環境への適応を可能にしているのかを、内分泌学的な観点から解明することを目的として行った。本研究では特に視床下部-下垂体の調節メカニズムに焦点を当てた。また、無尾両生類の低温環境適応および凍結耐性に関わる因子と、その調節機構を解き明かすことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 両生類の HPT 系の調節に関わる視床下部因子は、哺乳類で知られる TRH ではなく CRF である¹。CRF はその名が示すように、哺乳類においては副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の主要放出因子として機能する。両生類 TSH の強力な放出因子である CRF が、ACTH の放出調節にも関与しているのかどうかを調べるための実験を行なった。まず、ウシガエル ACTH 特異的な時間分解蛍光免疫測定 (TR-FIA) 法を開発した。次いで、ウシガエル成体下垂体細胞を CRF 存在下で培養し、培養液中に放出される ACTH 量を TR-FIA で測定することで、ACTH 放出に及ぼす CRF の影響を調べた。また、哺乳類においてアルギニンヴァソプレシン (AVP) が CRF による ACTH 放出を高めることが知られていることから、AVP の両生類におけるオースログであるアルギニンヴァソトシン (AVT) についても同様に検討した。さらに、AVT 受容体 cDNA のクローニングおよび *in situ* ハイブリダイゼーションによる mRNA 発現部位の解析を行なった。

(2) 最近、両生類のゲノム中には 2 種類の PRL 遺伝子が存在することが報告され、PRL1A および PRL1B と名付けられた⁴。PRL1A は、これまで様々な両生類の種においてタンパク質精製や cDNA クローニングがなされ、発現レベルや血中濃度などに関して多くの研究がなされてきた。一方、PRL1B についてはゲノム中に遺伝子が存在することが判明したが、実際に発現して機能しているかどうかは不明であった。そこで、本研究ではウシガエル幼生の下垂体から PRL1B cDNA のクローニングを行い、RT-PCR により mRNA 発現を解析した。また、cDNA 塩基配列より推定されるアミノ酸配列に基づき抗原ペプチドを合成し、PRL1A および 1B のそれぞれに特異的な抗体を作製した。得られた抗体を用いたウエスタンブロットティングおよび免疫組織化学により、PRL1A および 1B タンパク質の発現を調べた。

(3) 日本に生息するカエルの寒冷環境に対する適応や、凍結耐性の調節機構に関する情報は乏しかったため、知見を追加することを目指して凍結耐性を有するニホンアマガエル⁵を用いて

実験を行った。アマガエルは4つの実験群（活動群：5月に採集した活動期の個体、冬眠群：自然条件下で冬眠中の個体、凍結群：冬眠中の個体を -4°C で6時間凍結した個体、解凍群：凍結後解凍した個体）に分け、体内のグルコースの濃度を測定した。さらに、アマガエルのグルコース輸送体およびグルコース合成に関わる酵素をコードするcDNAをクローニングし、それぞれの実験群におけるmRNA発現を比較した。

4. 研究成果

(1) 両生類視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系に関わる視床下部因子

両生類 HPA 系に関わる視床下部因子を明らかにするため、まずウシガエル ACTH 特異的な TR-FIA を開発し、ACTH 放出に及ぼす CRF および AVT の影響を *in vitro* で調べた。カエル CRF および AVT はいずれも濃度依存的に下垂体細胞からの ACTH 放出を刺激したが、AVT は CRF と比較して著しく高い ACTH 放出活性を示した。CRF は単独で弱い ACTH 放出活性を示したが、AVT による ACTH 放出を相乗的に高めることがわかった。メソトシン、ハイドリン 1、ハイドリン 2 といった AVT 関連ペプチドは、比較的弱い ACTH 放出活性を示した。続いて、ウシガエル V1a 型および V1b 型 AVT 受容体をコードする cDNA のクローニングを行なった。特異的プライマーを用いて RT-PCR を行なったところ、下垂体前葉では AVT V1b 型受容体 mRNA が高レベルで発現するのに対し、V1a 型受容体 mRNA の発現レベルは非常に低いことが明らかになった。In situ ハイブリダイゼーションにより、下垂体の ACTH 産生細胞において V1b 受容体 mRNA の発現が検出された。これらの結果は、AVT がカエルの主要な ACTH 放出因子であること、AVT による ACTH 放出は V1b 型受容体を介すること、CRF は AVT と相乗的に作用することで ACTH 放出を増強していることを示す。CRF は元来 TSH の主要な促進因子であったが、進化の過程で TSH の放出活性を失い、ACTH 放出作用を高める能力を得た、と考えられる。一方で、AVT (AVP) による ACTH 放出活性は、進化に伴い低下していったと思われる。

(2) カエル幼生の下垂体に発現する新規 PRL (PRL1B)

PRL1B がカエル下垂体中で実際に発現するかどうかを調べるため、まず前変態期のウシガエル幼生の下垂体から、PRL1B をコードする cDNA をクローニングした。得られた cDNA から推定されるアミノ酸配列は、ゲノム配列から推定されたアフリカツメガエル PRL1B の配列と 62% 一致した。一方、ウシガエル PRL1A と 1B の間の配列保存性は 48% であった。分子系統解析により、ウシガエル PRL1B は両生類 PRL1B に分類されることが確かめられた。定量的 RT-PCR を行なったところ、ウシガエル下垂体における PRL1B mRNA の発現は前変態期および変態始動期で高く、変態最盛期に急激に低下し、変態完了後の成体では検出されなかった。対照的に、PRL1A mRNA 発現レベルは、前変態期および変態始動期では比較的低く、変態最盛期に急上昇した。PRL1A および 1B の配列中から抗原ペプチドを合成し、それぞれに特異的なペプチド抗体を作製した。免疫組織化学により、幼生の下垂体における PRL1A および 1B 免疫陽性細胞のほとんどは別々に分布していること、一部の細胞中では PRL1A と 1B の両方が発現していることが明らかになった。幼生の下垂体抽出物を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、約 22.1 kDa の PRL1B と約 22.8 kDa の PRL1A のバンドが検出されたが、成体下垂体抽出物では PRL1A だけが検出された。これらの結果から、幼生期の前半で PRL1B が発現することが明らかになった。PRL1B はこの時期に何らかの役割を担っていると考えられ、特に寒冷適応と関連してその解明が期待される。

(3) アマガエルの凍結耐性に関わる因子

ニホンアマガエルは凍結に対する抵抗性を有し、その調節にはグリセロールとその輸送体が寄与することがわかっている⁵。凍結実験を行ったニホンアマガエルの血中グルコースの濃度を測定したところ、活動群と冬眠群では差が認められなかったのに対し、解凍群では著しく上昇していた。また、ニホンアマガエル肝臓から2型グルコース輸送体 (GLUT2) のcDNAをクローニングした。アマガエル GLUT2 は12回膜貫通タンパク質であると推定され、これは他の脊椎動物の GLUT の特徴と一致した。ニホンアマガエル GLUT2 mRNA の発現分布を RT-PCR により調べたところ、脳、腸、肝臓、腎臓において高レベルの発現が見られた。さらに凍結実験を行ったニホンアマガエルの肝臓における GLUT2 の mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR により測定した結果、活動群と比較して冬眠群では約10倍、凍結群では約25倍高かった。解凍群の肝臓の GLUT2 mRNA 発現レベルは活動群の約20倍であった。

次に、ニホンアマガエル GLUT2 に特異的なペプチド抗体を作製し、肝臓における GLUT2 の局在を免疫組織化学により解析した。その結果、活動群の肝臓では GLUT2 の免疫陽性シグナルがほとんど観察されないが、冬眠群では肝細胞膜上にシグナルが出現することがわかった。凍結群では、肝細胞膜上にさらに高レベルの陽性シグナルが検出され、解凍群ではシグナル数が低下した。このことから、GLUT2 は季節変化や凍結により mRNA およびタンパク質発現を高め、細胞膜上に局在変化させることで、体内の水分が凍結した際のグルコース輸送に役立っている可能性が示唆された。

<参考文献>

1. Okada et al., 2009, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1163 262–270.
2. Nakajima et al., 1993, Gen. Comp. Endocrinol. 89, 11–16.
3. Yazawa et al., 1999, Gen. Comp. Endocrinol. 113, 302–311.
4. Yamaguchi et al., 2015, Gen. Comp. Endocrinol. 224, 216–227.
5. Hirota et al., 2015, Zool. Sci. 32, 296–306.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. **Okada, R.**, Suzuki, M., Ito, N., Hyodo, S., **Kikuyama, S.**, 2019. A novel type of prolactin expressed in the bullfrog pituitary specifically during the larval period. Gen. Comp. Endocrinol. 276, 77–85. doi: 10.1016/j.ygcen.2019.02.006 [査読有り]
2. Nakano, M., Hasunuma, I., Minagawa, A., Iwamuro, S., Yamamoto, K., **Kikuyama, S.**, Machida, T., Kobayashi, T., 2018. Possible involvement of thyrotropin-releasing hormone receptor 3 in the release of prolactin in the metamorphosing bullfrog larvae. Gen. Comp. Endocrinol. 267, 36–44. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.05.029 [査読有り]
3. Imamichi, Y., Sekiguchi, T., Kitano, T., Kajitani, T., **Okada, R.**, Inaoka, Y., Miyamoto, K., Uwada, J., Takahashi, S., Nemoto, T., Mano, A., Khan, M.R.I., Islam, M.T., Yuhki, K., Kashiwagi, H., Ushikubi, F., Suzuki, N., Taniguchi, T., Yazawa, T., 2017. Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary. Scientific Reports 7, 8374. doi:10.1038/s41598-017-08780-7 [査読有り]
4. **Okada, R.**, Yamamoto, K., Hasunuma, I., Asahina, J., **Kikuyama, S.**, 2016. Arginine vasotocin is the major adrenocorticotrophic hormone-releasing factor in the bullfrog *Rana catesbeiana*. Gen. Comp. Endocrinol. 237, 121–130. [査読有り]

5. Tamaoki, K., **Okada, R.**, Ishihara, A., Shiojiri, N., Mochizuki, K., Goda, T., Yamauchi, K., 2016. Morphological, biochemical, transcriptional and epigenetic responses to fasting and refeeding in intestine of *Xenopus laevis*. Cell Biosci. 6:2. doi: 10.1186/s13578-016-0067-9. [査読有り]
6. **岡田令子**, 鈴木賢一 2016. 両生類の変態：分子から個体レベルの制御. 生物科学(日本生物科学者協会編集), 農文協. 67, 146–153. [査読有り]
7. **岡田令子** 2016. 両生類における下垂体ホルモン放出因子の役割の特異性とその意義, 比較内分分泌学, 日本比較内分分泌学会, 42, 60–61. [査読有り]

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 須藤百合子, 池田卓聡, 岩室祥一, **菊山榮**, 蓮沼至 有尾両生類アカハライモリにおける新規プロラクチン受容体の同定 第 89 回日本動物学会(代替大会) 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区) 2018 年 12 月 9 日
2. **岡田令子**, 鈴木雅一 両生類の環境適応とアクアポリン 第 43 回日本比較内分分泌学会 東北大学青葉山新キャンパス青葉山 commons(仙台市) 2018 年 11 月 11 日【招待講演】
3. 中野真樹, 岩室祥一, 小林哲也, 山本和俊, **菊山榮**, 蓮沼至 アフリカツメガエル 3 型甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体(TRHR3)の構造と機能性発現の検討 第 43 回日本比較内分分泌学会 東北大学青葉山新キャンパス青葉山 commons(仙台市) 2018 年 11 月 11 日
4. **岡田令子**, 鈴木雅一, 伊藤希実, 兵藤晋, **菊山榮** ウシガエル幼生下垂体は 2 種類のプロラクチンを発現している 第 33 回日本下垂体研究会学術集会 桂浜荘(高知市) 2018 年 8 月 17 日~19 日
5. **菊山榮** 両生類をモデルとした腺性下垂体の研究 第 33 回日本下垂体研究会学術集会 桂浜荘(高知市) 2018 年 8 月 17 日~19 日【招待講演】
6. 須藤百合子, 池田卓聡, 岩室祥一, **菊山榮**, 蓮沼至 アカハライモリ新規プロラクチン受容体遺伝子の同定 日本動物学会関東支部第 70 回大会 上智大学四谷キャンパス(東京都千代田区) 2018 年 3 月 21 日
7. 伊藤希実, **岡田令子**, 鈴木雅一, 兵頭晋 変態期のウシガエル幼生下垂体中の 2 種類のプロラクチン mRNA の発現様式 平成 29 年度日本動物学会中部支部大会 岐阜大学応用生物科学部(岐阜市) 2017 年 12 月 9–10 日
8. 大和田孝祐, 豊田ふみよ, 岩室祥一, **菊山榮**, 蓮沼至 プロラクチンはイモリ脳内細胞の分裂活性を高める 第 42 回日本比較内分分泌学会 奈良女子大学(奈良市) 2017 年 11 月 17 日–19 日
9. **岡田令子**, 阿達駿, 岩崎良平 ニホンアマガエル凍結耐性におけるグルコースの役割 日本動物学会第 88 回 富山大会富山県民会館(富山市) 2017 年 9 月 21–23 日
10. 鈴木雅一, **岡田令子** 両生類の水環境適応におけるアクアポリンの役割 日本動物学会第 88 回富山大会 富山県民会館(富山市) 2017 年 9 月 22 日【招待講演】
11. **菊山榮** ソデフリンに走りアイモリンを得るまで 日本動物学会第 88 回富山大会 富山県民会館(富山市) 2017 年 9 月 22 日【招待講演】
12. 小野慧, 豊田ふみよ, 岩室祥一, **菊山榮**, 蓮沼至 アカハライモリのアルギニンバソトシン V2b 型受容体の発現とその機能 日本動物学会第 69 回関東支部大会 筑波大学東京キャンパス文京校舎(東京都文京区) 2017 年 3 月 20 日

13. **Okada R.**, Yamamoto, K., Hasunuma, I., Asahina, J., **Kikuyama, S.** Arginine vasotocin, but not authentic corticotropin-releasing factor, acts as the major factor for inducing the corticotropin release from the bullfrog pituitary. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and 87th meeting of Zoological Society of Japan. Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (Onna-son, Kunigami, Okinawa), Okinawa Convention Center (Ginowan, Okinawa). 2016年11月14日-19日
14. Hayama S., Watanabe T., Yamamoto K., Iwamuro S., **Kikuyama S.**, Hasunuma I. Prolactin acts directly on the thyroid gland of larval bullfrogs to suppress its function. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and 87th meeting of Zoological Society of Japan. Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (Onna-son, Kunigami, Okinawa), Okinawa Convention Center (Ginowan, Okinawa). 2016年11月14日-19日
15. 阿達駿, 滝谷優, 廣田敦司, 鈴木雅一, **岡田令子** ニホンアマガエルの凍結耐性に関わるグルコース輸送体 (GLUT) の機能 日本動物学会 2016 中部支部大会 静岡大学 (静岡市) 2016年9月10日-11日 (学生優秀発表賞)
16. **岡田令子** 変態に関わる下垂体ホルモンの放出制御因子 第2回次世代両生類研究会 岡崎コンファレンスセンター (岡崎市) 2016年8月8日-9日【招待講演】
17. 葉山舜, 山本和俊, **菊山榮**, 岩室祥一, 蓮沼至 ウシガエル幼生甲状腺のサイロキシン放出におよぼすプロラクチンの影響 第2回次世代両生類研究会 岡崎コンファレンスセンター (岡崎市) 2016年8月8日-9日

〔その他〕

ホームページ等

岡田研究室 <https://wpp.shizuoka.ac.jp/bio-okada/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：菊山 榮

ローマ字氏名：KIKUYAMA SAKAE

所属研究機関名：早稲田大学

部局名：教育・総合科学学術院

職名：名誉教授

研究者番号 (8桁)：20063638

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。