

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570059  
 研究課題名 (和文) 鳥類メラノコルチン受容体アンタゴニストの生理機能解析  
 研究課題名 (英文) Studies on the physiological roles of melanocortin receptor antagonists in birds.  
 研究代表者  
 竹内 栄 (TAKEUCHI SAKAE)  
 岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授  
 研究者番号：20226989

## 研究成果の概要：

ニワトリの雛や成鶏雌にみられる保護色パターン，及び成鶏雄に特徴的な婚姻色パターンが，ASIP遺伝子の同一プロモーターの働きによって形成されることが明らかになった。これは，体色における性差発現の分子機序に関する初めての成果である。また，ニワトリ視床下部におけるASIP発現は，絶食負荷や高エネルギー食負荷により変動しないことから，摂食制御以外の機能を持つか，変異に起因する異所発現である可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子内分泌学

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

$\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) は，プロホルモンであるプロオピオメラノコルチン (POMC) の限定切断によりつくられる一群のペプチドホルモンに属する。その主要な内分泌腺は下垂体中葉であるが，哺乳類では，視床下部や様々な末梢組織でも産生され，内分泌ホルモンとして，あるいは神経伝達物

質，局所調節因子として，多彩な生体機能制御に関与する。 $\alpha$ -MSH の作用は，cAMP 経路を活性化する G タンパク共役型受容体のメラノコルチン受容体 (MCR) により仲介されている。MCR には，組織分布と薬理学的性質を異にする 5 種類のサブタイプ (MC1R～MC5R) が存在するが， $\alpha$ -MSH は MC2R を除く 4 種の MCR に対して主要な生理的リガンドと

して作用し、個体や種の維持に不可欠な基本的生体機能（摂食、生殖、免疫など）や、体色発現、外分泌などを制御している。近年、これらの制御系において、 $\alpha$ -MSH の作用を抑制する制御因子として、2 種類の局所性 MCR アンタゴニストが同定された。アグチンシグナルタンパク（ASIP）とアグチ関連タンパク（AGRP）である。前者は主に皮膚に発現して体色制御にはたらき、後者は主に視床下部に発現して摂食行動、生殖機能の制御に関与している。

哺乳類の  $\alpha$ -MSH 調節系に関する研究は近年めざましい発展を遂げ、その分子機構に関する知見が急速に蓄積されつつある。しかし、鳥類の  $\alpha$ -MSH 調節系に関してはほとんど分かっていない。鳥類は  $\alpha$ -MSH の主要な内分泌腺である下垂体中葉をもたない‘特異な’生物種である。鳥類はその進化の過程で、下垂体中葉の消失とともに  $\alpha$ -MSH 調節系を失ってしまったのであろうか。申請者らはこれまで、その存在が否定されてきた鳥類  $\alpha$ -MSH 調節系についての分子生物学的解析を世界に先駆けて進めてきた。その結果、鳥類の  $\alpha$ -MSH は内分泌ホルモンとしての機能こそ失ったが、哺乳類の場合と同様に局所調節因子として多様な生体機能制御に関与している可能性が示唆された (Takeuchi et al. 総説, 2003; Boswell & Takeuchi 総説, 2005)。

本研究課題は、鳥類  $\alpha$ -MSH 調節系の全貌解明に向けた従来からの研究の一環として、ニワトリ ASIP の羽色制御機構、およびエネルギーの恒常性維持機構への関与を検討することを主目的とした。

## 2. 研究の目的

### (1) ASIP の羽色制御機構への関与に関する解析

哺乳類の毛色は、MC1R を介して毛包メ

ラノサイトの黒色メラニン合成を促進する  $\alpha$ -MSH と、その作用を阻害する毛包性 MC1R アンタゴニスト ASIP により制御されており、哺乳類一般にみられる毛色の背腹差（背側が濃色で腹側が淡色）は、腹側毛包での構成的発現を担う ASIP プロモーターのはたらきによって生じることが知られている。哺乳類の黒色系統は、この  $\alpha$ -MSH-ASIP 調節系の欠損に起因するものであり、MC1R の構成的活性化 ( $\alpha$ -MSH 非依存的な受容体機能の活性化)、もしくは ASIP の機能欠損が認められる。

申請者らはこれまでに、ニワトリの MC1R がメラノサイトに発現し、 $\alpha$ -MSH 依存的に細胞内 cAMP 濃度を上昇させること、ニワトリの羽色を支配する黒色拡張遺伝子座が MC1R をコードし、羽色を黒色化する対立遺伝子では MC1R の構成的活性が認められること、POMC、及び POMC を限定分解して  $\alpha$ -MSH をつくる 2 種のプロホルモン転換酵素が皮膚に共発現していることなどを明らかにし、羽色を制御する局所性  $\alpha$ -MSH 調節系の存在を示唆した (Takeuchi et al. 総説, 2003; Boswell & Takeuchi 総説, 2005)。本研究では、ニワトリにみられる逆影の保護色パターンや、成鶏雄に特異的にみられる性的誇示の婚姻色パターンに ASIP プロモーターが如何に関与するのかを明らかにすることを目的とした。

### (2) ASIP のエネルギーの恒常性維持機構への関与に関する解析

哺乳類のエネルギーバランスは、視床下部において MC4R を介して摂食を抑制する  $\alpha$ -MSH と、その作用を阻害することで摂食を促進する MC4R アンタゴニスト AGRP によって制御されている。2 種類の視床下部弓状核ニューロン ( $\alpha$ -MSH ニューロンと AGRP/NPY ニューロン) における  $\alpha$ -MSH と AGRP の産生・分泌は、末梢から脳内にエネル

ギー状態を伝えるホルモン（レプチン）により調節されている。申請者らはこれまでに、ニワトリやウズラの視床下部に  $\alpha$ -MSH ニューロンと AGRP/NPY ニューロンが存在すること、視床下部摂食中枢に MC4R 発現ニューロンが存在すること、絶食の負荷により視床下部における POMC mRNA の発現低下と AGRP mRNA の発現亢進が認められることを見出し、摂食を制御する視床下部  $\alpha$ -MSH-AGRP 調節系が鳥類にも存在する可能性を示唆した

(Takeuchi et al. 総説, 2003; Boswell & Takeuchi 総説, 2005)。しかし、ニワトリ（ブロイラー）は一般に摂食行動異常（多食）を示し、自由給餌下では過肥、X脚、精液減少、生育阻害などを発症する。また、生理的に高血糖（ヒトの正常血糖値のおよそ2倍）であり、インスリン抵抗性など二型糖尿病様の生理的性質を示す。これらニワトリの‘特異な’性質は何によるのであろうか。最近、申請者らはニワトリの ASIP mRNA が皮膚に加え、視床下部、脂肪組織などにも発現することを見出した。哺乳類における ASIP の視床下部発現は、摂食行動異常（多食）を示し、二型糖尿病を発症する変異マウス (yellow-obese mouse) に限られている。また、脂肪組織における ASIP 発現も、正常なマウスやラットでは認められないが yellow-obese mouse で確認されている。興味深いことに、ヒトでは糖尿病であるなしにかかわらず、脂肪組織での ASIP 発現が観察されるが、その発現亢進は肥満、二型糖尿病と関連する可能性が示唆されている。これらの事実を勘案すると、ニワトリの多食、生理的特異性が ASIP の発現分布と何らかの関係がある可能性が考えられる。

本研究課題では、ニワトリ ASIP の視床下部発現がエネルギー状態を反映した変化を示すか否かを検討することで、ASIP のエネルギー恒常性維持機構への関与を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ASIP の羽色制御機構への関与に関する解析

初生雛、若鶏、成鶏の背側と腹側の羽包及び皮膚を採取して全 RNA を調製し、RT-PCR 解析によりメラノコルチン調節系関連遺伝子群の発現を調べた。また、第2世代羽が生え出した時期に抜羽し、再生羽を形成させ、メラノコルチン調節系関連遺伝子群の発現を調べた。

#### (2) ASIP のエネルギーの恒常性維持機構への関与に関する解析

雛に絶食を負荷し、視床下部におけるメラノコルチン調節系関連遺伝子群の発現をリアルタイム RT-PCR 解析により調べた。また、高脂肪食を与えた場合の視床下部メラノコルチン調節系関連遺伝子群の発現動態についても同様な解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 羽装色パターンと ASIP

ニワトリの羽装色パターンには、哺乳類と共通な逆影パターンと、哺乳類にはない性的提示とがある。逆影を示すニワトリの雛やウズラでは、羽包における *Asip* mRNA の発現レベルに背腹差があり、暗色の背側羽よりも明色の腹側羽で発現レベルが高かった。この発現レベルの背腹差には *Asip* 遺伝子の3つのプロモーターの1つ、*Asip* type 1 プロモーターが関与した (図1)。

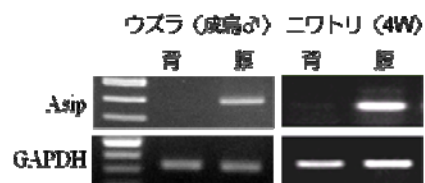


図1 逆影パターンを示すウズラとニワトリにおける *Asip* 発現。タイプ1プロモーターから転写される mRNA を特異的に認識するプライマーを用いた RT-PCR 解析結果。

さらに、雌雄差を示すニワトリ背側第3世

代羽の羽包（図 2a）における *Asip* mRNA の発現を雌雄で比較したところ、雄で発現レベルの顕著な上昇がみられ、それが *Asip* type 1 プロモーター活性の亢進によるものであることがわかった（図 2b）。

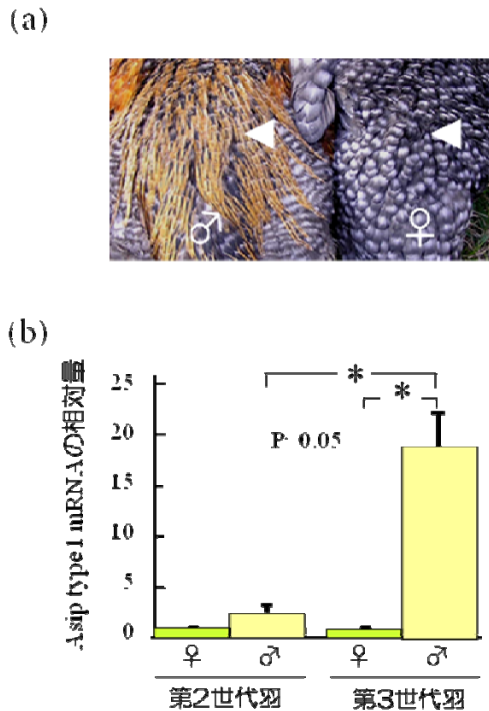


図 2 性的誇示の羽装パターンと *Asip* の発現。

背側第 3 世代羽に顕著な雌雄差を示さないウズラでは、*Asip* type 1 プロモーターの活性化はみられず、当該プロモーターから転写される mRNA は腹側羽のみで検出された（図 1）。これらの結果は、鳥類の逆影羽装色パターンが哺乳類の場合と同様に、*Asip* 遺伝子の特定のプロモーターの働きにより形成されること、ニワトリの性的提示の羽装色パターン形成にも逆影形成と同じ *Asip* 遺伝子のプロモーターが関与することを強く示唆する。ニワトリでは、進化的に保存された腹側特異的プロモーターの働きによって保護色（逆影）が表現されるとともに、そのプロモーターの未同定の変化によって、性成熟に応じた性的提

示の羽装色パターンが表現されるようになったものと考えられる。*Asip* の部域的な発現が性や成長段階で制御され得ること、その制御に種差（ここではニワトリとウズラ）が存在することが示されたことは、脊椎動物にみられる様々な体色パターンの形成機構を理解する上で重要な手がかりになるかもしれない。

## (2) 視床下部における ASIP 発現

2 週齢ロックコーニッシュのメスを用いて、自由に食事をとらせるグループ（control 群）と 6 時間、12 時間、24 時間、48 時間それぞれ水のみを与えて絶食を負荷するグループ（fasted 群）とに分けた。絶食終了とともに視床下部を採取し、リアルタイム PCR 解析により *Agrp*  $\cdot \cdot$  type, *Agrp*  $\cdot \cdot$  type, *Pomc*, *Mc4r*, *Asip* の mRNA の発現量を解析した。その結果、視床下部における *Agrp*  $\cdot$  type mRNA は 6 時間及び 12 時間の絶食負荷では大きい変化はみられなかったが、24 時間の絶食負荷により 3.9 倍に、48 時間の絶食負荷では 6.1 倍に増加した。*Agrp*  $\cdot \cdot$  type mRNA も 6 時間及び 12 時間の絶食負荷では大きい変化はみられなかったが、24 時間の絶食負荷により 4.0 倍に、48 時間の絶食負荷でも 3.8 倍に増加した。*Pomc* mRNA はいずれの絶食条件でも大きな変化はみられなかったが、48 時間の絶食負荷によりわずかに（0.86 倍）減少した。*Mc4r* mRNA 及び *Asip* mRNA はいずれの絶食条件でも大きな変化はみられなかった。また、2 日齢のロックコーニッシュのメスに 18 日間通常飼料（CON）と高脂肪飼料（HFD）を与え続け、視床下部におけるメラノコルチン調節系関連遺伝子群の発現をリアルタイム PCR 解析の結果、*Agrp*  $\cdot \cdot$  type, *Agrp*  $\cdot \cdot$  type, *Pomc*, *Mc4r*, *Asip* いずれの mRNA も CON と HFD の間で有意な差はみられなかった。このこと

から、視床下部における Asip の発現は、エネルギーバランスの制御以外の働きをもつか、変異に起因する異所発現である可能性が示唆された。ニワトリは自由食餌下で多食・肥満を呈する。本研究結果はその原因解明に一定の役割を果たすことが期待できる。

#### 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)

- ① 織部恵莉・吉原千尋・高橋純夫・竹内 栄  
鳥類におけるメラニンを用いた体色発現システムの分子機構, 比較生理生化学 (査読有) 第26巻1号3-11 (2009)

- ② 吉原千尋・竹内 栄 鳥類の羽色発現機構—メラニンによる羽の着色とメラニン形成の制御機構, 生物の科学 遺伝 (査読無) 11月号45-51 (2008)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 織部恵莉・吉原千尋・鑛山宗利・高橋純夫・竹内 栄: ニワトリの羽装形成に対するアグチングナルタンパク (ASIP) の関与の可能性: 第 33 回比較内分泌学会 (東広島) 2008 年 12 月 5 日

- ② 板東可奈・藪内雅文・鑛山宗利・高橋純夫・竹内 栄: ニワトリの脂肪組織における局所性メラノコルチン調節系: 第 33 回比較内分泌学会 (東広島) 2008 年 12 月 5 日

- ③ 平松美紗都・水谷 綾・藪内雅文・高橋純夫・竹内 栄: ニワトリの摂食行動制御系と多食・肥満との関連性: 第 33 回比較内分泌学会 (東広島) 2008 年 12 月 5 日

- ④ 竹内 栄: ニワトリの羽装形成と局所メラノコルチン制御系: 第 33 回鳥類内分泌研究会

シンポジウム「鳥類下垂体研究の最近の歩みと今後の展望」(草津) 2008 年 11 月 13 日

- ⑤ 藪内雅文・坂東可奈・平松美紗都・鑛山宗利・高橋純夫・竹内 栄: ニワトリメラノコルチン調節系に及ぼす絶食負荷の影響: 第 79 回日本動物学会大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日

- ⑥ 吉原千尋・織部恵莉・鑛山宗利・高橋純夫・竹内 栄: ニワトリ羽軸基部における POMC mRNA の発現: 第 79 回日本動物学会大会 (福岡) 2008 年 9 月 5 日

- ⑦ 竹内 栄: ニワトリの羽色を制御する局所メラノコルチン調節系: 第 79 回日本動物学会大会第 5 回色素細胞シンポジウム「動物における色素産生制御機構の新展開」(福岡) 2008 年 9 月 5 日

- ⑧ 織部恵莉・吉原千尋・高橋純夫・竹内 栄: ニワトリにおける羽色調節の分子機構に関する研究: 第 32 回鳥類内分泌研究会 (高松) 2007 年 11 月 15 日

- ⑨ 平松美紗都・藪内雅文・高橋純夫・竹内 栄: ニワトリにおけるアグチ関連タンパクの普遍的発現の分子機構: 第 32 回鳥類内分泌研究会 (高松) 2007 年 11 月 15 日

- ⑩ 板東可奈・藪内雅文・高橋純夫・竹内 栄: ニワトリの脂肪組織における局所性メラノコルチン調節系の生理機能解析: 第 32 回鳥類内分泌研究会 (高松) 2007 年 11

月 15 日

若手研究奨励賞受賞

- ⑪ 吉原千尋・高橋純夫・竹内 栄：ニワトリ羽軸基部に特異的に発現する新規 POMC mRNA の同定：第 78 回日本動物学会大会（弘前） 2007 年 9 月 22 日
  
- ⑫ 田代雄一・高橋純夫・竹内 栄：ASIP は鳥の羽色調節にも関与する：第 78 回日本動物学会大会（弘前） 2007 年 9 月 22 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 栄 (TAKEUCHI SAKAE)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：20226989