

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580388

研究課題名(和文) 抗利尿ホルモン遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Study of regulation of anti-diuretic hormone gene expression

研究代表者

斉藤 昇 (Saito, Noboru)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：40211924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類の抗利尿ホルモンであるアルギニンバソトシン(AVT)の浸透圧刺激による発現調節にTon  
icity-responsive Enhancer Binding Protein (TonEBP)が関与していることを明らかにした。ゲルシフトアッセイ法に  
より、AVT遺伝子の5'上流にTonEBPが結合することが明らかになった。また、TonEBPの免疫陽性反応がVT陽性細胞が多い  
PVNとSONにおいて観察された。鳥類の浸透圧調節に、TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid)が関与する  
ことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We suggested that Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein (TonEBP) participat  
ed in expression of birds adjustment by the osmoregulation of arginine vasotocin (AVT) which was antidiure  
tic hormone. We revealed that TonEBP bound to the upper region of the AVT gene by the gel mobility shift a  
ssay method. In addition, an immunoreactive localization of TonEBP was observed in PVN (para-ventricular n  
ucleus) and SON (supra optic nucleus) with many VT-positive cells. It was suggested that TRPV (Transient R  
eceptor Potential Vanilloid) participated in the osmoregulation of birds.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：ニワトリ 浸透圧調節 抗利尿ホルモン 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

浸透圧調節は、動物の基本的な恒常性維持機構の一つである。特に、抗利尿ホルモンは脳と末梢においての情報伝達において重要な役割を果たすと考えられている。脳において浸透圧受容器が存在し、そこにおいて血中の浸透圧の変化を感知していると考えられている。脳において高浸透圧を感受すると、抗利尿ホルモンである下垂体後葉ホルモン（アルギニンバソプレッシンあるいはアルギニンバソトシン）が分泌され、腎臓において作用し水分の再吸収を高め、体内の水分の損失を抑えることで浸透圧を低下させるように働くと考えられている。しかしながら、動物において、脳内における浸透圧受容体の実体および抗利尿ホルモンが放出されるまでの情報伝達系は不明なままである。

## 2. 研究の目的

申請者らは、鳥類の抗利尿ホルモンであるアルギニンバソトシン(AVT)の浸透圧刺激による発現調節に Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein (TonEBP)が関与していることを明らかにしている。したがって、高浸透圧刺激により増加する TonEBP と AVT の遺伝子発現を指標として、浸透圧受容器を明らかにすることを目的として、本研究を行なった。

## 3. 研究の方法

(1)、TonEBP 脳内局在と TonEBP の AVT 遺伝子調節領域での結合性。

1週齢のニワトリのヒヨコを用い、腹腔内に 3M NaCl を投与し、高浸透圧状態にし、3時間後に血液および脳を採取した。脳は、TonEBP 抗体を用い脳内局在性および AVT 細胞との共存性を調べた。また、脳の視床下部から核タンパク質を抽出し、ニワトリ AVT 遺伝子プロモーター領域に転写因子 TonEBP が、直接結合するかを明らかにするために、ゲルシフトアッセイ法を行なった。

(2)、AQP1 と AQP4 脳内局在。

1週齢のニワトリのヒヨコを用い、腹腔内に 3M NaCl を投与し、高浸透圧状態にし、3時間後に血液および脳を採取した。脳は、AQP1 と AQP4 抗体を用い脳内局在性および AVT 細胞との共存性を調べた。

(3)、TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid)と浸透圧調節との関係

初めに、TRPV ファミリーのアンタゴニストの脳室内投与を高浸透圧刺激の前に行い、TonEBP および AVT の遺伝子発現への影響を調べた。次に、TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンを脳室内に投与した時の、TonEBP および AVT の遺伝子発現への影響を調べた。

## 4. 研究成果

(1)、TonEBP の免疫陽性反応が VT 陽性細胞が多い PVN (para-ventricular nucleus)と SON (supra optic nucleus)において観察された。AVT 遺伝子プロモーター領域に存在する TonE (tonicity-responsive enhancer element)領域のプロンプを作成し、脳から抽出した核タンパク質と結合するかを調べた結果、TonE プロンプの電気泳動の位置が移動したために、TonE プロンプに何らかのタンパク質が結合したと考えられた。また、TonEBP 抗体を TonE プロンプと反応させた後には、移動するバンドの減少が見られたことから、TonE プロンプと結合したものは TonEBP であると考えられた。以上の結果から、TonEBP は AVT の転写調節部位に結合し、重要な役割を果たしていることが示唆された。

(2)AQP4は、脳内に広く存在することが明らかになった。また AQP1 は、局所的に commisura palli においてのみ存在が確認された。

(3)、TRPV ファミリーのアンタゴニストの脳室内投与は、TonEBP および AVT の遺伝子発現に有意な変化は見られなかったが、TonEBP の遺伝子発現が浸透圧刺激のみに比べ少し減少する傾向が観察された。したがって、TRP ファミリーが浸透圧受容体に何らかの関係があることが示唆された。

次に、TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンを脳室内に投与すると、TonEBP および AVT の遺伝子発現が低下することが観察された。以上の結果から、TRPV1 は TonEBP の発現に抑制的に作用することから、低浸透圧の受容器と関係があるかもしれないことが、示唆された。

## 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 16 件)

Aste N, Sakamoto E, Kagami M, Saito N. (2013) Vasotocin-mRNA expression is sensitive to testosterone and oestradiol in the bed nucleus of the stria terminalis in female Japanese quail. *Journal of Neuroendocrinology*, 25, 811-825. 査読有, doi: 10.1111/jne.12076.

Myint S. L., Shimogiri T., Kinoshita K., Nirasawa K., Saitoh N., Watanabe H., Kawabe K., Maeda Y. and Okamoto S. (2012) Analysis of egg white lysozyme polymorphisms among Japanese quail populations in Japan and France, *Journal of Poultry Science*, 49, 74-78. 査読有, DOI:10.2141/jpsa.011129

Yoshimura K, Kinoshita K, Mizutani M, Matsuda Y, Saito N. (2012) Inheritance and

developmental pattern of cerebral hernia in the crested polish chicken. *Journal of Experimental Zoology Mol Dev Evol.* 318B, 613-620. 査読有, DOI: 10.1002/jez.b.22464

Honda K, Kamisoyama H, Uemura T, Yanagi T, Saito N, Kurose Y, Sugahara K, Katoh K, Hasegawa S. (2012) The mechanism underlying the central glucagon-induced hyperglycemia and anorexia in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163, 260-264. 査読有, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.08.005>

Honda S-I, Kozako T, Shimeno H, Soeda S, Harada N. (2012) LIM-homeodomain transcription factor, *Lhx2*, is involved in transcriptional control of brain-specific promoter/exon 1f of the mouse aromatase gene. *J Neuroendocrinol.* 24, 1367-1374, DOI: 10.1111/j.1365-2826. 査読有

Li R, He P, Cui J, Staufenbiel M, Harada N, Shen Y. (2012) Brain endogenous estrogen levels determine responses to estrogen replacement therapy via regulation of BACE1 and NEP in female Alzheimer's transgenic mice. *Mol Neurobiol.* DOI:10.1007/s12035-012-8377-3, 査読有

Cornfield JR, Harada N, Iwaniuk AN. (2012) Aromatase expression in the brain of the ruffed grouse (*Bonasa umbellus*) and comparisons with other galliform birds (Aves, Galliformes). *J Chem Neuroanat.* DOI: 10.1016/j.jchemneu.2012.12.001. 査読有

Haraguchi, S., Sasahara, K., Shikimi, H., Honda, S. I., Harada, N., & Tsutsui, K. (2012) Estradiol Promotes Purkinje Dendritic Growth, Spinogenesis, and Synaptogenesis During Neonatal Life by Inducing the Expression of BDNF. *Cerebellum*, 11, 416-417, DOI 10.1007/s12311-011-0342-6, 査読有

Yoshimura K, Sugiura K, Ohmori Y, Aste N, Saito N. (2011) Immunolocalization of aquaporin-4 in the brain, kidney, skeletal muscle and gastro-intestinal tract of chicken, *Cell and Tissue Research*, 344, 51-61. 査読有, DOI 10.1007/s00441-011-1134-5

Balthazart, J., Charlier, T.D., Cornil, C.A., Dickens, M.J., Harada, N., Konkle, A.T.M., Voigt, C., Ball, G.F. (2011) Sex differences in brain aromatase activity: genomic and non-genomic controls. *Front. Neuroendocrin.*, 2,

34. DOI:10.3389/fendo.2011.00034,2011 査読有

Honda, S-I., Wakatsuki, T., & Harada, N. (2011) Behavioral analysis of genetically modified mice indicates essential roles of neurosteroidal estrogen. *Front. Neuroendocrin.*, 2,40. DOI:10.3389/fendo.2011.00040 査読有

Niki, Y., Yoshida, M., Ando, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Harada, N., Matsui, M.S., Yarosh, D.B., Ichihashi, M. (2011) 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane inhibits melanin synthesis by dual mechanisms. *J. Dermatol. Sci.*, 63, 115-121. 査読有, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.04.002

Honma, N., Saji, S., Hirose, M., Horiguchi, S., Kuroi, K., Hayashi, S., Utsumi, T., & Harada, N. (2011) Sex steroid hormones in pairs of tumor and serum from breast cancer patients and pathological role of androstene-3b, 17b-diol. *Cancer Sci.*, 102, 1848-1854. 査読有, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02018.x

Charlier, T. D., Harada, N., Balthazart, J., & Cornil, C. A. (2011) Human and Quail Aromatase Activity Is Rapidly and Reversibly Inhibited by Phosphorylating Conditions. *Endocrinology*, 152, 4199-4210. 査読有, DOI: 10.1210/en.2011-0119

(学会発表)(計 件)

Yoshimura K, Aste N, Saito N. Effects of fasting on AQP9 expression in the chick brain, International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry 2011. 2011年5月31日-6月5日、名古屋

Aste N, Sakamoto E, Kagami M, Saito N. Arginine-vasotocin (AVT) mRNA expression is sensitive to testosterone and estradiol in adult female Japanese quail, International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry 2011. 2011年5月31日-6月5日、名古屋

Saito N, Hirayama H, Yoshimura K, Atsumi Y, Kinoshita K, Mizutani M, Fujiwara A, Namikawa T, Nicoletta Aste N. Muscular dystrophic chicken is hypernatremic, International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry 2011. 2011年5月31日-6月5日、名古屋

吉村圭司、木下圭司、水谷誠、松田洋一、齋藤昇、Polish系ニワトリにおける“Cerebral hernia”形成機構の解明。鳥類内分泌研究会、2011年11月21-22日、箱根町

Aste N., Kagami M., Sakamoto E. and Saito N., Arginine-vasotocin (AVT)-mRNA expression is sensitive to testosterone and estradiol in the bed nucleus of the stria terminalis of adult female Japanese quail. 10<sup>th</sup> International Symposium on Avian Endocrinology 2012, 2012年6月5日-9日、岐阜

Aste N., Yoshioka N., Sakamoto E. and Saito N., Arginine-vasotocin (AVT)-expression is female-biased and associated with aromatase in the bed nucleus of the stria terminalis of developing Japanese quail. 10<sup>th</sup> International Symposium on Avian endocrinology 2012, 2012年6月5日-9日、岐阜

Saito N., Nozawa S., Fujii M. and Aste N., TonEBP mediates the effects of hyperosmolality on arginine vasotocin gene expression in the hypothalamus of chick (*Gallus domesticus*). 10<sup>th</sup> International Symposium on Avian Endocrinology 2012, 2012年6月5日-9日、岐阜

Saito N., Yoshimura K., Kinoshita K., Mizutani M. and Matsuda Y., Cerebral hernia in the crested Polish chicken: inheritance and developmental pattern. Chick 7: Avian Model Systems 7<sup>th</sup> International Chick Meeting, 2012年11月14日-18日、名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 昇 (SAITO NOBORU)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号: 40211924

### (3) 連携研究者

原田 信広 (HARADA NOBUHIRO)

藤田保険衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 00189705