

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18569

研究課題名(和文) 脳下垂体ホルモンの起源解明を目指して～MSH受容体からのアプローチ～

研究課題名(英文) Aiming at elucidating the origin of pituitary hormone (Approach from MSH receptor)

研究代表者

小林 勇喜 (Yuki, Kobayashi)

広島大学・総合科学研究科・助教

研究者番号：80736421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳下垂体は様々なホルモンを産生し、脊椎動物において内分泌の要となる重要な器官である。しかし、無脊椎動物において、脊椎動物の腺性下垂体に対応するホルモンの同定はなされておらず、腺性下垂体のシステムは脊椎動物の進化の過程で獲得されたと推測されてきた。申請者は、ゲノムデータベースを参考に腺性下垂体ホルモンの一種である黒色素胞刺激ホルモン(MSH)の受容体と相同な遺伝子を軟体動物であるカキからクローン化し、魚類MSHに対する応答性を調べた。その結果、当該受容体は、脊椎動物MCRの相同遺伝子であり、その細胞内シグナルは独自である可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In vertebrates, the pituitary gland is an important endocrine organ that produces various hormones. However, to date there have been no reports of hormones in invertebrates that correspond to the hormones of the anterior pituitary gland of vertebrates. Therefore, there is speculation stating that the anterior pituitary system was acquired during the process of evolution to vertebrates. In this study, we cloned a gene homologous to the receptor of melanophore stimulating hormone (MSH), which is one of the anterior pituitary hormones from oysters. When we investigated its response to teleost fish MSH, we found that oyster-MSHRlike is a homologous gene of vertebrate MSHR, suggesting that its intracellular signal may be unique.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：黒色素胞刺激ホルモン 脳下垂体 無脊椎動物 細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

脳下垂体は、成長、摂食、免疫、性成熟等、重要な生理機能を制御する多くのホルモンを産生する重要な器官である。内分泌系の要である脳下垂体は、腺性下垂体(下垂体前葉・中葉)と神経下垂体(後葉)に大分され、下垂体の部位および細胞により、産生されるホルモンが異なる。現在、脳下垂体と考えられる器官を有する最も原始的な生物は、魚類の“根”に位置する無顎類である。また、神経下垂体に由来するホルモンは無顎類より原始的な生物で同定された例があるが、腺性下垂体に由来するホルモンに関しては信用に足る報告は一切無い。加えて、様々な生物種でゲノムデータベースが充実してきているが、無顎類より原始的な脊索動物および無脊椎動物のデータベースには、脊椎動物の腺性下垂体ホルモン遺伝子と相同な遺伝子配列は見当たらない。以上のことから、現存する脊椎動物の脳下垂体システムは、脊索動物から魚類へ進化する過程で生じたと考えられてきた。しかし、脊椎動物が生きるために必須であるシステムが何の痕跡もなく急に生じ、継承されてきたとも考え難いのも事実である。そこで、私はこの問題のブレイクスルーを目指して、腺性下垂体ホルモンである“黒色素胞刺激ホルモン(MSH)”の受容体に着目した。

2. 研究の目的

脊椎動物の体色調節能は、魚類から両生類において、生殖や擬態を含む生存戦略に関わる重要な生理機能である。この体色調節は、内分泌系と神経系により支配される。体色の長期維持に関わる内分泌系に着目すると、体色の暗化には、MSHが重要な役割を担う。興味深い事に背景適応等の体色調節能を失った哺乳類においても、MSHの相同遺伝子が存在し、摂食抑制作用を有する事が示された。脊椎動物において、MSHは腺性下垂体から産生される。しかし、無脊椎動物に該当する器官が存在しない事、リガンドの一次構造(DNA)および三次構造(抗体)による探索においても検出されなかった事から、MSH(腺性下垂体)は、脊椎動物に進化した際に獲得されたと考えられてきた。一方、腺性下垂体では複数の生理ペプチドが産生される事を考慮すると、脊椎動物が生存に必須である本システムが、無脊椎動物から魚類へ進化する過程で何の痕跡もなく生じたとは考え難い。そこで、本研究ではリガンドではなくMSHの受容体(MCR)構造に着目し、無脊椎動物のゲノムデータベースからMSH受容体様遺伝子(MCRL)の探索およびそのクローニングと機能解析を試みた。

3. 研究の方法

無脊椎動物候補受容体遺伝子の同定
カキとナメクジウオのゲノムデータベースから、哺乳類MCRに類似の受容体候補を検索した。ナメクジウオ全身および黒色素胞の沈着が多く認められるカキの外殻膜から合

成したcDNAを鋳型に候補遺伝子のクローニングを試みた。全翻訳領域をクローニングした受容体に関しては、Flag-Tagを付加した後に、哺乳類培養細胞用発現ベクターを構築した。このベクターをヒト腎臓由来培養細胞(HEK293T細胞)に一過性に強制発現させ、硬骨魚類MSH類(MSHおよびDes-AC-alpha-MSH)を用いた薬理学的手法により、応答性を調べた。

哺乳類のMCRは共通して、セカンドメッセンジャーとして細胞内サイクリックAMP濃度を上昇させる。そこで、硬骨魚類MSH魚類型MSH類(N末端がアセチル化修飾された物とされていない物が存在するため、これら2種)を用いて、cAMPアッセイ(ユーロピウムアッセイ系)を行い、cAMP亢進能を解析した。また、受容体と培養細胞がヘテロガスな系であること、GPCRのGタンパク質共役能が進化の過程で変化することを考慮し、蛍光プレートリーダーを用いたリアルタイム細胞内Ca²⁺濃度変動アッセイを行った。加えて、生物種において特殊化が進んだGPCRサブタイプが存在する場合があり、上述した一般的な細胞内シグナルを検出する手法では応答が認められない例もある。そこで、リガンドが結合した後に細胞膜上から受容体が細胞内へ移行する受容体インターナリゼーション現象を解析した。受容体インターナリゼーションは、リガンドが受容体に結合した事および受容体が機能的である事の指標となる。具体的には、リガンド添加の有無に応じて細胞における受容体局在の変化(細胞膜上または細胞質内)をFlag-tagに対する抗体を用いた蛍光免疫化学染色により検出した。

4. 研究成果

無脊椎動物のゲノムデータベースから、脊椎動物(ヒト、ゼブラフィッシュ)のMCRサブタイプに最も高い相同性を示す哺乳類型受容体をカキ(Oy-MCRLa, Oy-MCRLb, Oy-MCRLc, Oy-MCRLd)およびカタユウレイボヤ(Ci-MCRL)から見出した。そこで、複数の候補を見出したカキからMCRLのクローニングを試みた。鋳型には、黒色素が多く認められる外殻膜由来cDNAを使用した。その結果、Oy-MCRLb(全翻訳領域の82.7%にあたる1040bp)、Oy-MCRLc(全翻訳領域の61.1%にあたる939bp)の部分配列およびOy-MCRLdの全翻訳領域(1152bp 384残基)を決定した。そこで、Oy-MCRLdが脊椎動物MCRの対応遺伝子(オルソログ)であるかを明らかにするために、Oy-MCRLdにFlagタグを付加した発現ベクターをHEK293T細胞に強制発現させ、受容体の機能解析を行った。脊椎動物のMCRサブタイプは全てGs共役であり、cAMP濃度を上昇させる。その共通性を基に魚類MSHで刺激したが、cAMP濃度の上昇は認められなかった。次に、進化の過程で、Gタンパク質選択性が変化している可能性を考慮し、細胞内Ca²⁺動員能測定も

行ったが同じく活性は見られなかった。この際、Oy-MCRLd が他の哺乳類型 GPCR である可能性を考え、カエルメラニン凝集ホルモンとラットソマトスタチン 14 添加も実施したが、反応は検出されなかった。そこで、Oy-MCRLd は MCR の一般的な細胞内シグナル以外の分子が活性化されている可能性を想定し、GPCR にリガンドが結合した後に細胞膜上の GPCR が細胞内に引き込まれる現象である、受容体インターナリゼーションの解析を行った。その結果、魚類 MSH 刺激により、細胞膜上の受容体が減衰し、細胞内に顆粒状の受容体が認められた。加えて、MSH よりも MCR に対して親和性が低いとされる Ac 基を持たない Des-AC- α -MSH では、その顆粒状受容体が認められる傾向がさらに減少した。以上より、更なる追加実験が必要であるが、Oy-MCRLd は脊椎動物 MCR のオルソログであり、その細胞内シグナルは独自である可能性が示唆された。本研究成果は、脳下垂体の起源解明の足掛かりとなるものであり、無脊椎動物を含めた MSH システムの包括的な理解につながることを期待される。

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 13 件)

(原著論文)すべて査読有り

1. Kobayashi Y, Takemoto R, Yasmato S, Okda Y, Iijima M, Uematsu H, Chaki S, Saito Y. Depression-resistant phenotype in mice overexpressing regulator of G protein signaling-8 (RGS8) Neuroscience. in press
2. Tomoshige S, Kobayashi Y, Hosoba K, Hamamoto A, Miyamoto T, Saito Y. Cytoskeletal-related regulation in primary cilia shortening mediated via melanin-concentrating hormone receptor 1. General Comp Endocri, 253, 44-52, 2017
3. Kobayashi Y, Hamamoto A, Mizusawa K, Takahashi A, Saito Y. Dimerization of melanocortin receptor 1 (MC1R) and MC5R creates a ligand-dependent signal modulation: Participation in colour changes in the barfin flounder, *Verasper moseri*. General Comp Endocri, 230-231, 103-109, 2016
4. Hamamoto A, Yamato S, Katoh Y, Nakayama K, Yoshimura K, Takeda S, Kobayashi Y, Saito Y. Modulation of primary cilia length by melanin-concentrating hormone receptor 1. Cell Signaling, 28, 572-584, 2016
5. Kobayashi Y, Hamamoto A, Hirayama Y, Saito Y. Molecular cloning, expression, and signaling pathway of four melanin-concentrating hormone receptors from *Xenopus tropicalis*. General Comp Endocri, 212:114-123, 2015
6. Hamamoto A, Kobayashi Y, Saito Y. Identification of amino acids that are selectively involved in Gi/o activation by the rat melanin-concentrating hormone receptor 1. Cellular Signaling, 27, 818-827, 2015
7. Mizusawa K, Sunuma K, Kobayashi Y, Hamamoto A, Kawashima Y, Saito Y, Takahashi A. Involvement of melanin-concentrating hormone 2 in background color adaptation of barfin flounder *Verasper moseri*. General Comp Endocri, 214, 140-148, 2015

(英文総説)すべて査読有り

8. Hamamoto A, Kobayashi Y, Saito Y. Melanin-concentrating hormone receptor 1. Encyclopedia of Signaling Molecules 2nd Edition (Ed. S. Choi), 3075-3082. Springer 2018
9. Nagasaki H, Kobayashi Y, Saito Y. Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART). pp85-87, In: Handbook of Hormones. Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research, Y. Takei, H. Ando, K. Tsutsui (eds.) Elsevier, 2015
10. Nagasaki H, Kobayashi Y, Saito Y. Melanin-concentrating hormone (MCH). pp.80-82, In: Handbook of Hormones. Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research, Y. Takei, H. Ando, K. Tsutsui (eds.) Elsevier, 2015

(日本語総説)

11. 濱本明恵 小林勇喜 斎藤祐見子 MCHR1 の internalization 機構 顕微鏡 51, 13-16, 2016 査読有り
12. 小林勇喜 濱本明恵 斎藤祐見子 ネットイ ツメガエルから同定した 4 種の MCHR サブタイプの網羅的解析 比較内分泌 41, 130-131, 2015 査読有り
13. 濱本明恵 小林勇喜 斎藤祐見子「摂食関連メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) の Gi/o 選択的活性に關与するアミノ酸残基の特定」BioMed サークラス.com 生命科学研究の総合ポータルサイト), 第 32 回掲載, 2015 査読なし http://biomedcircus.com/paper_03_32.html

[学会発表](計 26 件)

1. 岡田智哉, 三木大輔, 小林勇喜, 斎藤祐見子 絶食負荷における MCHR1 陽性 1 次繊毛の局在領域による動態変化 平成 30 年度日本動物学会中国四国支部・広島県例会 2018 年 03 月 8 日 広島大学
2. 三木大輔, 岡田智哉, 小林勇喜, 斎藤祐見子 海馬 CA1 と CA3 領域では MCHR1 陽性 1 次繊毛のリガンド応答性が異なる 平成 30 年度日本動物学会中国四国支部・広島県例会 2018 年 03 月 8 日 広島大学
3. 河淵省吾, 岡田智哉, 三木大輔, 小林勇

- 喜, 斎藤祐見子 脳凍結切片における一次繊毛局在タンパク質検出の基礎検討 平成 30 年度日本動物学会中国四国支部・広島県例会 2018 年 03 月 8 日 広島大学
4. 今門宏輔 友重桜子 小林勇喜 斎藤祐見子 1 次繊毛膜に局在する中枢摂食関連 GPCR を介した新規シグナルの解析 2017 年 12 月 7 日 生命科学学会合同年次会 神戸国際会議場 (神戸)
 5. 三木大輔 岡田智哉 斎藤祐見子 小林勇喜 海馬スライス培養を用いた摂食関連受容体 MCHR1 陽性 1 次繊毛長の評価 2017 年 12 月 7 日 生命科学学会合同年次会 神戸国際会議場 (神戸)
 6. 岡田智哉 大和翔吾 三木大輔 小林勇喜 斎藤祐見子 Immunanalysis of melanin-concentrating hormone receptor 1 located in neuronal primary cilia 第 60 回日本神経化学学会大会 2017 年 9 月 8 日 仙台国際センター (仙台)
 7. 友重桜子 細羽康介 濱本明恵 大和翔吾 宮本達雄 小林勇喜 斎藤祐見子 Metabolic GPCR-mediated primary cilia shortening through dynamic cytoskeletal reorganization 第 60 回日本神経化学学会大会 2017 年 9 月 8 日 仙台国際センター (仙台)
 8. 岡田智哉 大和翔吾 三木大輔 小林勇喜 斎藤祐見子 神経細胞 1 次繊毛膜に局在するメラニン凝集ホルモン受容体 1 (MCHR1) の生理的意義 - 絶食負荷による動態解析 - 第 15 回 GPCR 研究会 2017 年 05 月 12 日 日本科学未来館 (東京)
 9. 友重桜子 細羽康介 濱本明恵 大和翔吾 宮本達雄 小林勇喜 斎藤祐見子 摂食関連受容体 MCHR1 を介した 1 次繊毛縮退メカニズムの解明 第 15 回 GPCR 研究会 2017 年 05 月 12 日 日本科学未来館 (東京)
 10. 友重桜子 細羽康介 濱本明恵 大和翔吾 宮本達雄 小林勇喜 斎藤祐見子 培養細胞系を用いた 1 次繊毛縮退シグナルの解析 平成 29 年度日本動物学会中国四国支部・広島県例会 2017 年 03 月 09 日 広島大学
 11. 岡田智哉 大和翔吾 濱本明恵 小林勇喜 斎藤祐見子 絶食負荷による MCHR1 陽性 1 次繊毛長の変化 平成 29 年度日本動物学会中国四国支部・広島県例会 2017 年 03 月 09 日 広島大学
 12. 三木大輔 大和翔吾 岡田智哉 小林勇喜 斎藤祐見子 海馬 slice culture 及び初代培養を用いた一次繊毛局在型 GPCR の検出 平成 29 年度日本動物学会中国四国支部・広島県例会 2017 年 03 月 09 日 広島大学
 13. 小林勇喜 竹本梨紗 濱本明恵 斎藤祐見子 G タンパク質調節タンパク質 8 (RGS8) 過剰発現マウスは、既存の抗うつ薬経路とは異なる新規経路で抗うつ様表現型を示す 第 41 回日本比較内分泌学会大会 2017 年 12 月 10 日 北里大学相模原キャンパス (神奈川)
 14. Saito Y, Hamamoto A, Tomoshige S, Yamato S, Miyamoto T, Hosoba K, Kobayashi Y. Shortening of primary cilia length by melanin-concentrating hormone receptor 1-Gi/o mediated signaling. The 28th CDB Meeting, Cilia and Centrosomes 2016 年 11 月 28 日 CDB (兵庫)
 15. Saito Y, Hamamoto A, Yamoto S, Kobayashi Y. Melanin-concentrating hormone-mediated signaling induces cilium shortening via Gi/o-dependent Akt phosphorylation. Society for Neuroscience 2016 2016 年 11 月 12 日 San Diego
 16. 小林勇喜 竹本梨紗 大和翔吾 濱本明恵 斎藤祐見子 RGS8tg マウスは MCHR1 シグナルの抑制を介して抗うつ様表現型を示す 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会合同学会 2016 年 09 月 08 日 福岡国際会議場
 17. 濱本明恵 大和翔吾 小林勇喜 児島将康 斎藤祐見子 摂食・情動関連受容体 MCHR1 を介した 1 次繊毛縮退機構 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会合同学会 2016 年 09 月 08 日 福岡国際会議場
 18. 友重桜子 濱本明恵 大和翔吾 小林勇喜 斎藤祐見子 摂食ホルモン MCH は細胞のアンテナ 1 次繊毛の長さを短くする - モデル細胞を用いた解析 2016 生物系三学会中国四国支部大会 2016 年 05 月 14 日 米子コンベンションセンター「ビッグシップ」(鳥取)
 19. 岡田智哉 大和翔吾 濱本明恵 小林勇喜 斎藤祐見子 神経細胞における 1 次繊毛局在型 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 検出法の確立 2016 生物系三学会中国四国支部大会 2016 年 05 月 14 日 米子コンベンションセンター「ビッグシップ」(鳥取)

20. 濱本明恵 大和翔吾 小林勇喜 斎藤祐見子 メラニン凝集ホルモン受容体 1 による一次繊毛縮退及びその分子機構 第 14 回 GPCR 研究会 2016 年 05 月 13 日 日本科学未来館 (東京)
21. 斎藤祐見子 濱本明恵 大和翔吾 小林勇喜 1 次繊毛局在型受容体 MCHR1 の作用とシグナル解析 繊毛研究会 2015 年 11 月 13 日 基礎細胞生物学研究所 (愛知)
22. 大和翔吾 濱本明恵 小林勇喜 斎藤祐見子 Melanin-concentrating hormone-mediated signaling induces reduction of the primary cilium length. 第 56 回日本神経化学会 会長招聘講演 2015 年 9 月 12 日 大宮 (埼玉)
23. 蜜山聖夏 濱本明恵 小林勇喜 斎藤祐見子 Functional characterization of the phosphorylation sites of rat melanin-concentrating hormone receptor 1. 第 56 回日本神経化学会 会長招聘講演 2015 年 9 月 12 日 大宮 (埼玉)
24. 濱本明恵 大和翔吾 小林勇喜 斎藤祐見子 メラニン凝集ホルモン受容体 1 を介した一次繊毛「縮退」機構の解析 第 88 回日本生化学会 12 月 2 日 神戸
25. 徳丸雄一 小林勇喜 濱本明恵 斎藤祐見子 ボンベシン様ペプチド受容体 BRS-3 の活性化機構 第 13 回 GPCR 研究会 2015 年 05 月 16 日 日本科学未来館(東京)
26. 大和翔吾 濱本明恵 小林勇喜 斎藤祐見子 メラニン凝集ホルモンは 1 次繊毛縮退を誘発する 第 13 回 GPCR 研究会 2015 年 05 月 16 日 日本科学未来館(東京)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/yumist/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 勇喜 (KOBAYASHI YUKI)
 広島大学・総合科学研究科・助教
 研究者番号：80736421

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()