

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08055

研究課題名(和文) 鳥類視床下部因子によるプロラクチン細胞分化および機能制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of hypothalamic factors for prolactin cell differentiation and function.

研究代表者

神作 宜男 (Kansaku, Norio)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60333142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では鳥類、中でも家禽として最も飼育されている鶏におけるプロラクチン(PRL)細胞の分化機構を下垂体における遺伝子発現と視床下部ペプチドに遺伝子発現の両面から最新のRNAseqによる解析を行なった。その結果、プロラクチンの生理的放出因子である小腸血管作用ペプチド(VIP)の発現は発生胚後期16日より20日にかけて1.7倍に増加するが、下垂体におけるPRLの発現量変化(14日から20日へは600倍)とは大きなギャップがあることが示された。このギャップはVIP自身が下垂体でも発現し、発生後期において増加することとVIPの2種類の受容体が増加することによって引き起こされていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は地鶏や地域特産鶏において認められることが多い抱卵行動を制御するPRLに焦点を絞り、発生期におけるPRL細胞分化の機構を明らかにし、繁殖期における抱卵行動制御に繋がる研究成果をもたらすことを念頭に行われた。これまでに抱卵行動は主として視床下部にVIPの発現増加が引き金となり行動が誘起され産卵がストップすることが知られていたが、本研究により発生胚では視床下部因子の存在とは関係なくPRL遺伝子の発現増加は引き起こされることが示された。その結果、視床下部制御とは無関係な発現制御機構があることが示されたことから、初期の段階で発現増加を阻止することで繁殖期においても適応できる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：This study clearly demonstrate the relationship between hypothalamic Prolactin(PRL) releasing factor(VIP) and PRL mRNA expression in the anterior pituitary gland of chick embryo. Increase of hypothalamic VIP mRNA expression was observed between days 16 of embryo and days 20 of embryo. However, increase of PRL mRNA expression was observed between days 14 and days 16 of embryo. Interestingly, significant increase of VIP type 1 receptor mRNA expression was detected between days 14 and 20 of embryo. Thus, increase of PRL mRNA expression partially related to increase of hypothalamic VIP mRNA expression and pituitary VIP type1 receptor mRNA expression in the anterior pituitary gland of chick embryo.

研究分野：鳥類繁殖学

キーワード：下垂体 プロラクチン 抱卵行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の下垂体において合成分泌されるプロラクチン(PRL)は魚類から哺乳類に至るまで存在する、進化学的に非常に古いホルモンである。鳥類における PRL の作用として繁殖行動、中でも就巢行動の誘起、維持は古くから知られており、PRL あるいは PRL の生理的放出因子に対する抗体を注射すると就巢行動の中断あるいは停止が認められる (Sharp et al, 1989)。就巢行動の発現はニワトリやシチメンチョウをはじめとする卵用家禽における産卵率の低下を意味することもあり、産業的には望ましくない形質であり、古くから就巢性の除去あるいは除去個体の選抜が試みられてきた。しかしながら、PRL 遺伝子の解析はほ乳類における PRL 遺伝子の発現機構が基本モデルと見なされて研究が進められたことから、鳥類における遺伝子発現調節機構の解析はほ乳類の報告に大きく遅れた (Kurima et al 1998, Ohkubo et al 2000, Kansaku et al 2005)。これまでに明らかにされた事は哺乳類と比べて多くはなく、家禽の生産の面から詳細な PRL 遺伝子発現調節機構の解明が強く求められている。鳥類 PRL の研究はニワトリやシチメンチョウ生産が盛んな国で活発に取り組みられており、現在でも就巢性の除去という点では PRL の研究は未だ進歩し続けている、古くて新しい研究テーマである。

PRL の遺伝子発現に関する研究はほ乳類からはじまり、下垂体において特異的に発現する転写因子 Pit-1 が PRL の遺伝子発現に重要であると言われてきた。鳥類 PRL 制御領域では Pit-1 の結合が確認されているが、Weatherly ら(2001)は放出因子である小腸血管性作用ペプチド(VIP)による刺激により遺伝子発現に非常に大きな影響を与える領域(VRE)を報告している。VRE には VIP 刺激によって未同定の核内タンパク質が結合することで遺伝子発現が活性化することが確認されている。また、VRE は鳥類の PRL プロモーターに強く保存されていることも判明している (Kansaku et al, 2008, Hiyama et al, 2009)。申請者は Fliss ら(1999)が報告しているプロラクチン制御領域結合タンパク質(PREB)の結合するコンセンサス配列と VRE に高い相同性が見られることから、VRE に結合する転写因子の候補として PREB を考え、ニワトリ及びシチメンチョウ PREB のクローニングを行った (Hiyama et al., 2015, 2016)。ニワトリでは PREB は発生胚及び繁殖周期において PRL と類似した変動を示すことを明らかにしている。さらに VIP 刺激により PREB の遺伝子発現が PRL と共に発生胚、産卵鶏ともに誘起されることが示されている (Kansaku et al, 2016)。

申請者らが取り組み明らかにした報告から、視床下部ペプチドが発生胚下垂体あるいは繁殖周期下垂体の PRL 細胞における PRL 遺伝子発現と PRL 分泌に深く関わっていることが明らかである。しかしながら、*in vivo*、*in vitro* ともに VIP による発現誘導には限界があるため、その他の視床下部ペプチドも関与しているか可能性が高いが詳細は明らかにされていない。また、発生胚においても繁殖周期と同様に VIP が PRL 合成や分泌を制御している可能性が示唆されているが、詳しくは解明されていない。さらに正中隆起から下垂体門脈への VIP 放出に関しても発生胚あるいは繁殖周期で神経末端が形態的变化を伴うのかも強く解明が望まれている。

2. 研究の目的

細胞分化あるいは視床下部ペプチド VIP が発生胚下垂体あるいは繁殖周期下垂体の PRL 細胞における PRL 遺伝子発現と PRL 分泌に深く関わっていることが明らかである。実際、VIP の受動免疫や能動免疫などにより産卵が継続あるいは産卵数の増加が認められることから就巢行動の人為的制御の達成のためには VIP による支配の明確化と VIP の発現制御機構の解明は避けて通れない問題である。また、基礎的な機構が備わる発生期中でも急激な PRL の増加が認められる発生胚後期における VIP と PRL の関係を明確にすることは不可欠である。

これまでの研究な報告により VIP が PRL 細胞における PRL 遺伝子発現と PRL 分泌に深く関わっていることが明らかであるが、量的なものは判明しているが分泌された分子に関しての質的な解析は行われておらず、生体中に分泌されるアイソフォームの検証が必要である。しかしながら、*in vivo*、*in vitro* ともに VIP により分泌された PRL 分子の同定と機能も詳細は明らかにされていない。また、等電点が異なるアイソフォームについても下垂体中に含まれるアイソフォームが生体内で全て分泌されているのかも不明である。繁殖周期および発生胚の下垂体を用

いて VIP による分泌誘導路のアイソフォーム比率の同定を目的とした。また、発生胚においては PRL 細胞の分化や PRL 合成と分泌に関わっていると予測されているが、視床下部の VIP と下垂体の PRL に関する量的変化を定量化された報告はなく、明確な関係の解明が望まれている。これらの点から本研究では 1) 繁殖周期中の下垂体の VIP に対する反応性と分泌物の分子同定 2) 発生胚後期における下垂体の VIP 反応性 3) 発生胚視床下部と下垂体 RNA を用いた RNAseq により PCR に基づかない定量、これらにより VIP と PRL の関係を定量定性することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 繁殖周期中の下垂体の VIP に対する反応性と分泌物の分子同定

就巢性を有する烏骨鶏を 14 時間明期 10 時間暗期の光周期で飼育し、繁殖周期を最低 3 回烏骨鶏に体験させた。その結果、就巢行動発現直前の時期を見定められる個体を就巢直前期の下垂体採取用として設定し、その他の烏骨鶏より非産卵期、産卵期、産卵後期、抱卵期として下垂体を採取した。それぞれの下垂体は M199 による 30 分の前培養後に 100nM の VIP 存在下で器官培養を 60 分行った。培養液を用いて 1 次元、2 次元の PRL に関するウェスタンブロット解析を行った。

2) 発生胚後期における下垂体の VIP 反応性

種卵を購入し孵卵器において 37.5 度で胚の発生を誘導し、14 日より毎日常下垂体の採取を行った。採取後にプールした下垂体は M199 による 30 分の前培養後に 100nM の VIP 存在下で器官培養を 60 分行った。その後培養液を濃縮し、1 次元、2 次元の PRL に関するウェスタンブロット解析を行った。

3) 発生胚視床下部と下垂体 RNA を用いた RNAseq

発生胚 14 日、16 日、20 日の下垂体および視床下部の RNA を抽出し、ライブラリーを合成語に RNAseq 解析を行った。mRNA の長さを考慮して補正した数値を検出された全ての遺伝子に対して算出し、発現量定量を行い、14 日かあ 16 日、14 日から 20 日あるいは 16 日から 20 日の数値間で増加が認められる遺伝子の中で機能的に PRL と関連する遺伝子群の定量数値化を。

4. 研究成果

1) 繁殖周期中の下垂体の VIP に対する反応性と分泌物の分子同定

VIP に対する産卵期、産卵期、産卵後期、抱卵期の下垂体の反応性を検証した結果、分泌された PRL は概ね下垂体中の PRL 含量と比率は似ていたが、産卵期と産卵後期（抱卵直前）では下垂体中の含量には大きな差はないものの分泌された PRL 量は産卵期と抱卵期の半ばを示し、VIP に対する反応性が増加していることが示された。分泌された PRL を抗チロシンリン酸化抗体を用いて解析を行ったがシグナルは認められなかった。したがって分泌された PRL 分子の中にチロシン残基が硫酸化されたアイソフォームはないと考えられた。また、二次元電気泳動後のウェスタンブロットでは下垂体中の PRL とほぼ類似した分子種が検出されたが、完全な一致ではなく、最も濃いドットは下垂体中のものより分泌された分子の方は等電点がやや高いことが示された。この結果は生体内に分泌されるアイソフォームは必ずしも下垂体中の比率を反映していないことを意味していると考えられた。

2) 発生胚後期における下垂体の VIP 反応性

発生胚 14 日から 18 日までの下垂体を用いた培養実験では VIP による PRL の分泌誘導は示されなかった。19 日および 20 日胚の下垂体からは PRL の分泌が認められた。興味深いことに、下垂体の PRL は 17 日より 18 日にかけて増加していることが示された。この結果より 18 日には VIP に対する受容体は多く存在していないことが示され、発生胚後期の PRL 合成増加は VIP による合成制御ではない、しかし分泌は VIP 制御であることが示唆された。また、二次元電気泳動後のウェスタンブロットでは 19 日および 20 日の下垂体から分泌された PRL は繁殖期において分泌されたアイソフォームとほぼ一致した。このことより孵化直前の PRL は分子としても成体の PRL 分子と同じであり、分泌制御機構も同じであることが示された。

3) 発生胚視床下部と下垂体 RNA を用いた RNAseq

発生胚 14 日、16 日、20 日の下垂体および視床下部の RNA を抽出し、解析した結果 PRL 遺伝子の発現は 14 日から 16 日の段階で優位に増加していることが示された。一方、視床下部における VIP と下垂体における VIP 受容体の発現変動は見られなかった。また 16 日より 20 日への変動変化では視床下部における VIP の変動も、下垂体における PRL と VIP 受容体の変動も優位に増加した。このことから実験 2) で示されたように 16 日までの PRL 合成の増加は視床下部とは無関係であることが示された。また、16 日から 20 日にかけては VIP 受容体の合成量増加は 19 日にタンパク質としての受容体が完成される時期、18 日あるいは 18.5 日くらいに増加すると考えられた。さらに、発現量は多くはないものの下垂体における VIP 発現も増加することが示され、発生胚後期、孵化直前の時期の PRL 分泌には下垂体で合成される VIP も部分的に関与している可能性が示された。

総括

本研究により下垂体における PRL 細胞の分化は合成が増加することが 14 日から 16 日にかけて示された。これを裏付けるようにウェスタンブロットでは下垂体中の PRL は 14 日ではほとんど検出されないが、16 日胚の下垂体では弱いながらも検出されていることを反映している。つまり、視床下部が関与していない段階で PRL 細胞における PRL の合成は増加していることから未知の因子が関与している可能性が示され、発現量増加に関わる因子は 14 日より前の段階で存在している可能性が高いことが示唆された。一方、PRL 細胞の機能性獲得時期として VIP による合成と分泌の制御が完全になる 19 日であると言えることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神作宜男・中村絵美・小須田彩・副島実弥子・田中智夫・桑山岳人・河野友宏
2. 発表標題 烏骨鶏の抱卵行動発現に関する行動解析
3. 学会等名 日本家禽学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神作宜男、戸張靖子、笹浪知宏
2. 発表標題 ニワトリ発生胚下垂体におけるプロラクチン分子検出
3. 学会等名 日本家禽学会春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----