

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570052  
 研究課題名（和文） ミルクスタシスを制御するローカルモノアミンネットワーク

研究課題名（英文） Milkstasis regulated by mammary monoamine signalling

## 研究代表者

松田 学（MATSUDA MANABU）  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
 研究者番号：30282726

研究成果の概要：泌乳現象は、哺乳類の繁殖に重要なだけでなく、生物に広く用いられる分泌という生理現象の良いモデルとなる。本研究は、乳腺自体が合成しているモノアミンが泌乳分泌の調節に重要なはたらきをもっていることを明らかにした。とくに、ヒスタミン合成酵素を欠く乳腺は十分に泌乳すること無く産仔を死なせてしまうことがわかった。このほか、乳腺にはモノアミン合成に関わると思われる機能未知の酵素で、ユニークな発現調節がおこなわれる酵素 Mox が存在することが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：泌乳制御、モノアミン、乳腺、ヒスタミン、セロトニン、タンパク質合成

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 泌乳調節のしくみ

多産なマウスでは2-3週間のうちに、母体の数倍に及ぶバイオマスを新たに造り上げる。哺乳動物の生殖戦略のうえで斯くも大きな投資である泌乳という現象は、乳腺の発生・生理とそれを支える全身的な変化（ホメオレシス）という精密な遺伝子プログラムにより保障されていると考えられる。このプログラムは、脳-脳下垂体系によって制御されるシステミックシグナルという云わばマクロプログラムが、乳腺にもともと内在する半

自律的な泌乳制御プログラムのスイッチを入れる形で組まれている。このうち、前者については、脳下垂体や卵巣由来のホルモンによる泌乳制御機構など多くのことが、私も参画したこれまでの研究により明らかにされてきた<sup>1-3</sup>。一方、後者、即ちこれら外部からの刺激情報に応じて作動する乳腺内プログラムは、いまだ断片的な知識しか得られていない。このことは、遺伝子改変動物の解析から散発的に重要な因子が明らかになってきた昨今の情勢からも伺い知れる<sup>4, 5</sup>。さらに、エンドセリンやレプチンの発見にみるよ

うに、すべての器官は内分泌器官としての顔を持ち、双方向の情報のやりとりをしていることを考えると、乳腺からのフィードバック／フィードフォワード機能を担う乳腺由来物質（マンモカイン）の存在も期待される。私は、乳腺内および乳腺からの情報を担う物質の同定に興味を持ち、その候補として、システミックホルモンのひとつであるプロラクチンにより発現が誘導される乳腺遺伝子を独自の方法により探索した。その結果、乳腺が脳腸に匹敵する巨大なモノアミン産生器官であり、モノアミンが乳腺の半自律的な分泌制御プログラムを担っているのではないかという仮説を着想し、本研究で検証することとした。

### (2) 乳腺のモノアミン

モノアミンの中樞や腸などにおける作用の研究は枚挙に暇が無い。しかし、乳腺内でのモノアミン作用の研究は、本申請者らの研究を除いては、ほとんど見当たらない。無論、過去にもカテコールアミンの泌乳に対する影響などが調べられた報告はあるが、それらは全て神経もしくは血液由来の生理活性物質を想定した実験、あるいは生理条件からはかけ離れた薬理的な実験である。唯一、ヒスタミンに関しては、合成酵素と受容体の存在から、乳腺における自己傍分泌によるネットワークの存在が示唆されているが、組織学的観察に終始し、生理的に機能していることを実験的に検証したのではない<sup>6, 7</sup>。私は、モノアミン類の生合成酵素である末梢型トリプトファン水酸化酵素 (TPH1) が乳腺上皮で発現していることを発見し、これを端緒に、乳腺局所で産生されたセロトニンが、乳汁分泌の負のフィードバックを担う制御因子として重要な働きをしていることを世界に先駆けて明らかにしてきた<sup>8</sup>。しかし、この作用は、複雑系を構成する乳腺モノアミンシステムのほんの一面の作用であろうと思われる。他方、乳腺以外の分泌腺に眼を向ければ、セロトニンはハーダー氏腺や両生類・魚類の一部の皮膚腺でも組織学的に産生が確認され<sup>9</sup>、これらの器官でもモノアミンが分泌制御に働いているものと考えられる。このことは、乳腺研究が、他の外分泌腺の分泌制御の理解に結びつくことを十分に期待させるものである。

### (3) 乳腺とヒスタミン

乳腺ではたらくモノアミンはセロトニンだけとは限らない。実際、上述したように、ヒスタミンも泌乳制御に関わる重要な因子の候補である。しかし、そのことを示す確証は得られていなかった。そこで私は、ヒスタミン合成酵素欠損 (HDC-KO) マウスの表現型に着目した。東北大学工学部の大津浩博士が確立した HDC ノックアウトマウスでは、ヒスタミン欠乏による様々な症状が認められる

が、産仔の致死率が非常に高い (氏からの私信)。産仔の死亡の原因は解析されておらず、ヒスタミン欠乏に起因して生じる仔の代謝異常による発達障害もしくは母個体の行動異常による育児放棄が原因ではないかと考えられていた。しかし私は、HDC-KO の母親の泌乳異常が原因かもしれないという仮説を着想し、いくつかのパイロット実験を行なった結果もその整合性が支持されたため、本研究において検証を試みた。

### (4) モノアミンモノオキシゲナーゼ X

乳腺の機能制御には、さらに別のモノアミンも参画しているかもしれない。私は、前述したプロラクチン依存的に発現する乳腺遺伝子の解析において、ノルアドレナリン合成酵素であるドーパミンβ水酸化酵素 (DBH/DBHa) のファミリーに属するモノアミンモノオキシゲナーゼ X (Mox/DBHc) のひとつをコードする *moxd1* の mRNA が乳腺上皮で発現していることを見出した。*moxd1* 産物は、近年、フェニアラニンモノオキシゲナーゼの解析で著名な Johns Hopkins University の B. A. Eipper 博士らのグループによって、唾腺における生化学的解析が報告されたものの<sup>10</sup>、それが DBH 活性を持つか否かをはじめ、機能がほとんど未解明の酵素遺伝子である。この酵素とともに、カテコールアミン合成に関わる諸酵素の乳腺における発現については、私の過去の研究で調べられたものの、*moxd1* の機能が未解明な故に、その解釈ができないといった状況であった。そこで本研究では、*moxd1* の機能理解に向けた研究を展開させることにした。

### (5) 参考文献

- ①Matsuda et al. (1994) *Eur. J. Endocrinol.*, 130(2):187-194.
- ②Matsuda et al. (1996) *Exp. Biol. Med.* 212(3):243-247.
- ③Bauman DE. and Currie WB. (1980) *J Dairy Sci.*, 63(9):1514-1529.
- ④ Fata JE., et al. (2000) *Cell*, 103(1):41-50.
- ⑤ Wysolmerski JJ., et al. (1998) *Development*, 125(7):1285-1294.
- ⑥Wagner W., et al. (2003) *J. Physiol. Pharmacol.*, 54(2):211-223.
- ⑦Matsuda M., et al. (2004) *Dev. Cell*, 6(2):193-203.
- ⑧ Maslinski C., et al. (1993) *Comp. Biochem. Physiol. C*, 105(2):269-273.
- ⑨Fasulo S., et al. (1993) *Arch Histol. Cytol.*, 56(2):117-125.
- ⑩Xin X., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(46):48159-48167.

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、乳腺生理および泌乳調節

(ミルクスタシス)の制御に、乳腺自体がつくるモノアミンが重要なはたらきを担っているということ为例示することを通して、末梢モノアミン研究の未開拓分野を切り拓くための礎を築くことである。そのための手段として、HDC-KO ヒスタミン欠乏マウスで産仔致死率が高いことの原因および機構を解明すること、および、乳腺においてプロラクチン依存性発現を示す遺伝子の産物である未解析酵素 Mox タンパク質の機能を明らかにすること、を目標に設定した。

### 3. 研究の方法

#### (1) HDC-KOの授乳行動と乳腺の解析

①実験動物 大津らが作成した HDC-KO マウスおよびその戻し交配系統である C57BL/6 系統のマウスを使用した。HDC 遺伝子座の遺伝子型の同定は、PCR 法で行なった。一部、ICR 系統マウスを用いた。

②哺育行動の観察 産後 2~3 日または 5~7 日目の個体を小型赤外線カメラ (SEC-410) および PixeDV で撮影・記録した。母個体が仔に覆いかぶさるクローチング行動を指標として、授乳時間を測定した。

③搾乳刺激 出産後 3~7 日経過した哺育中の雌から仔を隔離した。4 時間後、再び仔を戻し搾乳させ、20 分後頸動脈より採血した。

④乳腺組織標本 搾乳刺激後に屠殺したマウスから第 4 乳腺を摘出した。カルノア氏液で固定した乳腺を、カルミンアルミニウム液を用いて染色し、ホルマウント標本とした。また、ホルマリン固定した Paraplast<sup>TM</sup> plus 包埋の 4 オム切片を、HE 染色した。観察は、実体顕微鏡 (Olympus SZX12) および光学顕微鏡 (Olympus BX40) にて行ない、デジタルカメラ (DP12) で撮影した。

⑤ホルモン濃度測定 EDTA 血漿中のオキシトシン濃度を EIA 法で測定した。血清中プロラクチン濃度は Harbor-UCLA Medical Center (California, USA) に委託し、ヤギ抗ラットプロラクチン抗体とマウスプロラクチンを用いた競合 RIA 法で測定した。

⑥免疫組織化学染色 乳腺の組織切片において、マウスモノクローナル抗マウス平滑筋アクチン抗体 (Progen, 1:2000) を用いた間接法 (SAV 法) にて検出し DAB を発色基質に検出した。

⑦ヒスタミン受容体阻害 産後 2 から 3 日目の、10 頭の産仔とともに単独で飼育した雌の ICR 系統に、pyrilamine (H1 受容体アンタゴニスト) 20 mg/kg 体重, cimetidine (H2 受容体アンタゴニスト) 20 mg/kg 体重, および thioperamide (H3 受容体アンタゴニスト) 10 mg/kg 体重の混合液, あるいはコントロールとして溶媒として用いた生理食塩水を 6,10,14,18,22 時に腹腔内へ投与し、24 時に

第四乳腺の一部を摘出した。また、生後 5 日目からそれらアンタゴニストを腹腔へ単回投与し、その後 5 時間の育児行動を撮影・観察した。なお、マウスは実験開始一週間前より、腹腔内投与等の操作に慣れさせた。

⑧統計処理 Student's t-test を用いて平均値の有意差の判定を行なった。ホルモン濃度は Mann-Whitney's U test で有意検定を行った (有意水準 5%)。

#### (2) moxd の機能解析

①Mox と DBH および変異体の発現コンストラクトの作成 C57B/6 マウス dbh, moxd1, moxd2 遺伝子由来の cDNA のシグナルペプチド下流領域を、pMT BiP\_V5His\_A ベクターに組み込み、各遺伝子産物の C 末に V5 エピトープタグがついた融合タンパク質が小胞体に発現するようにプラスミドを作成した。また、DBHa (DBH) と DBHc (moxd1) の活性中心に位置する銅イオン結合に関与するヒスチジン残基を他のアミノ酸に置換した水酸化酵素活性欠失 DN 体を、置換配列を含むプライマーを用いた PCR 法により作成した。次に、DBHa と DBHc の、3 つのドメイン (DoMON, Cu<sup>2+</sup>-monooxygenase, および C 末ドメイン) のヒンジ領域に制限酵素サイトを導入し、両者のキメラ分子 (AAC, ACA など) を作成した。また、C 末ドメインを 3 つに細分化し、キメラ体 (Aaacc など) を作成した。さらに、DBHc に関しその最 C 末部を 3 分割し欠失変異を導入した ( $\Delta$  1,2,3)。この  $\Delta$  2 の欠失領域にあたる疎水性  $\beta$  シート領域およびその周辺領域を GFP の C 末に付加した融合タンパクの発現コンストラクトも作成した。

②S2 細胞の培養とタンパク質の誘導発現 S2 細胞をシュナイダー完全培地中、28°C 下で培養した。1 × 10<sup>6</sup> 細胞/ml の細胞にリン酸カルシウム法によりプラスミド DNA を細胞に導入し、12 時間後に 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> を含む誘導培地に交換し、その 24 時間後に細胞および培地を回収した。安定導入株の作成は、pCoHygro を目的プラスミドとともに細胞に導入し、300 ug/ml のハイグロマイシンを添加した選択培地中で 4 週間培養後、銅イオン添加培地にて 24 時間、発現を誘導した。

③発現タンパク質および mRNA の検出 培養細胞からの抽出タンパクを SDS-PAGE 法により 8% もしくは 12.5% ゲルでサイズ分画したのち、セミドライ法により PVDF 膜に転写した。この PVDF 膜をアルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗 V5 epitope 抗体 (1:2000) を用いた直接法により検出した。また、GFP をウサギ抗 GFP 抗体 (1:2000) と AP 標識抗ウサギ Ig 抗体 (1:5000) を用いた間接法により検出した。AP 活性は、発色試薬 BM purple により検出した。一方、発現コンストラクトに由来する mRNA は、ベクター由来

のシグナルペプチド領域およびC末タグ領域に設計したプライマーを用いた RT-PCR 法により検出した。

④DBH 様活性の測定 DBH 様活性を、チラミンβ水酸化酵素活性 (TBH 活性) を指標に測定した。S2 細胞の 0.2% Triton X-100, 50mM sodium acetate, pH 5 可溶性画分を酵素試料とした。Bradford 法によるタンパク質定量後、TBH 反応液中で反応後、終濃度 PCA により除タンパク後、50 mM sodium acetate (pH5) を移動相とした逆相 HPLC カラム ODS-80Ts (東ソー) により分画し、反応で生成したオクトパミンを 272 nm の吸光により検出し、定量した。

⑤哺乳動物細胞発現系および無細胞発現系 前述のコンストラクトを pcDNA3.1-V5-His ベクターに組み入れ、wheat germ 抽出液およびウサギ網状赤血球溶解液を用いた無細胞転写翻訳系により、タンパク質を合成した。

#### 4. 研究成果

(1) HDC-KO マウスの解析 HDC-KO のヘテロ (+/-) とホモ KO (-/-) 個体との交配実験と仔の体重計測結果から、HDC-KO にみられる成長遅延は、母個体のホモ KO (-/-) 遺伝子由来であることが明らかとなった。HDC ホモ欠損雌の育仔行動を解析した結果、ネグレクトなど哺育を放棄するような行動は認められず、-/-雌のほうが授乳に費やす時間が長いことがわかった。授乳時間が長いにもかかわらず、仔に成長遅延が認められたことから、成長遅延の原因が雌の泌乳異常にあるのではないかと考え、搾乳刺激を与えた後屠殺し摘出した乳腺の形態を観察した。出産後2日目では、-/-個体の乳腺は野生型個体に比べ上皮組織の密度が疎であり、特に小葉と呼ばれる腺房構造が少なかった。さらに、-/-雌の乳腺では上皮細胞中に乳脂肪滴が導管内腔に分泌されずに細胞内に留まっているものと考えられる小滴が数多く認められた。HDC-KO マウスの乳腺は発達過程および泌乳機構に異常があり、そのために仔の成長不良が起こることが示唆された。授乳初期のマウスにおける搾乳刺激後の血中オキシトシン、プロラクチン濃度は-/-雌と+/+雌との間に有意差は認められなかった。HDC-KO マウスにおける乳腺の発達異常や泌乳異常は、搾乳刺激後のホルモン分泌異常によるものではなく、乳腺のホルモン感受性の違いによることが示唆された。また、乳腺の筋上皮細胞を抗マウス平滑筋アクチン抗体による免疫組織化学染色にて観察した限りでは、+/+雌と-/-雌の間に顕著な差は認められなかった。他方、野生型マウスに各種ヒスタミン受容体阻害剤を投与したが、HDC-KO マウスで見られたような行動や泌乳の異常

は認められなかった。むしろ、2型受容体の阻害によりプラロクチン値が上昇し、盛んな乳汁合成が認められた。HDC-KO マウスに認められる泌乳異常は、脳ヒスタミンニューロンの活性低下およびそれに由来するホルモン分泌異常によるものではなく、乳腺自体の HDC 欠損に由来するホルモン感受性の低下が原因であることが示唆された。

(2)moxd の機能解析 マウス DBHa, b, c を S2 細胞に導入して発現を抗 V5 抗体で調べたところ、DBHa タンパク質の発現がみられたが、DBHb, c の発現がみられなかった。一方、後2者の mRNA 発現量は前者に比べ顕著な低値ではなかった。DBHa, c の DN 体を S2 細胞に発現させたところ、酵素活性の有無に関わらず、DBHa タンパク質は発現し、DBHc タンパク質の発現は認められなかった。DBHa, c の3つのドメインを入れ替えたキメラ分子を S2 細胞に導入して発現を調べた。キメラ分子は、DBH\_CCA のように C 末ドメインが DBHa 由来であればタンパク質発現が認められ、DBH\_AAC のように DBHc 由来であれば発現が認められなかった (図1)。

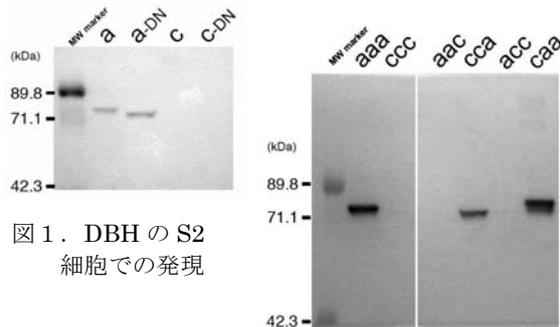


図1. DBH の S2 細胞での発現

さらに、DBH\_AAaac などC末を3分割したキメラでも、最C末による発現効率の決定が明らかとなった。そして、最C末部のうち中部約 1/3 にあたる富ロイシン疎水性部位がその活性領域であることがわかった。このC末部は、GFP の発現も抑制し、タンパク質発現低下を担う必要十分条件を満たすことが示唆された。さらに、点変異コンストラクトの解析から L-595,597,598 の3つの疎水性残基の重要性が示された。また、無細胞発現系でも同様の結果が得られ、翻訳の伸長段階での発現制御が行なわれている可能性が示唆された (図2)。しかし、一方で、このたびの実験に用いた V5 抗体による検出では、近傍の疎水性領域の存否により検出効率に変化するという技術的な発見がされたため、moxd1 の C 末部位が担う発現抑制作用を示す領域の確定には、さらなる検証が必要である。

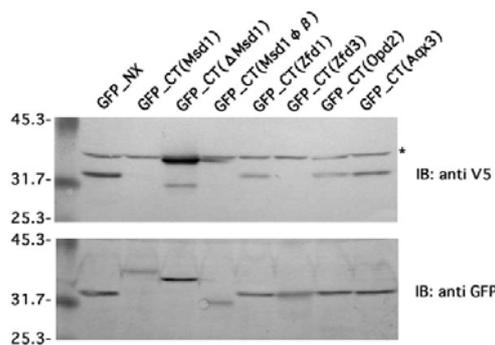


図2. GFP融合タンパクの無細胞系発現

DBHa と DBHc のキメラタンパクに関して、DBH 活性を測定したところ、DBH\_AAaac は DBHa 同様に活性を有するが DBH\_CCcca は DBHc 同様に DBH 様活性をもたないことがわかった。点変異導入によりはじめて発現が可能となったマウス *Moxd1* も、DBH 様活性を示さないことがわかった。以上より、*Moxd1* は DBH とは異なる基質特異性を有し、したがって、乳腺を含む生体において DBH とは異なる機能を担っていることが示唆された

### (3) 今後の展望と新たな課題

本研究を通して、乳腺は、現在の脳・腸におけるモノアミン研究に並ぶべき広大な研究分野を内包しているものと考えが強くなった。本研究は、その未知の研究領域への扉を開くものであり、今後、哺乳類にとどまらず脊椎動物が共有する一群の皮膚腺全般のモノアミン研究に波及し、成果がもたらされるものと期待される。さらに、モノアミン代謝や作用を修飾する薬が多用される現代社会にあって、泌乳という特殊状況下におけるその知られざる局所作用と複合作用の研究も、これを契機に発展するものと期待する。一方、Mox タンパク質の機能は未知のまま残されたが、これまで機能解析の道を阻んでいた発現抑制領域の存在を発見し、その新知見を活かしてモノオキシゲナーゼ活性を保持していると思われる変異タンパク質の発現に成功したことにより、当タンパク質の機能解析に道を開いた点で、本研究は意義をもつ。そして、翻訳伸長段階での発現調節という現象は、動物細胞ではまだ報告の無いはじめての現象であり、今後の研究の発展が期待される新たな課題であるといえる。

## 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 1 件)

① 松田学、西野賢治、大津浩、岡村直道、モノアミンによる泌乳制御-ヒスタミン欠乏マウスの解析から、*The Journal of*

*Reproduction and Development*、53巻、ページ j 60 (2007)、査読無

[学会発表] (計 7 件)

- ①池田香里、松田学、*moxd* タンパク質 C 末端の機能に関する進化的考察、日本動物学会第 60 回関東支部大会、平成 21 年 3 月 20 日、埼玉大学 (埼玉県さいたま市)
- ②松田学、ドーパミン  $\beta$  水酸化酵素ファミリーの C 末ドメインの役割と分子進化、第 33 回日本比較内分泌学会大会、平成 20 年 1 月 6 日、広島大学西条キャンパス (広島県東広島市)
- ③松田学、郡司隆徳、岡村直道、乳腺に発現するドーパミン  $\beta$  水酸化酵素様タンパク質の C 末ドメインの機能、日本動物学会第 79 回大会、平成 20 年 9 月 7 日、福岡大学七隈キャンパス (福岡県福岡市)
- ④郡司隆徳、仁平裕美、松田学、S2 細胞発現系を用いたドーパミン  $\beta$  水酸化酵素 (DBH) 様タンパク質の機能解析、日本動物学会第 60 回関東支部大会、平成 20 年 3 月 2 日、東京大学駒場キャンパス (東京都目黒区)
- ⑤松田学、周生期エストロゲン様物質による生殖毒性内分泌攪乱作用の機構、第 2 回つくば医科学研究交流会、平成 19 年 1 月 10 日、三菱化学つくばクリエーションセンター (茨城県つくば市)
- ⑥松田学、西野賢治、大津浩、岡村直道、モノアミンによる泌乳制御-ヒスタミン欠乏マウスの解析から、第 12 回日本生殖内分泌学会大会、平成 19 年 10 月 19 日、東京大学弥生キャンパス (東京都文京区)
- ⑦松田学、西野賢治、河内沙絵、大津浩、岡村直道、ヒスチジン脱炭酸酵素欠損 (HDC-KO) マウス乳腺のオキシトシン感受性低下、日本動物学会第 78 回大会、平成 19 年 9 月 20 日、弘前大学 (青森県弘前市)

[その他] (計 1 件)

本研究を通して達成された教育実績 3 件：西野賢治「ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子欠損マウスにおける成長不良の研究」平成 19-20 年度、筑波大学大学院フロンティア医科学修士課程／仁平裕美「DBHc タンパク質の生化学的解析」平成 19 年度、筑波大学医学群医療科学類／郡司隆徳「ドーパミン  $\beta$  水酸化酵素 (DBH) ファミリーの機能解析」平成 20 年度、筑波大学医学群医療科学類

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 学 (MATSUDA MANABU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
研究者番号：30282726

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

岡村 直道 (OKAMURA NAOMICHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：30134224

西野 賢治 (NISHINO KENJI)

筑波大学大学院フロンティア医科学修士課程

仁平 裕美 (NIHEI HIROMI)

筑波大学医学群医療科学類

郡司 隆徳 (GUNJI TAKANORI)

筑波大学医学群医療科学類