

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570076

研究課題名（和文）魚類赤・黄色素胞のプロラクチン受容体とそのシグナル伝達機構の
解明研究課題名（英文）Study on the prolactin receptors and there signal transduction in fish
erythrophores and xanthophores.

研究代表者

大島 範子 (OSHIMA NORIKO)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：70057735

研究成果の概要（和文）：下垂体ホルモン、プロラクチン（PRL）が魚類皮膚の赤色素胞、黄色素胞に直接作用して色素顆粒の凝集を引き起こすことを見出したので、本研究では色素胞に存在するプロラクチン受容体（PRLR）のクローニングを行い、哺乳類等で報告されている PRLR1 型と相同であることを明らかにした。そして、その情報伝達は PRLR-Jak2-Grb2-Ras-アデニル酸シクラーゼ-PKA という新規経路によることが新たに見出された。

研究成果の概要（英文）：We found that a pituitary hormone, prolactin (PRL), causes pigment dispersion in fish erythrophores and xanthophores. In the present study, therefore, cloning of PRL receptors in these chromatophores was performed and the receptors were identified as PRLR1 type. It was also suggested that the pigment dispersion by PRL is revealed through a novel signaling pathway, PRLR-Jak2-Grb2-Ras-adenylate cyclase (AC)-PKA pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、動物生理・行動

キーワード：赤色素胞、黄色素胞、プロラクチン受容体、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、下垂体ホルモンであるプロラクチンが多く魚種において迅速な赤・黄色素顆粒拡散作用を持ち、培養色素胞においても同様の効果が認められることを報告した (Oshima et al., 1996)。さらに、ティラピアを野外で飼育して、雄が赤い婚姻色を呈する繁殖のシーズンには鱗の赤・黄色素胞の数が増し、それらの色素胞のプロラクチン感受性が高まることを見出した (Oshima and Nakamura, 1997)。タイリクバラタナゴなど赤い婚姻色が現れる他の

魚種においても同様の結果を得た。そこで、“それでは実際に赤色素胞、黄色素胞にはプロラクチン受容体が存在するのか”、という問題がクローズアップされてきた。それまでの知見では、哺乳類、鳥類などのプロラクチン受容体はサイトカインスーパーファミリーに属する膜1回貫通型で、細胞内ドメインがチロシンキナーゼ Jak2 と相互作用し、順次、Stat タンパク質ファミリーに属する転写因子が活性化するとみなされていた (Horseman, 1997)。しかも、このようなケースではホルモン作用がわずか 10 分程度で

現れることはなく、申請者が国際学会（第13回国際比較内分泌学会、1997）において魚類赤・黄色素胞へのプロラクチンの迅速な効果を発表した時には、多くのプロラクチン研究が驚きを表明したものである。

一方、これまで知られている、色素顆粒運動を制御する1次メッセンジャーの受容体は全て7回膜貫通型で、細胞内情報伝達機構は下図のようであり、膜1回貫通型受容体を介する経路の存在は知られていない。そうした背景下で今回の研究課題が設定された。

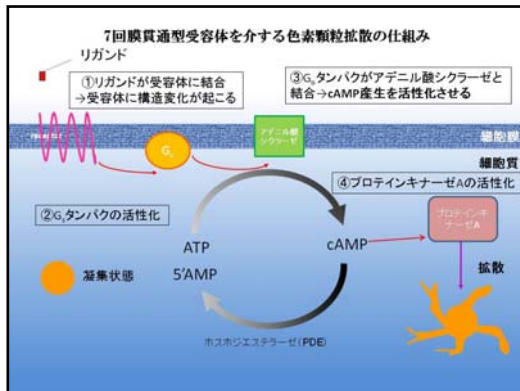


図1 一般に知られている7回膜貫通型受容体を介する細胞内情報伝達経路

2. 研究の目的

プロラクチン受容体が赤・黄色素胞に存在することを実証し、その受容体を介するシグナル伝達経路を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 色素胞の反応ならびに阻害剤の効果：生理的塩類溶液中の鱗標本に PRL 溶液あるいは種々の濃度の各種阻害剤を作用させ、光学顕微鏡で色素胞の反応を観察、デジタルカメラで撮影した。画像解析ソフトにて色素顆粒の分布面積を定量化し、反応性を拡散率の変化として表した。拡散率は、(阻害剤とプロラクチン共存溶液中での色素顆粒分布面積 - プロラクチン投与前の分布面積) / (プロラクチン投与後の色素顆粒分布面積 - プロラクチン投与前の面積) にて算出した。

(2) PRL 受容体のクローニング：黄色素胞や赤色素胞が多く存在するゼブラフィッシュ、ゴールデンバルブの尾鰭から total RNA を抽出し、cDNA を合成後、種々のプライマーの組合せで PCR を行い、その産物を電気泳動してバンドを検出。そのバンドを切り出して精製後、シーケンスを行った。

(3) 精製した活性化 Ras の測定：黄色素胞が多く存在するゼブラフィッシュ背側皮膚からタンパク質を抽出した。Active Ras pull-down detection kit を用いてプロトコルに従って活性化 Ras を精製した。精製サンプルを SDS-PAGE で分離した後、ウエスタンブロットで PVDF 膜に転写し、抗体反応させた。反応後、化学発光にて活性化 Ras のバンドを検出して写真撮影した。

(4) Grb2 のリン酸化の定量：PRL 未処理ならびに種々の時間 PRL 処理されたゼブラフィッシュ背側皮膚サンプルについてタンパク質濃度を測定した。等量のサンプルについて SDS-PAGE、ウエスタンブロットを行い、サンプルを PVDF 膜に転写した。1次抗体として Grb2 モノクローナル抗体、2次抗体としてマウス IgG モノクローナル抗体を利用して転写膜に抗体を反応させ、続いて化学発光法でチロシンリン酸化と Grb2 の量の比を測定した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュの黄色素胞ならびにゴールデンバルブの赤・黄色素胞では、他の魚種同様にプロラクチンで色素顆粒が拡散することが分かった。アデニル酸シクラーゼ (AC) の阻害剤である Li^+ -rich solution、MDL-12 ならびにプロテインキナーゼ A (PKA) の阻害剤 H-89 によって拡散は濃度依存的に阻害されたので、プロラクチンによる赤・黄色素顆粒の拡散は細胞内 cAMP 濃度増加によって起こることが示唆された。

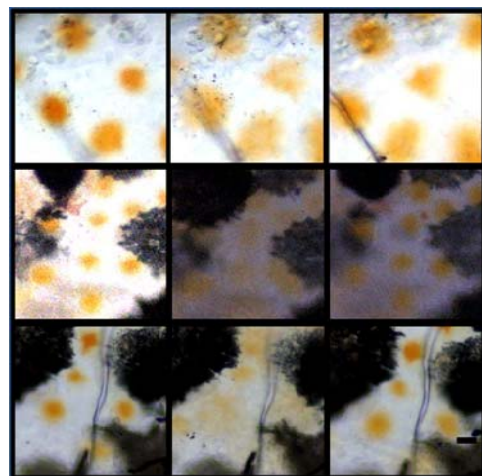


図2 MDL-12による拡散阻害の例
上段：左から生理的塩類溶液中10分、PRL単独投与15分後、PRLと10 μM MDL-12共存溶液投与15分後

中段：左から生理的塩類溶液中 10 分、PRL 単独投与 15 分後、PRL と 50 μ M MDL-12 共存溶液投与 15 分後

下段：左から生理的塩類溶液中 10 分、PRL 単独投与 15 分後、PRL と 100 μ M DL-12 共存溶液投与 15 分後（スケールバー：10 μ m）

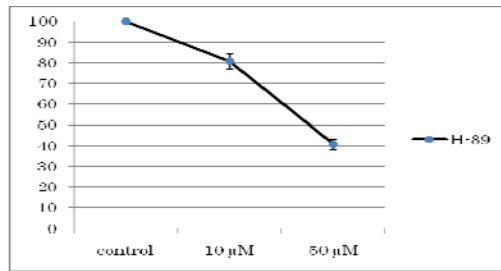


図3 H-89による濃度依存的拡散阻害
(縦軸は色素顆粒の拡散率；%)

(2) ゼブラフィッシュの黄色素胞からプロラクチン受容体のクローニングを行った。翻訳領域の起点から 229-1139 までの塩基配列が明らかになり、PRLR-a に一致した。3' 側の配列の解読は不完全であるが、RACE の反応自体はうまく行われており、その増幅フラグメントのサイズは PRLR-a で予測されるサイズと一致する。従ってゼブラフィッシュの黄色素胞には PRLR-a が発現していると結論した。

(3) ゴールデンバルブの赤・黄色素胞からプロラクチン受容体のクローニングを行った結果、923 塩基、307 アミノ酸を同定することができ、塩基配列の相同性はゼブラフィッシュ PRLR-a と 83%、コイ PRLR-a と 93% であった。アミノ酸配列から、立体構造を形成するのに必要なシステインや、サイトカインスーパーファミリー特有の WS モチーフ、膜貫通ドメインを有していること等が確認された。2) および 3) のクローニングの結果より、魚類の赤・黄色素胞のプロラクチン受容体は PRLR1 型 (PRLR-a もこのタイプに含まれる) に属すると結論した。

(4) PRLR1 型を介する情報伝達は Janus kinase (Jak2) チロシンキナーゼ-STAT pathway を経ており、STAT が核内 DNA と相互作用すると考えられている。しかし、哺乳動物では近年、Jak2 の SH2 ドメインを介して Grb2 のチロシンのリン酸化が起こり、リン酸化された Grb2 が Ras (低分子量 G タンパク質) の活性化を誘起するという、従来とは

異なる経路が報告された (Charles et. al., 2008)。また、酵母において Ras が AC を活性化する経路が報告された (Sarah and Micheal, 2008)。そこで、Jak2 の阻害剤 WP1066、Ras の阻害剤 Sulindac Sulfide の効果を調べたところ、いずれも濃度依存的に PRL による黄色素胞拡散を阻害した。

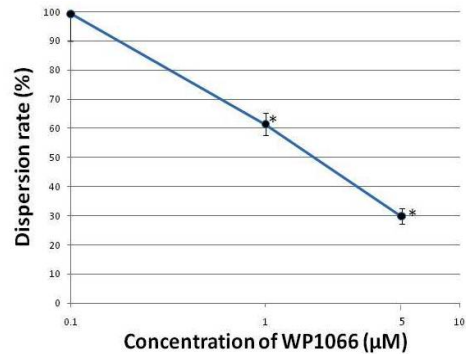


図4 WP1066の濃度依存的な拡散阻害効果

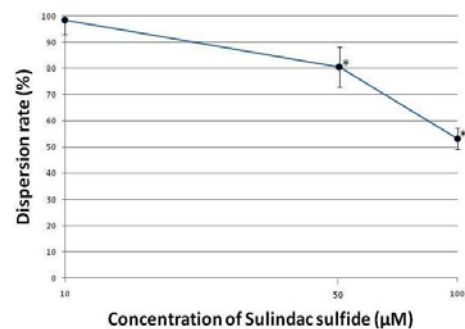


図5 Sulindac Sulfideの拡散阻害効果

(5) 続いて、精製した活性化 Ras の定量化を試みた。PRL で処理された皮膚標本において活性化 Ras のバンドが濃く出ている。



図6 活性化 Ras のバンド:左から PRL 未処理、PRL 処理 2.5、5、10、20 分のサンプル

(6) さらに、Grb2 全量に対してチロシンリン酸化された割合を決定した。PRL 未処理サンプルに比べて、PRL 処理サンプルの方が P-tyr/Grb2 の値が高かった。

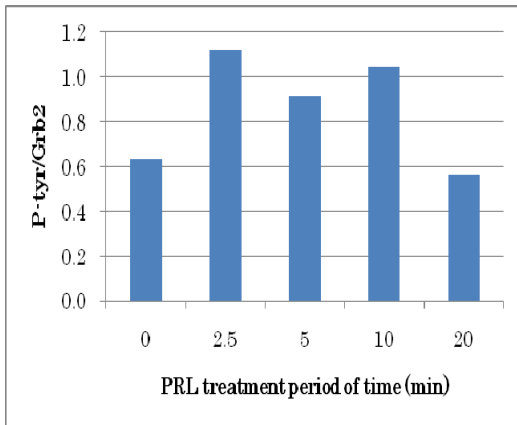


図7 total Grb2 においてリン酸化した割合

(7) 以上の実験結果から、PRL 受容体-Jak2-Grb2-Ras-AC-PKA という PRL 新規シグナル伝達経路を提案する。この伝達経路によって赤・黄色素胞では細胞内 cAMP 濃度上昇が起こり、色素拡散が生じると考えられる。

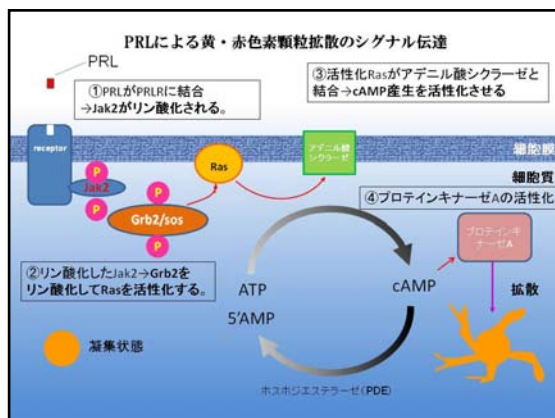


図8 予測される PRL の新規情報伝達経路

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 矢野雄大、西口慶一、大島範子：ゼブラフィッシュ黄色素胞におけるRasを介する新規プロラクチンシグナル伝達機構、日本動物学会 第81回大会、2010年9月23日、東京
- ② 矢野雄大、西口慶一、吉岡享、大島範子：魚類黄色素胞におけるプロラクチン(PRL)のシグナル伝達とPRL受容体の発現、日本動物学会 第80回大会、2009年9月20日、静岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 範子 (OSHIMA NORIKO)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：70057735

(2) 研究分担者

岩室 祥一 (IWAMURO SHOWICHI)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：70221794

(3) 連携研究者

なし