

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570071

研究課題名（和文） 両生類をモデルとした脳下垂体機能調節機構研究の新展開

研究課題名（英文） Development of the pituitary research in terms of regulation of its function in the amphibian as a model

研究代表者

菊山 榮（KIKUYAMA SAKAE）

早稲田大学・教育・総合科学学術院・名誉教授

研究者番号：20063638

研究成果の概要（和文）：両生類では、哺乳類で副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）を放出させるホルモンが甲状腺刺激ホルモン（TSH）の放出を促す主たる因子であることに端を発し、ACTHの分泌調節因子はアルギニンヴァソトシンであり、TSH放出ホルモンのTSH放出作用は微弱で、プロラクチン放出作用が強いことを示した。このような両生類・哺乳類間での違いと、その意義を変態と体温調節現象に関連付けて論じた。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that in amphibians, mammalian homologue of corticotropin-releasing factor (CRF) is the major factor that enhances the release of thyroid-stimulating hormone (TSH) from the pituitary. This prompted us to determine the role of some other hypothalamic factors in terms of regulation of the release of pituitary hormones, focusing on their activities and receptors. Thus, we concluded that arginine vasotocin is the major factor that stimulates the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and that thyrotropin-releasing hormone does not act as a TSH-releasing factor but as a prolactin-releasing factor. The discrepancy in the role of hypothalamic factors between amphibians and mammals is discussed in relation to metamorphosis and thermoregulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：視床下部因子；脳下垂体；両生類；変態；比較内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

脳下垂体のそれぞれのホルモンの分泌調節を司る脳由来の調節因子は数が限られているにも拘らず、脊椎動物間で必ずしも一定の役割を演じているとは限らないことが指摘されるようになった。従って、もっとも研究されている哺乳類での研究成果を他の動物に当てはめて考えることは適当とはいえない。我々は、両生類では、甲状腺刺激ホルモン (TSH) の分泌は哺乳類で知られている TSH 放出ホルモン (TRH) によって促進されるのではなくて、哺乳類で副腎皮質ホルモン分泌を促進することが知られている副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の放出をつかさどる ACTH 放出因子 (CRF) によってであることを実証した。これがきっかけとなって、脳下垂体の調節機構をそれぞれの動物綱で綿密に検証してゆく必要性を感じるに至った。

## 2. 研究の目的

我々自身がこれまで両生類を用いて得ている脳下垂体調節因子の働き、およびその受容体に関する知見のうち欠けている部分を補い、哺乳類で得られている脳下垂体調節因子に関する知見と対比することにより、その違いをそれぞれの動物群がたどった進化と適応とに関連付けて理解するための一助とすることを目的とした。なお、われわれのこれまでの研究結果から、さらに研究を進める必要があるのは ACTH およびプロラクチンであり、すでに「背景」の項でとりあげた TSH と合せて、奇しくもそれらは両生類に特徴的な変態に関連しているホルモン群であることから、変態の内分泌学的研究をさらに進展させることにも繋がると考えた。本研究は ACTH およびプロラクチンの放出調節因子とその受容体の特定に的を絞って行なった。

## 3. 研究の方法

主としてウシガエルの脳下垂体前葉細胞を酵素により解離し、その一次培養系に各種ホルモンの放出活性をテストすべき視床下部因子を加えて一定時間作用させたのち、培養液中に放出されたホルモンを免疫測定法により測定して活性を確かめる手段とした。また、これまでに両生類では微量定量法が確立されていない、副腎皮質刺激ホルモンのような下垂体前葉ホルモンについては、先ずそれを確立することとし、ユーロピウムを用いた時間分解蛍光免疫測定法の開発を先行させた。さらに放出活性が確認された因子については、その受容体の cDNA のクローニングを行い、それを用いて各放出因子の標的細胞における発現を検証することにより、確かにその放出因子が作用可能であることを裏付

けるような研究方法を選択した。

## 4. 研究成果

(1) 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 放出促進因子の特定：目的の項でのべたように、我々は甲状腺刺激ホルモン (TSH) の放出は哺乳類で知られている TSH 放出ホルモン (TRH) ではなくて、主として副腎皮質ホルモン放出ホルモン (CRH) によってであり、その作用は CRH 2 型受容体を介することを明らかにしている。一方、ACTH の放出活性を示す物質候補としては CRH と脳下垂体後葉ホルモンの一つであるアルギニンヴァソトシン (AVT) があげられてきた。我々はウシガエル下垂体細胞培養系と時間分解蛍光免疫測定法により、両生類ではコルチコトリピン放出因子 (CRF) よりもアルギニンヴァソトシン (AVT) が強い ACTH 放出活性を示すこと、また両因子の相乗効果により ACTH 放出がより刺激されることを明らかにした。さらに受容体作動剤を用いた実験から、AVT による ACTH 放出は V1b 型受容体を介することを明らかにした。また、ウシガエル下垂体前葉全 RNA を用いて AVT V1b タイプ受容体 cDNA をクローニングし、それを用いて *in situ* RT-PCR により下垂体 ACTH 細胞には同受容体 mRNA が発現していることを示した。両生類は変態をすることが特徴的であるが、TSH に刺激されて分泌促進がおこる甲状腺ホルモンと、甲状腺ホルモンの作用をより高める副腎皮質ホルモンとの協調により変態の促進が起こるとされてきた。今回の研究により、変態促進に関わる両ホルモンの分泌は CRF により一元的に支えられているというよりは、CRF と AVT の両者によって促進されていると考えるのが妥当であると結論した。

(2) プロラクチン放出因子 TRH の受容体の特定：ウシガエル 1、2 型、3 型 TRH 受容体について哺乳類培養細胞発現系を用いたルシフェラーゼアッセイにより、TRH に対する反応性を解析した。いずれの受容体も、TRH により濃度依存的にホスホリパーゼ C を介する経路が活性化され、50%効果濃度は  $10^{-8}$  M 以下であった。この結果より、3 種類のウシガエル TRH 受容体はいずれも機能的であると判断した。ウシガエルでは 3 型受容体が下垂体前葉でドミナントに発現しており、かつプロラクチン産生細胞に発現していることも明らかにした。このことから、TRH は 3 型 TRH 受容体を介してプロラクチン放出を促すと結論づけた。更にウシガエル幼生の変態期における TRH3 型受容体 mRNA 発現レベルと血液中プロラクチン濃度とは相関していること、幼生のプロラクチン細胞に 3 型受容体 mRNA が発現していることを示したが、これ

は上記結論を裏付けるものである。

(3)プロラクチン放出抑制とドーパミン (DA) 受容体:一方プロラクチン分泌を抑制する DA は D2 受容体を介することを、D2 受容体アンタゴニスト、アゴニストを培養下垂体に作用させ、プロラクチン分泌量をモニターすることにより薬理的に確認した。ついで D2 受容体のクローニングを試み、444 アミノ酸残基から成る D2 受容体 (bfd2A) の同定に成功した。次いで、G-タンパク質との共役に関わる第 3 細胞内領域にそれぞれ 4 及び 33 アミノ酸残基を欠いた bfd2B 及び bfd2C アイソフォームの同定にも成功した。更に、脳および脳下垂体ではこれらアイソフォーム 3 種の mRNA 全てが発現していること、末梢組織では主に bfd2C が発現していることも確認された。

(4) 研究結果の考察から生じた成果: 以上のような研究結果から、両生類と哺乳類における脳下垂体ホルモン放出因子の「ねじれ現象」、すなわち、哺乳類での作用に鑑みて命名された、ACTH 放出因子 (CRF) が両生類では TSH 放出因子であり、哺乳類で同定された TSH 放出ホルモン (TRH) は両生類では殆ど TSH の放出に関与せず、もっぱらプロラクチンの放出の役割を演じていること、両生類では ACTH の放出には CRF よりむしろ脳下垂体後葉ホルモンのアルギニンヴァソトシン

(AVT) が強い活性を有していること (実際 AVT は両生類では幼生期より正中隆起部を通じて脳下垂体前葉に輸送されていることを我々は確かめている) などが、両生類にとっていかなる意味を持つかを、両生類に特徴的な変態現象のホルモン調節に焦点をあてて考察した。まず、CRF は元来 TSH を放出させる役割を有していると考えられ、事実、いわゆる下等脊椎動物と見做せる魚類でもそのような働きのあることが知られている。

一方、ACTH には副腎皮質ホルモン分泌を促す働きをもち、両生類の場合このホルモンは甲状腺ホルモンの活性を高める性質があって、変態を短期間のうちに終了させるには甲状腺と副腎皮質由来の二つのホルモンの協調が必要とされる。これら二つのホルモンの微妙なバランスを実現するには、脳下垂体レベルで単一の物質 (CRF) によって TSH と ACTH を調節するよりは、別々の物質による調節のほうが有利であろう。かくして、TSH および ACTH の分泌促進は、それぞれ CRF および AVT が担うことになったと考えられる。

哺乳類で TSH 分泌促進の役を担う TRH には、両生類の幼生ではそのような作用は見られず、成体での作用も CRF に比べると著しく弱い。両生類では TRH はもっぱらプロラクチンの分泌促進を司る。プロラクチンのはたらきとして両生類でもっとも特異的なものは、

成長の促進と変態の抑制である。興味あることに、両生類視床下部の TRH 神経細胞は温度感受性を有し、低温に動物を晒すと脳内 TRH 前駆体 mRNA の発現が増大し、プロラクチン分泌がたかまる。このことは特に両生類の幼生にとっては重要なことである。低温下ではプロラクチンにたよって変態をせずに成長を続けるほうが、変態後の食性 (低温下では餌となる小動物に不足する) や、運動能力に関連するからだのサイズなどの点で生存に有利であるからである。一方、鳥類、哺乳類は TRH 細胞の温度感受能力は引き継いでいて、これを体温維持に利用し、恒温動物たりえたと考えられる。これらの動物では熱発生は甲状腺ホルモンによってひきおこされる。従って、低温下で甲状腺ホルモン分泌を上昇させるためには TSH 分泌上昇が必要であり、そのためには TRH が TSH 分泌調節を担うのが動物にとって最善の策といえよう。かくして、脊椎動物の恒温動物への進化とともに、TSH 分泌促進因子として CRF から TRH への役割のシフトが起こったことが他の脳下垂体ホルモンの分泌調節因子の役割転換を生じたと考えられる。

尚、TRH には恒温動物でもプロラクチン放出活性がみられるが、TRH による TSH とプロラクチンのパラレルな分泌上昇が必ずしも見られないのは、プロラクチン放出抑制因子であるドーパミンなどの介在が推測される。両生類でもドーパミンはプロラクチン放出抑制作用をある程度示すが、プロラクチンの放出は抑制系からの解放よりむしろ促進系の作動の方がより比重を占めており、その点で哺乳類と違いが生じていると考えられる。

## 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 17 件)

1: Haraguchi S, Koyama T, Hasunuma I, Okuyama S, Ubuka T, Kikuyama S, Do Rego JL, Vaudry H, Tsutsui K. Acute stress increases the synthesis of

7 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, a new key neurosteroid stimulating locomotor activity, through corticosterone action in newts. *Endocrinology*. 2012, 153:794-805. 査読有り

2: Morimoto N, Hashimoto K, Okada R, Mochida H, Uchiyama M, Kikuyama S, Matsuda K. Inhibitory effect of corticotropin-releasing factor on food intake in the bullfrog, *Aquarana catesbeiana*. *Peptides*. 2011, 32:1872-5. 査読有り

3: Suda M, Kodama M, Oshima Y, Yamamoto K, Nakamura Y, Tanaka S, Kikuyama S, Nakamura M. Up-regulation of FSHR expression during gonadal sex determination in the frog *Rana rugosa*. Gen Comp Endocrinol. 2011, 172:475-86. 査読有り

4: Kikuyama S, Tsutsui K. Historical view of development of comparative endocrinology in Japan. Gen Comp Endocrinol. 2011, 171:117-23. 査読有り

5: Hasunuma I, Toyoda F, Kadono Y, Yamamoto K, Namiki H, Kikuyama S. Localization of three types of arginine vasotocin receptors in the brain and pituitary of the newt *Cynops pyrrhogaster*. Cell Tissue Res. 2010, 342:437-57. 査読有り

6: Takase M, Haraguchi S, Hasunuma I, Kikuyama S, Tsutsui K. Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme mRNA and production of pregnenolone in the brain of the red-bellied newt *Cynops pyrrhogaster*. Gen Comp Endocrinol, 2011, 170:468-74. 査読有り

7: Nakano M, Minagawa A, Hasunuma I, Okada R, Tonon MC, Vaudry H, Yamamoto K, Kikuyama S, Machida T, Kobayashi T. D2 Dopamine receptor subtype mediates the inhibitory effect of dopamine on TRH-induced prolactin release from the bullfrog pituitary. Gen Comp Endocrinol. 2010, 168:287-92. 査読有り

8: Haraguchi S, Koyama T, Hasunuma I, Vaudry H, Tsutsui K. Prolactin increases the synthesis of 7alpha-hydroxypregnenolone, a key factor for induction of locomotor activity, in breeding male Newts. Endocrinology. 2010, 151(5):2211-22

9: Hasunuma I, Iwamuro S, Kobayashi T, Shirama K, Conlon JM, Kikuyama S. Expression of genes encoding antimicrobial peptides in the Harderian gland of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2010, 152(3):301-5. 査読有り

10: Lutz I, Kloas W, Kikuyama S. Sixth International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology ISAREN 2009. Gen Comp Endocrinol. 2010, 168(2):169-70. 査読有り

11: Nakano M, Hasunuma I, Okada R, Yamamoto K, Kikuyama S, Machida T, Kobayashi T. Molecular cloning of bullfrog D2 dopamine receptor cDNA: Tissue distribution of three isoforms of D2

dopamine receptor mRNA. Gen Comp Endocrinol. 2010, 168(1):143-8. 査読有り

12: Kikuyama S. Twenty years of ISAREN: an amphibian biologist in Wonderland. Gen Comp Endocrinol. 2010, 168(2):171-3. 査読有り

13: Matsuda K, Morimoto N, Hashimoto K, Okada R, Mochida H, Uchiyama M, Kikuyama S. Changes in the distribution of corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the larval bullfrog brain and the involvement of CRF in the cessation of food intake during metamorphosis. Gen Comp Endocrinol. 2010, 168(2):280-6. 査読有り

14: Kobayashi K, Yamamoto K, Kikuyama S, Machida T, Kobayashi T. Impaired Development of Somatotropes, Lactotropes and Thyrotropes in Growth-Retarded (grt) Mice. J Toxicol Pathol. 2009, 22(3):187-94. 査読有り

15: Okada R, Kobayashi T, Yamamoto K, Nakakura T, Tanaka S, Vaudry H, Kikuyama S. Neuroendocrine regulation of thyroid-stimulating hormone secretion in amphibians. Ann N Y Acad Sci. 2009, 1163:262-70. 査読有り

16: Kikuyama S, Hasunuma I, Toyoda F, Haraguchi S, Tsutsui K. Hormone-mediated reproductive behavior in the red-bellied newt. Ann N Y Acad Sci. 2009, 1163:179-86. 査読有り

17: Galas L, Raoult E, Tonon MC, Okada R, Jenks BG, Castaño JP, Kikuyama S, Malagon M, Roubos EW, Vaudry H. TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates. Gen Comp Endocrinol. 2009, 164(1):40-50. 査読有り

〔学会発表〕(計 26 件)

1: 岡田令子、蓮沼至、菊山榮、他 両生類における ACTH 放出促進機構  
第 36 回日本比較内分泌学会大会 2011 年 11 月 23, 24 日 都道府県会館 (東京)

2: 蓮沼至、菊山榮、他 ウシガエル甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体の発現解析  
第36回日本比較内分泌学会大会 2011年11月 23, 24日 都道府県会館 (東京)

3: 岡田令子、蓮沼至、菊山榮、他 両生類 ACTH の主たる放出因子は AVT である  
日本動物学会第82回大会 2011年9月22日 大雪クリスタルホール (旭川)

4: 蓮沼至、菊山榮、他 ウシガエル甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体のリガンドに対する反応性  
日本動物学会第82回大会 2011年9月22日 大雪クリスタルホール (旭川)

- 5: 岡田令子 Neuroendocrine control of thyroid-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone in amphibians.  
7th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (招待講演) 2011年7月12日 University of Michigan (USA)
- 6: 蓮沼至、菊山榮、他 アルギニンバソトシンによるアカハライモリ求愛行動発現機構 第35回日本比較内分泌学会大会 2010年11月18日静岡
- 7: 蓮沼至、菊山榮、他 ソデフリン前駆体遺伝子の多様性 第81回日本動物学会大会 2010年9月23日 東京
- 8: 岡田令子 両生類の変態: 視床下部—下垂体—甲状腺系の調節機構 日本下垂体研究会第25回学術集会 (招待講演) 2010年8月19日愛知
- 9: 岡田令子、菊山榮 Neuroendocrine control of thyrotropes in vertebrates. The 7th International Congress of Neuroendocrinology (招待講演) 2010年7月13日 Rouen (フランス)
- 10: 原口省吾、蓮沼至、菊山榮、他 プロラクチンによる7 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロン合成の制御機構 第34回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第31回大会 合同大会 2009年10月千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- 11: 蓮沼至、菊山榮、他 イモリマウスナー細胞におけるアルギニンバソトシンV1aタイプ受容体の発現 第34回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第31回大会 合同大会 2009年10月千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- 12: 森本憲明、菊山榮、他 ウシガエルの摂食行動に及ぼすコルチコトロピン放出因子 (CRF) の影響 第34回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第31回大会 合同大会 2009年10月千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- 13: 菊山榮 Twenty years of ISAREN: Research by an amphibian biologist in globally changing environment 6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (招待講演) 2009年9月 Berlin-Adlershof (ドイツ)
- 14: 蓮沼至、菊山榮、他 Distribution of arginine vasotocin (AVT) and AVT V1a-type receptor in the male newt brain 6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology 2009年9月 Berlin-Adlershof (ドイツ)
- 15: 中野真樹、蓮沼至、岡田令子、菊山榮、他 D2 dopamine receptor subtype mediates the inhibitory effect of dopamine on the TRH-induced prolactin release from the bullfrog pituitary 6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology 2009年9月 Berlin-Adlershof (ドイツ)
- 16: 松田恒平、岡田令子、菊山榮、他 Distribution of corticotropin-releasing factor(CRF)-immunoreactivity in the bullfrog brain: Central effect of CRF on the inhibition of food intake in the bullfrog 6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology 2009年9月 Berlin-Adlershof (ドイツ)
- 17: 中田友明、菊山榮、他 Responsiveness of lateral nasal sinus epithelial cells of the newt, *Cynops pyrrhogaster* to sodefrin 6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology 2009年9月 Berlin-Adlershof (ドイツ)
- 18: Jean-Luc Do Rego、蓮沼至、他 Regulation of neurosteroid biosynthesis in the frog brain. Involvement of corticotropin-releasing hormone and related peptide 6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology 2009年9月 Berlin-Adlershof (ドイツ)
- 19: 原口省吾、蓮沼至、他 Stress-induced changes in the synthesis of 7 $\alpha$ -hydroxypregnenolone stimulating locomoter activity in newts 6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology 2009年9月 Berlin-Adlershof (ドイツ)
- 20: 松田恒平、菊山榮、他 神経ペプチドによる下等脊椎動物の摂食行動の制御機構: ウシガエルの摂食行動に及ぼす副腎皮質刺激ホルモン放出因子の影響 日本動物学会第80回大会 (招待講演) 2009年9月静岡大学 (静岡)
- 21: 岩室祥一、菊山榮、他 Sequence captureに基づく両生類抗菌ペプチド遺伝子の効率的なクローニング法 日本動物学会第80回大会 2009年9月静岡大学 (静岡)
- 22: 中野真樹、蓮沼至、岡田令子、菊山榮、他 ウシガエル幼生下下垂体前葉におけるプロラクチン分泌調節因子受容体mRNAの発現解析 日本動物学会第80回大会 2009年9月静岡大

学 (静岡)

23: 豊田ふみよ、蓮沼至、菊山榮、他 アルギニンヴァソトシンと7 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロンのイモリ求愛行動発現作用  
日本動物学会第80回大会 2009年9月静岡大学 (静岡)

24: 岡田令子、菊山榮 Neuroendocrine control of thyrotropes in vertebrates.  
16th International Conference of Comparative Endocrinology (招待講演)  
2009年6月 The University of Hong Kong (中国)

25: 蓮沼至、菊山榮、他 Localization of AVT V1a-type receptor in the newt brain.  
16th International Conference of Comparative Endocrinology 2009年6月  
The University of Hong Kong (中国)

26: 原口省吾、蓮沼至、菊山榮、他 Stress-induced regulation of the synthesis of the neurosteroid 7 $\alpha$ -hydroxypregnenolone stimulating locomotor activity in newts. 2009年6月 The University of Hong Kong (中国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菊山 榮 (KIKUYAMA SAKAE)

早稲田大学・教育総合科学学術院・名誉教授

研究者番号：20063638

### (2)

岡田 令子 (OKADA REIKO)

静岡大学・創造科学技術大学院・講師

研究者番号：50386554

### (3) 研究分担者

蓮沼 至 (HASUNUMA ITARU)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：40434261