

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570072

研究課題名(和文)ヌタウナギの生殖内分泌機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of reproductive endocrine system in hagfish

研究代表者

野崎 眞澄 (Nozaki, Masumi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：70136232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：クロヌタウナギの視床下部-下垂体-生殖腺軸について調べた。その結果、生殖腺の発達に相関して、下垂体のGTH量と性ステロイド合成の律速酵素であるCYP11AmRNA量がともに増加すること、性ステロイドホルモン投与によりGTH分泌が抑制されること、視床下部因子であるPQRFアミドペプチド投与によりGTHのRNA量が増加することなどから、ヌタウナギ段階で視床下部-下垂体-生殖腺軸が確立していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Since hagfishes are considered the most primitive vertebrate known, living or extinct, studies on their reproduction are important for understanding the evolutionary aspects of the vertebrate reproductive endocrine system. Recently, single functional GTH was identified in the hagfish pituitary gland. In the present study, cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (CYP11A) was cloned from the hagfish testis. A clear positive correlation was noted between CYP11A mRNA levels and gonadal development in both sexes. Moreover, hagfish GTH stimulated CYP11A mRNA levels in the cultured testis. A PQRFamide peptide identified from the hagfish hypothalamus was shown to stimulate GTH mRNA levels in the hagfish pituitary. The present study further showed the presence of a steroid (estradiol) feedback system at the hypothalamic-pituitary levels. It is suggested that vertebrates, during their early evolution, have established the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

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：ヌタウナギ 無顎類 下垂体 生殖腺刺激ホルモン 性ステロイドホルモン コレステロール側鎖切断酵素 ステロイド産生細胞

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、今からおよそ5億年前に顎のない原始的な魚類(無顎類)として地球上に出現して以来、様々な環境に適応して生息域を広げ、進化を遂げてきた。脊椎動物の適応と放散が成功した要因は、情報伝達系としての神経系と内分泌系、そして両者をつなぐ神経内分泌系の発達によるところが大きい。下垂体は内分泌系の中心器官であり、脳からの指令を腺下垂体ホルモンに変換して体組織に伝達する重要な器官である。それゆえ、脊椎動物の適応と放散は下垂体の進化と密接な関係にあるといえる。下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン(GTH)は、生殖腺の発達や配偶子の形成・成熟に関わるホルモンであり、有顎脊椎動物(顎口類)の生殖現象において中心的役割を担っている。しかし、脊椎動物の進化の最初期に出現した無顎類のヌタウナギにおいては、下垂体の構造もきわめて原始的で、前葉と中葉の区分すらない。また、これまで腺下垂体ホルモンの存在も疑問視されてきたため、ホルモンの単離や機能解析はまったくなされておらず、この動物の生殖現象と内分泌系による制御機構に関する知見はきわめて乏しい。

報告者は、長年にわたって無顎類の腺下垂体ホルモンに関する研究を進めてきた。その結果、ヌタウナギの下垂体は、従来考えられてきた以上に機能的であることが分かってきた。すなわち、8年ほど前に、新潟県産のクロヌタウナギ(*Paramyxine atami*)の下垂体の免疫組織切片を観察していて、腺下垂体が著しく発達していること、しかも、発達した腺下垂体の過半数の細胞が脊椎動物各種のゴナドトロピン(GTH)抗体に対して強い陽性反応を示すことに気がついた。この発見を手掛かりとして、クロヌタウナギの下垂体から cDNA ライブラリーを構築し、世界ではじめて GTH の鎖と鎖をコードする遺伝子の単離に成功した。そして、GTH 鎖と鎖の抗体を作成し、下垂体内の局在性を明らかにするとともに、GTH 遺伝子の発現量やタンパク量が生殖腺の機能状態とよく一致していること、さらに約 2000 尾の

クロヌタウナギの下垂体から GTH を化学的に単離し、精巣培養系に投与することにより、精巣から性ステロイドホルモンの放出を証明した。これらの一連の研究により、ヌタウナギが機能的な GTH を持つこと、そして、ヌタウナギでは、糖タンパク質ホルモンとして1種類のGTHしか存在せず、ヌタウナギのGTHがLH、FSH、TSHの分化以前の状態であることを明らかにした。今後、視床下部-下垂体-生殖腺軸に着目して、ヌタウナギの生殖内分泌機構を明らかにすることにより、脊椎動物の生殖内分泌機構の起源と進化を総括的に理解することが可能となることが強く期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、ヌタウナギの視床下部-下垂体-生殖腺軸に関連した以下の研究を行う。
1)ヌタウナギの生殖腺がいかなる性ホルモンを生産しているかを明らかにするため、性ステロイドの合成酵素群の遺伝子をクローニングし、性ステロイド合成経路の全貌を明らかにする。ついて、2)主要性ステロイドホルモンについて、生殖腺の機能状態と血中ホルモン動態の相関関係を調べる。さらに、3)下垂体の視床下部支配の観点から、GnRHをはじめとする視床下部ペプチドについて生化学的分析法やMALDI-TOF MS分析法により単離を行い、可能性のあるペプチドについては、*in vitro* の下垂体培養系において GTH 遺伝子の発現量に及ぼす効果を調べる。また、4)性ホルモンのフィードバック機構を知るため、エストロゲンとテストステロンをヌタウナギに投与して、下垂体における GTH 遺伝子の発現量に及ぼす効果を解析する。これらの一連の研究により、脊椎動物の生殖内分泌機構の起源と進化を総括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 生殖腺の発達段階と血中ステロイドホルモン動態の関係

前年度までの研究で、時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)によるクロヌタウナギの血中性ステロイドホルモンの測定法を確立し、*in vitro* の精巣培養系において、天然型 GTH の投与により培養液中にエス

トラジオール 17 とテストステロンが用量反応的に放出されることを報告した。そこで、幼弱個体から生殖腺の発達した個体までの各種段階のクロヌタウナギを用いて、生殖腺の機能状態と血中ステロイドホルモン動態の相関関係を調べる。注目する性ステロイドホルモンは、TR-FIA による測定系の確立しているエストラジオール 17、テストステロン、プロゲステロン、11-ケトテストステロンなどである。

2) ヌタウナギにおける性ステロイドホルモン合成経路の解明

前年度までの研究で、クロヌタウナギの精巢から cDNA ライブラリーを構築し、網羅的大規模シーケンス(EST)を行い、約 1300 クロノンの解析を終えている。さらに約 5000 クロノンまで解析検体数を増やして、ヌタウナギにおける性ステロイド合成遺伝子群の単離をめざす。次に、単離した遺伝子群に対し、Real-time PCR 法を取り入れ、成長段階や生殖腺の発達段階の違いによる遺伝子発現量の変動を測定し、ヌタウナギにおける性ステロイド合成経路の全貌を明らかにする。報告者らが所属する研究部所にはシーケンス機器が完備されていないため、大規模シーケンスについては、北海道システムサイエンス(株)に委託する予定である。

3) 視床下部-下垂体-生殖腺軸の解析その1: 視床下部ペプチドの検索

下垂体からの GTH 分泌は、視床下部の GTH 放出ホルモン(GnRH)により調節されている。顎口類では、さらに GnRH ニューロンの機能を調節する視床下部ペプチドとして、キスペプチンや GTH 抑制ホルモン(GnIH)などが知られている。ヌタウナギでも、視床下部に GnRH 免疫陽性ニューロンが観察されることから、GnRH の存在が強く示唆されているが、未だ単離に至っていない。一方、報告者らはすでにクロヌタウナギの視床下部から GnIH と相同な PQRF アミドペプチドを単離しており、予備的な実験から in vitro での下垂体培養系に当該ペプチドを投与すると GTH mRNA の発現シグナルが有意に増加することも確認している。このペプチドについて GTH 分泌調節との関係を幼弱個体や成熟個体などを用いてさらに詳しく調べる。

4) 視床下部-下垂体-生殖腺軸の解析その2: ステロイドによるフィードバック機構

顎口類の生殖内分泌系においては、生殖腺からの性ステロイドホルモンのフィードバックにより下垂体の GTH (LH と FSH) の生産と分泌が調節されている。ヌタウナギにも同様な制御機構が存在する可能性が高い。そこで、エストラジオールとテストステロンをヌタウナギの腹腔内に投与し、下垂体における GTH 遺伝子(鎖と鎖の両方)の発現量に及ぼす効果を Real-time PCR 法により明らかにする。また、ステロイド投与後の下垂体 GTH 産生細胞の形態学的変化を、免疫組織学的手法により組織学的に明らかにする。

4. 研究成果

1) 血中性ステロイドホルモン動態と生殖腺の発達段階の関係

エストラジオール 17、テストステロン、プロゲステロンの血中濃度が測定された。メスでは血中エストラジオール量と生殖腺の発達との間に正の相関がみられ、卵黄形成の進んだ群で最も高い値を示した。血中テストステロンとプロゲステロン量は卵黄形成の未熟な成体群で最も高い値を示し、プロゲステロン量については卵黄発達に伴い減少した。このことから、エストラジオールがヌタウナギのメスにおいて生殖腺の発達、特に卵黄形成に関連しており、テストステロンや P は中間産物として存在する可能性が考えられた。一方のオスでは、生殖腺の発達と血中性ステロイドホルモン量の間に関連は得られなかった。

2) 生殖腺機能関連分子の遺伝子探索と CYP11A の発現動態

総数 5136 クロノンのシーケンス解析を行った結果、生殖腺機能に関係ある分子として 11 種が認められた。その中にステロイド合成の律速酵素として知られるコレステロール側鎖切酵素(CYP11A)が得られたことから、CYP11A に着目し、研究を進めた。生殖腺における CYP11A の遺伝子発現を調べると、メスでは卵黄形成、オスでは精子形成にともなう有意な発現量の上昇がみられたことから、CYP11A が性ステロイドホルモン合成酵素として働き、生殖腺の発達に関わっていること

が示唆された。また、in situ hybridization により、クロヌタウナギ生殖腺における CYP11A 発現が、脊椎動物における性ステロイド産生細胞として知られる精巢の間細胞（ライデッヒ細胞）と管状境界細胞、卵巢の莢膜細胞で確認された。さらに、クロヌタウナギ GTH を与えて培養した精巢では、有意に CYP11A の遺伝子発現が上昇していたことから、GTH により発現が誘導されたと考えられた。なお、雄での CYP11A の発現動態が血中エストラジオール値やテストステロン値と相関が見られなかったことから、雄では主要アンドロジェンとして、未知の性ステロイドホルモンが使用されている可能性が示された。

3) 視床下部-下垂体-生殖腺軸の解析その1: 視床下部ペプチドの検索

ヌタウナギでは、GnRH は単離されていないが、ヤツメウナギ GnRH-III 抗体などを用いた免疫染色で、GnRH-III 陽性ニューロンが検出され、それらの終末が神経葉の背壁に集まっているので、GnRH が存在することは間違いない。クロヌタウナギの脳から単離した新規の PQRF アミドペプチドを器官培養した下垂体に投与すると GTH の 鎖の mRNA 量が用量反応的に増加することを示し、GTH 合成が視床下部支配を受けていることを示した。この PQRF アミドペプチドの神経終末の一部は、視床下部内の血管壁に終わることから、視床下部ホルモンは、血液に運ばれて腺下垂体に至る可能性も指摘された。

4) 視床下部-下垂体-生殖腺軸の解析その2: ステロイドによるフィードバック機構

幼弱クロヌタウナギにエストラジオールを4週間腹腔内投与した後、下垂体の GTH のタンパク量を免疫組織学的に調べたところ、GTH 量は 鎖、鎖とも顕著に増加した。一方、エストラジオール投与後、1、2、4、14 日後に屠殺して GTH の mRNA 量を調べた結果、鎖 鎖とも顕著な変化がみられなかった。これらの結果は、エストラジオール投与によ

り GTH の合成は抑制されなかったが、分泌が抑制されたため、生産された GTH が下垂体内に蓄積されたものと考えられた。この結果は、エストロゲンが視床下部の GnRH ニューロンなどを介して GTH の分泌を抑制的に調節していることを示唆するものと考えられる。

以上の成果から、脊椎動物は進化の初期段階で下垂体を獲得すると同時に、視床下部-下垂体-生殖腺軸を確立したことが強く示唆された。

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 6 件)

1. Nozaki, M.:

Hypothalamic-pituitary-gonadal endocrine system in the hagfish. *Front. Endocrinol.* 4:200. 査読あり, doi:10.3389/fendo.2013.00200.

2. Nishiyama, M., Chiba, H., Uchida, K., Shimotani, T., Nozaki, M.:

Relationships between plasma concentrations of sex steroid hormones and gonadal development in the brown hagfish, *Paramyxine atami*. *Zool. Sci.* 30: 967-974 (2013). 査読あり, doi:10.2108/zsj.30.967

3. Nozaki, M., Uchida, K., Honda, K.,

Shimotani, T., Nishiyama, M.: Effects of estradiol or testosterone treatment on expression of gonadotropin subunit mRNAs and proteins in the pituitary of juvenile brown hagfish, *Paramyxine atami*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 189:111-118 (2013). 査読あり, doi:org/10.1016/j.gcen.2013.04.034

4. Uchida, K., Moriyama, S., Sower, S.A., Nozaki, M.:

Glycoprotein hormone in the pituitary of hagfish and its evolutionary implications. *Fish Physiol. Biochem.* Feb. 39: 75-83

- (2013). 査読あり,
doi:10.1007/s10695-012-9657-6
5. Osugi, T., Daukss, D., Gazda, K., Ubuka, T., Kosugi, T., Nozaki, M., Sower, S.A., Tsutsui, K.: Evolutionary origin of the structure and function of gonadotropin-inhibitory hormone: insights from lampreys. *Endocrinology*, 153: 2362-2374 (2012). 査読あり, doi:10.1210/en.2011-2046
6. Osugi, T., Uchida, K., Nozaki, M., Tsutsui, K.: Characterization of novel RFamide peptides in the central nervous system of the hagfish: isolation, localization, and functional analysis. *Endocrinology*, 152: 4252-4264 (2011). 査読あり, doi:10.1210/en.2011-1375

[学会発表](計 12 件)

1. 野崎眞澄: ヌタウナギからみた下垂体の進化。小林英司先生記念シンポジウム「比較内分泌学の創成と発展」。第 38 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2013 年 10 月 24-26 日、宮崎、査読なし。
2. 西山真樹・内田勝久・森山俊介・千葉洋明・阿部希美・下谷豊和・野崎眞澄: クロヌタウナギにおける生殖腺発達に応じた血中性ステロイドホルモン動態と合成酵素の探索。第 38 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2013 年 10 月 24-26 日、宮崎、査読なし。
3. 野崎眞澄: ヌタウナギからみた腺下垂体ホルモンの進化。シンポジウム「下垂体の起源と進化」。日本下垂体研究会 第 28 回学術集会、2013 年 8 月 7-9 日、花巻、査読なし。
4. 西山真樹・阿部希美・内田勝久・下谷豊和・野崎眞澄。クロヌタウナギにおける生殖腺発達に応じた血中性ステロイドホルモン動態と合成酵素の探索。日本下垂体研究会 第 28 回学術集会、2013 年 8 月 7-9 日、
- 花巻、査読なし。
5. 野崎眞澄: ヌタウナギからみた視床下部一下垂体一生殖腺軸の進化。セッション「境界動物の内分泌現象」。東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会「海洋生物の様々な適応戦略」、2013 年 6 月 21-22 日、柏、査読なし。
6. Nozaki, M.: Hypothalamic-pituitary-gonadal endocrine system in the hagfish. Deep Sequencing at CDB, Kobe, June 13-14, 2013. 査読なし。
7. 野崎眞澄・本田香織・内田勝久・下谷豊和・西山真樹: クロヌタウナギ下垂体の GTHmRNA レベルならびに GTH タンパク質レベルに対するエストロゲン投与の効果。日本下垂体研究会 第 27 回学術集会、2012 年 8 月 9-11 日、花巻、査読なし。
8. Nozaki, M., Shimotani, T., Nishiyama, M., Uchida, K.: Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. The 7th Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Kuala Lumpur, Malaysia, March 3-7, 2012, 査読なし。
9. Nishiyama, M., Uchida, K., Moriyama, S., Chiba, H., Awata, S., Nozaki, M.: Study on sex steroid hormones in the hagfish - Their serum concentrations and sex steroid biosynthetic enzymes. The 7th Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Kuala Lumpur, Malaysia, March 3-7, 2012, 査読なし。
10. 西山真樹・内田勝久・森山俊介・千葉洋明・下谷豊和・安房田智司・野崎眞澄: クロヌタウナギにおける性ステロイド合成酵素の探索。日本動物学会第 82 回大会。2011 年 9 月 13-15 日、旭川、査読なし。

し。

11. 野崎真澄：吉村賞受賞者講演「無顎類からみた下垂体の進化に関する研究」。日本下垂体研究会第26回学術集会、2011年8月25-27日、せとうち児島ホテル、岡山、査読なし。

12. Nozaki, M.: Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. 2nd JAMBIO Forum, Shimoda Marine Res. Center, Univ. of Tsukuba, January 21, 2011, 査読なし。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
野崎 真澄 (NOZAKI MASUMI)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：70136232

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：