

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440159

研究課題名(和文) 原始脊椎動物における視床下部-下垂体制御機構の理解とその進化的基盤を探る

研究課題名(英文) Evolutionary origin of the hypothalamic-pituitary axis in the most primitive vertebrate, hagfish

研究代表者

内田 勝久(Uchida, Katsuhisa)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：50360508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヌタウナギ(*Eptatretus burgeri*)の下垂体の次世代シーケンス解析により、GHをコードする遺伝子の全長配列を同定した。推定されるアミノ酸配列は203残基であり、第75位、177位、194位、202位のアミノ酸にシステイン残基が認められ、これらがGH分子の立体構築に寄与していると推察された。また、第109位から122位までのアミノ酸配列から合成ペプチドを作出し、ウサギに免疫し、抗血清を得た。作出した抗血清を用いた免疫組織化学染色により、成熟個体の腺下垂体を構成する細胞塊の周辺部の細胞に免疫陽性反応が認められた。現在、GH遺伝子の発現部位の同定やGH分子の機能解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Here we report the identification of a growth hormone (GH) from the pituitary of the Pacific hagfish (*Eptatretus burgeri*) by next-generation sequence analysis. The hagfish GH cDNA consists of 870 nucleotides encoding a prehormone of 203 amino acid (aa) residues, with a putative signal peptide of 20 aa residues and a mature protein of 183 aa residues. By aligning cysteine (Cys) residues, the aa sequence was comparable to gnathostome GHs; four Cys were conserved at position 75, 177, 194, 204, which have been considered to be crucial for molecular construction of GH. For immunohistochemistry, a rabbit antiserum was raised against the synthetic peptides corresponding to the hagfish pre-GH (aa 109-122). An intense immunoreaction to anti-hagfish GH was observed in peripheral cells of most cell clusters in the adenohypophysis. We are now analyzing the cellular localization of GH gene and functions of GH molecule in the Pacific hagfish.

研究分野：生物学

キーワード：下垂体 ホルモン 無顎類 進化

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、今から約 5.4 億年前に出現し、様々な環境に適応して生息域を広げ、進化を遂げてきた。脊椎動物の適応放散の背景には、神経系や内分泌系といった情報伝達系の進化とその機能の多様化が深く関わっている。視床下部-下垂体系は、脊椎動物に特有の内分泌機構であり、個体の生殖、成長、代謝といった生命活動に必須のホルモン分子を分泌している。一方、脊椎動物の進化の最初期に出現した、顎を持たない無顎類・ヌタウナギにおいては、視床下部-下垂体系のホルモン分子の構造や機能については、視床下部に RFamide ペプチドの存在が(文献 1)、下垂体にヘテロ 2 量体構造を有する 1 種類の GTH が産生されていることが報告されている(文献 2)に過ぎない。また、十分に成熟したクロヌタウナギの下垂体に、GTH 産生細胞以外の細胞塊が存在することから、体成長や代謝に関連する他の下垂体ホルモンが存在する可能性を示している(文献 2)。つまり、ヌタウナギの下垂体にも、個体の成長制御、甲状腺の機能制御に関わるホルモンが産生されている可能性が極めて高い。従って、最も原始的な脊椎動物である無顎類・ヌタウナギの視床下部-下垂体系の機能を分子レベルで総括的に理解し、得られた成果を基盤として、ヌタウナギ類における繁殖、初期発生、成長・代謝制御機構を個体レベルで理解することは、極めて重要な学術的意義と発展性がある。

## 2. 研究の目的

本研究においては、長年の採集記録から繁殖時期がある程度推定され、かつ、様々な生育段階の個体が入手可能である、東京大学大学院理学系研究科三崎臨海実験所を共同利用拠点とし、実験所周辺で採集したヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) を題材に、視床下部と下垂体で発現する遺伝子群の網羅

的探索を、次世代シーケンサーを用いて解析する。代謝・成長、ならびに繁殖に関連する機能遺伝子にターゲットを絞り、その全配列構造の同定と、遺伝子発現動態を解析する。生化学的な手法によるホルモン分子の精製、合成ペプチドや組換え型ホルモンの作出等により、視床下部-下垂体因子の機能解析を器官培養系や個体への投与実験により明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 次世代シーケンサーを用いた下垂体の網羅的遺伝子探索

東京大学三崎臨海実験所において採取した下垂体から total RNA を抽出し、poly A RNA を精製後、逆転写反応により double strand DNA を合成した。この DNA 断片にアダプター配列を付加後、ライブラリー化を進め、次世代シーケンサーにかけ、リード配列を得た。各リード配列を基に、ソフトウェア解析(Denovoassembler ver. 3.0)により、Contig 配列を得た。得られた Contig 配列をベースに、ホモロジー検索を解析ソフト(Blast2Go)により行った。なお、本研究における大規模シーケンス解析には、Roche 社製の機器(GS Junior)を使用し、平均シーケンス長を 400 塩基対、総リード数を 15 万程度と想定し、解析を進めた。また、総リード数は、マウスやゼブラフィッシュなどのモデル生物で頻用される、Illumina 社製の次世代シーケンサーと比較して 10~1000 分の 1 程度であると想定されたが、平均シーケンス長は約 4 倍長いことが、GS Junior シーケンサーの特徴である。従って、より長いシーケンス配列を基盤に、既知の遺伝子データベースとのホモロジー検索を進め、下垂体で発現する遺伝子プロファイルの構築とそのデータベース化を進めた。

### 下垂体で発現するホルモン分子をコードする遺伝子の全長クローニング

次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子

探索の結果から、有顎類の下垂体で発現するホルモン分子と相同と思われる分子の遺伝子配列の全長クローニングを、RACE-PCR法により行った。

#### 下垂体ホルモン分子の細胞局在ならびに機能解析

次世代シーケンス解析ならびに全長クローニングにより得られたホルモン分子の構造から、合成ペプチドを作出し、これをウサギに免疫することで、ホルモン分子を特異的に認識可能な抗血清を作製した。なお、一連の抗血清作出に関しては、(株)ユーロフィンジェノミックスに委託した。作出抗体の抗体価(IgG量)をELISA法により測定し、抗体の産生を確認した。その後、ブアン氏液で固定したヌタウナギの脳-下垂体組織切片標本を作出し、ヘマトキシリン-エオシン染色による下垂体の組織学的観察ならびに免疫組織化学的手法により、得られたホルモン分子の産生部位の同定を行った。

一方、同定したホルモン遺伝子の一部を、T7ならびにSP6プロモーター配列を持つVectorに挿入し、クローン化した。ジゴキシゲニン(DIG)を標識物質とし、ホルモン分子の発現部位を解析するためのcRNAプローブを作製し、パラフィン包埋切片上での *in situ* hybridization 法を確立した。

さらに、同定した下垂体ホルモンの標的となる器官で産生される内分泌因子の遺伝子構造の単離をPCR法により進め、その部分塩基配列をシーケンス解析により明らかにし、下垂体ホルモンの機能を器官培養実験やホルモン投与実験により明らかにするための解析・評価ツールを整えた。

## 4. 研究成果

### ヌタウナギの下垂体の次世代シーケンス解析

シーケンサー解析により出力された全リード数は119,906であり、全出力塩基数は、

49,336,938塩基であった。平均リード長は411.46であり、最長リード、最短リード、リード中央値は、それぞれ、819、40、457塩基であった。また、形成contigは11,786であり、平均contig長は約525塩基対であった。遺伝子同定作業を進めた結果、全contig配列のうち、約40%が既知の遺伝子配列として同定されたが、この同定の割合は、軟骨魚類の場合(50-70%)に比べて、低い結果であった。同定された遺伝子の中には、太平洋産ヌタウナギのlymphocyte receptor b、neogenin 1などの免疫系に関連する分子種が含まれていたほか、内分泌因子として、顎口類の成長ホルモン(GH)に相同性を示す分子種が含まれていた。

### ヌタウナギの成長ホルモンをコードする遺伝子の全長構造とそのタンパク質構造

次世代シーケンス解析により、ヌタウナギの下垂体から、顎口類のGH分子に相同性を示す部分塩基配列が得られたため、この配列をもとにヌタウナギGH遺伝子の全長配列をRACE-PCR法により同定した。その結果、5'-RACEにおいては約250塩基対の、3'-RACEでは約625bpの増幅産物が得られた。これらの増幅産物をシーケンスし、全長870塩基対から成るヌタウナギGH遺伝子を同定した。得られた配列は、78塩基から成る5'非翻訳領域、609塩基から成るタンパク質コード領域、183塩基から成る3'非翻訳領域を含んでいた。タンパク質コード領域の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は203残基であり、メチオニンから始まる20個のアミノ酸配列がシグナル配列であると推定された。また、GHのアミノ酸配列の第75位、177位、194位、202位にはシステイン残基が認められ、これらがGH分子の立体構築に寄与していると推察された。軟骨魚類を除く顎口類の下垂体においては、成長ホルモン分子族として、GH、プロラクチン(PRL)、ソマトラクチン(SL)が産生されている(文献

3) GH 分子族のホルモンは、システイン残基同士によるジスルフィド結合(S-S 結合)を保持し、GH は分子中央部と C 末端部の 2 ヶ所に、PRL と SL は分子中央部と N、C 両末端部の計 3 ヶ所に S-S 結合を保持している。また、GH 分子では中央部に存在する大きなループ構造が生物活性に重要である(文献 3)。本研究で単離された分子構造内には、システイン残基が 4 ヶ所保存されており、S-S 結合を形成すると推察される部位が、分子中央部と C 末端部であると考えられた。また、ヌタウナギの GH 分子のアミノ酸配列を、他魚種の GH 配列と比較すると、上述した 4 ヶ所のシステイン残基は極めて保存的であった。ヌタウナギの GH は、ニホンウナギやアブラツノザメといった顎口魚類の GH とは約 27%の相同性を、同じ無顎類であるウミヤツメの GH とは約 30%の相同性を示した。顎口類の GH 分子には、それら全てに共通するコンセンサス配列が 24 残基存在するが、ヌタウナギの GH 分子内には、このコンセンサス配列 24 残基中、16 残基が保存されていた。

以上の成果から、脊椎動物の下垂体 GH 分子族は、最も原始的な脊椎動物において、下垂体の誕生とともに GH が共通祖先分子として獲得され、その後の顎口類の誕生に伴い、この共通祖先分子から遺伝子重複により、PRL、SL が分子進化ならびに機能進化を遂げたと推察される。

#### ヌタウナギの GH 分子の下垂体における細胞局在

ヌタウナギの GH 分子内のアミノ酸配列(第 109 位から 122 位までの 14 残基)から合成ペプチドを作出し、ウサギに免疫したところ、抗体価の(IgG 量)の上昇が認められた。作出されたウサギ抗血清を、以下の組織学的解析に供した。

ヌタウナギの腺下垂体は、間脳の視床下部の下方部に認められた。腺下垂体は、顎口類の下垂体とは異なり、視床下部直下の結合組

織に埋没して存在し、個々の細胞が集まり細胞塊を形成し、それらが複数集まり構成されていた(図 1)。この構造は、クロヌタウナギの腺下垂体と極めて類似している(文献 2)

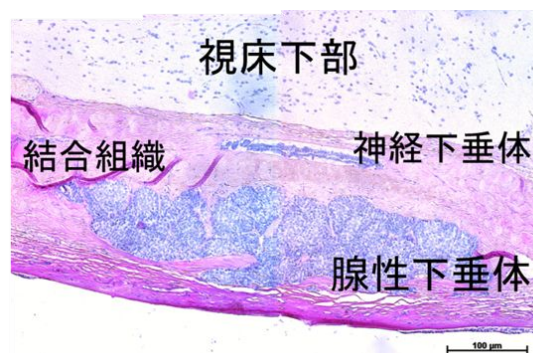


図 1. ヌタウナギの腺下垂体の組織学的観察。脳と下垂体を含む組織の矢状横断切片をヘマトキシリン・エオシンで染色した組織像

一方、作出した抗血清を用いた免疫組織化学染色により、成熟の進んだ個体の腺下垂体の各細胞塊のうち、周辺部の細胞の細胞質に免疫陽性反応が認められた(図 2)。

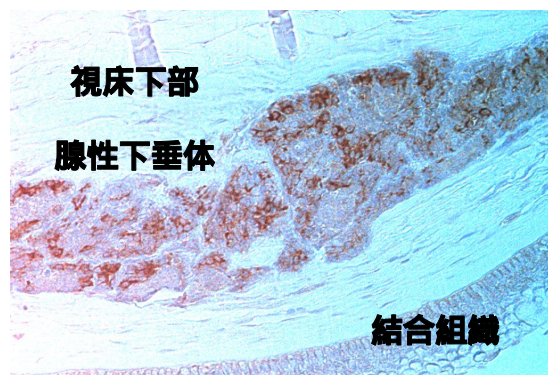


図 2. 成熟個体の下垂体の免疫組織学的観察。下垂体の各細胞塊の周辺部の細胞の細胞室に陽性反応が認められる。

現在、抗体作製に用いた抗原ペプチドを用いた吸収実験により、作出した抗ヌタウナギ GH 抗体の特異性を調べている。また、クローン化したヌタウナギ GH 遺伝子の配列から DIG 標識 cRNA プローブを作製しており、GH 遺伝子の発現部位の組織学的探索を進めることで、ヌタウナギの GH 分子の発現部位とタンパク合成部位の整合性を確認する予定である。さらに、成熟したクロヌタウナギの下垂体では、各細胞塊の大部分の細胞がゴ

ナドトロピン (GTH) を産生していることが知られている (文献 2)。今後、ヌタウナギの下垂体において、GTH を産生している細胞と、抗 GH 抗体に陽性反応を示す細胞の分布の違い、もしくは同一性について、解析したいと考えている。

#### ヌタウナギの GH 分子の機能解析

一般に GH 分子の機能を類推するには、体サイズや成熟度の違いによる GH 分子の発現動態を捉える必要がある。本研究では、体サイズの異なる個体や成熟段階の異なる個体の下垂体を採取し、リアルタイム PCR 法による遺伝子発現定量解析の系を確立した。今後、解析サンプルを遺伝子発現定量解析に供し、ヌタウナギの GH 遺伝子の発現動態を明らかにしたい。また、顎口類においては、下垂体 GH 分子の標的器官として肝臓が知られており、GH 分子が肝臓のインスリン様成長因子 I (IGF-I) の合成を促進し、この因子の作用により体成長が促進される (文献 3)。これまで、大西洋産のヌタウナギにおいては、IGF 分子が同定されている (文献 4)。本研究では、ヌタウナギの下垂体 (GH)-肝臓 (IGF) 機能軸を明らかにするため、ヌタウナギの IGF 分子のクローニングを進め、本種の肝臓から部分塩基配列を同定した。今後、ヌタウナギの天然型 GH の精製、または、組換え型 GH の遺伝子工学的手法による作出を進め、これらのホルモン分子を肝臓の培養系や個体への投与実験系に供し、肝臓の IGF の遺伝子発現変動を解析することで、ヌタウナギの GH の機能評価へ繋げたい。また、ヌタウナギの下垂体の GTH や GH を制御する視床下部因子についても次世代シーケンス解析を進め、分子構造の同定と機能解析を進めたい。

#### 引用文献

1. Osugi T., Uchida K., Nozaki M., Tsutsui K. (2011). Characterization of novel RFamide peptides in the central nervous system of the brown hagfish: isolation, localization, and functional analysis. *Endocrinology*, 152:

4252-4264.

2. Uchida K., Moriyama S. (他 7 名). (2010). Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107: 15832-15837.
3. 川内浩司、高橋明義、森山俊介 (2007). 下垂体ホルモンの多様性“内分泌と生命現象” (長濱嘉孝、井口泰泉編) pp7-39. 培風館、東京.
4. Nagamatsu S., Chan SJ., Falkmer S., Steiner DF. (1991). Evolution of the Insulin Gene Superfamily- Sequence of a preproinsulin-like growth factor cDNA from the Atlantic hagfish. *J. Biol. Chem.* 266(4): 2397-2402.

#### 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)

- Kawajiri M., Uchida K., Chiba H., Moriyama S., Yamahira K. (2015). Variation in the ontogeny of sex steroid levels between latitudinal populations of the medaka. *Zoological Letters*, DOI: 10.1186/s40851-015-0032-1. (Online Published). 【査読有】
- Inokuchi M, Breves JP, Moriyama S., Watanabe S, Kaneko T, Lerner DT, Grau EG, Seale AP. (2015). Prolactin 177, prolactin 188 and extracellular osmolality independently regulate the gene expression of ion transport effectors in gill of Mozambique tilapia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309: R1251-63. 【査読有】
- Yamaguchi Y, Takagi Y, Kuraku S, Moriyama S., Bell JD, Seale AP, Lerner DT, Grau EG, Hyodo S. (2015). Discovery of conventional prolactin from the holocephalan elephant fish, *Callorhinchus milii*. *General and Comparative Endocrinology*, 224: 216-27. 【査読有】
- Nishiyama M., Uchida K., Abe N., Nozaki M. (2014). Molecular cloning of

cytochrome P450 side-chain cleavage and changes in its mRNA expression during gonadal development of brown hagfish, *Paramyxine atami*. *General and Comparative Endocrinology*, Vol. 212: 1 – 9.

【査読有】

Nozaki M., Uchida K., Honda K., Shimotani T., Nishiyama M. (2013). Effects of estradiol or testosterone treatment on expression of gonadotropin subunit mRNAs and proteins in the pituitary of juvenile brown hagfish, *Paramyxine atami*. *General and Comparative Endocrinology*, Vol. 189: 111-118.

【査読有】

Nishiyama M, Chiba H, Uchida K., Shimotani T., Nozaki M.(2013). Relationships between plasma concentrations of sex steroid hormones and gonadal development in the brown hagfish, *Paramyxine atami*. *Zoological Science*, Vol. 30: 967-974. 【査読有】

〔学会発表〕(計 5 件)

Uchida K. Evolutionary origin of a pituitary-gonadal axis in the most primitive vertebrate, hagfish. Annual International Joint Seminar between University of Miyazaki and Pukyong National University. Pukyong National University, Busan, Korea. December 3-4, 2014.

Uchida K., Hyodo S., Watanabe T., Kagawa H. Morphological and molecular approaches on pituitary gland of the cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame*. 7<sup>th</sup> Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. Keelung, Taiwan. March 18-23, 2014

内田勝久 . 最古の脊椎動物の下垂体：その機能と進化を探る . 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会 , “ 海洋生物のさまざまな適応戦略 ” . 東京大学大気海洋研究所 , 2013 年 6 月 21 日 ~ 22 日 .

Uchida K., Nishiyama M., Moriyama S., Nozaki M. Expression of a recombinant glycoprotein hormone and its biological

activities in most primitive vertebrates, hagfish *Paramyxine atami*. 17th International Congress on Comparative Endocrinology (ICCE 2013), Barcelona, Spain. July 15 - 19, 2013.

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 . 宮崎市民プラザ , 2013 年 10 月 24 日 ~ 26 日 .

〔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

内田 勝久 (Katsuhisa Uchida)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号 : 50360508

(2) 研究分担者

森山 俊介 (Shunsuke Moriyama)  
北里大学・海洋生命科学部・教授  
研究者番号 : 50222352

(3) 連携研究者

兵藤 晋 (Susumu Hyodo)  
東京大学・大気海洋研究所・准教授  
研究者番号 : 40222244