

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450401

研究課題名(和文)鳥類下垂体転写因子PREBの生理遺伝学的研究

研究課題名(英文)Physiological and genetical study of bird prolactin regulatory element binding protein

研究代表者

神作 宜男(Kansaku, Norio)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：60333142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では鳥類のプロラクチンプロモーターに結合して発現制御を担うことが推測されているプロラクチン制御領域結合タンパク質(PREB)のクローニング、発現解析を行い発生期および繁殖周期における変動解析をプロラクチン遺伝子の発現との関連性から検討した。また、多型解析を様々な品種や系統において行い就巢性の有無との関連性を検討した。

その結果、プロラクチン遺伝子の発現が上昇する際にはかならずPREBは同時にあるいは先んじて上昇することが確認されるほか、プロラクチンの放出因子であるVIPによる発現誘導も行われることを明らかにした。一方で、就巢性と多型に強い関連性は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Expression of chicken and turkey prolactin regulatory element binding protein in anterior pituitary gland was investigated during embryogenesis and reproductive cycle. Levels of PREB mRNA generally show the similar profile to PRL mRNA. Especially, high level of PREB mRNA was detected during incubation stage. Since high level PRL mRNA was induced by hypothalamic VIP during incubation stage, effects of VIP on mRNA expression of PREB in the anterior pituitary gland of embryo and laying stage were examined. Levels of PREB and PRL mRNAs were not changed by stimulation of VIP in the anterior pituitary gland of embryonic days of 14. However, induced effects of forskolin was observed in the embryonic day 14. On the other hands, stimulatory effects of VIP and forskolin were observed in the anterior pituitary gland of embryonic day 20. This result clearly indicating that effects of VIP mainly regulated by the mRNA levels of VIP receptor in the anterior pituitary gland.

研究分野：応用動物科学

キーワード：下垂体 転写因子 プロラクチン 繁殖周期 就巢

1. 研究開始当初の背景

鳥類においてみられる就巢行動と下垂体ホルモンであるプロラクチンの間に強い関連があることは1930年代より知られていた。ニワトリ及びシチメンチョウのプロラクチンを測定するアッセイ系が確立されて、様々な鳥類の繁殖周期において血中のPRL濃度が測定され、早成性鳥類においては抱卵時に、晩成性鳥類においては育雛初期にプロラクチン濃度が高いことが判明した。さらに、血中プロラクチン濃度が高い時には視床下部におけるVIP含量が高いことも明らかにされ、VIPとプロラクチンには密接な関係があることが判明していた。また家禽種におけるプロラクチン cDNA のクローニング以来、遺伝子発現に関する制御因子の研究が進み、視床下部ペプチドVIPがプロラクチンの生理的放出因子であることが明らかにされた。視床下部に由来するVIPはプロラクチンの放出を制御するだけではなく遺伝子発現も誘起することが判明した。さらには免疫学的な実験によりVIPを不活性化することで抱卵行動や育雛行動を中断させることができるために、就巢行動の主たる視床下部制御因子はVIPであることが明確になった。また、研究代表者らはアヒルのプロラクチン遺伝子のクローニングに成功し、近位プロモーター領域が鳥類においては類似性が高い可能性を示していた。その後シチメンチョウのプロモーター領域にVIP刺激に反応する領域があることが示され、その領域は鳥類において高度に保存されていることが本研究の代表者により明らかにされていた。しかしながら、プロラクチン産生細胞内でVIPによる刺激に反応する領域にどのような転写因子が結合するかについては全く解明されていなかった。そのようなことからプロラクチン産生細胞内における情報伝達、中でも遺伝子発現に直接的に関わる転写因子予測が望まれて、細胞内における情報伝達経路の解明が望まれていた。

2. 研究の目的

鳥類のプロラクチン遺伝子の近位プロモーターに存在するVIP反応領域は早成性鳥類から晩成性鳥類まで共通して有しており、非常に強く保存されている。さらに、この領域に変異が生じるとルシフェラーゼアッセイでは発現が優位に低下することから転写因子が結合することが推測されてきた。また、哺乳類のプロラクチン制御領域結合タンパク質(PREB)のコンセンサス配列は鳥類のVIP反応領域とほぼ同じ配列を有している。従って、本研究ではVIP反応領域に結合する転写因子の候補としてPREBを考え、その発現動態を検討することを目的とした。PREB遺伝子の構造には多くの多型が存在することが過去の研究において判明していることから様々な品種、あるいは系統での多型解析と就巢行動発現の関連性をみることにより、産卵能力の向上を図る上で有用なデータを得ら

れると思われた。以上のことからニワトリの繁殖周期あるいは発生期におけるPREB遺伝子の変動を明らかにするとともに、VIPによりどのような発現変動が見られるかについても検討し、繁殖期に見られる変動と一致するかを検討する。またニワトリ品種あるいは品種内系統を用いて品種間あるいは系統間において遺伝子多型が存在するか、そして多型頻度と就巢性に関連性があるかどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

①ニワトリ胚発生期及び繁殖周期におけるPREB遺伝子の発現変動

ニワトリの中で完全繁殖周期を示すウッケイを14L10Dの光条件下で飼育し、産卵前、産卵期、抱卵期の下垂体を採取し、PREB、プロラクチン及びPit-1の発現を定量した。また、同様に発生胚下垂体における遺伝子変動を定量した。

下垂体を採取後にRNA抽出を行い逆転写をランダムヘキサマーをもちいて行った。その後遺伝子特異的プライマーをもちいてPCRによる増幅を行いGAPDHに対する比率として算出した。

②シチメンチョウの胚発生期における下垂体と睪臓におけるPREB遺伝子発現変動

シチメンチョウの発生胚より下垂体及び睪臓を採取し、下垂体においてはプロラクチン及びPREB遺伝子の変動を定量した。睪臓においては哺乳類において関連性が示されているPREBとインシュリン遺伝子の変動を定量した。組織よりRNAを抽出し、逆転写後に遺伝子特異的プライマーをもちいてPCRによる増幅を行い18Sに対する比率として算出した。

③VIPが下垂体PREB遺伝子発現に及ぼす影響

先の実験で判明した変動をもとに発生胚では14日目及び20日目の下垂体を採取しVIP存在下で培養を行った。また、細胞内でcAMPを上昇させることが判明しているフォルスコリンをもちいて同様の実験を行い、VIPとの違いが存在するかを検討した。成鶏では産卵中の個体にVIPを投与し、PREBとプロラクチンの発現変動を検討した。

④PREB遺伝子の多型解析

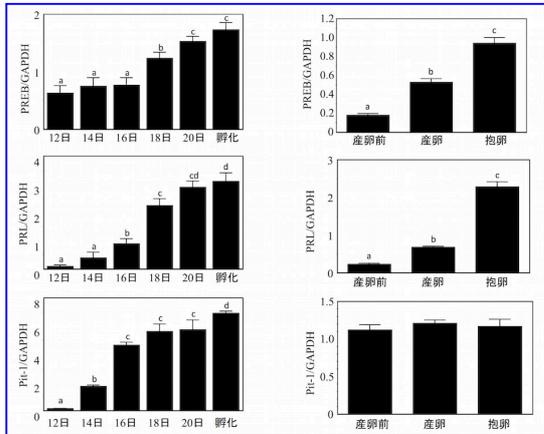
様々な品種及び品種内系統が確立している名古屋コーチンをもちいてエクソン1よりエクソン5、エクソン5よりエクソン9の間でPCRの増幅を行い精製後に配列決定し、多型解析を行った。

4. 研究成果

①ニワトリ胚発生期及び繁殖周期におけるPREB遺伝子の発現変動

ニワトリ発生胚においては転写因子Pit-1の発現上昇が最初にみられ、次にプロラクチン

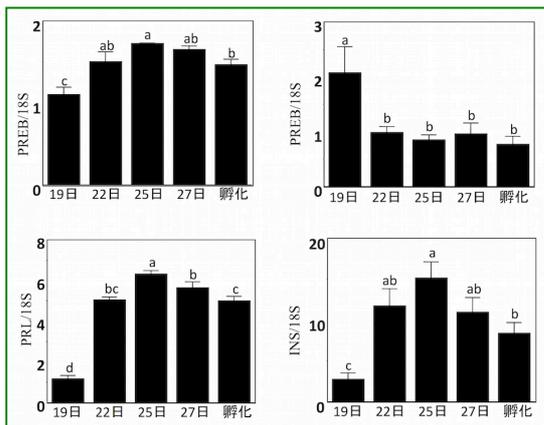
の上昇がみられた。PREB の発現上昇は Pit-1 の上昇が停止した後にみられた。また、繁殖周期では Pit-1 は過去のシチメンチョウと同様に变化しなかったが、PREB はプロラクチンと同様の変動を示した。



以上のことから PREB 遺伝子の発現は標的遺伝子と考えられるプロラクチン遺伝子の発現変動と基本的には同様の変動であることが示され、VIP による制御をプロラクチンだけでなく、PREB も受けている可能性が高いことが示された。

②シチメンチョウの胚発生期における下垂体と臍臓における PREB 遺伝子発現変動

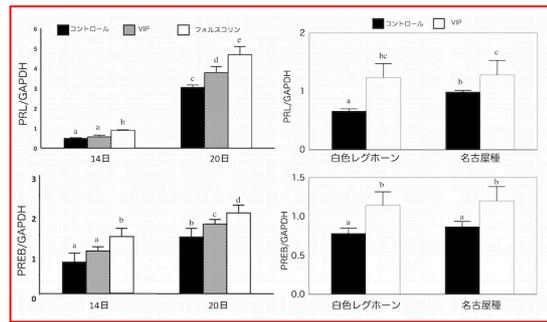
シチメンチョウの下垂体においては孵化 2 日前である 25 日に PREB およびプロラクチン遺伝子ともに発現が最高レベルに達した。一方、臍臓において PREB は発生に伴い低下することが示されたが、インシュリン遺伝子の発現はニワトリにおいて報告されているインシュリン濃度変化と類似して発生が進むに当たって増加する傾向が認められた。



本実験の結果より、PREB 遺伝子は鳥類においても複数の組織で発現していることが確認され、それらの組織における発現は特異的に制御されていることが判明した。

③VIP が下垂体 PREB 遺伝子発現に及ぼす影響
発生胚 14 日の下垂体を VIP 存在下で培養した際にはプロラクチンおよび PREB ともに発現変動は認められなかった。一方、フォルス

コリンを用いて刺激した場合には発現が誘起された。20 日胚では VIP およびフォルスコリンとともに発現誘起効果が認められた。



以上の結果より実験①において認められた PREB 遺伝子の発現変動は視床下部由来に VIP により誘起されている可能性が非常に高いことが示され、抱卵中において認められる高いプロラクチン遺伝子の発現は VIP の直接的な刺激とともに PREB を介した転写制御によって行われている可能性が高いことが示された。また、白色レグホーンと名古屋種で同じ反応が認められたことから、就巢性の有無はプロラクチンや PREB 遺伝子ではなく、視床下部などの下垂体より上流において発現する遺伝子の変異によっている可能性が高いことを示した。

④PREB 遺伝子の多型解析

本研究はロードアイランドレッド、烏骨鶏、岐阜地鶏、Geline (フランスの就巢性をもつ地鶏)、白色レグホーンおよび名古屋種の様々な系統 (肉用系統、卵用系統、速羽系統、遅羽系統) を用いた。就巢性を示す烏骨鶏や Geline においては様々な多型が検出された。また、選抜がほとんど行われていない岐阜地鶏でも同様に複数の多型が検出された。一方、白色レグホーンではほとんど検出されなかった。しかしながら白色レグホーンやロードアイランドレッドなどで検出された配列は烏骨鶏や Geline においても多く存在することが示され、就巢性との関連性は認められず、実験③の結果と矛盾しない結果が示された。

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 7 件)

- ① Motohashi M, Inomata T, Takahashi H, Ichihara N, Kansaku N, Ikegami M, Asari M, Mutou T, Wakui S. Three-Dimensional Study of the Terminal Portion in Sprague-Dawley Rat Ejaculatory Ducts. *Anat Histol Embryol.* 2015 Aug 13. doi: 10.1111/ahc.12196.
- ② Hiyama G, Kansaku N, Tanaka T, Wakui S, Zadworny D. Characterization of Chicken Prolactin Regulatory Element

Binding Protein and its Expression in the Anterior Pituitary Gland during Embryogenesis and Different Reproductive Stages. Journal of Poultry Science, 52:42-51. 2015.

- ③ Motohashi M, Wempe MF, Mutou T, Takahashi H, Kansaku N, Ikegami M, Inomata T, Asari M, Wakui S. Male rats exposed in utero to di(n-butyl) phthalate: Age-related changes in Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and testicular testosterone-biosynthesis enzymes/proteins. *Reprod Toxicol.* 2016 Jan;59:139-46. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.12.001.
- ④ Hiyama G, Kansaku N, Wakui S, McQuaid R, Zadworny D. Characterization and Expression of Turkey Prolactin Regulatory Element Binding in the Anterior Pituitary Gland and Pancreas During Embryogenesis. *Journal of Poultry Science*, 53:67-75. 2016.
- ⑤ Hiyama G, Mizushima S, Matsuzaki M, Ichikawa Y, Kansaku N, Sasanami T. Expression of Prolactin Receptor on the Surface of Quail Spermatozoa. *Journal of Poultry Science*, 53:. 2016.
- ⑥ Motohashi M, Wempe MF, Mutou T, Okayama Y, Kansaku N, Takahashi H, Ikegami M, Asari M, Wakui S. In utero-exposed di(n-butyl) phthalate induce dose dependent, age-related changes of morphology and testosterone-biosynthesis enzymes/associated proteins of Leydig cell mitochondria in rats. *J Toxicol Sci.* 2016;41:195-206. doi: 10.2131/jts.41.195.
- ⑦ Kansaku N, Tobari Y, Hiyama G, Wakui S, Minoguchi N, Numata M, Kino K, Zadworny D. Effects of vasoactive intestinal polypeptide and forskolin on mRNA expression of prolactin and prolactin regulatory element-binding protein in the anterior pituitary gland of chicken embryo and laying hens. *Journal of Poultry Science*, accepted.

[学会発表] (計 6件)

- ① 神作宜男, 戸田美紀 イヌ Y 染色体特異的配列の多様性日本畜産学会第 117 回大会 新潟大学
- ② 川原玲香, 神作宜男, 河野友宏, 桑山岳人 比較ゲノム解析によるニワトリの就巢行動発現制御に関わる変異の探索日本畜産学会第 117 回大会 新潟大学
- ③ ニワトリ下垂体における Prolactin Regulatory Element Binding Protein の発現 神作宜男, 檜山源, 田中智夫,

David Zadworny 日本家禽学会 2014 年春季大会 筑波大学

- ④ 下垂体におけるプロラクチン選択的スプライシングアイソフォームの発現 神作宜男, 梅田有里那, 滝沢達也 日本畜産学会第 119 回大会 宇都宮大学 2015 年
- ⑤ 川原玲香, 神作宜男, 河野友宏, 桑山岳人 品種間の比較ゲノム解析によるニワトリの就巢行動発現制御に関わる変異の探索と絞り込み 日本畜産学会第 119 回大会 宇都宮大学 2015 年
- ⑥ ニワトリ胚下垂体における PREB 遺伝子の発現 神作宜男, 戸張靖子, 檜山源, David Zadworny 日本家禽学会 2016 年春季大会 日本獣医生命科学大学

[図書] (計 1 件)

ニワトリの科学 p108~115 朝倉書店 2014 年 古瀬充宏他 24 人分担執筆

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

神作 宜男 (Kansaku Norio)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号 : 60333142

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :