

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840115

研究課題名(和文) 恒温動物への進化の基盤としての視床下部 下垂体調節機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of hypothalamus-pituitary system as a basis of vertebrate's evolution

研究代表者

岡田 令子 (OKADA, Reiko)

静岡大学・理学部・講師

研究者番号：50386554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の体温維持に関わる視床下部-下垂体-甲状腺(HPT)系を調節する視床下部因子(甲状腺刺激ホルモン放出因子：TRH)のmRNA発現が、両生類においても哺乳類と同様に低温刺激により増大することを明らかにした。しかし、両生類においてTRHはHPT系の調節にはほとんど関わらず、プロラクチン(PRL)の放出因子として機能する。TRH-PRL系が両生類の低温環境適応に果たす役割、および視床下部-下垂体調節系の両生類・哺乳類間の違いが変温動物から恒温動物への進化とどのように関わっているのかを考察した。

研究成果の概要(英文)：Hypothalamus-pituitary-thyroid gland (HPT) axis plays an important role to maintain body temperature in mammals. Thyrotropin-releasing factor (TRH) is a major factor that enhances the release of thyroid-stimulating hormone (TSH) from the pituitary in mammals, whereas it mainly acts as a prolactin-releasing factor in amphibians. In this study, it was revealed that expression of TRH precursor mRNA in the frog hypothalamus was increased by cold stimulation as in mammals. The discrepancy in the role of hypothalamic factors between amphibians and mammals is discussed in relation to metamorphosis and thermoregulation.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：視床下部 下垂体 両生類

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の体温維持には、視床下部 - 下垂体 - 甲状腺 (HPT) 系による調節が重要な役割を果たしている。すなわち、体温の低下を感じると視床下部における甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) の合成が高まり、TRH の刺激により脳下垂体からの甲状腺刺激ホルモン (TSH) が放出される。TSH は甲状腺に作用し、熱代謝促進作用を有する甲状腺ホルモンの分泌を促進する。一方、変温動物である両生類では TRH に代わり副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) が強い TSH 放出活性を有すること<sup>1</sup>、TRH はプロラクチン (PRL) の主要な放出因子として機能すること<sup>2</sup>がわかっている。脊椎動物が変温動物から恒温動物への進化を遂げた過程を解明するためには、視床下部 - 下垂体調節系について哺乳類 (恒温動物) と両生類 (変温動物) で大きな差異が存在することの意義を明らかにする必要があると考えられた。また、体内で熱を生み出すことができない両生類にとって重要な、寒冷環境に対する順応および凍結耐性の調節機構について十分な解明がなされているとは言えなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、変温動物から恒温動物への移行が両生類においてどこまで準備され、いかなる内分泌的要因が両生類をして変温動物にとどまらせているのかを明らかにすることを目的として行った。また、無尾両生類の低温環境適応および凍結耐性に関わる因子と、その調節機構を解明することも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) カエル視床下部ホルモンの mRNA 発現が環境温度の影響を受けるかどうかを明らかにするため、低温で飼育したウシガエルおよびネツタイツメガエルの脳を用いて定量的 PCR による TRH および CRF mRNA 発現レベルの解析を行った。ウシガエル TRH に関しては、前駆体 cDNA が得られていなかったため、ウシガエル脳より TRH 前駆体をコードする cDNA をクローニングした。また、TSH  $\beta$  サブユニット、PRL の cDNA を用いて同様に下垂体におけるこれらのホルモンの mRNA 発現に及ぼす低温の影響を調べた。

(2) 日本に生息するカエルの寒冷環境に対する適応や、凍結耐性の調節機構はこれまで研究されていなかった。この解明を目指し、ニホンアマガエルを用いて実験を行った。アマガエルが凍結耐性を有するかどうかを明らかにするため、冬眠中 (1 - 3 月) の個体を  $-4^{\circ}\text{C}$  で 6 時間凍結し、その後解凍した場合の生存率を調べた。また、活動期 (5 月)、冬眠中、凍結、解凍の 4 群につき、体内のグリセロールおよびグルコースの濃度を測定した。さらに、グリセロール輸送体であるアクアポリン 9 (AQP-h9) をコードする cDNA

をアマガエル肝臓からクローニングし、それぞれの実験群の肝臓における mRNA 発現を比較した。

### 4. 研究成果

(1) ウシガエル TRH 前駆体 mRNA の発現を測定するために、はじめに TRH 前駆体をコードする cDNA のクローニングを行った。得られた cDNA から推定される TRH 前駆体アミノ酸配列中には、7 回のプレプロ TRH 配列が含まれていた。プレプロ TRH 配列の繰り返し回数は、脊椎動物の種によって異なる。推定されるアミノ酸配列を他の脊椎動物の TRH 前駆体と比較すると、プレプロ TRH 領域に関しては高度に保存されていたが、それ以外の箇所の保存性は低く、全体的な類似性は 30 - 50% であった。本 cDNA を用いて RT-PCR を行った結果、TRH 前駆体 mRNA は全身のほとんど全ての器官に発現していること、中でも脳および背側皮膚における発現が高レベルであることがわかった。

次に、得られた cDNA を用いて定量的 PCR によりウシガエル視床下部における TRH 前駆体 mRNA の発現を調べた。夏期に採集したウシガエル成体を  $4^{\circ}\text{C}$  で飼育し、継時的に TRH 前駆体 mRNA の発現を測定して常温 ( $25^{\circ}\text{C}$ ) で飼育した個体と比較すると、低温曝露後 24 時間以内に TRH 前駆体 mRNA 発現が上昇することがわかった。一方、この実験条件では、視床下部における CRF mRNA 発現には有意な変動は認められなかった。さらに、脳下垂体における PRL mRNA の発現が上昇すること、TSH  $\beta$  サブユニットの mRNA の発現レベルには差が見られないことが明らかになった。ネツタイツメガエルを低温 ( $10^{\circ}\text{C}$ ) で飼育した場合にも、ウシガエルの場合と同様に、常温飼育群に比べて視床下部中の TRH 前駆体 mRNA の発現増大が認められた。一方、CRF mRNA 発現には変化が見られなかった。

これらの結果から、哺乳類で見られる低温刺激による TRH 発現上昇の機構は両生類においても既に備わっていることが示唆された。しかし、両生類において TRH は下垂体からの TSH の分泌増大を介した甲状腺ホルモンの分泌調節には結びつかず、もっぱら PRL の分泌促進を司る。PRL のはたらきとして両生類でもっとも特徴的なものは、成長の促進と変態の抑制である。低温刺激によるカエルの TRH 発現上昇は、下垂体からの PRL 分泌を引き起こす可能性が考えられる。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 PRL によって変態をせずに幼生として成長を続ける方が、変態後の食性 (低温下では餌となる小動物が不足する) や、運動能力に関連する体のサイズなどの点で生存に有利であるからである。

両生類は体内で熱を産生する機構を持たない。それに加えて、低温で発現増大する因子 (TRH) が視床下部 - 甲状腺系に大きく影響しないことも両生類が変温動物にとどまって

いる要因の一つであると考えられる。換言すれば、1) 体内での熱産生機構を備える、2) 熱産生機構を促進的に調節する甲状腺ホルモンの分泌を、低温により発現増大する因子が促進的に調節する、の両方が揃うことが恒温動物の出現のための条件であったと言える。

(2) ニホンアマガエルは亜寒帯気候地域である北海道を含む日本列島のほぼ全域に分布している。しかし、ニホンアマガエルの低温環境順応や凍結耐性の調節に関する研究はこれまでなされていなかった。本研究では、まず冬眠中のアマガエルを $-4^{\circ}\text{C}$ で6時間凍結した後解凍した場合の生存率を調べた。その結果、80%以上の個体の生存が確認され、ニホンアマガエルが凍結耐性を有することが明らかになった。

5月に採集した活動群、秋季に採集したのち自然環境下で飼育した冬眠群、冬眠中のカエルを上記の条件で凍結した凍結群、および凍結後に室温で1時間解凍した解凍群のカエルについて、様々な検討を行った。血中および組織中のグルコースおよびグリセロールの濃度を測定したところ、凍結・解凍によりいずれも冬眠群に比べて上昇することがわかった。活動群と冬眠群の間では差が見られなかった。組織中のグルコース含量については、肝臓、骨格筋、および下腹部皮膚において凍結または解凍群での増大が認められた。グリセロール含量は、骨格筋および腎臓において凍結または解凍群で増大した。

アマガエルの凍結耐性にはグリセロールが関与している可能性が浮上したので、耐凍におけるグリセロールの調節機構の解明を目指した。そのための第一歩として、アマガエル肝臓よりグリセロール輸送に関わる膜タンパク質であるアクアグリセロポリン9 (AQP9) をコードするcDNAをクローニングした。得られたcDNAより推定されるアミノ酸配列を他の脊椎動物のAQP9と比較したところ、50~60%保存されていた。また、RT-PCRにより、アマガエルAQP9は全身のほとんどすべての器官で発現していることがわかった。その内、胃、肝臓、および下腹部皮膚において高レベルの発現が認められた。さらに、ツメガエル卵母細胞を用いたスウェリング・アッセイにより、アマガエルAQP9が水およびグリセロールの透過性を有することを明らかにした。

アマガエルAQP9 cDNAより推定されるアミノ酸配列に基づき抗原ペプチドを合成し、AQP9を特異的に認識するウサギ抗体を作製した。本抗体を用いた免疫組織化学により、活動群の肝臓ではAQP9免疫陽性シグナルがほとんど検出されないのに対し、冬眠群および凍結群では肝臓中の赤血球においてシグナル強度が増強し、解凍群ではシグナルがほぼ消失することがわかった。一方、骨格筋においては活動期にはAQP9免疫陽性シグナルがほとんど検出されず、冬眠群で弱いシグナルが筋細胞の細胞質内に観察された。陽性シグ

ナルの強度は凍結群で著しく増加し、解凍群では減少した。

これらの結果から、ニホンアマガエルは凍結耐性を有し、グリセロールおよびグルコースの両方を耐凍物質として利用していることが示唆された。また、AQP9が凍結時に赤血球および骨格筋で発現が高まり、水および/またはグリセロールの輸送に関わることでアマガエルの耐凍機構に寄与している可能性が見出された。

低温環境

#### <参考文献>

1. Okada, R. *et al.* Neuroendocrine regulation of thyroid-stimulating hormone secretion in amphibians. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1163**, 262–270 (2009).
2. Nakajima, K. *et al.* Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is the major prolactin-releasing factor in the bullfrog hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.* **89**, 11–16 (1993).

#### 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)

岡田令子、鈴木賢一・2016・両生類の変態：分子から個体レベルの制御・生物科学(日本生物科学者協会編集)・67, 146–153. 査読有.

Tamaoki, K., Okada, R., Ishihara, A., Shiojiri, N., Mochizuki, K., Goda, T., Yamauchi, K., 2016. Morphological, biochemical, transcriptional and epigenetic responses to fasting and refeeding in intestine of *Xenopus laevis*. *Cell Biosci* 6, 2. doi:10.1186/s13578-016-0067-9. 査読有.

Hirota, A., Takiya, Y., Sakamoto, J., Shiojiri, N., Suzuki, M., Tanaka, S., Okada, R., 2015. Molecular cloning of cDNA encoding an aquaglyceroporin, AQP-h9, in the Japanese tree frog, *Hyla japonica*: possible roles of aqp-h9 in freeze tolerance. *Zool. Sci.* 32, 296–306. doi:10.2108/zs140246. 査読有.

Suzuki, M., Shibata, Y., Ogushi, Y., Okada, R., 2015. Molecular machinery for vasotocin-dependent transepithelial water movement in amphibians: aquaporins and evolution. *Biol. Bull.* 229, 109–119. 査読有.

Shibata, Y., Katayama, I., Nakakura, T., Ogushi, Y., Okada, R., Tanaka, S., Suzuki, M., 2015. Molecular and cellular characterization of urinary bladder-type aquaporin in *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 222, 11–19. doi:10.1016/j.ygcen.2014.09.001. 査読有.

Saitoh, Y., Ogushi, Y., Shibata, Y., Okada, R.,

Tanaka, S., Suzuki, M., 2014. Novel vasotocin-regulated aquaporins expressed in the ventral skin of semiaquatic anuran amphibians: evolution of cutaneous water-absorbing mechanisms. *Endocrinology* 155, 2166–2177. doi:10.1210/en.2013-1928. 査読有 .

Shibata, Y., Sano, T., Tsuchiya, N., Okada, R., Mochida, H., Suzuki, M., Tanaka, S., 2014. Gene expression and localization of two types of AQP5 in *Xenopus tropicalis* under hydration and dehydration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R44–R56. doi:10.1152/ajpregu.00186.2013. 査読有 .

〔学会発表〕(計19件)

Regulation: Hypothalamic control of the release of thyrotropin and corticotropin in amphibians. Okada, R. 第40回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第37会大会合同大会 シンポジウム “Sensation, Movement, Learning, and Regulation”, アステールプラザ(広島県広島市), 2015.12.11–13. 【招待講演】.

両生類から見た脊椎動物間における下垂体調節因子の使いまわし. 岡田令子. 日本動物学会第86回大会シンポジウム「両生類はワンダーランド(4)」, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市), 2015.9.17–19. 【招待講演】.

ニホンアマガエル凍結時における GLUT の発現 阿達駿, 滝谷優, 廣田敦司, 鈴木雅一, 岡田令子 日本動物学会第86回大会 朱鷺メッセ(新潟県新潟市), 2015.9.17–19.

ウシガエル下垂体前葉における POMC mRNA の発現に及ぼす AVT の影響 四元優太郎, 山本和俊, 菊山榮, 岡田令子 平成26年度日本動物学会中部支部大会 金沢, 2014.11.22–24.

Aquaporins involve in freeze-tolerance in hibernating Japanese green tree frog, *Hyla japonica*. Hirota, A., Takiya, Y., Suzuki, M., Shiojiri, N., Tanaka, S., Okada, R. 8<sup>th</sup> International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市). 2014.11.7–9.

Elevation of thyrotropin-releasing hormone precursor mRNA expression in the amphibian brain in response to cold temperature. Kowata, N., Nakano, M., Kobayashi, T., Hasunuma, I., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Okada, R. 8<sup>th</sup> International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市). 2014.11.7–9.

Molecular evolution and physiological roles of aquaporins expressed in anuran osmoregulatory organs. Suzuki, M., Shibata, Y., Okada, R. 8<sup>th</sup> International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市). 2014.11.7–9.

Arginine vasotocin receptors in the amphibian brain and pituitary. Hasunuma, I., Toyoda, F., Okada, R., Yamamoto, K., Iwamuro, S., Kikuyama, S. 8<sup>th</sup> International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市). 2014.11.7–9.

Angiogenesis in the pars intermedia of the pituitary alters its structure and function. Nakakura, T., Unno, K., Okada, R., Suzuki, M., Jansen, E.J.R., Martens, G.J.M., Kikuyama, S., Tanaka, S. 8<sup>th</sup> International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市). 2014.11.7–9.

Spatial and temporal expression of aquaporins, AQP2 and AQP3, in the kidney during metamorphosis of the tree frog, *Hyla japonica*. Ueno, T., Shibata, Y., Sano, H., Yamashita, S., Okada, R., Suzuki, M. 8<sup>th</sup> International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市). 2014.11.7–9.

凍結時のアマガエル肝臓における GLUT2 の発現 岡田令子, 廣田敦司, 滝谷優, 鈴木雅一, 田中滋康 日本動物学会第85回大会 東北大学(宮城県仙台市), 2014.9.11–13.

アマガエル凍結時のグリセロールおよびアクアグリセロポリンの機能 廣田敦司, 滝谷優, 鈴木雅一, 塩尻信義, 田中滋康, 岡田令子 日本動物学会第85回大会 東北大学(宮城県仙台市), 2014.9.11–13.

有尾両生類における腹側皮膚型アクアポリン(AQP2S)の機能と分子進化 柴田侑毅, Hillyard, S.D., 岡田令子, 田中滋康, 鈴木雅一, 長井孝紀 日本動物学会第85回大会 東北大学(宮城県仙台市), 2014.9.11–13.

アフリカツメガエルを用いた消化管の絶食/再摂食に対する応答の検討 玉置啓二, 岡田令子, 石原顕紀, 望月和樹, 山内清志 日本動物学会第85回大会 東北大学(宮城県仙台市), 2014.9.11–13.

有尾両生類に発現する両生類特異的な AVT 調節性アクアポリン(AQP)の機能と分子進化 柴田侑毅, Stanley D Hillyard, 岡田令子, 田中滋康, 鈴木雅一, 長井孝紀 平成25年度日本動物学会

中部支部大会 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市), 2014.3.8-9.

ウシガエルTRH前駆体mRNA発現に及ぼす環境温度の影響 木幡奈都乃, 中野真樹, 小林哲也, 蓮沼至, 山本和俊, 菊山榮, 岡田令子 第38回日本比較内分泌学会大会 宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市), 2013.10.25-26.

ネッタイツメガルの腹側皮膚型アクアポリン(AQP)を介した極限水環境への順応機構 柴田侑毅, 佐野貴大, 岡田令子, 鈴木雅一, 田中滋康 日本動物学会第84回大会 岡山大学(岡山県岡山市), 2013.9.26-29.

ニホンアマガエルの変態過程におけるアクアポリンの発現解析 山下詩織, 佐野晴奈, 柴田侑毅, 岡田令子, 鈴木雅一 日本動物学会第84回大会 岡山大学(岡山県岡山市), 2013.9.26-29.

Molecular evolution and function of the orthologue of mammalian aquaporin 5 in anuran and urodele amphibians. Shibata, Y., Hillyard, S.D., Suzuki, M., Okada, R., Nagai, T., Tanaka, S. 17<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology, Barcelona (Spain), 2013.7.15-19.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡田 令子 (OKADA, Reiko)

静岡大学・理学部・講師

研究者番号: 50386554

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし