



# 日本下垂体研究会誌

2018年3月26日 発行

## 本号の内容

1. 論文 II 「キンギョにおけるソマトラクチンの分泌制御と生理機能に関する研究」  
松田 恒平 (富山大学)
2. 短報 - 1 「マウス下垂体由来の TtT/GF 細胞における TGF $\beta$  の作用 : SILAC 解析法を用いたタンパク質の網羅的な比較定量解析」  
磯和 幸延 (明治大学)
3. 短報 - 2 「メダカの鰓におけるバソトシン V2a 受容体と AQP3 の機能連関の可能性」  
稲垣 祐香 (富山大学)
4. 短報 - 3 「ヒト妊娠免疫モデルとしての妊娠ヒト化マウスの作製」  
大野 裕介 (東海大学)
5. 短報 - 4 「ゼブラフィッシュ OGR1, GPR4 の金属による応答解析」  
武者 詩織 (明治大学)
6. 短報 - 5 「ACTH 産生細胞株における GPHR の機能解析」  
村上 奨 (明治大学)
7. 第 32 回学術集会報告 輿水 崇鏡 (自治医科大学)

## 事務局

北里大学海洋生命科学部  
〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1  
事務局長 高橋 明義  
e-mail akiyoshi@kitasato-u.ac.jp

## 日本下垂体研究会

<http://www.jichi.ac.jp/jspr>

## 論文Ⅱ

## キンギョにおけるソマトラクチンの分泌制御と生理機能に関する研究

<sup>1</sup>富山大学大学院理工学研究部（理学）、<sup>2</sup>自治医科大学医学部解剖学講座（組織学部門）松田恒平<sup>1</sup>、東 森生<sup>1,2</sup>、浜口晃吉<sup>1</sup>、南 和希<sup>1</sup>

kmatsuda@sci.u-toyama.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.5, 1-9, 2018)

## 1. はじめに

脊椎動物の中で最も多数の種を有する硬骨魚類（条鰭類・肉鰭類）は、非常に多様な水環境に適応し、繁栄している一大グループである。硬骨魚類では神経系と種々の内分泌系が適切に機能することによって様々な水環境に応答し適応することができる。硬骨魚類の下垂体は、他の脊椎動物と同様に、複数のペプチド・タンパク質ホルモンを産生・分泌し、生体の内分泌機能を調節する代表的な器官の1つである。興味深いことに、硬骨魚類の下垂体における際立った特徴として、正中隆起部が未発達であり、また、神経性下垂体が腺性下垂体主部および中葉部領域に深く侵入するといった組織学的な構造が挙げられる。そのため、視床下部に由来する下垂体調節ニューロンはその軸索を神経性下垂体に投射して、直接的に腺性下垂体細胞を支配すると考えられている。魚類から哺乳類に至る脊椎動物に共通して、腺性下垂体には成長ホルモン（GH）、プロラクチン（PRL）、生殖腺刺激ホルモン（GTH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）および $\alpha$ -黒色素胞刺激ホルモン（ $\alpha$ -MSH）を合成・分泌するそれぞれの産生細胞が存在する。硬骨魚類において、GHは個体の成長を促すのみならず、海水適応（余剰イオンの排出促進）にも関与する。一方、PRLは淡水適応（イオンの保持）の制御に重要なホルモンである。しかしながら、両ホルモンの一次構造や遺伝子構成は類似しており、共通祖先遺伝子の重複により生じたパラログであると考えられている。本論文では、近年になって見出されたもう一つのGH/PRLパラログである腺性下垂体ホルモンのソマトラクチン（SL）に関する研究成果について報告する。

## 2. SL研究の背景と目的

SLは1991年に川内浩司（第1回日本下垂体研究会吉村賞受賞）らのグループによってタイセイヨウタラ（*Gadus morhua*）の下垂体より発見された[1]。SLはその一次構造や遺伝子構成

の類似性からGH/PRLと共通のホルモンファミリーに属し、共通祖先遺伝子の遺伝子重複により獲得されたことが示唆されている。これまでにSLは複数種の条鰭類と肉鰭類において同定されているが、無顎類や軟骨魚類、四足類では見出されていない。遺伝子構成のシntenニー解析により、SLは四足類においてはゲノム上より欠損していることが示され、脊椎動物の陸上適応の過程で失われたことが示唆されている。一方、GHとPRLは魚類から四足類に至る全ての脊椎動物群で見出されている。また、GHとPRL産生細胞は下垂体主葉の吻側部と基部にそれぞれ島状に局在するのに対し、SL産生細胞は下垂体中葉に散在する。加えて、多くの硬骨魚類において、SLはN型糖鎖修飾部位を有し、組織切片においてSL産生細胞はperiodic acid-Schiff（PAS）陽性として観察される。これらことはSLが組織学的および生化学的にGHやPRLとは異なるホルモンであり、脊椎動物、特に硬骨魚類の進化過程において機能的に分化した可能性を示している。SLの発見以降、様々な魚種を対象として生理機能解析が行われ、SLは生殖調節、ステロイド合成、ストレス応答、体色調節、免疫機能、エネルギー代謝、イオン輸送および酸-塩基平衡と多様な生理機能を有する可能性が報告されている。近年、ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）を用いた解析により、2つのSL分子種（SL- $\alpha$ とSL- $\beta$ ）の存在が報告された[2]。脊椎動物は、その進化過程において、脊椎動物の共通祖先（first-round, 1R）、有顎類の共通祖先（second-round, 2R）および真骨類の共通祖先（third-round, 3R）でそれぞれ一回の全ゲノム重複（whole genome duplication, WGD）を経験したことが示唆されている。SL- $\alpha$ とSL- $\beta$ はこの真骨類特有の3R-WGDにより獲得されたことが、ゼブラフィッシュ、メダカ（*Oryzias latipes*）およびトラフグ（*Takifugu rubripes*）のゲノム情報を用いて行われたシntenニー解析により示されている。興味深いことに、SL- $\alpha$ は調べられた全ての魚種に存在するのに対し、SL- $\beta$ はコイ科やサケ科、ナマズ

(*Ictalurus punctatus*)、ウナギ (*Anguilla Anguilla*) などの一部の魚種でのみ同定されている。また、メダカやフグのゲノム上に SL- $\beta$  遺伝子を見出せないことから、SL- $\beta$  は真骨類の多様化に伴い失われたと考えられている。一方、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  を有する魚種の存在は、各ホルモンの生理機能が分化し、保存されてきたか、あるいは SL- $\beta$  の機能が退化的になったことを推測させる。しかしながら、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の生理機能の異同に関する報告はない。SL の生理機能解析が行われる中で、下垂体における SL の遺伝子発現や分泌の調節に関わる因子の同定も進められてきた。これまでに、下垂体における SL の遺伝子発現や分泌は様々な生理的因子

(視床下部因子、性ステロイドおよびインスリン様成長因子) により制御されることが報告されている。しかしながら、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  を明確に識別し、比較した解析は少なく、これらのホルモン間での遺伝子発現や分泌の制御機構の差異は見出されていない。SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  が機能的に分化していると仮定すると、各ホルモン産生細胞や遺伝子発現、分泌制御機構に差異が生じたことに起因するという仮説が立てられる。真骨類特有の 3R-WGD は肉鰭類と条鰭類が分岐した後に起きたと推定されていることから、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  は 1R-WGD および 2R-WGD から比較して最近、獲得された遺伝子であると考えられる。遺伝子重複により生じた多数の遺伝子は、脊椎動物に固有な形態的、生理的、生態的および行動的形質の進化に寄与してきたと考えられている。従って、GH/PRL ファミリーに属する SL の 2 分子種の機能分化の可能性を見出すことは、硬骨魚類における SL の生理機能解析へと貢献するのみならず、遺伝子重複と新規機能遺伝子の獲得を考察する上でも興味深い重要な知見となる。そこで、本研究では、真骨類における SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の生理機能の分化を明らかにすることを目的として、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  両方

を有する魚種における各ホルモン分子の同定と産生細胞を特徴付け、それらの遺伝子発現や分泌、細胞の活性化に及ぼす視床下部因子や外部環境要因の影響を探った。また、組換え SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  を作製して、体色、特に鱗における黒色素胞の色素顆粒の凝集あるいは拡散に及ぼす組換え SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の影響を調べ、また、SL 受容体候補遺伝子の同定を行った。実験材料には、真骨類の中でも生理学的知見が豊富であり、特に、下垂体初代培養細胞を用いた実験系が確立されていることが利点であるキンギョ (*Carassius auratus*) を用いた。

### 3. SL- $\alpha$ と SL- $\beta$ の特徴付け

前述のとおり、SL は、その一次構造の類似性から GH/PRL ファミリーに属する。GH や PRL が単純タンパク質であるのに対し、SL はそのアミノ酸配列中に N 型糖鎖修飾部位を有する糖タンパク質として報告された。一方で、組織化学的観察やアミノ酸配列の解析から、魚種によっては糖鎖修飾されない SL が存在することも示唆されている。真骨魚類の進化過程において、早期に分岐したコイ目に属するキンギョは SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  を有することが示唆されており、それらの cDNA 配列が明らかにされている (GenBank accession number, SL- $\alpha$ : EU58712.1、SL- $\beta$ : U72940.1)。SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の両方を有する魚種において、各ホルモンの機能分化の可能性を考察する上で重要な知見となりうると考えられる。しかしながら、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の比較解析の多くは、一次構造の比較や系統学的解析が主であり、それらの生化学的特徴や産生細胞の局在を比較した報告は少ない。そこで、キンギョ SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の特徴付けを目的として、各ホルモンの一次構造を他魚種と比較するとともに、各ホルモンの三次元構造モデルを作製し、立体構造の比較を試みた。データベースに公開されている cDNA 配列より推定されるキンギョ SL-

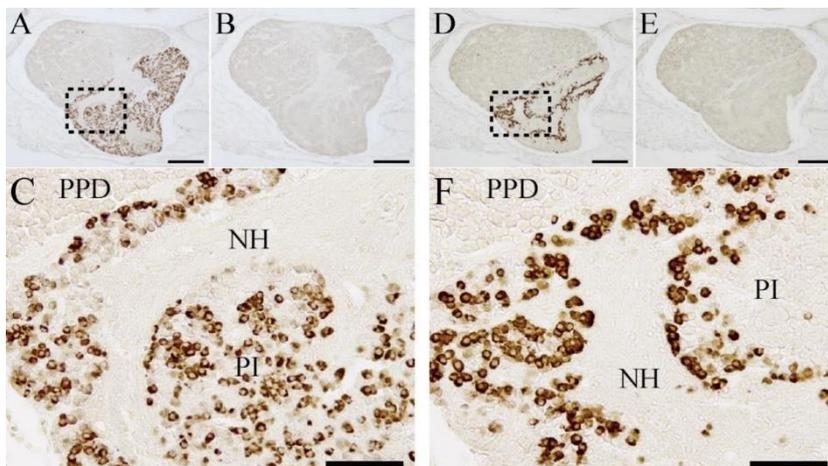


図 1. キンギョ下垂体における SL- $\alpha$  (A, C) および SL- $\beta$  (D, F) 免疫陽性細胞の分布  
SL- $\alpha$  産生細胞は下垂体中葉全体に散在し、SL- $\beta$  産生細胞は中葉に索状、島状に存在する。(B, E) は抗血清吸収によるネガティブコントロール。NH, 神経葉; PI, 中葉; PPD, 主葉基部。Bars 200  $\mu$ m (A, B, D, E) 50  $\mu$ m (C, F)

$\alpha$  および SL- $\beta$  の一次構造と他魚種の SL の一次構造を比較した。近隣結合法により作製した分子系統樹より、キンギョ SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  はそれぞれの分子種のクレードに属することが示された。キンギョ SL- $\alpha$  は他魚種の SL- $\alpha$  においても保存されている7つのシステイン (Cys) を有し、N型糖鎖修飾部位が存在した。一方、キンギョ SL- $\beta$  はウナギ以外の魚種と同様に、第3の Cys を欠いており、N型糖鎖修飾部位も存在しなかった。また、キンギョ SL- $\alpha$  の一次構造を他魚種の SL- $\alpha$  の一次構造と比較したところ、64~84.2%の相同性を示した。キンギョ SL- $\beta$  の一次構造を他魚種の SL- $\beta$  の一次構造と比較したところ、41.2~76.0%の相同性を示した。さらに、予想されるキンギョ SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の三次元構造モデルを構築し、比較したところ、4つの  $\alpha$ -ヘリックス (H1-H4) 構造を有することが見出された。そのうち、SL- $\alpha$  の H1 は SL- $\beta$  のものと比べて短く、一方で H2 は長く、また、SL- $\beta$  においては H2 と H3 の間に  $\beta$ -シート構造を有することも見出された。キンギョ SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の一次構造の相同性は 44.3%であるが、 $\alpha$ -ヘリックス構造を構成する部分の配列の保存性は高いことが示された。

#### 4. SL- $\alpha$ 産生細胞ならびに SL- $\beta$ 産生細胞の特徴付け

SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の生化学的解析および各ホルモン産生細胞の特徴付けを行うため、推定される一次構造をもとに、キンギョ SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  のそれぞれを特異的に認識する抗血清を作製した。作製した抗血清を用いて、キンギョ下垂体における SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の生化学的特徴、特に糖鎖修飾の有無を解析した。さらに、免疫組織化学的手法により、キンギョ下垂体における SL- $\alpha$  免疫陽性反応と SL- $\beta$  免疫陽性反応の分布を精査した。GH/PRL ファミリーのホルモンや  $\alpha$ -MSH の各免疫陽性反応の分布と比較し、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の各産生細胞の特徴付けを行った。また、免疫陽性細胞を用いたシングルセル PCR により、免疫陽性細胞において産生される SL のサブタイプを同定した。ウエスタンブロット法により免疫化学的に内在性のキンギョ SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の同定を試みた。その結果、キンギョ下垂体抽出液よりキンギョ SL- $\alpha$  抗血清に対して免疫陽性反応を示すバンドを2本、キンギョ SL- $\beta$  抗血清に対して免疫陽性反応を示すバンドを1本検出した。タンパク質マーカーの位置をもとに免疫陽性反応を示すバンドのサイズを推定したところ、SL- $\alpha$  抗血清に対して免疫陽性反応を示すバンドは約 28 kDa と 31 kDa、SL- $\beta$  抗血清に対

して免疫陽性反応を示すバンドは約 27 kDa であった。各 SL 抗血清により検出されたバンドのサイズは、cDNA より推定されるキンギョ SL- $\alpha$  (精密分子量: 27.0795 kDa) と SL- $\beta$  (精密分子量: 25.7350 kDa) の分子量とほぼ一致した。さらに、各ホルモンの糖鎖修飾の有無を解析したところ、SL- $\alpha$  抗血清に対して免疫陽性反応を示す 31 kDa のバンドは N-glycosidase 処理により消失し、28 kDa のバンドのシグナル強度が増加することを確認した。一方で、N-glycosidase 処理により SL- $\beta$  抗血清に対して免疫陽性反応を示す 27 kDa のバンドのシグナル強度は減少した。キンギョの下垂体は主葉吻側部 (RPD: rostral pars distalis)、主葉基部 (PPD: proximal pars distalis)、中葉 (PI: pars intermedia) および神経葉 (NH: neurohypophysis) より構成される。作製した SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  抗血清は PI の腺性下垂体細胞に反応し、SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  免疫陽性反応は PI の細胞の細胞質において検出され、SL- $\alpha$  免疫陽性細胞の分布と SL- $\beta$  免疫陽性細胞の分布は異なっていた (図 1)。キンギョ下垂体の隣接切片を作製し、SL- $\alpha$ 、SL- $\beta$ 、PRL および GH 抗血清を用いて免疫染色を施した。SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  免疫陽性反応は PI に、PRL 免疫陽性反応は RPD に、GH 免疫陽性反応は PPD にそれぞれ検出された。また、PI における SL- $\alpha$  免疫陽性反応と SL- $\beta$  免疫陽性反応は一部類似することが観察された。SL- $\alpha$ 、SL- $\beta$  および  $\alpha$ -MSH の各ホルモン産生細胞の局在を比較するため、蛍光二重免疫染色により PI における各ホルモンの免疫陽性細胞の局在を比較した。SL- $\alpha$  と  $\alpha$ -MSH 免疫陽性細胞は PI に散在し、隣接して存在する様子が観察されたが共局在する細胞は無かった。SL- $\beta$  免疫陽性細胞は PI の吻側に密集して存在し、 $\alpha$ -MSH 免疫陽性細胞とはその局在性が大きく異なっており、共局在する細胞も認められなかった。SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の蛍光二重染色では、一部の細胞に共局在する様子が観察された[3]。

#### 5. SL 遺伝子発現と SL 分泌に及ぼす視床下部因子の影響

SL の遺伝子発現や分泌は、複数の視床下部因子による制御を受けることが報告されている[4]。下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) はセクレチン・グルカゴンスーパーファミリーに属し、ラット下垂体前葉細胞においてアデニル酸シクラーゼ (AC) を活性化し cAMP 産生を促す物質として初めにヒツジ視床下部抽出物より単離されたペプチドホルモンである [5]。PACAP の生理活性は PAC<sub>1</sub> 受

容体、VPAC<sub>1</sub> 受容体および VPAC<sub>2</sub> 受容体と呼ばれる 3 種の G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体を介して発揮される。PAC<sub>1</sub> 受容体は PACAP 特異的受容体であり、PACAP との結合親和性は血管作動性腸ペプチド (VIP) と比べて 1000 倍以上高い。一方、2 種の VPAC 受容体に対しては、PACAP と VIP はそれぞれ同程度の結合親和性を有する。真骨類において、PACAP は間脳視床下部のニューロンにおいて産生され、その神経線維は下垂体に投射する [6]。In vitro 実験系において、下垂体細胞への PACAP の添加は GH および黄体形成ホルモン (LH) の分泌を促す。また、これまでに、PACAP 含有神経線維が下垂体 SL 産生細胞の近傍に存在し、キンギョ下垂体初代培養細胞からの SL 分泌を促すことを見出した [7, 8]。また、この反応は PAC<sub>1</sub> 受容体を介して発揮されることが薬理的解析により示唆された [8]。本研究において、キンギョ SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  それぞれ特異的に結合する抗血清を作製したことにより、各ホルモン分子を識別することが可能となった。また、免疫組織化学的解析により、キンギョ下垂体には 3 種類の SL 産生細胞 (SL- $\alpha$  産生細胞、SL- $\beta$  産生細胞、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  両方を産生する細胞) が存在することを明らかにした [3]。産生細胞の差異は、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の遺伝子発現や分泌の制御に関わる機構が異なることを予測させる。しかしながら、これら 3 種の SL 産生細胞における PAC<sub>1</sub> 受容体の発現の有無は不明であり、どの細胞種が PACAP に応答するのかは明らかではない。真骨類は遺伝子重複の結果、2 種の PAC<sub>1</sub> 受容体 (PAC<sub>1a</sub> および PAC<sub>1b</sub> 受容体) を有することが報告されている。キンギョにおいては PAC<sub>1a</sub> 受容体が同定されているのみであった。そこで、本研究では、キンギョの PAC<sub>1b</sub> 受容体の cDNA 配列を同定し、RT-PCR 法によりキンギョ PAC<sub>1a</sub> 受容体 mRNA と PAC<sub>1b</sub> 受容体

mRNA の発現分布を比較した。また、3 種の SL 産生細胞における PAC<sub>1a</sub> 受容体 mRNA および PAC<sub>1b</sub> 受容体 mRNA 発現の有無を単一細胞 PCR により検討した。次に、キンギョ初代培養細胞を用いた in vitro 実験により、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の mRNA 発現や分泌に及ぼす PACAP の影響を探り、SL の 2 分子種間の PACAP への応答性を比較した。キンギョにおける SL 遺伝子発現に関わる細胞内情報伝達経路は全く不明である。そこで、薬理学的手法により、SL 遺伝子発現に関わる細胞内情報伝達経路の解析を行った。キンギョ PAC<sub>1b</sub> 受容体をコードする cDNA の単離を試みたところ、キンギョ下垂体よりオープンリーディングフレームを含む 7 回膜貫通型の受容体をコードしている cDNA を単離した。他の脊椎動物における PAC<sub>1</sub> 受容体の一次構造と比較し、近隣結合法により分子系統樹を作製したところ、単離した cDNA はキンギョ PAC<sub>1b</sub> 受容体をコードすることが示された。また、既知のキンギョ PAC<sub>1</sub> 受容体は PAC<sub>1a</sub> 受容体であることが確認され、キンギョ PAC<sub>1a</sub> 受容体はゼブラフィッシュ PAC<sub>1a</sub> 受容体と 96% の相同性、キンギョ PAC<sub>1b</sub> 受容体はゼブラフィッシュ PAC<sub>1b</sub> 受容体と 95% の相同性を示した。キンギョ PAC<sub>1a</sub> 受容体と PAC<sub>1b</sub> 受容体の一次構造の相同性は 77.8% であり、N 末端側以外の配列は非常に類似していた。キンギョ PAC<sub>1a</sub> 受容体と PAC<sub>1b</sub> 受容体の発現部位を比較するため、脳、下垂体、眼、鰓、心臓、腸、肝臓、胆嚢、脾臓、腎臓、精巣、卵巣および筋肉における各受容体 mRNA 発現を RT-PCR 法により調べた。PAC<sub>1a</sub> 受容体 mRNA は脳、下垂体、鰓、心臓および腸において強く発現し、眼や胆嚢、腎臓および精巣において弱く発現し、報告されているスプライシングバリエーションも発現していた。一方、PAC<sub>1b</sub> 受容体 mRNA は脳、下垂体および眼において強く発現し、腸や精巣において弱く発現していた。

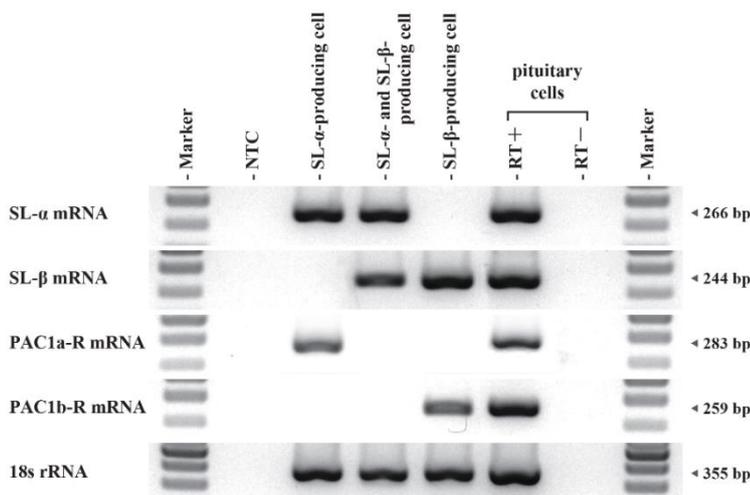


図 2. SL- $\alpha$  産生細胞、SL- $\beta$  産生細胞および両 SL 産生細胞における PAC<sub>1</sub> 受容体 mRNA の発現 SL- $\alpha$  産生細胞において PAC<sub>1a</sub>-R mRNA が発現し、SL- $\beta$  産生細胞において PAC<sub>1b</sub>-R mRNA が発現していた。一方、両 SL 産生細胞においては PAC<sub>1</sub> 受容体 mRNA を検出されなかった。

SL- $\alpha$  免疫陽性細胞または SL- $\beta$  免疫陽性細胞をレーザーマイクロダイセクション法により回収し、単一細胞 PCR を行い、SL- $\alpha$ 、SL- $\beta$ 、PAC $_{1a}$  受容体および PAC $_{1b}$  受容体 mRNA 発現を調べた。SL- $\alpha$  mRNA のみを発現する細胞を SL- $\alpha$  産生細胞とし、SL- $\beta$  mRNA のみを発現する細胞を SL- $\beta$  産生細胞とし、両方の SL mRNA を発現する細胞を両 SL 産生細胞とした。PAC $_{1a}$  受容体 mRNA は、SL- $\alpha$  産生細胞において検出され、PAC $_{1b}$  受容体 mRNA は、SL- $\beta$  産生細胞において検出された。両 SL 産生細胞においては、どちらの受容体 mRNA も検出されなかった (図 2)。キンギョ下垂体初代培養細胞における SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  mRNA 発現量に及ぼす PACAP の影響を real-time PCR 法により調べたところ、培養液への PACAP 添加により SL- $\alpha$  mRNA 発現量は対照群と比べて有意に減少した。一方、SL- $\beta$  mRNA 発現量は PACAP 添加で対照群と比較して有意に増加した [3]。PACAP の添加により誘起される SL- $\alpha$  mRNA 発現量の減少および SL- $\beta$  mRNA 発現量の増加に及ぼす PAC $_1$  受容体アンタゴニスト PACAP $_{(6-38)}$  の影響を調べ

た。その結果、PAC $_1$  受容体アンタゴニストである PACAP $_{(6-38)}$  は SL- $\alpha$  mRNA 発現量に影響せず、PACAP による SL- $\alpha$  mRNA 発現量の減少にも影響を与えなかった (図 3A)。一方で、PACAP による SL- $\beta$  mRNA 発現の増加は、PACAP $_{(6-38)}$  により阻害された (図 3B)。キンギョ下垂体初代培養細胞からの SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  分泌量に及ぼす PACAP の影響をウエスタンブロット法により調べた。PACAP を培養液に添加し、30 分後の培養液中へ分泌された SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  量を測定した。その結果、PACAP によりキンギョ SL- $\alpha$  抗血清に免疫陽性を示す 28 kDa および 31 kDa のバンドのシグナル強度が増加した。また、PACAP によりキンギョ SL- $\beta$  抗血清に免疫陽性を示す 27 kDa のバンドのシグナル強度が増加した。PACAP の添加により誘起される SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  分泌量の増加に及ぼす PAC $_1$  受容体アンタゴニストの影響を調べた。その結果、PAC $_1$  受容体アンタゴニストである PACAP $_{(6-38)}$  は PACAP による SL- $\alpha$  分泌量の増加を阻害した。また、PACAP による SL- $\beta$  分泌量の増加を阻害した (図 3C, D)。

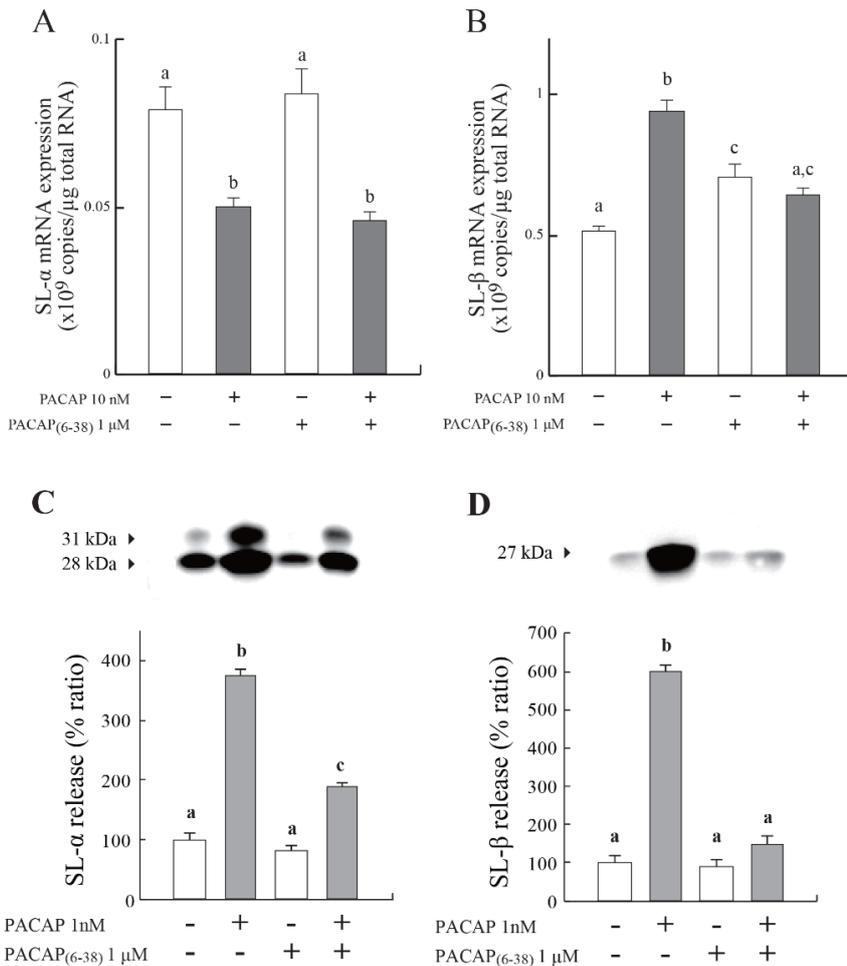


図 3. 下垂体初代培養細胞における SL mRNA 発現 (A, B) と SL 分泌 (C, D) に及ぼす PACAP の影響

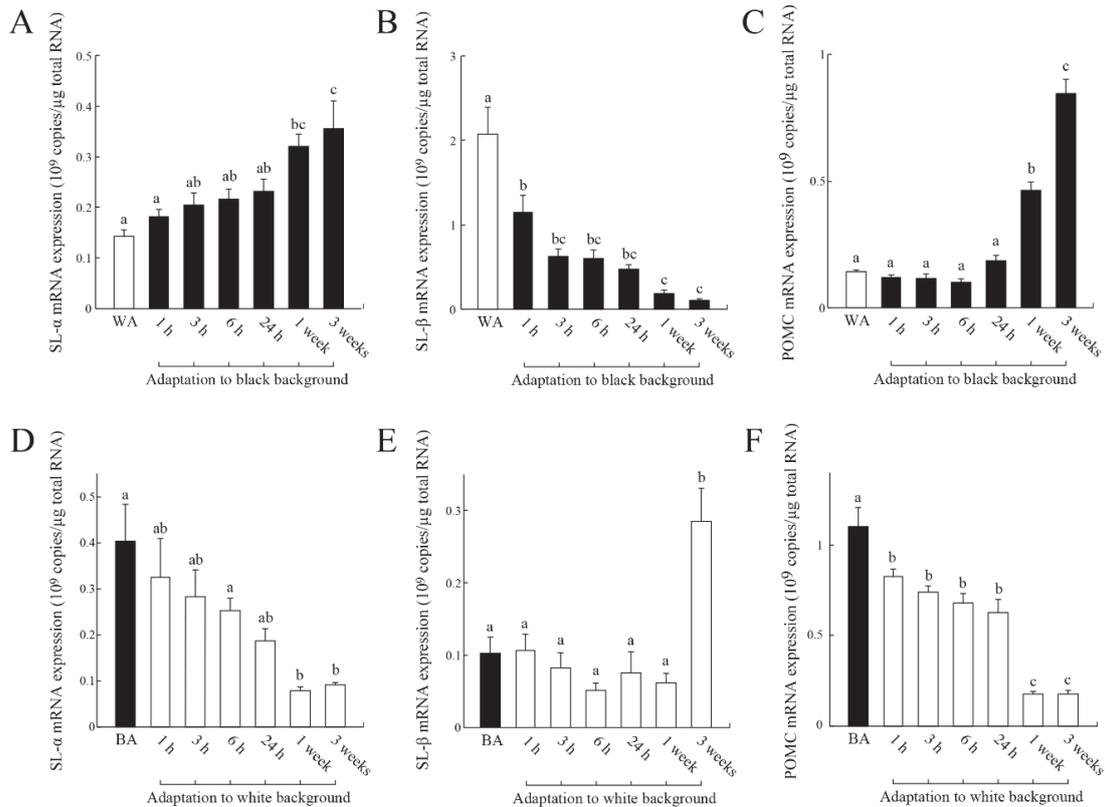
PACAP の添加により下垂体初代培養細胞中の SL- $\alpha$  mRNA 量は減少し、この減少は PAC $_1$  受容体アンタゴニスト (PACAP $_{(6-38)}$ ) の添加によって阻害されなかった (A)。一方、PACAP の添加により下垂体初代培養細胞中の SL- $\beta$  mRNA 量は増加し、この増加は PACAP $_{(6-38)}$  の添加によって阻害された (B)。PACAP の添加により下垂体初代培養細胞からの SL- $\alpha$  放出量および SL- $\beta$  放出量はともに増加し、これらの増加は PACAP $_{(6-38)}$  の添加によって阻害された (C, D)。

n=4  
a,b,c- Treatment groups denoted by different letters represent a significant difference at P < 0.05 (two-way ANOVA with Tukey test)

6. SL 遺伝子発現に及ぼす背景色の影響

近年、体色異常を示すメダカ変異体より、SL- $\alpha$  遺伝子変異により白色を呈する変異体 (*color interfere: ci*) が見出された。さらに、遺伝子導入により *ci* へ SL- $\alpha$  を過剰発現させることにより、野生型と同様に灰色の体色を示すことが報告されている。これらの知見は、SL- $\alpha$  が体表の色素胞の分裂や分化を制御する可能性を示している。さらに、SL- $\alpha$  の発現は背景色への応答性を示し、体色を調節する重要なホルモンであることが示唆される。一方で、SL- $\beta$  の生理機能は未だ不明であり、その発現に及ぼす背景色を含む環境要因の影響は全く不明である。硬骨魚類の代表的な下垂体刺激因子である PACAP は、前述のとおり、キンギョ下垂体初代培養細胞における SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  遺伝子発現を調節すると共に、それらの分泌を促すが、SL- $\alpha$  産生細胞と SL- $\beta$  産生細胞に発現する PACAP 受容体サブタイプは異なり、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  両方を産生する細胞は PACAP 受容体を発現していなかった。これらの結果より、SL 産生細胞の性質は異なり、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の生理機能が異なる

ことやその発現動態に差異が存在することが予測される。しかしながら、キンギョにおいて、SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  がどのような生理機能を有するのかは全く不明である。そこで、キンギョの SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の生理機能を明らかにすることを目的として、各 SL の発現に及ぼす背景色の影響を探った。キンギョを白背景または黒背景にて飼育し、次いで白背景から黒背景へ、あるいは黒背景から白背景へ移行して一定期間飼育し、それぞれの状態における下垂体 SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  mRNA 発現量を測定し、また、下垂体  $\alpha$ -MSH の前駆体であるプロオピオメラノコルチン (POMC) mRNA 発現動態と比較した。1ヶ月間、白背景で飼育したキンギョの体色は明化し、黒背景で飼育したキンギョの体色は暗化した。SL- $\alpha$  mRNA 発現量と POMC mRNA 発現量は黒背景への移行により増加し、移行後 1 週間および 3 週間の個体において、白背景飼育個体に比べて有意に高い値を示した (図 4A, C)。一方、SL- $\beta$  mRNA 発現量は黒背景への移行後 1 時間と早期より減少した (図 4B)。SL- $\alpha$  と POMC mRNA 発現量は白背景への移行により減少し、



n=8  
<sup>a,b,c</sup>Treatment groups denoted by different letters represent a significant difference at  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Tukey test)

図 4. SL 遺伝子発現に及ぼす背景色の影響

白背景から黒背景への移行により SL- $\alpha$  mRNA 量と POMC mRNA 量は増加した (A, C)。一方、SL- $\beta$  mRNA 量は減少した (B)。黒背景から白背景への移行により SL- $\alpha$  mRNA 量と POMC mRNA 量は減少した (D, F)。一方、SL- $\beta$  mRNA 量は増加した (E)。

移行後 1 週間および 3 週間の個体において、黒背景飼育個体に比べて有意に低い値を示した (図 4C, E)。一方、SL- $\beta$  mRNA 発現量は白背景への移行後 3 週間の個体において、黒背景飼育個体に比べ有意に高い値を示した (図 4D)。

### 7. 鱗の黑色素胞に及ぼす組換え SL- $\alpha$ と組換え SL- $\beta$ の影響

キンギョ下垂体より RT-PCR によって SL- $\alpha$  と SL- $\beta$  の各 cDNA を得て、プラスミド DNA に導入した後にシスメックス社のバキュロウイルス-カイコ発現系により FLAG タグ標識された組換え SL- $\alpha$  と組換え SL- $\beta$  をそれぞれ作成した。体色調節に及ぼす SL- $\alpha$  および SL- $\beta$  の生理作用を明らかにするため、作製した組換え SL- $\alpha$  および組換え SL- $\beta$  を黑色素顆粒の凝集した鱗と拡散した鱗にそれぞれ添加した。凝集した鱗を用いた結果、SL- $\alpha$  の添加により色素顆粒の凝集率は減少した (図 5A)。一方、SL- $\beta$  の添加により色素顆粒の凝集率は増加した (図 5B)。拡散した鱗を用いた結果、SL- $\alpha$  の添加により色素顆粒の拡散率は増加した (図 5C)。一方、SL- $\beta$  の添加により色素顆粒の拡散率は減少した (図 5D)。なお、メラニン凝集ホルモン (MCH) と  $\alpha$ -MSH の影響を対照実験とした。

### 8. SL 受容体候補遺伝子の同定

データベースに公開されているシクリッド、タイセイヨウタラ、サクラマス、マスノスケおよびニジマスの塩基配列をもとに、キンギョ

SL 受容体候補配列を探るための縮重プライマーを設計し、キンギョ鱗より黑色素胞を単離して SL 受容体候補 cDNA のクローニングを行った。得られた cDNA よりチロシンキナーゼ型受容体のキンギョ GH 受容体と高い相同性を示す SL 受容体様の塩基配列を見出した。そこで得られた配列を基に特異的プライマーを作製して 3'RACE 法および 5'RACE 法を行い、翻訳領域と推定された 1578 bp の塩基配列 (SL 受容体候補配列) を得た。推定されたアミノ酸配列には、1 回膜貫通領域 (23 アミノ酸)、細胞内領域 (335 アミノ酸) を有しており、細胞外領域には FGEFS モチーフが、細胞内領域には Box1 および Box2 が存在し、他魚種で保存された SL 受容体の特徴を有することが分かった。SL 受容体候補配列をキンギョ GH 受容体および PRL 受容体のアミノ酸配列と比べたところ、相同性はそれぞれ 94.7% と 18.3% であった。また、SL 受容体候補配列が GH 受容体、PRL 受容体および SL 受容体の無根系統樹においてどのクレードに属するか調べたところ、SL 受容体候補配列は SL 受容体のクレードに属することが分かった (図 6A)。次にキンギョ GH 受容体とは配列が異なるコード領域部分と 3'側の非翻訳領域の塩基配列部分で受容体候補配列に特異的なプライマーを作製し、キンギョの各組織における SL 受容体候補 mRNA、GH 受容体および PRL 受容体 mRNA の発現を調べた。その結果、SL 受容体候補 mRNA の発現は、SL 受容体の発現が報告されている組織全てにおいて認められ

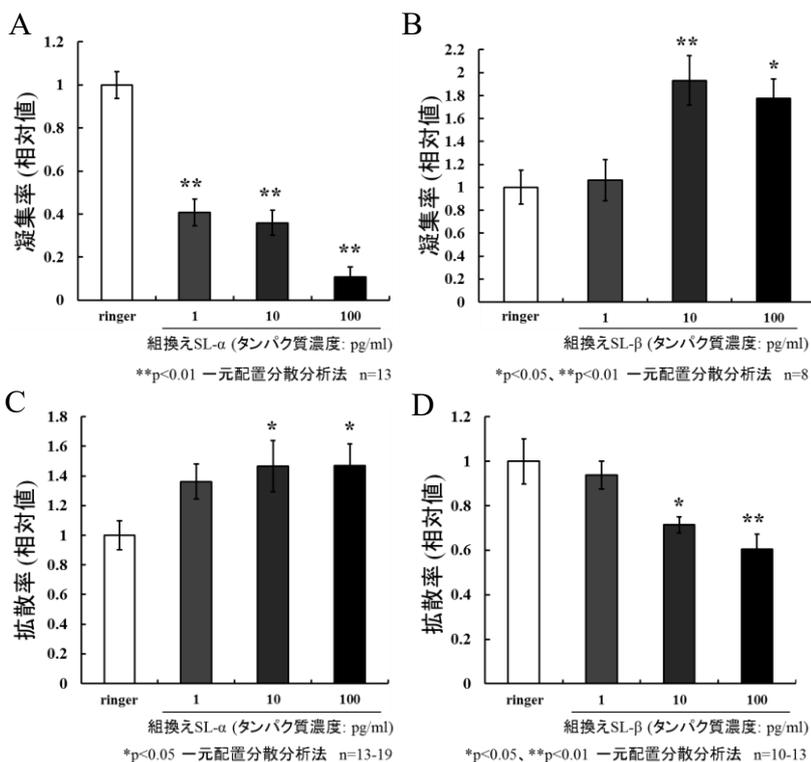


図 5. キンギョ鱗における黑色素胞中の色素顆粒の凝集 (A, B) および拡散 (C, D) に及ぼす組換えキンギョ SL の影響

組換え SL- $\alpha$  の添加により色素顆粒の凝集率は減少 (A) し、拡散率は増加 (C) した。一方、組換え SL- $\beta$  の添加により色素顆粒の凝集率 (B) は増加し、拡散率は減少 (D) した。

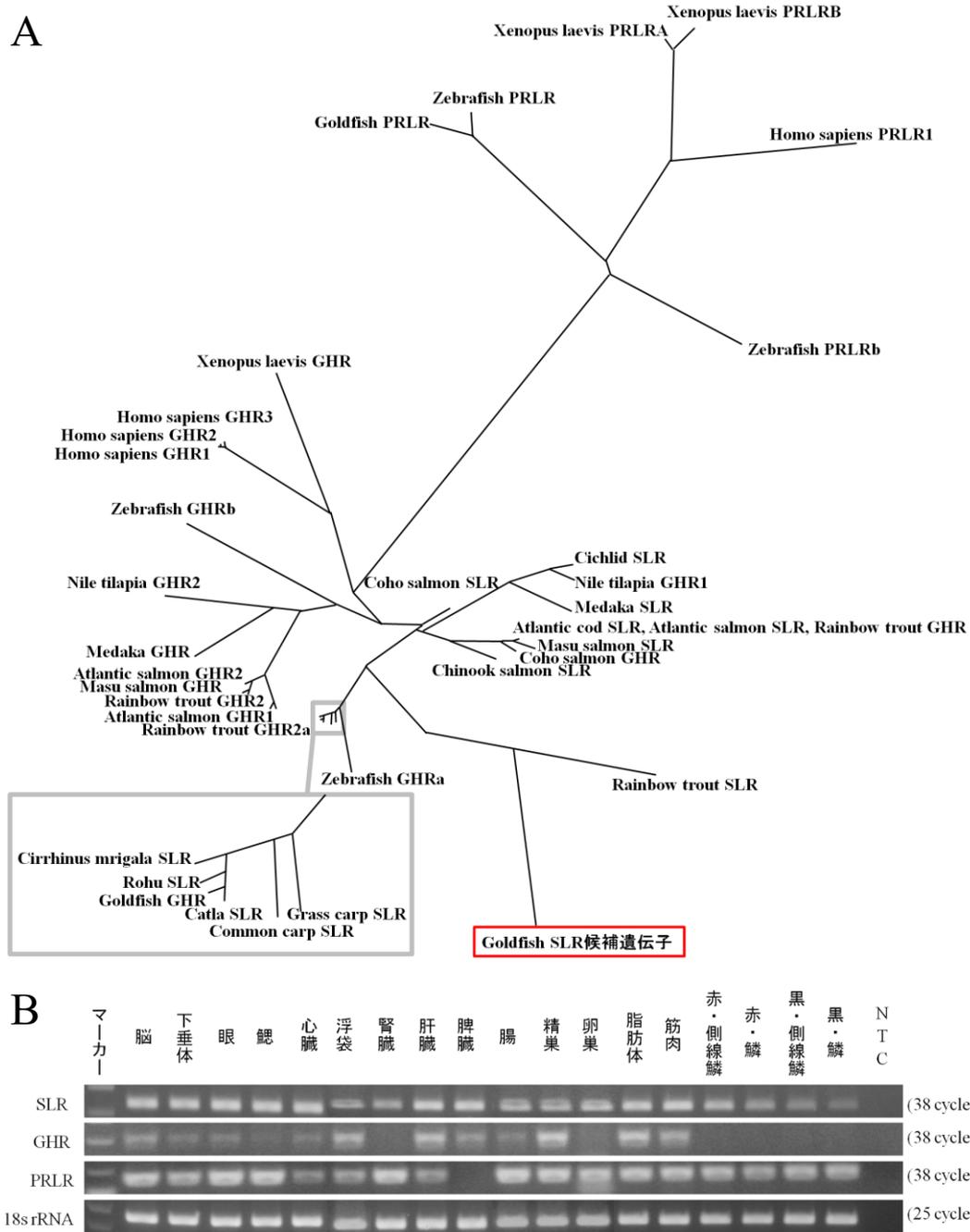


図 6. SL 受容体 (SLR)、GH 受容体 (GHR) および PRL 受容体 (PRLR) の一次構造に基づく無根分子系統樹 (A) とキンギョの各組織における SLR 候補 mRNA、GHR および PRLR mRNA の発現解析 (B)

キンギョ SLR 候補遺伝子をクローニングし、分子系統樹解析を行ったところ、GH 受容体および PRL 受容体とは異なるクレードに位置した。SLR 候補 mRNA は体内各所に存在し、その存在様式は GH 受容体および PRL 受容体の存在様式とは異なっていた。

た。さらに SL 受容体候補 mRNA の発現箇所と GH 受容体および PRL 受容体 mRNA の発現箇所を比較したところ、SL 受容体候補 mRNA と同源性の高い GH 受容体 mRNA は鱗における発現が認められなかった。一方、赤色素胞内の顆粒の拡散に関与することが報告されている PRL 受容体 mRNA は鱗における発現が認められた (図 6B)。

### 9. まとめ

著者らは SL と PRL の視床下部制御に関する研究に着手して以来、キンギョをモデルとして SL の生理作用の解析まで広げた研究を展開してきた。キンギョでは、SL の機能の 1 つとして体色調節が挙げられ、上述した諸結果より SL- $\alpha$  は体色の暗化に、SL- $\beta$  は体色の明化にそれぞれ働くことが示唆された。これらの SL は

PACAP 等の視床下部因子によって分泌・合成が制御されている実体も明らかになってきた。本論文では触れなかったが、MCHによるSL分泌制御の可能性も見出している[9]。本研究に加えて、著者らは、魚類の摂食行動と情動行動の脳制御機構の解明を目指した研究にも携わっており、今後は視床下部因子による中枢作用（行動制御）と末梢作用（下垂体軸などの内分泌制御）を統合する研究を進め、下垂体ホルモンの生理的意義に関する理解の深化を目指したい。本論文は、共著者の東 森生の博士論文 [10]、浜口晃吉の修士論文 [11]ならびに南 和希の卒業論文 [12]の記載内容を基に、共著者各氏の許諾を得て一部引用と編集を加えて執筆した。なお、上記の学位論文には未公表データが多数含まれているため、図表の一部を割愛した。

### 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究開始時には川内浩司北里大学名誉教授および高橋明義北里大学教授より抗体試薬等を供与いただきました。また、キンギョ SL に係る研究を支えてくれた永野祐順、捫垣友三香、田中爾織、今坂宏章の諸氏と、組換え SL の作成に際してご支援賜った小林牧人国際基督教大学教授に対してお礼を申し上げます。

本論文で紹介した研究は平成 29 年度日本下垂体研究会第 16 回吉村賞の対象となりました。ここに同賞選考委員会に推薦賜った屋代 隆自治医科大学教授、選考委員長の輿水崇鏡自治医科大学教授並びに選考委員各位に感謝申し上げます。

### 文献

1. Rand-Weaver M, Noso T, Muramoto K, Kawauchi H, 1991, Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry*. **30**, 1509-1515.
2. Zhu Y, Stiller JW, Shaner MP, Baldini A, Scemama JL, Capehart AA, 2004, Cloning of somatolactin alpha and beta cDNAs in zebrafish and phylogenetic analysis of two distinct somatolactin subtypes in fish. *J Endocrinol*. **182**, 509-518.
3. Azuma M, Suzuki T, Mochida H, Tanaka S, Uchiyama M, Takahashi A, Matsuda K, 2012, Polymorphism of somatolactin-producing cells in the goldfish pituitary: immunohistochemical investigation of somatolactin-a and -b. *Cell Tissue Res*. **350**, 167-176.
4. Kawauchi H, Sower SA, Moriyama S, 2009, Chapter 5 The Neuroendocrine Regulation of Prolactin and Somatolactin Secretion in Fish. *Fish Physiology*. **28**, 197-234
5. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH, 1989, Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **164**, 567-574.
6. Matsuda K, Takei Y, Katoh J, Shioda S, Arimura A, Uchiyama M, 1997, Isolation and structural characterization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like peptide from the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides*. **18**, 723-727.
7. Matsuda K, Nejigaki Y, Satoh M, Shimaura C, Tanaka M, Kawamoto K, Uchiyama M, Kawauchi H, Shioda S, Takahashi A, 2008, Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on prolactin and somatolactin release from the goldfish pituitary in vitro. *Regul Pept*. **145**, 72-79.
8. Azuma M, Tanaka M, Nejigaki Y, Uchiyama M, Takahashi A, Shioda S, Matsuda K, 2009, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces somatolactin release from cultured goldfish pituitary cells. *Peptides*. **30**, 1260-1266.
9. Tanaka M, Azuma M, Nejigaki Y, Saito Y, Mizusawa K, Uchiyama M, Takahashi A, Shioda S, Matsuda K, 2009, Melanin-concentrating hormone reduces somatolactin release from cultured goldfish pituitary cells. *J Endocrinol*. **203**, 389-398.
10. 東 森生, 2013, キンギョ下垂体におけるソマトラクチンの特徴付けとソマトラクチン産生細胞の分化に関する研究 富山大学大学院理工学教育部博士論文
11. 浜口晃吉, 2015, キンギョにおけるソマトラクチンの分泌調節と生理作用に関する研究 富山大学大学院理工学教育部修士論文
12. 南 和希, 2016, キンギョにおける組換えソマトラクチンの黒色素胞に及ぼす影響に関する研究 富山大学理学部卒業論文

※本稿は、第 32 回日本下垂体研究会学術集会で「吉村賞」を受賞した研究内容の紹介です。

## 短報-1

マウス下垂体由来の TtT/GF 細胞における TGF $\beta$  の作用：  
SILAC 解析法を用いたタンパク質の網羅的な比較定量解析

明治大学 研究・知財戦略機構

磯和 幸延

isowa@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.5, 10, 2018)

TtT/GF 細胞は、マウス下垂体腫瘍から単離された下垂体ホルモンを産生しない細胞株である。この細胞は、突起状の細胞質をもち、S100 $\beta$  を発現することから、長年、濾胞星状細胞のモデル細胞として利用されてきた。しかし、microarray を用いた先行研究で、TtT/GF 細胞が濾胞星状細胞のマーカーの他に、幹細胞、内皮細胞、ペリサイトなどのマーカー遺伝子を発現することがわかり<sup>1)</sup>、TtT/GF 細胞が最終分化した細胞ではなく、可塑性をもつ細胞であることが示唆された。さらに、リアルタイム PCR 解析により、サイトカインの一種である TGF $\beta$  が TtT/GF 細胞のペリサイトへの分化に関与していることが示唆された<sup>2)</sup>。本研究では、TtT/GF 細胞における TGF $\beta$  の作用をタンパク質レベルで解析するため、SILAC (stable isotope labeling using amino acids in cell culture) 法を用いて、大規模な比較定量解析を行った。具体的には、TGF $\beta$  処理群または TGF $\beta$  受容体阻害剤 (SB431542) 処理群を安定同位体標識したアミノ酸を含む培地 (heavy medium) で培養し、通常の培地 (light medium) で vehicle 処理群を培養した。そして、それぞれの培地で培養した細胞からタンパク質を抽出し、等量を混合してトリプシン消化を行った後、質量分析を行い、比較定量をした。その結果、1693 種のタンパク質で定量値が得られ、その中でタンパク質量が有意に上昇したものが 51 種、減少したものが 112 種見つかった ( $|\text{Log } 2| > 0.6, n = 3$ )。これらのタンパク質について gene ontology 解析を行ったところ、細胞骨格、細胞接着、細胞遊走、細胞分裂、細胞外マトリックスに関わるタンパク質量が変化した (図 1)。また、個々のタンパク質の変動を確認すると、未分化細胞、血管内皮細胞に関わるタンパク質群が減少しているのに対し、骨格筋細胞、ペリサイト、平滑筋細胞の収縮に関わるタンパク質群が増加していることが明らかになった (図 1)。以上のことから、今回の SILAC 法を用いた大規模な比較定量解析により、TGF $\beta$  で誘導されるタンパク質群を同定することができ、これらのタンパク質群が

TtT/GF 細胞の形質変化に深く関わっていることが明らかとなった。

## 【引用文献】

- 1) Yoshida S, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Tsuda M, Yako H, Chen M, Mitsuishi H, Sano Y, Kato T, Kato Y, “Characterization of murine pituitary-derived cell lines Tpit/F1, Tpit/E and TtT/GF” J Reprod Dev. 60 (2014): 295-303
- 2) Tsukada T, Yoshida S, Kito K, Fujiwara K, Yako H, Horiguchi K, Isowa Y, Yashiro T, Kato T, Kato Y, “TGF $\beta$  signaling reinforces pericyte properties of the non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF” Cell Tissue Res 371 (2018): 339-350

※本報は第 32 回日本下垂体研究会学術集会で最優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

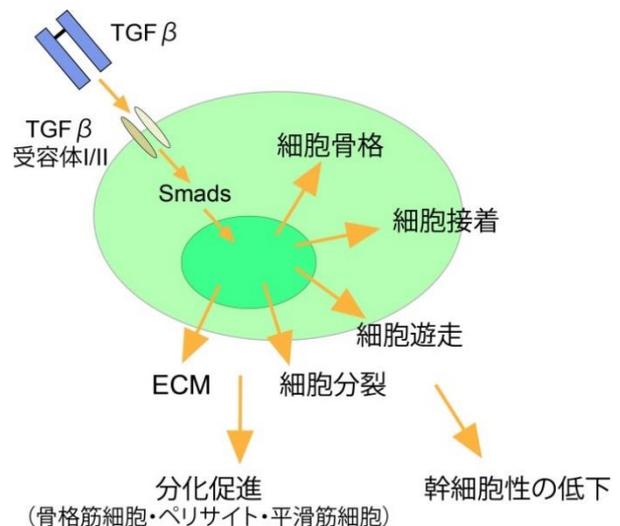


図 1. TGF $\beta$  刺激により TtT/GF 細胞において発現変動するタンパク質群の概要

## 短報-2

## メダカの鰓におけるバソトシン V2a 受容体と AQP3 の機能連関の可能性

富山大学・大学院理工学研究部・生体制御学講座

稲垣 祐香

m1741302@ems.u-toyama.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.5, 11, 2018)

四肢動物において、下垂体神経葉ホルモンのバソプレシン (VP)/バソトシン (VT) は、腎臓に発現する V2a 受容体 (V2aR) を介して水チャネルの 2 型アキアポリン (AQP2) の発現を調節し、抗利尿作用に働く。この VP/VT による水保持機構は、常に脱水の危険に晒される陸生の脊椎動物にとって必要不可欠な仕組みである。一方、水中生活を営む魚類は、四肢動物のような水保持機構を有していないと考えられており、実際、AQP2 遺伝子は魚類のゲノム中に存在しないことが明らかとなっている<sup>1)2)</sup>。所属研究室は、これまでに真骨魚類の鰓や腎臓といった浸透圧調節器官にも V2aR が発現することを明らかにしたが<sup>3)</sup>、その生理機能は未だ明らかになっていない。そこで、本研究ではゲノム編集技術 TALEN 法を用いて作製した V2aR ノックアウト (KO) メダカ (図 1) を用いて魚類の V2aR を介した VT の機能を明らかにすることを目的とした。

四肢動物において、V2aR 機能の異常は尿崩症という疾患を引き起こし、尿から水を再吸収できずに脱水する。そこで、脱水を誘起する高張環境で飼育した V2aR-KO メダカの筋肉水分率と血漿 Na<sup>+</sup>濃度を計測し、野生型 (WT) メダカと比較した。その結果、V2aR-KO メダカの各パラメーターは WT メダカと有意な差は見られず、高張環境下においても V2aR-KO メダカは正常な体液調節が行われた。したがって、メダカの V2aR は抗利尿作用とは異なる機能を仲介していることが示唆された。

次に、鰓において水やイオンの輸送に働く水チャネルおよびイオン輸送体の遺伝子発現レベルを、両群間で比較した結果、V2aR-KO メダカの鰓における AQP3 mRNA の発現レベルが WT メダカと比較して有意に低いことが明らかとなった。また、*in situ* hybridization 法において、AQP3 は鰓の塩類細胞に局在することが示された。

VT-V2aR 系が AQP3 発現の調節に直接的もしくは間接的に関与している可能性が考えられるが、浸透圧調節には多様なホルモンや輸送体が関与しているため、代償作用について考慮する

必要がある。そこで、受精卵の段階から等張液 (300 mOsm) で飼育したメダカの鰓における遺伝子発現解析を行った結果、V2aR-KO メダカにおいて AQP3 の有意な発現量の低下が見られた。さらに、等張液から淡水へ移行した際に野生型メダカは鰓における AQP3 の発現が有意に増加したのに対し、V2aR-KO メダカの AQP3 発現量は低いままであった。これらの結果から、メダカの VT-V2aR 系が AQP3 の発現調節に関与している可能性が考えられる。そこで現在、V2aR 発現培養細胞を用いて、AQP3 の転写調節領域のレポーターアッセイにより、その機能連関の検証を行っている。

## 【引用文献】

- 1) Suzuki M, Tanaka S. "Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 153(3):231-41 2009
- 2) Finn RN, Cerdà J. "Aquaporin evolution in fishes." *Front Physiol.* 26;2:44 2011
- 3) Konno N, Kurosawa M, Kaiya H, Miyazato M, Matsuda K, Uchiyama M. "Molecular cloning and characterization of V2-type receptor in two ray-finned fish, gray bichir, *Polypterus senegalus* and medaka, *Oryzias latipes*." *Peptides. Volume 31, Issue 7, Pages 1273-1279* 2010

※本報は第 32 回日本下垂体研究会学術集会で最優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

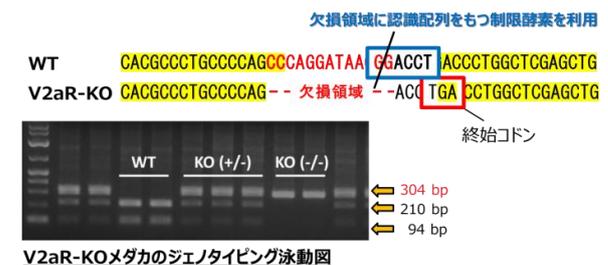


図 1. V2aR-KO メダカの遺伝子配列と遺伝子型の判別

## 短報-3

## ヒト妊娠免疫モデルとしての妊娠ヒト化マウスの作製

東海大学大学院医学研究科医科学専攻

大野 裕介

7bmr002@mail.u-tokai.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.5, 12-13, 2018)

ヒトを含む有胎盤哺乳類は妊娠中に胎盤を通して胎児を成長させる。本来、免疫系とは非自己を認識し攻撃する生体防御機構であるが、妊娠時の母体免疫系は胎児を拒絶せず、妊娠状態は維持されている。妊娠免疫は Semi-allogenic tissue に対する免疫抑制という点で、がん細胞の免疫回避機構(Cancer immunoediting)との共通点も多く、近年衆目を集めつつあるが、妊娠機構は種差が大きいいため、ヒトモデル動物を用いた解析は進んでいない。

一方、妊娠時に産生が亢進するプロゲステロン(P4)は免疫系を抑制する因子の一つと考えられている。ヒト免疫系における P4 の作用機序解析については制限が多いため、妊娠免疫機構と P4 の関係性を *in vivo* で調べるのは困難である。そこで妊娠に特有の P4 依存的な免疫回避機構を *in vivo* で明らかにするために、ヒト免疫環境を再現したヒト化マウスを妊娠させ、ヒト妊娠免疫環境を再構築する事を試みた。

本研究には重度免疫不全マウスである NOG(NOD/Shi-scid,IL-2R $\gamma$ KO Jic)を使用した。このマウスは免疫系が著しく低下・欠失しており、移植したヒト細胞を高率で生着させることが可能である<sup>1)</sup>。また、ステロイドホルモンはヒトとマウスで共通であるため、同様な妊娠ホルモン環境を構築することが可能であると考えられる。

メスの NOG マウスを交配させ、膣垢を確認した後、ヒト健常者末梢血単核球を  $5 \times 10^6$  個尾静脈から移植した。移植から 14 日後に骨髓、末梢血、脾臓、胎盤を摘出し、Flow cytometry(FCM)を用いてリンパ球画分の割合と細胞数の比較、Immunohistochemistry(IHC)を用いて胎盤組織の観察、Liquid Chromatography-Mass spectrometry(LC/MS)を用いて血漿中 IgG 相対値の測定、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)を用いて血漿中 P4 濃度の測定を行った。

妊娠ヒト化マウス血漿中の P4 濃度は妊娠 NOG マウスの平均値と同等であり、非妊娠ヒト化マウスの約 18.2 倍の濃度であった。また、このマウスの脾臓における B 細胞数は非妊娠マ

正式名称: NOD/Shi-scid,IL-2R $\gamma$ KO Jic

特徴:

- T, B細胞の欠失
- NK細胞の欠失
- 樹状細胞機能の低下
- マクロファージ機能の低下
- 補体活性の欠失

図 1. NOG マウスの特徴

ウスより平均 1.72 倍多く、その大部分は抗体産生能を持つ形質細胞様 B 細胞であった。しかしながら、血漿中 IgG は平均 10.4 倍少なく、抗体産生能は優位に抑制されていた。

妊娠ヒト化マウスの骨髓、脾臓において、免疫系の調節を担うヘルパー T 細胞(Th) の比率が細胞障害性 T 細胞(CTL)より優位に高かった。しかし胎盤局所においてはその傾向が逆転しており、CTL が優位に高く、Th と CTL の活性化マーカーの発現は他組織と比較して抑制傾向であった。また、移植に伴う胎盤の形状の変化は認められず、アポトーシスも正常の範囲内で確認された。

我々の先行研究により、ヒト妊娠時における血漿中抗体量の減少と P4 濃度依存的なヒト T 細胞の活性化抑制が確認されている。P4 が豊富な妊娠ヒト化マウスにおける抗体産生能と T 細胞の活性化抑制は、胎児が拒絶されずに生育するための免疫回避機構であると推測される。このように、妊娠ヒト化マウスはヒト妊娠免疫をある程度模倣しており、今後 P4 の機能を明らかにする為の妊娠免疫解析モデルとして有用であることが考えられる。

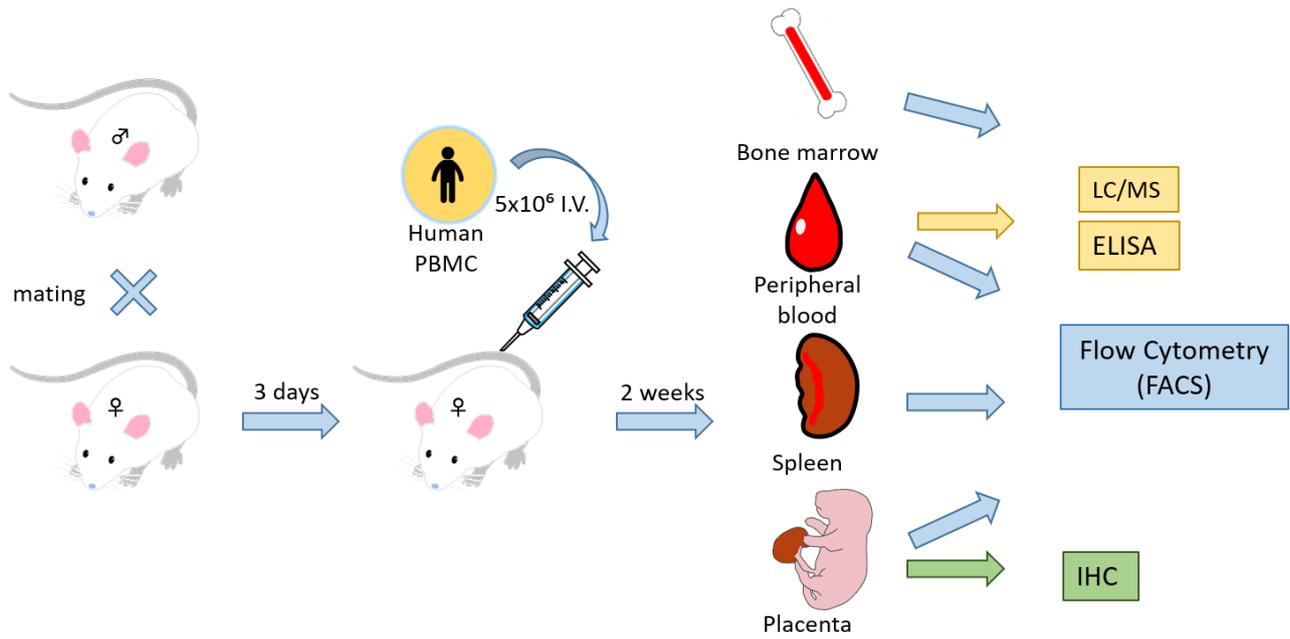


図 2. 実験プロトコール

【引用文献】

1) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T, 2002, NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells, Blood, 100, 3175-3182.

※本報は第 32 回日本下垂体研究会学術集会で優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

## 短報-4

## ゼブラフィッシュ OGR1, GPR4 の金属による応答解析

明治大学農学部生命科学科 細胞情報制御学研究室

武者 詩織

ef41520@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.5, 14, 2018)

OGR1、GPR4 は細胞外プロトンを感じて活性化する、プロトン感知性 GPCR である。OGR1 はヒト、ラットやゼブラフィッシュ下垂体においても、その発現が観察される。ラット下垂体では、S100 $\beta$  陽性細胞での IL-6 の発現に、OGR1 の関与が報告されている<sup>1)</sup>。これまでに我々は、ゼブラフィッシュに存在する OGR1、GPR4 相同遺伝子産物 (zOGR1、zGPR4) が、ヒトやマウスの OGR1(hOGR1、mOGR1)や GPR4 と同様にプロトン感知性 GPCR であることを報告してきた<sup>2)</sup>。

今回、ゼブラフィッシュ抽出液が zOGR1 を活性化することを我々は見出した。この抽出液の pH は約 8 であることから、抽出液中のプロトン以外のアゴニストが zOGR1 を活性化している可能性がある。この活性化はキレート剤により抑制された。したがって抽出液内の金属が活性化に関与していることが考えられた。

本研究では、zOGR1 が金属により実際に活性化されるのか、また活性化されるとすれば、その金属種はどのようなものかを明らかにすることを目的とした。また OGR1 と同じファミリーに属する GPR4 に関して、この受容体もプロトンに加えて金属によっても活性化されるのかどうか検討した。

受容体の活性化は、SRE-プロモーターなどのレポーター遺伝子を HEK293 細胞に導入後、各種金属を添加し、レポーター遺伝子の活性を測定することで判定した。

実験の結果、hOGR1 と同様に zOGR1 は金属によっても活性化された。しかしながら hOGR1、zOGR1 を活性化する金属の種類は異なっていた。マンガンはどちらの OGR1 も活性化した。一方 GPR4 は、調べたどの金属種によっても活性化されないことが、明らかとなった。

下垂体はマンガン濃度が高い組織の 1 つであることが報告されている。またマンガンが視床下部に移行すること、GnRH ニューロンを介して LH 分泌に関与するとの報告などもある<sup>3)</sup>。今回明らかとなった活性化に関与する金属は、ほとんどが生命活動に必要な微量または超微量元素である。以上本研究の結果から、これら微

量元素の新たな作用機構として OGR1 を介した応答が関与すること<sup>4)</sup>、マンガンが OGR1 を介して下垂体機能を調節しているという可能性が示唆された。

## 【引用文献】

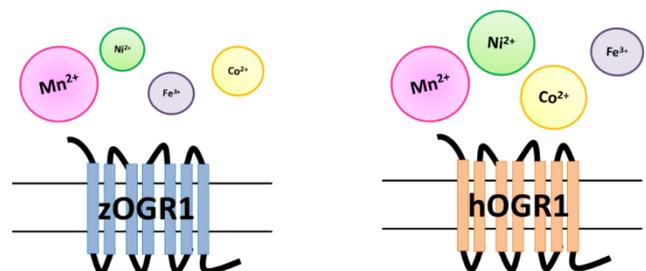
1) Horiguchi K, Higuchi M, Yoshida S, et al. Proton receptor GPR68 expression in dendritic-cell-like S100 $\beta$ -positive cells of rat anterior pituitary gland: GPR68 induces interleukin-6 gene expression in extracellular acidification. *Cell Tissue Res.* 2014, 358:515-25.

2) Mochimaru Y, Azuma M, Oshima N, et al. Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebra fish. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015, 457:493-9.

3) Pine M, Lee B, Dearth R, et al. Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: a potential influence on female pubertal development. *Toxicol Sci.* 2005, 85:880-5.

4) Negishi J, Omori Y, Shindo M, et al. Manganese and cobalt activate zebrafish ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 but not GPR4. *J Recept Signal Transduct Res.* 2017, 37:401-8.

※本報は第 31 回日本下垂体研究会学術集会で優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。



図：ヒト (h)、ゼブラフィッシュ (z) OGR1 を活性化する金属種

各金属種の受容体活性化の強さは、円の大きさとして表した。

## 短報-5

## ACTH 産生細胞株における GPHR の機能解析

明治大学農学部生命科学科 細胞情報制御学研究室  
村上 奨  
ef41639@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.5, 15, 2018)

GPHR (Golgi pH regulator)は GPR89 とも呼ばれ、その発見当初は7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体であるとされていた。しかしながらその後、GPHRは9個の膜貫通領域を持ち、ゴルジ体に局在するpH regulatorであり、ゴルジ体内腔のpHを酸性に保つ役割を有するということが報告された<sup>1)</sup>。GPHRはショウジョウバエや、キイロタマホコリカビの発生に大きな役割を担っていることが報告されている<sup>2)3)</sup>。今回私たちは、GPHRがラット下垂体とACTH産生細胞株(AcT20細胞)に発現していることを見出した。分泌顆粒、エンドソーム、ゴルジ体などのホルモン分泌に関与するオルガネラ内は、酸性に保たれていることから、この酸性環境がこれらオルガネラの機能に影響を与えているものと思われる。これらのオルガネラのうちゴルジ体は、ホルモンのプロセッシングが行われる重要なオルガネラであり、その内腔のpHが適切に保たれることが、ホルモンの成熟に重要と考えられる。しかしながらGPHR遺伝子欠損マウスは致死であることから、ホルモンの分泌応答に対するGPHRの作用は不明である。

本研究ではAcT20細胞を用いて、そのホルモン分泌応答にGPHRがどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。今回、AcT20細胞からのホルモン分泌応答の測定には、ガウシアルシフェラーゼを使用した<sup>4)</sup>。ガウシアルシフェラーゼは、AcT20細胞においてACTH分泌と同様の挙動を示すこと、また細胞内で一部のガウシアルシフェラーゼはACTHと共局在を示すことから、ACTH分泌量の変化をメディアム中のガウシアルシフェラーゼ発光量の変化として測定することが出来る。

AcT20細胞にGPHRを過剰発現させCRHによる刺激を行うと、ガウシアルシフェラーゼ発光量が変化、すなわちACTH分泌量が変化した。また、AcT20細胞株へのGPHR遺伝子導入量を増加させ、CRHによる刺激を行うと、GPHR導入量、すなわちGPHR発現量が増加するほど、ガウシアルシフェラーゼ発光量の変化も増大した。

今回の研究によりGPHRは、コルチコトロフのホルモン分泌の調節に関与することが示唆された。GPHRの活性を制御するアゴニスト、アンタゴニストの開発が、コルチコトロフからのホルモン分泌を制御する新たな方法となる可能性がある。

## 【引用文献】

- 1) Y. Maeda, T. Ide, M. Koike et al. Nat Cell Biol. 2008, 10:1135-1145
- 2) B. Charroux, J. Royet. Biol Open. 2014, 3:72-80
- 3) J. Deckstein, J. Appeldorn, M. Tsangarides et al. Eukaryot Cell. 2015, 14:41-54
- 4) K. Satou, Y. Mochimaru, T. Nakakura et al. J Reprod Dev. 2017, 63:199-204

※本報は第31回日本下垂体研究会学術集会で優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

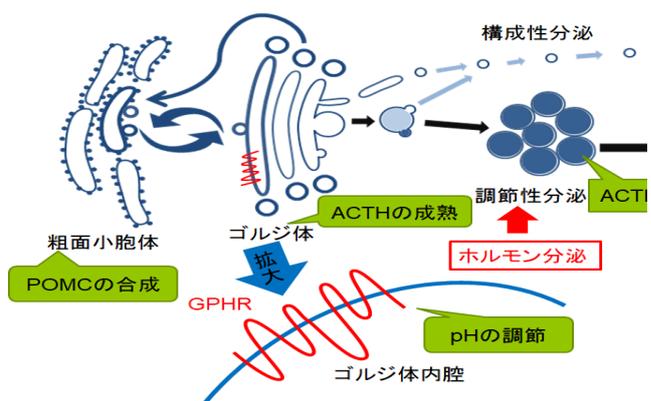


図. GPHRはゴルジ体内腔のpH調節因子として、ホルモン分泌に関与している。

## 第 32 回学術集会報告

自治医科大学医学部  
奥水 崇鏡  
t\_koshi@jichi.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.5, 16, 2018)

平成 29 年 8 月 2 日より 4 日の 3 日間の日程で、栃木県鬼怒川温泉「鬼怒川グランドホテル」を会場とし、第 32 回日本下垂体研究会学術集会を無事終えることができました。皆様に深く感謝を申し上げるとともに、ここにご報告申し上げます。

第 16 回吉村賞受賞講演では、富山大学工学研究部の松田恒平先生より、「キンギョにおけるソマトラクチンの分泌制御と生理機能に関する研究」のご演題名で、これまでの先生のご研究の成果を拝聴いたしました。特別講演では自治医科大学の永井良三先生に、また特別シンポジウムでは、3名のシンポジストと一緒に、東北大学の大隅典子先生に特別講演を行っていただきました。さらに 2 つのシンポジウム 8 題、若手企画 2 題、一般発表 28 題と、多くの先生のご発表に加え、フロアを含めた活発なご議論が印象に残りました。エクスカージョンでは、吹き抜ける風とともに鬼怒川の川下りを楽しむことができ、会期を通じた暑さの中にも涼しいひと時を過ごすことができました。

合宿形式で 1 日を通じて共に過ごす従来の学会スタイルは、今回も多くの踏み込んだ議論を交わすことを可能にしたと思います。大勢の方にご参加いただき、膝を詰めて行いましたファイルオンザデスクでは、参加者の皆様だけでなく開催する私どもも時間の経つのを忘れていた程でした。最終日には、最優秀発表賞 3 名、優秀発表賞 3 名を讃えて会を終了することができました。ご参加いただきました皆様、ご協力いただきました関係各位には、学術集会事務局一同、深く御礼申し上げます。

来年度の第 33 回は、高知大学の岩崎泰正先生が大会長で開催されます。次回の大会におきまして皆様と再会できることを楽しみにしております。



写真 1. 全体写真



写真 2. エクスカージョン 鬼怒川下り



写真 3. 「若手最優秀発表賞」受賞者



写真 4. 「若手優秀発表賞」受賞者

## 編集後記

立春の候、日々の研究活動のなか、少しずつ春の暖かみを感じられ、そろそろ桜も咲きそうです。会員の皆様におかれましては、年度末の引き継ぎや新しい学生の受け入れなど、お忙しいことと存じます。本誌においては、新年度より、屋代隆編集長から菊地元史編集委員へと編集長が引き継がれます。屋代より、関係各位へお礼申し上げます。

さて、会員の皆様のご協力を賜り、日本下垂体研究会誌第 5 号を発行することができました。本号には、論文Ⅱ（1 報）、短報（5 報）に加えて、昨年度開催された第 32 回日本下垂体研究会学術集会の報告文を掲載しております。硬骨魚類の下垂体には、成長ホルモン/プロラクチンファミリーのソマトラクチンが存在します。松田先生は、キンギョのソマトラクチンに関して、ホルモンの分子構造や産生細胞の特徴付け、ホルモン分泌調節機構、体色調節への関与、受容体探索などの研究を遂行されました。遺伝子重複により 2 分子種が生じるなど、未だ不明なことが多いホルモンですが、今後の研究のご発展によりその謎が紐解かれることを期待しております。本号では、第 32 回学術集会における吉村賞受賞講演内容をご執筆いただきました。また、第 32 回学術集会における発表賞の受賞者の方々にもアクティブな研究内容をご紹介いただきました。質量分析と安定同位体を組み合わせた発現変動タンパク質の網羅的解析、メダカにおけるバソトシン受容体とアクアポリンとの機能連関、免疫不全マウスを用いたヒト妊娠免疫モデルの作製、ゼブラフィッシュのプロトン感受性 GPCR の金属による活性化、ゴルジ体の pH regulator によるホルモン分泌調節と様々な記事を掲載しております。原稿をご投稿くださいました先生方に、この場をお借りして御礼申し上げます。

さて、今年の第 33 回日本下垂体研究会学術集会は高知大学の岩崎先生を会長に高知県で開催されます。下垂体維新と銘打ち、過去、現在、未来と日本下垂体研究の歴史を感じ、活発な議論が行われることを期待しております。是非ご参加ください（龍馬に会いに行きましょう！）。最後になりますが、日本下垂体研究会誌もより充実した情報発信の場となるように編集部も日々、努力してまいります。今後とも宜しくお願い致します。

（東 森生）

本誌は、日本下垂体研究会の会誌として、下垂体及びその関連する分野に関する記事（論文 I、論文 II、短報）とその他（解説、学会記録、紹介、事務局からのお知らせなど）を掲載する。会誌の発行は年 1 回（3 月末）とする。本誌は、印刷版に加えて Web 掲載（PDF 形式、Open access）する。

1. 執筆要領

- 1) 使用言語は日本語ないし英語とする。
- 2) 最初の頁に表題、著者名（所属）、E-mail address を書く。
- 3) 本文に節を設ける場合は、1.○○○、2.△△△、3.□□□、をつけて節を示す。節の見出しは簡潔にする。
- 4) 文字はなるべく常用漢字と新仮名遣いとする。
- 5) 述語、物質名などは、できる限り日本語で表し、必要に応じてその原語を（）で示す。ただし、略号に関してはそのまま用いる。（例）テストステロン、cAMP
- 6) 生物名は、片仮名書きの和名で表し、必要に応じて初出時に学名を（）で示す。学名は斜体（イタリック体）文字で表記する。（例）ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）
- 7) 人名は、姓の原綴りで示す。  
（例）吉村は、Guillemin と Schally は、
- 8) 原則として国際単位（SI）記号、化学記号、数学記号は立体、量記号は斜体とする。  
（例）h、cm、A、g、H<sub>2</sub>O
- 9) 数字は、原則としてアラビア数字を用いる。ただし、漢字と結合して名称を表すものは、漢字とする。（例）1 つ、2～3 時間、50 個、数十個、一例
- 10) 文献の記載方法  
参考文献は、本文の出現順に並べ、1 から順に通し番号をつけて文末にまとめる。本文中での引用箇所には、通し番号を右肩につけて示す（表示のしかたは下記の例を参照）。著者名を引用する場合、3 名以上の連名のときは“ら”あるいは“*et al.*”とする。  
（例）吉村らによると<sup>1)3)</sup>、……である<sup>4)6)7)</sup>。
- 11) 文末の参考文献の記載は、次のようにする。著者が連名の場合でも省略せず、全員の名前を記載する。  
[雑誌] 通し番号) 著者名, 発行年, 題名, 雑誌名 (省略形), 巻 (ボールド), ページ。  
[書籍] 通し番号) 著者名, 発行年, 表題, 編集者, 書名, 出版社, ページ。  
（例）1) Fujiwara K, Maliza R, Tofrizal A, Batchuluun K, Ramadhani D, Tsukada T, Azuma M, Horiguchi K, Kikuchi M, Yashiro T, 2014, In situ hybridization analysis of the temporospatial expression of the midkine/pleiotrophin family in rat embryonic pituitary gland. *Cell Tissue Res.* **357**, 337-44.  
2) 川島誠一郎, 1993, ホルモンとホメオスタシス, 川島誠一郎編, 内分泌学, 朝倉書店, pp.6-7
- 12) 表は簡潔な表題と必要な説明をつけて、本文とは別に作成する。
- 13) 図には必ず簡潔な表題をつける。図の表題と説明は、図面原稿とは別紙にまとめて書く。
- 14) 図および表の表示は、図 1、図 2、……、表 1、表 1、……の通し番号で行う。これらを挿入する箇所を本文の原稿欄に赤字で指示する。
- 15) 図および表を文献から引用した場合は、引用を明記するとともに、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可をとっておく。

2. 原稿は、すべてワードプロセッサ（ワープロ）を使用する。フォントはタイトル、サブタイトルはゴシック体、本文は明朝体、英数字は Times New Roman を使用する。左寄せで打ち、行間は「1 行」とする。特殊なコマンドは使用しない。

3. 本誌の刷り上がり 1 頁は、21 字×40 行×2 段 = 1680 字の分量に対応する。

4. 記事内容

- 1) 論文 I: 下垂体あるいは関連分野における最近の目立った研究成果や学界で注目された事象に関する記事を掲載する。（5 千字～1 万字程度 = 図を含めて 4～6 頁程度）
- 2) 論文 II: 吉村賞を受賞した者に、受賞講演内容に関する総説の執筆を依頼する。（5 千字～1 万字程度 = 図を含めて 4～6 頁程度）
- 3) 短報: 日本下垂体研究会の開催する学術集会において、最優秀発表賞等を受賞した研究者に原稿を依頼する。（1 千字 = 図を含めて 1 頁程度）
- 4) 解説、学会記録、紹介、事務局からのお知らせなど

5. その他

- i) 掲載希望の方は、編集委員に連絡の上、発行の 1 ヶ月前までに原稿をお届けください。
- ii) 投稿原稿（論文 I）の採用は、編集委員を含む 2 名の査読により決定し、その他の採用は編集委員で査読し決定します。
- iii) 本誌に掲載された記事、画像の著作権は、日本下垂体研究会に帰属します。
- iv) 本文中の図は、写真も含め、白黒およびカラーのどちらの使用も認めます。
- v) 掲載料、寄稿や記事の掲載に著者負担はありません。
- vi) 校正は著者による校正を 1 回のみ行います。日本下垂体研究会誌編集委員より著者宛に E-mail で初稿が送られますので、校正して当該委員へ返送してください。

6. 論文の送り先

各日本下垂体研究会誌編集委員へ E-mail で送ってください。

印刷原稿の送付先

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

自治医科大学医学部解剖学講座（組織学部門）

電話: 0285-58-7314 Fax: 0285-44-5243

編集長 : 屋代 隆: tyashiro@jichi.ac.jp

編集委員 : 菊地元史: kikuchim@jichi.ac.jp

東 森生: azumam@jichi.ac.jp



**日本下垂体研究会誌編集部**

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1  
自治医科大学医学部解剖学講座(組織学部門)

電話: 0285-58-7314

Fax : 0285-44-5243

編集長 : 屋代 隆 tyashiro@jichi.ac.jp

編集委員: 菊地元史 kikuchim@jichi.ac.jp

東 森生 azumam@jichi.ac.jp