

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻  
平成 19 年度博士課程 入学  
氏 名 丹藤 由希子  
指導教員名 窪川 かおる

論文題目 **Studies on the origin of the hypothalamus-pituitary endocrine axis and the evolution of glycoprotein hormones in amphioxus**  
(ナメクジウオにおける視床下部一下垂体系の起源と糖タンパク質ホルモンの進化に関する研究)

内分泌系は、魚類をはじめとする脊椎動物の恒常性の維持、成長、繁殖などの制御に必須の生体調節機構である。脊椎動物の内分泌器官あるいはホルモンとその受容体には、その存在の有無や構造の違いが動物群間にあるが、無脊椎動物と比較すればその特徴はほぼ同じと言える。一方、無脊椎動物の内分泌機構は、動物群によって大きく異なる。しかも、その多くはホルモンの合成・分泌に特化した内分泌器官をもたず、神経細胞が内分泌細胞を兼ねる神経内分泌機構を発達させている。

脊椎動物に固有の内分泌機構の一つに視床下部一下垂体系がある。中枢神経からの情報と体の各所の機能を結ぶ重要な内分泌経路で、今までにその役割の解明について膨大な研究がなされてきたが、なぜ脊椎動物だけにその内分泌機構が形成され、機能が獲得されたか、という進化の側面はよく分かっていない。したがって、視床下部一下垂体系の進化を研究することは、それらの内分泌器官の原型および根本的な役割を明らかにし、それらの理解を深めるために重要である。本

研究では、脊椎動物と同じ脊索動物門に属し、脊椎動物の祖先と最も近縁なナメクジウオを対象とし、視床下部一下垂体系に相当する内分泌系の探索のために内分泌物質の分子生物学的解析を行った。

ナメクジウオは脊索をもつ無脊椎動物であるが、視床下部一下垂体系は確認されていない。しかし、体軸と平行する神経索があり、ハチェック窩という小器官が頭部にある。ハチェック窩はその形態と発生・分化の様式、分泌顆粒の存在のために下垂体と相同器官であるとみなされてきた。しかし、2008年に終了したフロリダナメクジウオのゲノム解析からは下垂体ホルモンと相同な遺伝子は見つかっていない。

本論文は、脊椎動物の視床下部一下垂体系の進化を、ナメクジウオの内分泌機構の解析から明らかにすることを目的として、ナメクジウオに下垂体ホルモンの存在を探索し、その候補となる遺伝子の単離、その発現組織について明らかにした。これらの結果に加えて、下垂体に存在する他の内分泌物質の存在を調べ、合わせて視床下部一下垂体系の進化について新たな考察を加えた。以下に研究の各論を記し、最後に総合的な結論を示す。

## 1. ナメクジウオにおける下垂体ホルモンの探索

ナメクジウオのハチェック窩は、脊椎動物の下垂体の発生初期に外胚葉の陥入によって形成されるラトケ嚢と同様な分化をすること、ペプチド顆粒が電顕で観察されることから、下垂体と相同な器官であると考えられてきた。そこで、ハチェック窩に存在する下垂体関連遺伝子を探索した。ハチェック窩は長さ約 100  $\mu\text{m}$ 、高さ 50  $\mu\text{m}$ ほどの小器官なので、レーザーマイクロダイセクション法によりハチェック窩だけを切除して集め、サブトラクションライブラリーおよび cDNA ライブラリーの作製と網羅的解析を行った。約 2000 個の発現遺伝子の中に、成長ホルモン (GH)、プロラクチン (PRL)、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) および糖タンパク質ホルモンである濾胞刺激ホルモン (FSH)、黄体ホルモン(LH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)のホモログはなかったが、内分泌作用と関連のある転写因子 AP-1、SREBP1 等、及び分泌に関係する Rab 様タンパク質等の遺伝子発現が確認された。

なお、LC-MS/MS によるハチェック窩の網羅的アミノ酸配列解析でも、下垂体タンパク質ホルモンは得られなかったため、ハチェック窩が下垂体と同じ働きをもつ器官であるという結論は出せなかったが、発現遺伝子の解析から何らかの分泌活動に関与していることは分かった。

## 2. ナメクジウオの糖タンパク質ホルモンの構造

フロリダナメクジウオのゲノム解析では、下垂体ホルモン遺伝子の存在は報告されていないが、詳細に再度の検索を行った。やはり GH、PRL、ACTH、さらには FSH、LH、TSH の遺伝子もなかったが、下垂体、脳、生殖腺、膵臓等に存在する Thyrostimulin のホモログ遺伝子が見つかった。Thyrostimulin は 2002 年に発見された糖タンパク質ホルモンで、ハエや線虫などの無脊椎動物にも存在する。脊椎動物の Thyrostimulin は、FSH、LH、TSH の $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖それぞれと相同性の高い GPA2 と GPB5 の 2 つのサブユニットからなる。ナメクジウオの GPA2 (AmpGPA2) と GPB5 (AmpGPB5) は下垂体ホルモンには分類できないが、唯一の糖タンパク質ホルモンとして注目し、まずそれらの cDNA を取得し、構造を調べた。

PCR 法で単離したナメクジウオ cDNA のうち、AmpGPA2 は全長 1205bp、AmpGPB5 は全長 1129bp であった。脊椎動物の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖および他の無脊椎動物の GPA2 と GPB5 の遺伝子のアライメントは、糖付加部位の位置こそ異なるが、脊椎動物とナメクジウオの間に高い相同性を示した。また、カイコで発現させ作製した AmpGPA2 と AmpGPB5 の融合タンパク質の糖鎖切断処理により、糖の付加を確認した。また、化学的架橋処理によってヘテロダイマーを形成することを示した。さらに、N 端のアミノ酸解析で、シグナルペプチド部分を同定した。

## 3. AmpGPA2 と AmpGPB5 のゲノム構造とシンテニー解析

AmpGPA2 と AmpGPB5 のイントロン-エキソン構造は、脊椎動物の下垂体糖タンパク質ホルモン遺伝子と同様の構造をもっていた。また、フロリダナメクジウオのゲノム上では GPA2 と GPB5 遺伝子は約 2kbp の間隔で近接していた。これは、両サブユニットが同一分子の遺伝子重複により生じた可能性を示す。また、染色体上の遺伝子の位置および並び順の異同を示すシンテニー解析を、ヒトの糖タンパク質ホルモンサブユニット (GPA1、GPA2 と 3 種類の $\beta$ 鎖) およびナメクジウオの GPA2 と GPB5 について行った。ヒトの $\beta$ 鎖遺伝子と AmpGPB5 を比較したシンテニーは高い類似性が示された。 $\alpha$ 鎖では、ヒトとナメクジウオそれぞれの GPA2 が、FSH の $\beta$ 鎖遺伝子あるいは AmpGPB5 と近接し、同様のシンテニーを示した。他の脊椎動物のニワトリ、マウス、フグとの間においても類似性を示したが、染色体上の周辺の遺伝子の欠失がみられ、ヒトとのシンテニーよりも類似性は低かった。これらの結果は、 $\alpha$ 鎖も $\beta$ 鎖も脊椎動物への進化における 2 回のゲノム重複で分化し、 $\alpha$ 鎖の一部はその後欠失したこと、またヒトとナメクジウオは同じ祖先からの遺伝子をよく保存していることを示している。

#### 4. *AmpGPA2* と *AmpGPB5* の発現

*AmpGPA2* と *AmpGPB5* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法で調べた。両遺伝子ともに発現は神経索、鰓、生殖腺にみられたが、ハチェック窩には発現はみられなかった。神経索では、咽頭前端から生殖腺前端の背側に位置する神経索前方の神経細胞に発現が局在した。*AmpGPB5* の抗体を作製し、免疫染色法でタンパク質の存在場所を調べた結果も、遺伝子発現部位と同様な場所における分布を示した。さらに、蛍光二重染色で両遺伝子が同じ細胞に発現することを明らかにした。以上から、ナメクジウオの *Thyrostimulin* は同一細胞で合成されヘテロダイマーを形成する糖タンパク質ホルモンであることが示された。

#### 5. 下垂体ホルモン以外の内分泌物質の探索と遺伝子発現解析

視床下部一下垂体系には神経ホルモンやペプチドホルモン受容体が存在する。ナメクジウオのゲノム解析は、バソトシン遺伝子 (*AmpVT*) と生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 受容体 (*AmpGnRHR*) の存在を示したが、これら以外の遺伝子は見つからなかった。そこで、これらの遺伝子発現を ISH 法で調べたところ、*AmpVT* は神経索の先端腹側及び *AmpGPA2* と *AmpGPB5* の発現領域より少し前方の領域にある細胞に発現していた。また、2種類ある *GnRHR* の遺伝子はいずれも神経索の前半部分に発現し、そのうち1種類は神経索先端付近の細胞に強く発現していた。視床下部および下垂体には性ステロイド受容体も存在し、生殖腺から分泌された性ステロイドによるフィードバック調節を行っている。そこで、ナメクジウオのエストロゲン受容体 (*AmpER*) とステロイド受容体 (*AmpSR*) の遺伝子発現の局在を調べたところ、*ER* のみが神経索の先端部分に発現していた。

以上から、脊椎動物の視床下部一下垂体系に存在するホルモンおよび受容体は、ナメクジウオにその祖先型がみられ、それらの遺伝子発現は神経索前端に集中していることが明らかになった。このことは、視床下部一下垂体系が、脊椎動物の祖先では神経内分泌系として機能し、脊椎動物になって現在の系になったことを示唆する。

本研究は内分泌系の進化、ひいては脊椎動物の生体制御系の進化に新たな知見を与えるものである。魚類から哺乳類に至る脊椎動物の内分泌系の本質を理解する上で本研究の意義は大きく、今後の下垂体の発生と機能、さらには応用分野の研究への寄与が期待される。