

氏名(本籍)	檜山 源(東京都)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第34号
学位授与年月日	平成19年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	鳥類プロラクチンに関する分子遺伝学的研究
論文審査委員	(主査) 政岡 俊夫 (副査) 滝沢 達也 有嶋 和義 神作 宜男

## 論文内容の要旨

### 目的

プロラクチン(PRL)は、脊椎動物の下垂体前葉において合成、分泌されるペプチドホルモンであり、多彩な生理作用を示すことが知られている。鳥類においては、生体内PRL濃度の上昇が抱卵及び育雛行動からなる就巢行動発現と密接な関係があることが明らかとされている。さらに、他の脊椎動物と同様に、糖鎖修飾による糖鎖付加型PRL(G-PRL)が存在し、繁殖周期等の生理的状态の変化に伴いG-PRL存在比率は変動することが明らかとされている。また、鳥類PRLは哺乳類等とは異なり、主として血管作動性腸ポリペプチド(VIP)により促進的に制御されていることが知られている。しかしながら、VIPによるPRL遺伝子発現制御機構の詳細及び繁殖周期におけるG-PRLの機能及び比率変動の制御機構は解明されておらず、PRLによる就巢行動制御機構の詳細は未だ不明な点が多く残されている。様々な鳥種においてPRL遺伝子構造及び糖鎖付加型アイソフォームを同定することは、詳細なPRL遺伝子発現機構及びPRLの組織への作用機序解明を可能とし、鳥類共通の就巢行動発現機構の解明に繋がると考えられる。さらにこれは将来的な人為的鳥類繁殖制御法の確立を可能とすると考えられ、産業的にも動物応用科学的にも大きな意味を持つと言える。従って、本研究では、就巢行動発現機構解明の一助とするため、様々な鳥種におけるPRL構造を明らかにすることにより、PRLの合成及び分泌、そして機能における鳥類共通性を分子遺伝学的な面から解析を行うことを目的とした。

### 実験1 ニワトリ胚発生期及び繁殖周期におけるPRLアイソフォーム解析

現在までに、ニワトリ、シチメンチョウ及びアヒルにおいて、翻訳後修飾である糖鎖修飾による糖鎖付加型PRL(G-PRL)の存在が明らかとされており、成熟PRLアミノ酸配列における糖鎖コンセンサス配列は、3種に共通して56番目に認められるAsn-Gly-Cys(N-G-C)、シチメンチョウにおいて197

番目に認められる Asn-Asn-Cys (N-N-C)、アヒルにおいて6番目に認められる Asn-Gly-Ser (N-G-S) が考えられるが、それらの機能は未だ明らかとされていない。また、シチメンチョウにおける G-PRL は、分子量がほぼ等しい2種が存在し、生理的状态の変化により G-PRL の存在比率が変動を示すことが明らかとされている。シチメンチョウとは異なり、糖鎖コンセンサス配列が1箇所のみであるニワトリにおける G-PRL が、生理的状态によりシチメンチョウと同様の変化を示すか否かは不明である。従って、本実験では、糖鎖コンセンサス配列の機能解明のため、ニワトリにおける異なる繁殖期及び胚発生期における G-PRL 存在比率の変動を明らかにすることを目的とし、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、ニワトリ各繁殖期及び胚発生期においては、シチメンチョウにおける報告とは異なり、時期特異的アイソフォームを含め最大6種の分子量の異なる G-PRL が検出された。さらにそれら G-PRL アイソフォームは、結合糖鎖に対するシアル酸の結合数及び糖鎖分岐構造が異なることが明らかとなった。これらのことから、少なくとも56番目に認められる N-G-C に対し糖鎖が結合し、さらに各アイソフォームにおけるレセプターに対する親和性等の機能が異なる可能性が示唆された。シチメンチョウにおける報告及び本実験結果との相違において、197番目における糖鎖コンセンサス配列の有無による G-PRL アイソフォームの立体構造変化、又は種特異的糖鎖構造の存在、あるいは実験条件の違いが起因している可能性が考えられた。

## 実験2 キジ目鳥類における成熟 PRL cDNA 及びウエスタンブロット解析

実験1において推測された、ニワトリ及びシチメンチョウにおける G-PRL 比率変動に関する差異の原因を明らかとするためには、他のキジ目鳥類における G-PRL 及び糖鎖コンセンサス配列に関する共通性あるいは特異性を解明する必要がある。従って、本実験では、キジ目鳥類であるキジ、クジャク及びホロホロチョウにおける cDNA 構造を明らかとし、既に報告されているキジ目鳥種 cDNA との相同性解析、さらにキジ目各鳥種におけるウエスタンブロット解析を行った。その結果、キジ目鳥種 cDNA 塩基配列及びアミノ酸配列における相同性は何れにおいても90%以上であり、非常に強く保存されていることが明らかとなった。また、Cys 残基の配置は共通であることから、ジスルフィド結合によるループ形成は保存されていると考えられた。さらに、用いた全ての鳥種において共通して、成熟 PRL 領域56番目において N-G-C が認められ、ウエスタンブロットにより複数の分子量の異なる G-PRL が検出された。また、キジにおいては、系統解析によりシチメンチョウと非常に近縁であることが明らかとされ、シチメンチョウと同様、56番目に加え、197番目において N-N-C が認められたが、他の鳥種と同様に複数の G-PRL が検出されたことから、シチメンチョウにおいても複数の G-PRL の存在が推測された。さらに、197番目に認められる N-N-C に対し糖鎖が結合する場合、ジスルフィド結合によるループ形成に影響を及ぼし、検出されるバンドパターンが変化する可能性が考えられたが、ジスルフィド結合還元及び非還元状態におけるバンドパターンの比較の結果、各種とも大きな違いは認められなかった。これらのことから、197番目の N-N-C は糖鎖結合部位としての機能を持たず、56番目において認められた N-G-C がキジ目共通の糖鎖結合部位である可能性が考えられ、ニワトリ及びシ

チメンチョウにおける G-PRL 比率変動の差異は、種特異的糖鎖構造が存在する可能性は否定できないが、系統遺伝学的に非常に近いキジにおける結果より、実験条件による違いが起因している可能性が強く示唆された。

### 実験3 キジ目鳥類における PRL プロモーター構造解析

鳥類 PRL 遺伝子発現制御機構においては、VIP が大きく関与することが明らかとされているが、その詳細な経路や PRL プロモーターにおける作用部位に関する共通性は未だ不明である。プロモーターにおける構造共通性を明らかにすることは、キジ目鳥類 PRL 共通制御機構解明のみならず、実験2において推測された56番目に認められる N-X-C の機能及び G-PRL の存在に関する共通性を裏付けることが可能であると考えられ、キジ目鳥類における PRL 機能類似性を示すことが可能であると考えられる。従って、本実験においては、様々なキジ目鳥類 PRL における転写開始点より約 3kb 上流までの PRL プロモーターにおける塩基配列決定及び相同性解析を行い、構造的共通性及び特異性を明らかとすると共に、相同性による遺伝的類縁関係の検討を行った。その結果、キジ及びシチメンチョウは、cDNA 解析と同様、他の鳥種とは独立したクラスターを形成し、非常に近縁であることが明らかとなった。また、ウズラ及びホロホロチョウにおいては、大きな挿入配列が認められるが、転写開始点より上流約 3kb までのその他の領域における相同性は 81% 以上と比較的高い値が示され、キジ目鳥類における PRL プロモーターにおける基本構造は強く保存されていることが明らかとなった。また、特に近位プロモーターにおける相同性は、93.5% 以上と非常に高く、これまでの研究により VIP 刺激による PRL 転写制御の機能部位とされている領域 (VIP レスポンスエレメント: VRE) は、用いた全てのキジ目鳥類において完全に保存されていた。以上のことから、キジ目鳥類における PRL 遺伝子発現調節機構は共通性が非常に高く、基本的な発現調節は VIP により支配されており、その経路には PRL 近位プロモーターの VRE を中心とした高保存領域が大きく関与していると考えられた。また、キジ目鳥類において、PRL は cDNA のみならず、プロモーターにおいても構造が強く保存されていることから、PRL が有する機能は非常に類似性が高いことが強く示唆された。

### 実験4 晩成性鳥類における PRL cDNA 及びプロモーター構造解析

キジ目を始めとする早成性鳥類における血漿 PRL 濃度は、産卵後期において急激に上昇し、抱卵期においてピークに達し、孵化と共に急激に減少することから、早成性鳥類における PRL は、主に抱卵行動の誘起及び維持に作用すると考えられている。一方、ハトやインコ等の晩成性鳥類においては、産卵期及び抱卵初期における血漿 PRL 濃度の急激な上昇は認められず、抱卵後期において急激な上昇を示し、育雛初期においても高濃度が維持されることから、主として育雛行動の誘起に関与している可能性が示されている。繁殖期における PRL 作用が異なると考えられる晩成性鳥類において PRL 遺伝子発現制御機構及び構造を明らかとすることは、鳥類共通あるいは種特異的なアッセイ系の確立を可能とし、より詳細な PRL 作用機序の解明へ繋がると考えられる。従って、本章においては、晩成性鳥

類であるセキセイインコ及びブンチョウにおける PRL cDNA 及び近位プロモーターにおける塩基配列決定による構造解析及び早成性鳥類と比較することにより、鳥類 PRL 共通性解明を目的とした。その結果、セキセイインコ及びブンチョウ共に、アヒルやシチメンチョウ等と同様、成熟 PRL 領域において複数の糖鎖コンセンサス配列が認められた。しかしながら、早成性及び晩成性を問わず全ての鳥種において共通して認められる糖鎖コンセンサス配列は 56 番目に認められる N-X-C のみであることから、少なくともこの配列が鳥類共通の糖鎖結合部位である可能性が示され、晩成性鳥類においても G-PRL が存在する可能性が考えられた。また、セキセイインコ及びブンチョウ成熟 PRL 領域における cDNA 及びプロモーターにおける早成性鳥類との相同性を解析した結果、何れにおいても約 85% 以上と比較的高い値が示され、さらにプロモーターにおいて VRE は完全に保存されていたことから、鳥類における基本的な PRL 遺伝子構造及び転写制御機構は共通である可能性が強く示された。

## 結論

本研究により、鳥類における基本的な PRL 遺伝子構造、転写制御機構及び G-PRL の存在は早成性、晩成性を問わず共通性が非常に高く、PRL の機能に関しても鳥類共通性が存在する可能性が示された。また、鳥類において初めて時期特異的なアイソフォームを含めた複数の分子量が異なる G-PRL の存在を明らかとし、さらに鳥類における基本的な PRL 遺伝子発現は、VIP 刺激が VRE に作用することにより促進される共通機構により制御されている可能性を示した。これらのことから、今後各アイソフォームのレセプターに対する親和性等の機能特異性及び VIP - VRE 経路の詳細を明らかにすることにより、人為的な PRL 遺伝子転写制御あるいはレセプターへの結合制御による就巢行動発現制御が可能となると考えられる。以上の様に、複数の異なるアプローチによる人為的就巢行動制御の可能性を示し、さらに晩成性鳥類を含む様々な鳥種における PRL 転写制御領域及び cDNA 構造を明らかとした本研究結果は、家禽においては卵産生、稀少鳥類においては種の保存に関連する研究分野に大きく貢献すると言える。

## 論文審査の結果の要旨

プロラクチン (PRL) は、脊椎動物の下垂体前葉において合成、分泌されるペプチドホルモンである。鳥類においては、血漿 PRL 濃度の上昇と就巢行動の発現に密接な関係があり、さらに、生理的状态の変化に伴い、糖鎖修飾による糖鎖付加型 PRL (G-PRL) と非糖鎖付加型 PRL (NG-PRL) の存在比率が大きく変化することが明らかにされている。鳥類 PRL の合成と分泌は、主として視床下部において産生される血管作動性腸ポリペプチド (VIP) により促進的に制御されているが、PRL 遺伝子の発現や糖鎖修飾の機構は未だ不明な点が多い。鳥類における G-PRL の同定及び PRL 遺伝子発現調節機構の解明は、鳥類における人為的就巢行動発現制御を可能にし、産業的にも野生動物学的にも大きな意味を持っている。

このような背景から、本論文では、まず生理的状态の変化に伴う NG-PRL と G-PRL の存在比率を検

討するとともに、G-PRLアイソフォームの分子種の同定を行っている。次に、種特異的糖鎖構造の可能性を検討するために、キジ目鳥類におけるPRL cDNAをクローニングし、さらに糖鎖付加型アイソフォームの分子種を同定している。さらに、キジ目鳥類におけるPRLの合成及び分泌機構を解明するために発現制御領域をクローニングし、共通制御領域の同定を試みている。従来、鳥類の遺伝子解析には主として家禽が用いられてきた。晩成性鳥種における報告は非常に少なく、また、繁殖に関して早成性鳥種との相違点が不明なことから早成性鳥種におけるPRL cDNA及び発現制御領域をクローニングし、分子遺伝学的な側面から両者を比較解析している。本論文は4実験から構成されている。

#### 実験1 ニワトリ胚発生期及び繁殖周期におけるPRLアイソフォーム解析

近年、糖鎖はAsn-X-Cys：N-X-Cという配列にも付加することが明らかにされている。現在までに報告されている鳥種では成熟PRLの56～58番目にこの配列が認められる。シチメンチョウにおいてはさらに197～199番目にも認められる。ニワトリでは糖鎖付加の新コンセンサス配列は一箇所のみであり、生理的状态によりシチメンチョウと同様の変化を示すか否かは不明である。実験1においては、ニワトリを用いて繁殖期及び胚発生期におけるNG-PRL及びG-PRL存在比率の変動を検討している。

ニワトリの各繁殖期及び胚発生期において、シチメンチョウにおける報告とは異なり、時期特異的アイソフォームを含め分子量の異なる最大6種のG-PRLアイソフォームが検出された。さらに、このG-PRLアイソフォームは、結合糖鎖に対するシアル酸の結合数及び糖鎖分岐構造が異なることが明らかとなった。これらの結果より、56番目に認められるAsnに糖鎖が結合し、異なる糖鎖構造を有するアイソフォームが存在することから、各アイソフォームのPRLレセプターに対する親和性等の機能が異なる可能性を示唆している。本実験の結果はシチメンチョウにおいて報告された結果と一致しない点もあり、種特異的糖鎖構造が存在する可能性が考えられると推論している。

#### 実験2 キジ目鳥類における成熟PRL cDNA及びウエスタンブロット解析

実験1においてニワトリ及びシチメンチョウにおけるG-PRL比率変動に関する違いから特異的糖鎖構造が存在する可能性が考えられた。しかしながら、他の鳥種におけるPRL cDNA構造及びG-PRLの存在に関しては現段階では不明であることから、実験2ではキジ目鳥類における糖鎖コンセンサス配列の保存及びG-PRLアイソフォームの存在を解明するために、キジ、クジャク及びホロホロチョウを用いて、cDNA構造を明らかにし、さらにキジ目各鳥種PRLのウエスタンブロット解析を行っている。

その結果、キジ目鳥種cDNA塩基及びアミノ酸の配列相同性は非常に高いことを明らかにしている。また、用いた全ての鳥種において、共通して成熟PRL領域56～58番目においてN-G-Cが認められ、ウエスタンブロットにより複数の分子量の異なるG-PRLが検出され、キジPRLの塩基配列及びアミノ酸配列はシチメンチョウに最も近く、非常に近縁である可能性が示された。この結果から、56番目のAsnがキジ目共通の糖鎖結合部位である可能性が考えられたと述べている。さらに、キジにおける結果から、シチメンチョウにおいて報告されているG-PRLは異なる分子種から構成されている可能性が

強いことを示唆し、分子量の異なる G-PRL が存在することは、少なくともキジ目においては種特異的な糖鎖構造が存在していることを明らかにしている。

### 実験3 キジ目鳥類における PRL プロモーター構造解析

鳥類 PRL 遺伝子発現は VIP によって制御されていることが明らかとされているが、VIP による刺激後の細胞内経路や PRL プロモーターにおける作用部位等は未だ不明であることから、実験3においては、様々なキジ目鳥類 PRL における転写開始点より約 3kb 上流までの PRL プロモーターにおける塩基配列を解析し、共通性及び特異性を明らかとするとともに、遺伝的類縁関係を検討している。

その結果、キジ及びシチメンチョウは、PRL cDNA 配列と同様、他の鳥種とは独立したクラスターを形成し、両種は非常に近縁である可能性が高いことを示している。また、ウズラ及びホロホロチョウにおいては、大きな挿入配列が認められるが、転写開始点より上流約 3kb までのその他の領域における相同性は 81% 以上と比較的高いことを示し、キジ目鳥類における PRL プロモーターの基本構造が強く保存されていることを明らかにしている。また、翻訳開始点より 200 塩基までの近位プロモーターにおける相同性は、93.5% 以上と非常に高く、これまでの研究により VIP 刺激に応答し、PRL 転写制御における機能部位とされている領域は、用いた全てのキジ目鳥類において完全に同じ配列であることを明らかにしている。以上の結果から、VIP による PRL 遺伝子発現調節機構はキジ目鳥類において強く保存されており、PRL 近位プロモーター高保存領域が大きく関与していることを明らかにしている。

### 実験4 晩成性鳥類における PRL cDNA 及びプロモーター構造解析

キジ目を初めとする早成性鳥類における血漿 PRL 濃度は、産卵後期において急激に上昇し、抱卵期においてピークに達し、孵化とともに急激に減少する。一方、ハトやインコ等の晩成性鳥類においては産卵期及び抱卵初期における血漿 PRL 濃度の急激な上昇は認められず、抱卵後期において急激な上昇を示し、育雛初期においても高濃度が維持されている。晩成性鳥類において PRL 遺伝子発現制御機構を解明することは、鳥類共通あるいは種特異的なアッセイ系の確立を可能とし、より詳細な PRL 作用機序の解明へ繋がると思われる。実験4においては晩成性鳥類であるセキセイインコ及びブンチョウにおける PRL cDNA 及び近位プロモーターの塩基配列を決定している。

その結果、セキセイインコ及びブンチョウともに、アヒルと同様、成熟 PRL 領域アミノ酸配列 6 番目において N-G-S、アヒルキジ目鳥類と同様、56 番目において N-G/S-C、さらにブンチョウにおいてはキジ及びシチメンチョウと同様、197 番目において N-N-C が認められることを明らかにしている。早成性及び晩成性を問わず全ての鳥種において共通して認められる糖鎖コンセンサス配列は 56 番目に認められる N-X-C のみであることから、この配列が鳥類共通の糖鎖結合部位である可能性を示し、晩成性鳥類においても G-PRL が存在する可能性があるとして述べている。また、セキセイインコ及びブンチョウの成熟 PRL 領域における cDNA 及び近位プロモーターにおける早成性鳥類との相同性を解析した結

果、何れにおいても約85%以上と比較的高いことから、鳥類における基本的なPRL構造及び転写制御機構は、早成性、晩成性を問わず共通している可能性が強いと推論している。

以上のように、本論文は、鳥類におけるPRL遺伝子発現制御領域の構造を明らかにし、早成性、晩成性を問わず鳥類に共通してG-PRLが存在する可能性が高いことを明らかにしている。アミノ酸配列の相同性等からPRLの高次構造も強く保存されている可能性が考えられ、機能に関しても、鳥類全体において高い類似性が存在する可能性を示している。また、糖鎖付加型PRLには多くのアイソフォームが存在し、時期特異的に量的あるいは質的に変化し、糖鎖付加型PRLにも機能的差異が存在することを明らかにしている。これまでに報告されていたニワトリ、シチメンチョウ、アヒル及びウズラに加え、キジ、クジャク及びホロホロチョウといったキジ目鳥類のみならず、系統遺伝学的に遠縁であるセキセイインコ及びブンチョウを含めた、様々な鳥種におけるPRL構造及び遺伝子発現制御の類似性を明らかにした本研究の成果は、鳥類の抱卵行動及び育雛行動の発現機構に関する研究に対し、有益な情報を提示し、家禽においては卵産生、稀少鳥類においては種の保存に関する研究に大きく貢献するものであり、博士（学術）の学位を授与するに相応しい業績と判定した。