

博士論文(要約)

メダカの脳におけるコルチコトロピン放出ホルモン
(CRH)ファミリー作用系の性差

細野 耕平

目次

目次	2
序論	4
第1章 本項の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
緒言	6
材料と方法	7
結果	13
考察	15
図表	19
第2章 魚類特有の新規 CRH ファミリーメンバーの発見	
緒言	33
材料と方法	33
結果	39
考察	41
図表	46
第3章 本項の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
緒言	54
材料と方法	54
結果	61
考察	64
図表	68
第4章 本項の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
緒言	84
材料と方法	85
結果	90
考察	91

図表	94
総合考察	116
要旨	120
謝辞	123
引用文献	124

序論

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内
に出版予定。

第 1 章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内
に出版予定。

第 2 章

魚類特有の新規 CRH ファミリーメンバーの発見

2-1. 緒言

CRH ファミリーペプチドについては、ヒトやマウスといった哺乳類を中心に、基礎研究から応用・臨床まで幅広く研究されており、知見が蓄積しつつある。種々の動物種での解析結果から、CRH を介したストレス応答メカニズムは脊椎動物を通してリジッドに保存されているのではないかという見方が強まっている (Lovejoy and de Lannoy, 2013)。しかし、魚類においては、未だ CRH ファミリーペプチドに関する研究は発展途上であり、そもそも四足動物と同様に、Crh、Uts1、Ucn2、Ucn3 の 4 種の CRH ファミリーペプチドを有するかどうかさえ明らかとなっていなかった。そのような状況の中、第 1 章において、メダカから CRH ファミリーペプチドをクローニングするとともに、それらの脳内での発現解析を行った。その結果、魚類も既知の CRH ファミリーペプチドを全て有するとともに、メダカの脳内でこれらの遺伝子が発現していることもわかった。これにより、四足動物と同様に、魚類の脳内でも CRH ファミリーペプチドを軸としたストレス応答メカニズムが保存されている可能性が示唆された。一方で、上記のスクリーニングの過程で、これまで報告されていない新規の CRH ファミリーペプチドが見出された。哺乳類では知見が十分に蓄積しているにもかかわらず、このペプチドに相当する分子の報告がないことから、このペプチドは魚類のみ、あるいはそれに近いグループのみに存在する分子である可能性が高いと考えられた。つまり、魚類の脳内には、脊椎動物間で保存性の高いストレス応答メカニズムが存在するとともに、魚類、あるいはそれに近縁なグループにおいてのみ機能するようなストレス応答分子も存在する可能性が示唆された。魚類において特異的にみられるストレス応答メカニズムを理解することは、長年の課題であった魚類のストレス統御をより効率的に実現するための、重要な手掛かりとなると考えられた。そこで本章では、本研究によって同定された新規の CRH ファミリーペプチドをテレオコルチン (Tcn) と命名し、その構造解析、発現解析、および生化学的解析を行うこととした。それにより、魚類に特有のストレス応答を理解するための知見を得ることを目指した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 実験魚

本章での実験には、性成熟した 3-4 ヶ月齢の d-rR 系統のメダカを用いた。メダカは水温 28 度、14 時間明期/10 時間暗期の条件で飼育し、生きたブラインシュリンプの幼生、または市販の固形餌料(おとひめ; 日清丸紅飼料、東京、日本)を一日 3、4 回与えた。脳のサンプリングは、明期開始後 1-3 時間の間に行った。

2-2-2. *tcn* の完全長 cDNA の決定

Ensembl のメダカゲノムデータベース中に、CRH ファミリーペプチドと相同性の高い配列をもつ未知の遺伝子を見出した(遺伝子 ID: ENSORLG00000006816)。そこで、Marathon cDNA Amplification Kit (Takara Bio) によって合成したメダカの脳由来の cDNA プール (Okubo *et al.*, 2006) を鋳型として、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によるクローニングを行った。クローニングに用いたプライマーを表 2 に示した。

1st PCR、nested PCR はともに、14.2 μ l のヌクレアーゼフリー水 (Life Technologies)、2.0 μ l の 10 \times LA PCR Buffer II (Takara Bio)、1.6 μ l の 2.5 mM dNTP (Takara Bio)、0.5 μ l の 10 μ M フォワードプライマー、0.5 μ l の 10 μ M リバースプライマー、1.0 μ l の鋳型 DNA、0.2 μ l の LA Taq HS Polymerase (Takara Bio) を含む、計 20 μ l の反応系で行った。いずれの PCR でも、94 $^{\circ}$ C で 2 分間熱変性させた後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の増幅反応を 5 サイクル、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、70 $^{\circ}$ C で 2 分間の増幅反応を 5 サイクル、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、68 $^{\circ}$ C で 2 分間の増幅反応を 30 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 10 分間の伸長反応を行った。なお、nested PCR の鋳型には、1st PCR の反応液を 200 倍希釈したものを使用した。一連の PCR の後に、産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動した。その後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲルからの切り出し精製を行った。

続いて、以下の作業により TA クローニングを行った。まず、6.9 μ l のゲル精製産物、2.0 μ l の 5 \times KAPATaq Extra Buffer (KAPA Biosystems)、0.8 μ l の 25 mM MgCl₂ (KAPA Biosystems)、0.2 μ l の 10 mM dNTP (KAPA Biosystems)、および 0.1 μ l の KAPATaq Extra Polymerase (KAPA Biosystems) を混合し、72 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートすることで、増幅産物の 3' 末端に dATP の付加をおこなった。その後、1.5 μ l の上記反応産物に、2.5 μ l の 2 \times Rapid Ligation Buffer (Promega)、0.5 μ l の T4 DNA Ligase (Promega)、0.5 μ l の pGEM-Teasy vector (Promega) を加えて混合し、4 $^{\circ}$ C で 16 時間以上インキュベートすることで、ライゲーションを行った。こうして作製されたプラスミドを用いて、以下の方法にしたがって大腸菌を形質転換した。まず、5.0 μ l (全量) の上記ライゲーション産物に、50 μ l のコンピテント

セル懸濁液(*E. coli* JM109; Promega)を加え、氷上で 30 分間のインキュベート、42°C で 1 分間のインキュベート、そして再度、氷上で 2 分間のインキュベートを行った。続いて、37°C に加温した SOC 培地を 300 μ l 添加し、37°C で 1 時間振盪培養した。その後、75 μ g/ml のアンピシリン、0.1 mM の IPTG、および 80 μ g/ml の X-Gal を含む LB 寒天培地に菌体をプレーティングし、37°C で 18 時間培養した。

形質転換体のスクリーニングは、菌体のコロニーを鋳型として用いたコロニーPCR により行った。PCR は、1.0 μ l のヌクレアーゼフリー水(Life Technologies)、2.0 μ l の 5 \times KAPATaq EXtra Buffer(KAPA Biosystems)、0.8 μ l の 25 mM MgCl₂(KAPA Biosystems)、0.2 μ l の 10 mM dNTP(KAPA Biosystems)、0.5 μ l の 10 μ M フォワードプライマー、0.5 μ l の 10 μ M リバースプライマー、5.0 μ l のコロニー懸濁液、0.02 μ l の KAPATaq Extra Polymerase(KAPA Biosystems)を含む、計 10.02 μ l の反応系で行い、94°C で 2 分間熱変性させた後、94°C で 15 秒間、57°C で 15 秒間、72°C で 1 分間の増幅反応を 30 回繰り返した。

コロニーPCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、目的のインサートを含むプラスミドをもつと考えられるコロニーを 4 つずつ選択した。その後、それらのコロニーを 4.5 ml の LB 培地中において、37°C で 16 時間の振盪培養を行い、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)を用いてプラスミドを精製した。得られたプラスミドのシーケンシングは FASMAC に委託した。得られた配列をアセンブルし、メダカの *tcn* cDNA の完全長配列を決定した。加えてこの cDNA を Ensembl のメダカゲノムデータベースと照らし合わせることで、エキソンおよびイントロンの構造を把握した。

2-2-3. Tcn の構造解析

2-2-2 で得られた cDNA から演繹されるアミノ酸配列を、InterProScan 5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>)、および SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)を用いて解析し、特定のドメインやモチーフを検索した。解析は全てデフォルトのセッティングで行った。

2-2-4. *in silico* での他の動物種における Tcn の探索、系統樹解析、およびシンテニー解析

得られたメダカ Tcn の配列をクエリとして GenBank や Ensembl のデータベースを Blast サーチすることで、他の動物種の Tcn オースログを探索した。同時に、様々な動物種から、予想配列も含めて既知の CRH ファミリーペプチドの配列を得た。そして Clustal W を用いてそれらの配列のアライメントを作成し、近隣結合法を用いて系統樹解析を行った

(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php>)。系統樹解析に用いたペプチド、動物種、および GenBank のアクセッション番号を表 2-3 に示した。

また、これらのペプチドのうち、Crh、Tcn および UtsI については、Ensembl のゲノムデータベースを用いて、それらの遺伝子の近傍遺伝子 (*trim55*、*adhfe1*、*dnajc5b*) の配置を調べた。

2-2-5. *tcn* の *in situ* hybridization 用プローブの作製

1-2-2 と同様の手順で、*in situ* hybridization 用のプローブを作製した。なお、用いたプライマーを表 2-1 に示した。

2-2-6. *tcn* の *in situ* hybridization

2-2-5 で作製された *tcn* のプローブを用いて、1-2-3 と同じ手順で *in situ* hybridization を行った。ProK の濃度は 5 $\mu\text{g/ml}$ 、ハイブリダイゼーションの際のプローブ濃度は 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 、DIG 抗体の希釈倍率は 1000 倍とした。BCIP/NBT の発色は 20 時間行った。写真撮影は 1-2-4 と同様の手順で行った。

2-2-7. *tcn* と *crh* の二重 *in situ* hybridization

T7 RNA Polymerase (Roche Diagnostics) と Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) を用いて、2-2-5 で作製した *tcn* プローブを fluorescein 標識した。この fluorescein 標識 *tcn* プローブと 1-2-2 で作製した DIG 標識 *crh* プローブを用いて、以下の方法にしたがって二重 *in situ* hybridization を行った。

性成熟した雌雄のメダカ各 5 匹の脳を摘出し、4%PFA/PBS 溶液中で、4°C で 3 時間固定した。続いて 10%、20%、30% のスクロース/PBS 溶液でスクロース置換を行い、5% アガロース/20% スクロースに包埋し、-80°C で保存した。その後、クリオスタット (HM550; Thermo Fisher Scientific) を用いて厚さ 20 μm の凍結切片を作製し、スライドガラス (MAS-GP typeA; Matsunami) 上に並べた後、使用まで -80°C で保存した。

凍結切片を解凍、乾燥し、PBS で 10 分間洗浄した後、内在性ペルオキシダーゼの不活化のために、0.6% H_2O_2 /PBS で 30 分間処理した。続いて、PBS で 2×10 分間洗浄した後、1-2-3 と同じ手順でアセチル化処理とプレハイブリダイゼーションを行った。その後、ハイブリダイゼーションバッファー中に 0.4 $\mu\text{g/ml}$ の DIG 標識 *tcn* プローブ、および 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の fluorescein 標識 *crh* プローブを加え、55°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。1-2-3 と

同じ手順で洗浄、ブロッキングを行った後、1.5% Blocking Reagent (Roche Diagnostics) /TBS で 1000 倍希釈した DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 溶液 (5 mg/ml) (Life Technologies)、1000 倍希釈した AP 標識ヒツジ抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics)、100 倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヒツジ抗 fluorescein 抗体 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) と、4°C で一晩反応させた。その後、TBST で 2×20 分間洗浄し、Tyramide Signal Amplification (TSA) Plus Fluorescein System (PerkinElmer) を用いて 45 分間 TSA 反応を行った。TBST で 3×5 分間洗浄した後、Fast Red Tablets (Roche Diagnostics) を用いて 6 時間発色させた。PBS で 2×5 分間洗浄した後、VECTASHIELD Hard Set (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて封入した。撮影は、共焦点レーザースキャン顕微鏡 TCS SP8 (Leica microsystems) によって行った。取得した画像は、Photoshop CS6 (Adobe Systems) を用いて、明度とコントラストを調節した。

2-2-8. 受容体アッセイ用の Crh 受容体コンストラクトの作製

Marathon cDNA Amplification Kit (Takara Bio) を用いて合成したメダカの脳由来の cDNA プール (Okubo *et al.*, 2006) から、メダカがもつ 2 種類の Crh 受容体の翻訳領域の全長を PCR によって増幅した。PCR に用いたプライマーを表 2-1 に記した。なお、両受容体ともにフォワードプライマーは翻訳開始点を含む領域でデザインし、培養細胞中における翻訳の効率を高めるため、Kozak 配列 (Kozak, 1981, 1984) を付加した。12.8 μ l のヌクレアーゼフリー水 (Life Technologies)、4.0 μ l の 5× Fidelity Buffer (KAPA Biosystems)、0.6 μ l の 10 mM dNTP (KAPA Biosystems)、0.6 μ l の 10 μ M フォワードプライマー、0.6 μ l の 10 μ M リバープライマー、1.0 μ l の鋳型 cDNA、0.1 μ l の KAPA HiFi HotStart Polymerase (KAPA Biosystems) を含む、計 20 μ l の反応系で PCR を行った。95°C で 5 分間熱変性させた後、98°C で 20 秒間、55°C で 15 秒間、72°C で 1 分 30 秒間の増幅反応を 40 回繰り返した。PCR は duplicate で行った。PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて、目的のバンドのゲルからの切り出し精製を行った。

続いて、以下の作業により TA クローニングを行った。まず、6.9 μ l のゲル精製産物、2.0 μ l の 5× KAPATaq Extra Buffer (KAPA Biosystems)、0.8 μ l の 25 mM MgCl₂ (KAPA Biosystems)、0.2 μ l の 10 mM dNTP (KAPA Biosystems)、および 0.1 μ l の KAPATaq Extra Polymerase (KAPA Biosystems) を混合し、72°C で 30 分間インキュベートすることで、増幅産物の 3' 末端に dATP を付加した。その後、4.0 μ l の反応産物に 1.0 μ l の Salt Solution (Life

Technologies)、1.0 µl の pcDNA3.1/v5-His TOPO vector (Life Technologies) を加えて混合し、室温で 20 分間インキュベートすることで、ライゲーションを行った。こうして作製されたプラスミドを用いて、以下の方法にしたがって大腸菌を形質転換した。まず、5.0 µl (全量) のライゲーション産物に、50 µl のコンピテントセル懸濁液 (*E. coli* JM109; Promega) を加え、氷上で 30 分間、42°C で 1 分間、そして再度氷上で 2 分間のインキュベートを行った。続いて、37°C に加温した SOC 培地を 300 µl 添加し、37°C で 1 時間振盪培養した。その後、75 µg/ml のアンピシリン、0.1 mM の IPTG、および 80 µg/ml の X-Gal を含む LB 寒天培地に菌体をプレーティングし、37°C で 18 時間培養した。

形質転換体のスクリーニングは、菌体のコロニーを鋳型として用いたコロニーPCR により行った。PCR 反応は、1.0 µl のヌクレアーゼフリー水 (Life Technologies)、2.0 µl の 5× KAPATaq EXtra Buffer (KAPA Biosystems)、0.8 µl の 25 mM MgCl₂ (KAPA Biosystems)、0.2 µl の 10 mM dNTP (KAPA Biosystems)、0.5 µl の 10 µM フォワードプライマー、0.5 µl の 10 µM リバースプライマー、5.0 µl のコロニー懸濁液、0.02 µl の KAPATaq Extra DNA (KAPA Biosystems) を含む、計 10.02 µl の反応系で行い、94°C で 2 分間熱変性させた後、94°C で 15 秒間、57°C で 15 秒間、72°C で 1 分間の増幅反応を 30 回繰り返した。

コロニーPCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、目的のインサートを含むプラスミドをもつと考えられるコロニーを 4 つずつ選択した。その後、それらのコロニーを 4.5 ml の LB 培地中において、37°C で 16 時間の振盪培養を行い、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドを精製した。プラスミドのシーケンシングは FASMAC に委託した。得られた配列に PCR エラーによる塩基置換や挿入欠失変異等がないことを確認した後、再び菌体を培養し、QIAfilter Plasmid Midiprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドを大量精製した。

2-2-9. 受容体アッセイ

ヒト胎児の腎細胞由来である HEK293 細胞株を 37°C、CO₂ 濃度 5.0% の条件に設定した CO₂ インキュベーター (Sanyo Electric, Osaka, Japan) 内で、5% の非働化したウシ胎児血清 (Life Technologies) と 50 µg/ml のゲンタマイシン (Life Technologies) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies) にて培養した。ただし、ウシ胎児血清中には CRH ファミリーペプチドが含まれている可能性も考慮して、トランスフェクション以降の培地の血清濃度は 1% に設定した。1-2-2 および 2-2-2 で得られた配列をもとに、C 末端をアミド化した Tcn および Crh ペプチドを受託合成した (Scrum, Tokyo, Japan)。

細胞のトランスフェクションは、以下の方法によって行った。上記で作製した CRH 受容体発現コンストラクト、cAMP 駆動性のレポーターコンストラクトである pGL4.29 (Promega)、および内部標準の pGL4.74 (Promega) を 11:18:1 で混合した DNA 溶液 (総 DNA 量は 15 μ g) に、3 ml の Opti-MEM (Life Technologies)、15 μ l の Plus 試薬 (Life Technologies) を加え、5 分間インキュベートした。さらに、30 μ l の Lipofectamine LTX (Life Technologies) を加えて 30 分間インキュベートした。100 mm ディッシュ (BD Primaria; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 中で 65%コンフルエント程度に達した細胞を用意し、培地を取り除いた上で、上記の溶液を投与した。

トランスフェクションから 24 時間後、100 mm ディッシュ (Becton, Dickinson and Company) 中の細胞を 0.05% Trypsin-EDTA (Life Technologies) を用いて剥離し、細胞塊を分離した後、DMEM (Life Technologies) で希釈した。その細胞懸濁液を、24 ウェルプレート (Becton, Dickinson and Company) の各ウェルに 0.5 ml ずつ分注した。トランスフェクションから 42 時間後、0 M、 10^{-11} M、 10^{-10} M、 10^{-9} M、 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M の Crh および Tcn を含む 500 μ l の DMEM (Life Technologies) を加え、リガンド刺激を 6 時間行った。その後、1 ウェルあたり 100 μ l の 1x Passive Lysis Buffer (Promega) を加え、室温で 15 分間シェイクした。さらにその懸濁液をボルテックスすることで、細胞を完全に破碎した。

ルシフェラーゼの蛍光測定は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて、GloMax 20/20n Luminometer (Promega) によって行った。1 回の測定につき、6 μ l の上記の細胞懸濁液、30 μ l の Luciferase Assay Reagent II (Promega) (レポーターコンストラクト由来のホタルルシフェラーゼの基質)、30 μ l の Stop & Glo Reagent (Promega) (内部標準コンストラクト由来のウミシイタケルシフェラーゼの基質) を加えた後、ルシフェラーゼの発光を 10 秒間計測した。

すべてのアッセイは triplicate で行い、独立して 3 回繰り返した。得られたデータは GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA) によって解析した。

2-3. 結果

2-3-1. メダカの新規 CRH ファミリー遺伝子、Teleocortin の同定

メダカのゲノムデータベース中に、既知の Crh とは異なる Crh 様配列を発見したので、その配列のクローニングを行った。その結果、メダカの脳からポリ A テイルを除き、914 bp の全長 cDNA が単離された (GenBank に登録済。アクセッション番号は LC02816)。後の解析が

ら、真骨魚類でのみ保存されている新規の CRH ファミリーペプチドであることがわかったので、テレオコルチン(Teleocortin; Tcn)と名付けた。tcn の cDNA は 1.3 kb のイントロンを挟んで2つのエキソンで構成されており、第2エキソンには、41 アミノ酸残基からなる成熟ペプチドを C 末端に含む、144 アミノ酸残基の前駆体タンパク質がコードされていた。また、前駆タンパク質の N 末端にはシグナルペプチドが、成熟ペプチドの C 末端にはアミド化シグナルが存在していた。これらの構造は、既知の CRH ファミリーペプチドに共通な構造である。さらに Tcn の成熟ペプチドは他の CRH ファミリーペプチドと非常に高い相同性を示し、例えばメダカ Crh の成熟ペプチドとの相同性は 73%であった。一方で、前駆タンパク質のそれ以外の領域においては高い相同性を示さなかった。

次に、メダカの Tcn 配列を用いて公共のデータベースを Blast サーチしたところ、トゲウオ (*Gasterosteus aculeatus*) やティラピア (*Oreochromis niloticus*) を含むいくつかの魚種で Tcn のオーソログと考えられる配列が見つかったが、ヒトやマウス、ニワトリ、ゼノパスといった主要な四足動物のゲノム上にはそのような配列は見つからなかった。また、真骨魚類に近い部類であると考えられる肉鱗類のシーラカンス (*Latimeria chalumnae*) においても、この配列の存在は確認されなかった。メダカからクローニングした Tcn、およびトゲウオやティラピアから見つかった Tcn のアミノ酸配列を、メダカ、トゲウオ、ティラピアの Crh のそれと比較した結果を図 2-1 に示した。

2-3-2. TCN の系統樹解析

Tcn と既知の Crh ファミリーペプチドの関係性を理解することを目的として、系統樹解析を行った(図 2-2)。その結果、メダカの Tcn は CRH ファミリーペプチドに属すものの、既知のペプチド群とは独立してクラスターを形成したことから、新規の CRH ファミリーペプチドであることが確認された。Tcn は既知の CRH ファミリーペプチドのどれよりも Crh に近縁であることもわかった。さらに、上述の解析によりトゲウオやティラピアから見つかった配列も、Tcn のオーソログであることが明らかとなった。また、真骨魚類には2種類の Crh パラログ(それぞれ Crha と Crhb とよぶこととした)が存在することも明らかとなったが、今回発見された Tcn はそれらの Crh パラログとは明らかに異なる系統に位置することが確認された。

2-3-3. Tcn のシンテニー解析

Tcn や他の CRH ファミリーペプチドをコードするゲノムローカスが、どの程度保存性を示し、進化の過程でどのように変化してきたのかについて理解するため、シンテニー解析を行

った(図 2-3)。その結果、*crh* と *tcn* の間でシテニーが高度に保存されていることがわかった。一方で、今回同定された *tcn* をコードするゲノムローカスに相当するローカスを四足動物のゲノム中から見出すことはできなかった。

2-3-4. *tcn* の発現解析

メダカの脳内における *tcn* 発現の局在を把握することを目的として、*in situ hybridization* を行った(図 2-4)。その結果、脳内の 5 つの神経核において、*tcn* の発現が確認された。最も強い発現が確認されたのは終脳の VI であり、それ以外にも視索前野の PMm や視床下部の NVT、被蓋の NIII、延髄の NGS において *tcn* の発現が確認された。

2-3-5. *tcn* と *crh* の共発現解析

tcn と *crh* の脳内における共局在を調べるために、二重 *in situ hybridization* を行った(図 2-5)。その結果、上述の 5 つの神経核全てにおいて、*tcn* を発現するニューロンのほとんどが *crh* も発現していることがわかった。一方で NIII において、*crh* を発現しないものの、*tcn* を発現している小細胞が確認された(図 2-5)。この細胞は形態的にニューロンとは異なり、核が小さく楕円形であり、細胞質も小さかった。

2-3-6. Tcn と Crh の受容体活性化能の比較

Tcn の受容体活性化能の有無や程度を調べることを目的として、Tcn と Crh について受容体アッセイを行った(図 2-6)。その結果、Tcn と Crh のいずれも、濃度依存的に 2 種類の受容体を活性化することがわかった。また、どちらの受容体に対しても Tcn のリガンドとしての能力は Crh とほぼ同程度であることがわかった。Crhr1 に対する Tcn の EC50 は 0.19 nM、Crh の EC50 は 0.58 nM であり、Tcn による最大活性値はベースラインの 28 倍、Crh による最大活性値はベースラインの 29 倍であった。また、Crhr2 に対する Tcn の EC50 は 3.4 nM、Crh は 7.5 nM であり、Tcn による最大活性値はベースラインの 450 倍、Crh による最大活性値はベースラインの 360 倍であった。

2-4. 考察

本研究により、CRH ファミリーに属する新規のペプチドとして Tcn が同定された。Tcn は真骨魚類においては保存されているものの、他の四足動物のゲノム中からは見出されな

った。また、Tcnのアミノ酸配列は、既知のCRHファミリーペプチドのアミノ酸配列と高い相同性を示し、加えて、N末端のシグナルペプチド、C末端のアミド化シグナルなどといった特徴的な構造も保存されていることがわかった。さらに、*tcn* はメダカの脳内において発現しているとともに、リガンドとして Crh 受容体の活性化を引き起こすことがわかった。これらの結果から、Tcn は真骨魚類においてのみ保存されている、新規の機能的な CRH ファミリーペプチドであることが明らかとなった。

ここで、なぜ Tcn は真骨魚類でのみ保存されており、他の脊椎動物には存在しないのか、という疑問が生じる。真骨魚類は進化の過程で、四足動物との分岐後、全ゲノム重複を経験したとされている (Amores *et al.*, 1998)。Tcnのアミノ酸構造がCRHファミリーペプチドの中でも Crh に最も近いということを考え合わせると、まずは、Tcn は真骨魚類特異的なゲノム重複の結果生じた Crh のパラログではないか、と考えるのが最も妥当であろう。実際に、本章の解析によっていくつかの魚種で、真骨魚類特有の全ゲノム重複によると考えられる 2 種類の Crh が見出され (それぞれ Crha と Crhb とよぶこととした)、それらは四足動物と真骨魚類の分岐後に、真骨魚類の Crh の中で 2 つに分岐していることがわかった。そして系統樹解析の結果、Tcn はこれらとは明らかに異なるグループに属すとともに、その起源は真骨魚類と四足動物の分岐よりも前に遡ることがわかった。より詳細には、Crh と Uts1 が分岐した後、Crh と Tcn が分岐し、その後、真骨魚類と他の四足動物の分岐が起こったと考えられた。系統樹における Crh と Tcn の分岐のブートストラップ値(993/1000)が高いこと、そして、*tcn/crh* の最も近くに存在する遺伝子であり、多くの生物種で保存されている *trim55* の系統樹解析を行っても同様の結果が得られること (Hosono *et al.*, unpublished data) からも、この系統樹は信頼に値するといえよう。したがって、Tcn は真骨魚類特有の全ゲノム重複から生じた Crh のパラログではなく、四足動物と真骨魚類の共通祖先の段階で既に生じていた CRH ファミリーペプチドであると考えられた。

ではなぜ、四足動物のゲノムデータベースから Tcn が見つからないのか。実際に、真骨魚類に近い四足動物であるシーラカンスやゼノパスのゲノム上からも Tcn が見つからなかったことを考慮すると、真骨魚類と四足動物の分岐後、かなり早い段階で四足動物の祖先において Tcn が失われてしまったと考えられた。さらに、Tcn 様の配列はタラ (*Gadus morhua*) やミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*)、トラフグ (*Takifugu rubripes*) といった一部の真骨魚類からは見つからないことから、これらの魚種は比較的最近、Tcn を失ってしまったと考えられる。シンテニー解析の結果、*crh* ローカスと *tcn* ローカスの間で高度にシンテニーが保存されていることがわかった。一方で、四足動物や上記の Tcn を欠く魚種には *tcn* ローカスに相当

するようなローカスが見つからなかったことから、*tcn* と *crh* の分岐、および *tcn* の消失は、単一遺伝子レベルではなく、周囲の遺伝子と共にある程度まとまったローカスごと起きたと考えられた。このようにして、*tcn* は一部の真骨魚類においてのみ存在するようになったと考えられた。

tcn の起源について、より詳細な考察を続けることとする。現在のところ、最も脊椎動物に近縁であると言われている尾索類のカタクエレイボヤで CRH 様ペプチドが 1 種のみ見ついている (Delsuc *et al.*, 2006; Loivejoy and Barsyte-Lovejoy, 2010)。また本研究により、脊椎動物の祖先は CRH、UCN/Uts1、UCN2、UCN3、TCN の 5 つの CRH パラログを有していたであろうと考えられた。しかし、進化の過程でこの 2 つの事柄を説明するには、脊椎動物の祖先で起きたとされる 2 度の全ゲノム重複という現象のみではことたりない。尾索動物が他の CRH 様ペプチドをもつ可能性も排除できないが、むしろそれよりも、連続した全ゲノム重複により祖先型 CRH 様配列から CRH、UCN/Uts1、Ucn2、Ucn3 の 4 つの CRH ファミリーペプチドが生じ、その後、CRH を含むローカスがさらに単独で重複して *crh* と *tcn* に分岐したと考えるのが妥当であろう。

では、*Tcn* が真骨魚類以外から見出される可能性はあるのだろうか。最近、*in silico* クローニングによりゾウギンザメ (*Callorhinchus milii*) のゲノムから 2 つ目の *crh* 様配列が見出され、*crh2* と名付けられた (Nock *et al.*, 2011)。したがって、今回メダカで同定された *tcn* は、ゾウギンザメの *crh2* に相当する遺伝子である可能性が考えられた。しかし、ゾウギンザメ *Crh2* の成熟ペプチドにおけるいくつかの特徴的な構造に着目すると (Nock *et al.*, 2011)、その全てについて、*Tcn* は *Crh* と共通しているか、あるいはより *Crh* に近い構造を示すことがわかった。ゾウギンザメのゲノムの進化速度は、現在調べられているすべての生物において最も遅いということがわかっており (Venkatesh *et al.*, 2014)、そうしたゾウギンザメの *Crh2* と *Crh/Tcn* との間にペプチド構造レベルでこれほど違いが生じていることから考えても、*Crh2* が *Tcn* のオーソログであるとは考えにくい。したがって、ゾウギンザメの *Crh2* は、*Crh* と *Tcn* の分岐よりも以前に、軟骨魚類、或いは全頭類の中でのみ起きた遺伝子重複により生じた CRH ファミリーペプチドであると考えるのが妥当である。この考えは、系統樹の結果とも矛盾しない。その他の軟骨魚類の研究は発展途上であるが、これらの状況を踏まえると、現時点では、*Tcn* は真骨魚類においてのみ保存されていると考えるのが妥当であろう。

発現解析の結果、VI、PMm、NVT、NIII、NGS の 5 つの神経核で *tcn* のシグナルが確認された。魚類は下垂体門脈系を欠くため、主に視索前野の小細胞群からなる神経細胞が軸索を下垂体に直接投射することで神経支配をしているが (Zohar *et al.*, 2010; Zupanc *et al.*,

1999)、そうした神経核では *tcn* のシグナルは確認されなかった。また上記の 5 神経核が下垂体に投射しているという報告はない。したがって、Tcn は HPA 軸の制御には関与せず、それとは別の脳内における何らかのストレス応答経路にかかわっているのではないかと考えられる。さらに、上記の 5 神経核において *tcn* を発現するニューロンの大半は *crh* も発現していたことから、Tcn は Crh とある程度共通した機能をもつことが示唆された。

最も強く、また最も多い *tcn* のシグナルが確認されたのは VI であった。メダカと同様、ティラピアにおいても VI で多量の Crh 免疫陽性シグナルが確認されており、またそれらのニューロンは DI (終脳腹側部) に投射していることが報告されている (Pepels *et al.*, 2002)。DI は四足動物の脳皮質や海馬に相当すると考えられており、空間的、時間的な記憶との関与が示唆されている (Pepels *et al.*, 2002; Northcutt, 2011; Demski, 2013)。したがってメダカの VI で合成された Crh や Tcn は、魚類のストレス下での学習能力に影響を与えているかもしれない。

議論の余地はあるが、魚類の VI は一般に、哺乳類の中隔核やマイネルト基底核からなる前脳基底部複合体の神経核に相当すると考えられている (Rink and Wullimann, 2004; Wullimann and Mueller, 2004; O'Connell and Hofmann, 2011; Goodson and Kingsbury, 2013)。げっ歯類の中隔核では、少数ながら CRH 陽性ニューロンが報告されている。一方でこの神経核は CRH ファミリーペプチドを発現するニューロンの投射を数多く受けるとともに、この神経核自体が CRHR2 を強く発現しており、ストレス条件下ではその系を介して不安行動が誘起されることが、げっ歯類で報告されている (Gysling *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2006)。第 1 章の発現解析の結果、メダカの VI において *Crhr2* の発現は確認されなかったものの、*Crhr1* が発現していることがわかった。したがって、メダカの VI の特徴は哺乳類の中隔核のものとは完全に一致するわけではないが、少なくとも CRH ファミリーペプチド作用系を介した何らかのストレス応答系が存在する可能性、そしてそれが魚類ではオートクライン/パラクライン的に機能している可能性が示唆された。

脊髄に投射している PMm は NVT からの投射を受けることが知られており、これらの神経核は性行動への関与が示唆されている (Forlano and Bass, 2011; Hasebe *et al.*, 2014; Hiraki *et al.*, 2014)。したがって、これらの神経核で発現する *tcn* は、ストレスと性行動に関わる機能を有しているのかもしれない。一方、NIII や NGS における *tcn* の発現からは、Tcn が感覚の入力に関与している可能性が考えられる。Tcn を介した中枢のストレス応答を理解するためにも、今後それぞれの神経核における詳細な解析が必要である。

tcn と *crh* の二重 *in situ hybridization* における NIII の写真に示した通り、明らかにニュ

一ロンではないと考えられる *crh* 陰性の細胞が、強い *tcn* 発現を示していた。細胞のサイズと形態から、その細胞は血球である可能性が高く、これにより、*Tcn* が血管系、或いは免疫系において何らかの役割を担っている可能性が示唆された。ヒトの白血球で分泌された *Crh* が、炎症反応の制御を介して免疫応答にかかわることはよく知られている (*Stephanou et al.*, 1990; *Karalis et al.*, 1991; *Aird et al.*, 1993)。そして今回、観察された血球様の細胞で *crh* の発現が確認されなかったことを踏まえると、魚類では、*Tcn* と *Crh* の間で機能分化が起きている可能性がある。真骨魚類において *Tcn* と *Crh* の両ペプチドが保存されている理由は、こうした機能分化に起因するのかもしれない。

受容体アッセイの結果、*Tcn* はピコモラーからナノモラーの濃度で機能するとともに、いずれの受容体に対しても *Crh* とほぼ同程度の活性化能をもつということがわかり、*Tcn* が十分機能的な内因性のリガンドであることが示された。これにより、*Tcn* と *Crh* の間には、アミノ酸構造やメダカの脳内における発現パターンに加えて、受容体の活性化能についても、類似性が存在することがわかった。また、*Crhr1* は比較的低いリガンド濃度で受容体の活性化が起きる一方、*Crhr2* は受容体の活性化度合いが非常に高いことも明らかとなった。*Crhr1* の閾値が *Crhr2* に比べて低いことは、これまでの他の脊椎動物の先行研究と矛盾しない (*Perrin et al.*, 1995)。一方で *cAMP* の産生量に関しては、魚類は他の動物種と異なる様相を呈することがわかった。両生類や哺乳類では一般に、*Crh* の結合による *cAMP* の産生量に関しては *Crhr1* と *Crhr2* であまり差がない、あるいは *Crhr1* でわずかに産生量が多いという傾向がみられる (*Lovenberg et al.*, 1995; *Dautzenberg et al.*, 1997; *Hsu and Hsueh*, 2001)。これに対し今回の受容体アッセイは、*Crh* が *Crhr2* に結合した際の *cAMP* 濃度の上昇が、*Crhr1* に結合した場合と比べて 10 倍ほど高いという結果を示した。こうした例は魚類以外の動物種においてはみられないため、魚類の *Crh* 受容体に特有の現象かもしれない。

本研究により、*CRH* ファミリーに属する新規のペプチドとして *Tcn* が見出だされた。そしてこれを契機に今後 *Tcn* の研究が進むことで、脳内ストレス応答のみならず、脊椎動物も含めた進化学的な知見や、免疫の知見も蓄積し、魚類ひいては脊椎動物のストレス応答の理解が一層進展すると考えられる。これまで *CRH* 受容体と *CRH* ファミリーペプチドが様々な動物種から見つかり、広く研究が進められているが、真骨魚類においては、それらの複雑なストレス応答メカニズムの役者の一員として、*Tcn* が機能している可能性があり、脊椎動物に保存されたカスケードを詳細に理解するためにも、今後 *Tcn* の研究が進むことが望まれる。

2-5. 図表

表 2-1. 第 2 章で用いたプライマー

名称	用途	塩基配列 (5'-3')
AP1	RACE 1st	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	RACE nested	ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC
TCN-F1	3'-RACE 1st	GGAGGCACAGCTCCAGATCCATCCT
TCN-F2	3'-RACE nested	CTCTGCTGCAGCTCTCACAGCACCT
TCN-R1	5'-RACE 1st	GGGTGAACGTCCAGCTCAGACAGGA
TCN-R2	5'-RACE nested	CTCAGACAGGAGGAGGTCATTTTCCAA
TCN-F3	PCR	GCTGTGAGATGAAGGTGAAAGTG
TCN-R3	PCR	AGTCATCTAAATGATAGAATAAAGGTATG
TCN-F4	c-PCR, Seq	TCTCACAGCACCTCCTGCAGA
TCN-R4	c-PCR, Seq	GGTGAACGTCCAGCTCAGACA
pcDNA3.1/V5-His-F	c-PCR	TACGACTCACTATAGGGAGAC
pcDNA3.1/V5-His-R	c-PCR	GTTAGGGATAGGCTTACCTTC
crhr1-pcDNA3.1-kozak-F1	PCR	GTGCCGCCATGGGCCTCAAATGCTTTTGTGTC
crhr1-pcDNA3.1-kozak-R1	PCR	GGTTTCCTCTTTCAGAGCGATG
crhr1-pcDNA3.1-F3	c-PCR, Seq	AACTGCGGGCCTCCACAACCT
crhr2-pcDNA3.1-kozak-F1	PCR	CTGCCGCCATGGATGCTACCATTTATGAAA
crhr2-pcDNA3.1-kozak-R1	PCR	GTGTCTCTGCTTCACACCGCT
crhr2-pcDNA3.1-F3	c-PCR, Seq	GAATTCTTATGACCAAGCTAAGAGCA

名称カラム中の-F はフォワードプライマー、-R はリバースプライマーを意味する。用途カラムの RACE は 5'-および 3'-RACE に用いたプライマーを、PCR は PCR に用いたプライマーを、C-PCR はコロニー PCR に用いたプライマーを、Seq はシーケンシングに用いたプライマーを意味する。

表 2-2. Tcn の系統樹解析で用いた配列

Peptide	Species	Accession number
CRH	Human (<i>Homo sapiens</i>)	NP_000747
CRH	Mouse (<i>Mus musculus</i>)	NP_991338
CRH	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	NP_112281
Crh	Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	NP_001116503
Crh	Finch (<i>Taeniopygia guttata</i>)	NP_001232541
Crh	Xenopus (<i>Xenopus laevis</i>)	NP_001165680
Crh (predicted)	Elephant shark (<i>Callorhinchus milii</i>)	XP_007894939
Crh	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	NP_001121990
Crh (predicted)	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	XP_003443663
Crh (predicted)	Stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	ENSGACP00000003885
Crha	Salmon (<i>Salmo salar</i>)	ACM09696
Crha	Smelt (<i>Osmerus mordax</i>)	ACO09991
Crha (predicted)	Cod (<i>Gadus morhua</i>)	Scaffold_2511
Crhb	Salmon (<i>Salmo salar</i>)	NP_001135062
Crhb	Smelt (<i>Osmerus mordax</i>)	ACO10011
Crhb (predicted)	Cod (<i>Gadus morhua</i>)	ENSGMOP00000021639
Tcn	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	LC002816
Tcn (predicted)	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	ENSONIP00000025716
Tcn (predicted)	Stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	Scaffold_120
Crh2 (predicted)	Elephant shark (<i>Callorhinchus milii</i>)	XP_007909389
Uts1	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	BAG16734
UCN	Human (<i>Homo sapiens</i>)	NP_003344
UCN	Mouse (<i>Mus musculus</i>)	NP_067265
Ucn2	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	NP_001121991
Ucn3	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	NP_001121992

括弧内は学名を示す。

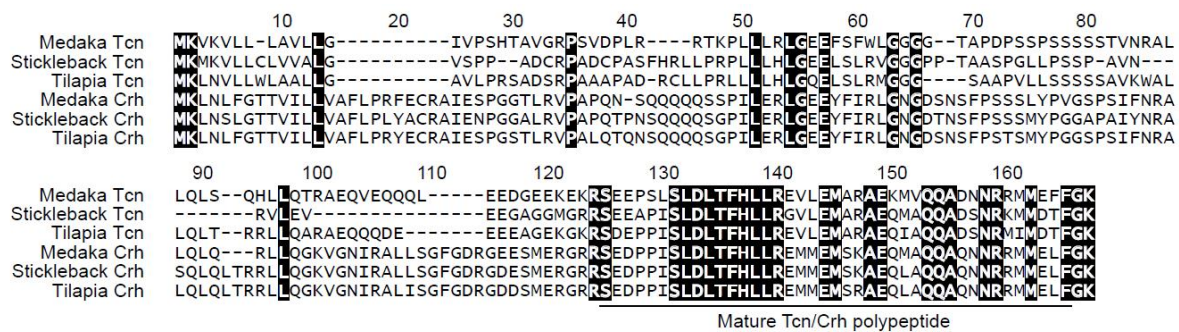


図 2-1. Tcn と Crh の演繹アミノ酸配列の比較

メダカ、トゲウオ、ティラピアの Tcn と Crh の演繹アミノ酸配列の比較。黒の背景は、ペプチド間で共通してみられる配列を示す。C 末端側の下線部は成熟ポリペプチドを示す。

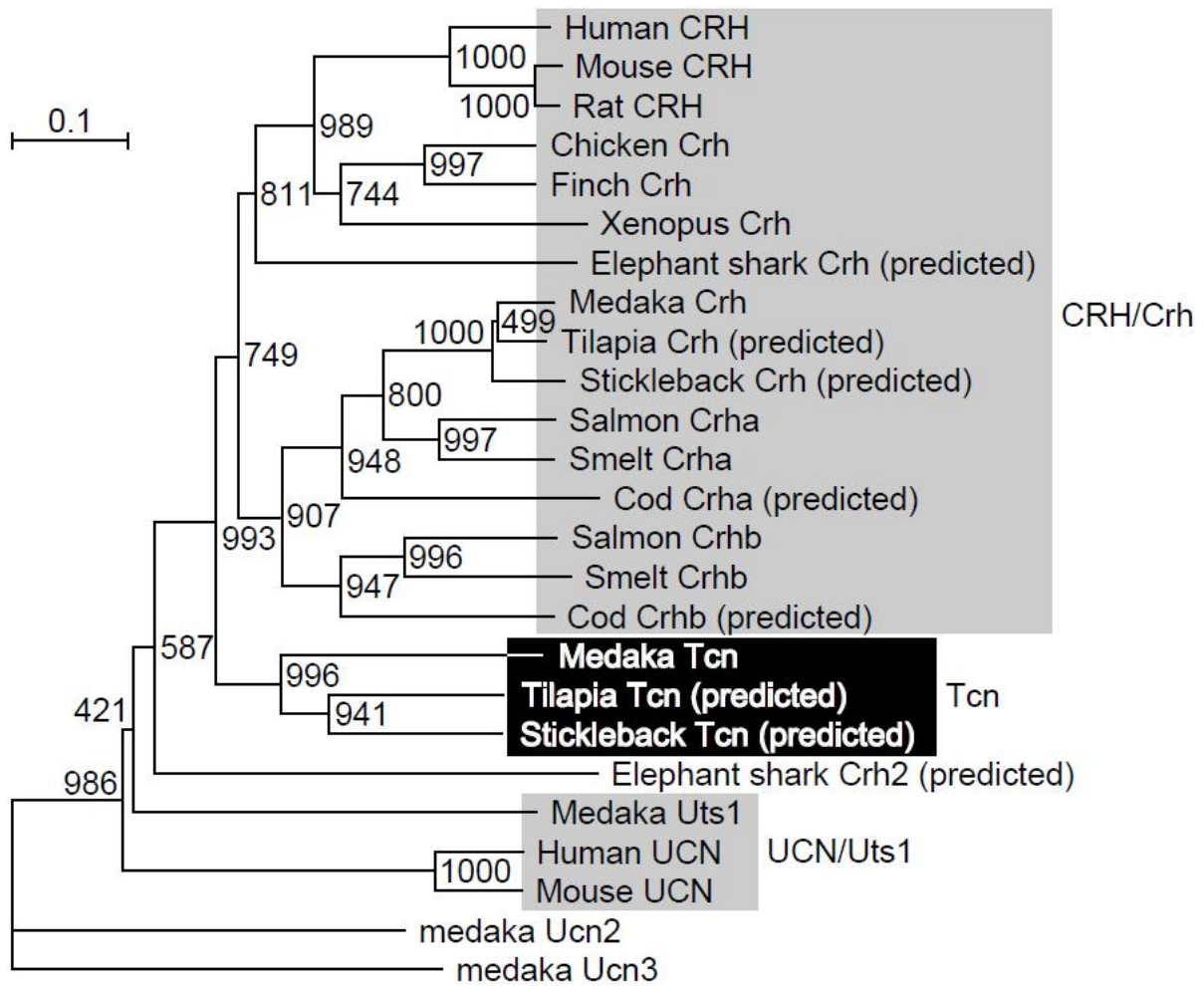


図 2-2. CRH ファミリーペプチドの系統樹解析

グレーの背景は、CRH/Crh および UCN/Uts1 のグループを表す。黒の背景は、Tcn のグループを表す。メダカの Ucn3 をアウトグループとして用いた。各分岐の数字はブートストラップ値を示す。また、スケールバーは推定の進化距離を表す。

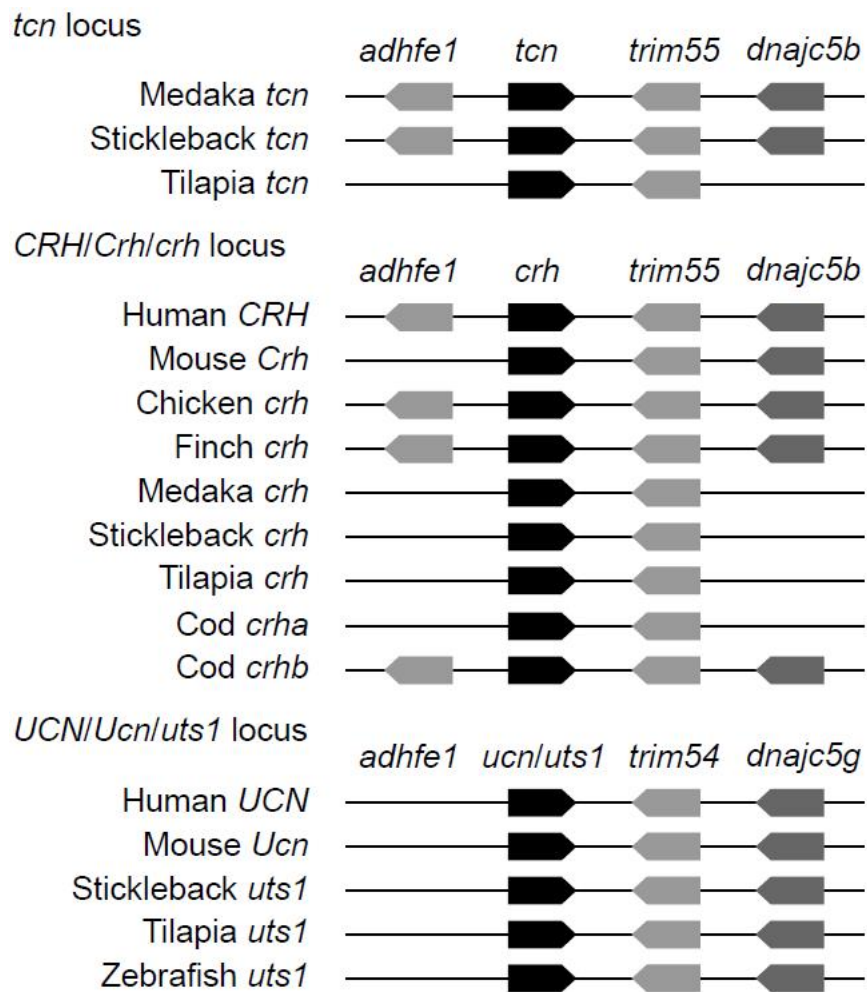


図 2-3. *tcn*、*CRH/Crh/crh*、*UCN/Ucn/Uts1* のシンテニー解析

矢印型のボックスはそれぞれの遺伝子を示し、その向きは転写の方向を示す。

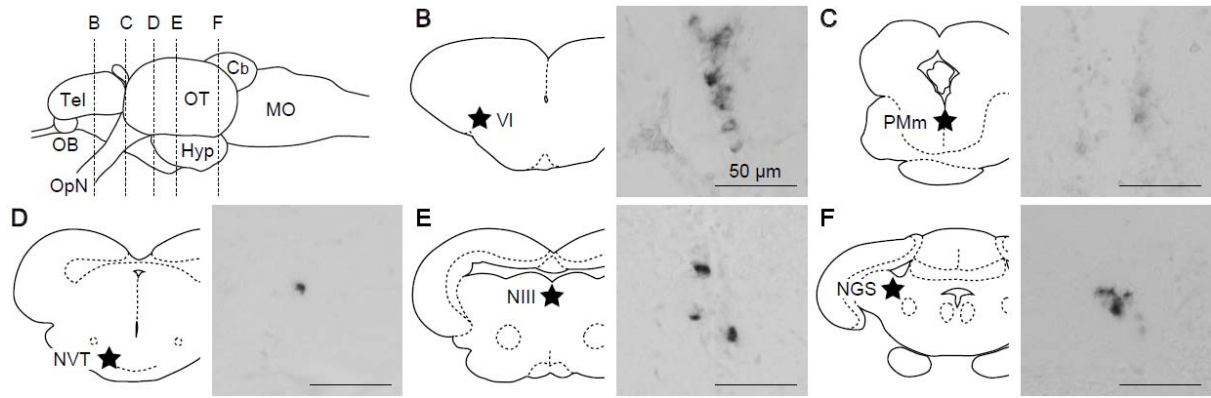


図 2-4. メダカの脳における *tcn* の発現

(A) メダカの脳を側面から見た模式図。左が吻側、右が尾側、上が背側、下が腹側。B-F のラインで切った断面をパネル B-F に示す。Cb は小脳、Hyp は視床下部、MO は延髄、OB は嗅球、OpN は視神経、OT は視蓋、Tel は終脳を示す。(B-F) 各パネルの左側の線画上の印 (★) は、*tcn* 発現ニューロンの位置を表す。右半分の写真は、代表的な *in situ* hybridization による染色写真を示す。なお、写真は全てメスのものである。各神経核の名称については、表 1-3 を参照のこと。スケールバーは 50 μm。

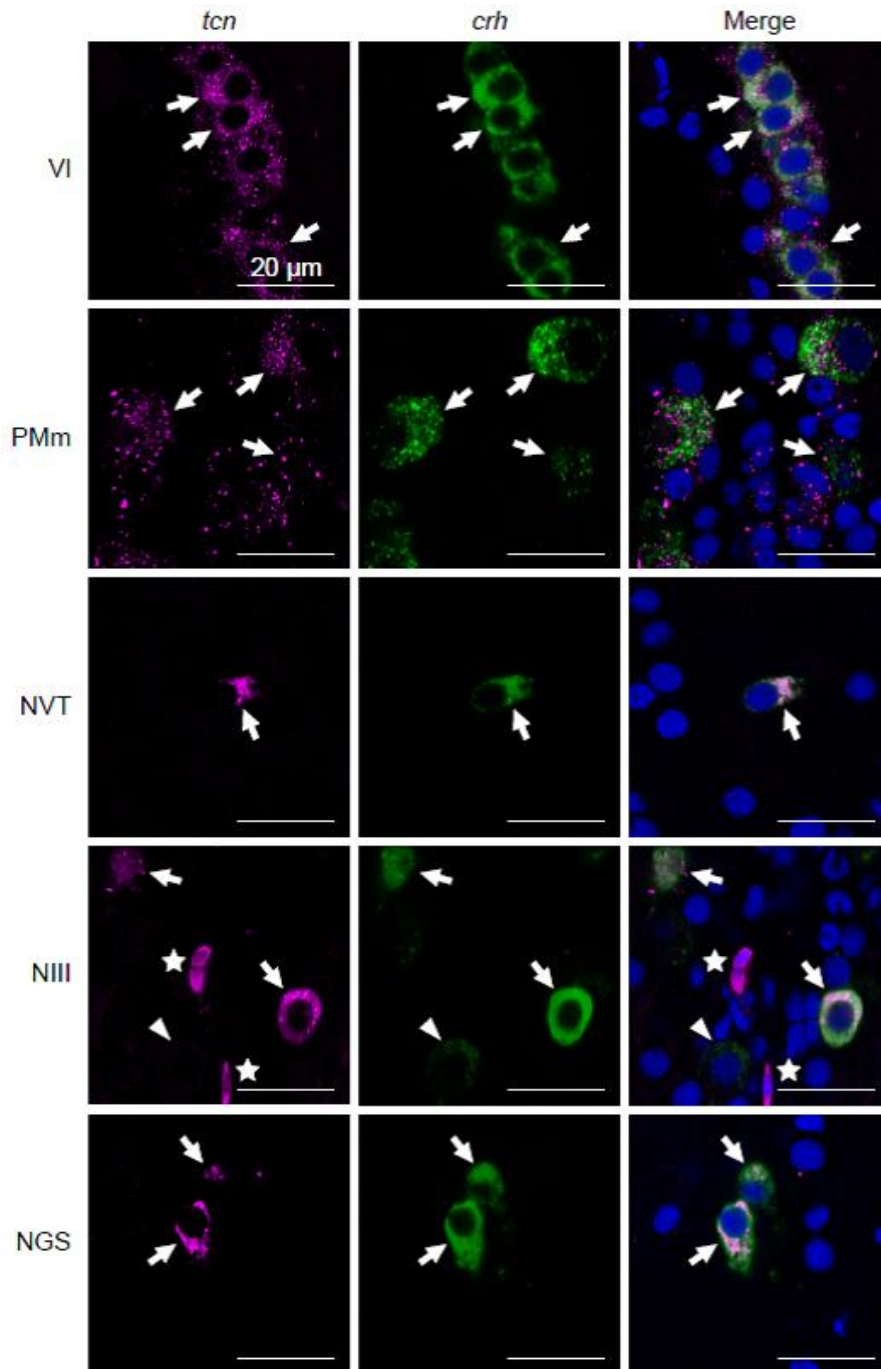


図 2-5. *tcn* と *crh* の共発現解析

VI、PMm、NVT、NIII、NGS の 5 つの神経核における *tcn* と *crh* の二重 *in situ* hybridization。左のパネルは *tcn* (マゼンタ) の発現を、中央のパネルは *crh* (緑) の発現を表す。右のパネルはそれらをマージし、さらに DAPI による核の染色 (青) を加えたものである。矢印は両遺伝子が共局在しているニューロンを示し、矢じりは *tcn* ネガティブ、*crh* ポジティブのニューロンを示す。また☆は *crh* ネガティブ、*tcn* ポジティブの、血球様の細胞を示す。なお、写真は全てメスのものである。各神経核の略称については、表 1-3 を参照のこと。スケールバーは 20 μm 。

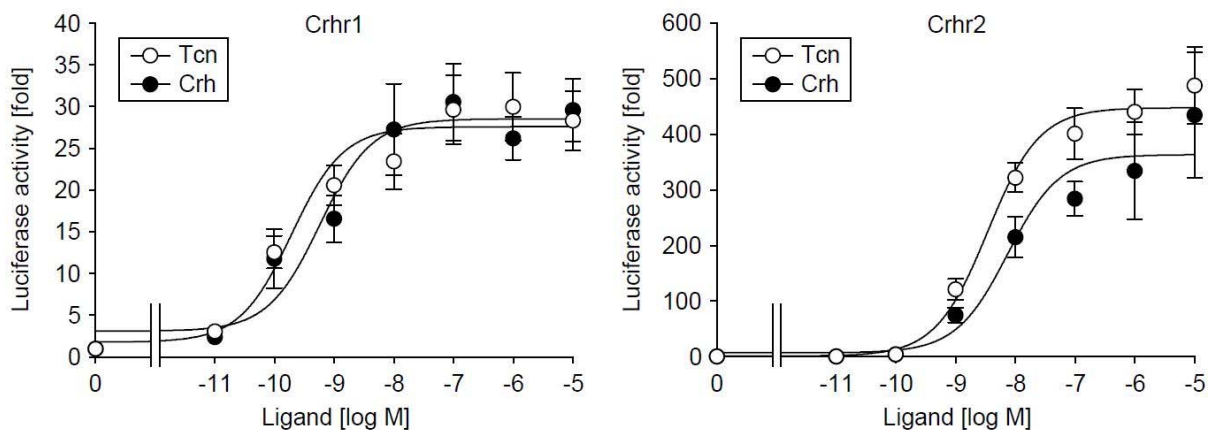


図 2-6. Tcn、Crh の受容体アッセイ

メダカがもつ2種類の受容体(Crhr1、Crhr2)に対する、TcnとCrhの受容体活性化能の比較。左のパネルはCrhr1での結果を、右のパネルはCrhr2での結果を示す。白のドットがTcn、黒のドットがCrhを示す。グラフの縦軸は、リガンド濃度が0の時のルシフェラーゼの値の平均を1とし、それに対する相対値を示す。横軸はリガンドの濃度を示す。

第3章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

第 4 章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内
に出版予定。

総合考察

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内
に出版予定。

要旨

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内
に出版予定。

引用文献

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内
に出版予定。