

氏名	中野 真樹
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 823 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	両生類プロラクチンの分泌制御機構の解析
論文審査委員	委員長 教授 小林 哲也 委員 教授 坂井 貴文 委員 教授 末光 隆志 委員 准教授 塚原 伸治

## 論文の内容の要旨

脳下垂体前葉から分泌されるプロラクチン（PRL）は、他の前葉ホルモンに比べて多様な生理作用を有している。両生類の成体において PRL は、電解質代謝や生殖活動の調節などに、また幼生では、尾びれや鰓の発達、さらに変態の抑制などに関与している。この両生類 PRL の分泌は、主に甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）により刺激され、ドーパミン（DA）により抑制される。DA の作用を仲介する DA 受容体は、哺乳類において構造的、および機能的な違いから D1 様受容体と D2 様受容体に大別されている。しかしながら、両生類では PRL の分泌抑制作用に関与する DA 受容体のサブタイプやその構造、ならびに分泌細胞内での情報伝達機構などは、ほとんど明らかにされていない。

先にも述べたように、両生類の幼生において PRL は変態抑制作用を有している。興味深いことに、ウシガエル幼生における PRL の血中レベルは、前変態期や変態始動期では低く、変態最盛期の後半に著しく上昇する。この時の PRL の分泌制御機構については、TRH や DA といった分泌調節因子の面からいくつかの報告がなされているが、その詳細は不明なまま今日に至っている。そこで本研究では、両生類 PRL の分泌制御機構を明らかにすることを目的として、まず、ウシガエル PRL の分泌抑制作用を仲介する DA 受容体サブタイプの同定と、その cDNA のクローニングを行った。さらに、変態期における PRL の分泌制御機構を、DA 受容体および TRH 受容体の発現レベルの観点から検討した。

両生類 PRL の分泌抑制に関与する DA 受容体サブタイプの同定は、ウシガエル脳下垂体前葉の組織灌流培養系、およびウシガエル PRL に対する酵素免疫測定法を用いて行った。組織灌流培養系において、TRH は PRL の分泌を刺激し、DA は TRH により誘導される PRL の分泌増加を濃度依存的に抑制した。D2 受容体アゴニストである Quinpirole は、DA と同様に、TRH 誘導性の PRL 分泌増加を有意に抑制し、また、D2 受容体アンタゴニストである L-741,626 は、PRL の分泌増加に対する DA の抑制作用を打ち消した。これに対し、D1 受容体アゴニストの SKF-38393 は、TRH により誘導された PRL の分泌増加に対し抑制的な作用を示さず、また、D1 受容体アンタゴニストの SCH-23390 は、DA の PRL 分泌抑制作用に対し影響を与えなかった。これらの結果から、TRH 刺激により誘導される両生類 PRL の分泌増加に対する DA の抑制作用は、D2 受容体により仲介されていると結論づけた。

次いで、縮重プライマーを用いた RT-PCR 法、および RACE 法により、ウシガエル D2 受容体 cDNA のクローニングを試みた。その結果、ウシガエル脳下垂体前葉から 3 種の D2 受容体アイソフォーム cDNA を同定した。これらはそれぞれ、444 (bfD2A)、440 (bfD2B) および 411 (bfD2C) アミノ酸残基から成り、7 回膜貫通型受容体であると推定された。これらアイソフォーム mRNA の発現分布を RT-PCR 法により解析したところ、脳や脳下垂体では 3 種のアイソフォーム全ての発現が確認された。一方、末梢組織では主に bfD2C が発現し、bfD2A および bfD2B の発現はほとんど認められなかった。D2 受容体では、第 3 細胞内領域が G-タンパク質との共役に関与すると考えられているが、bfD2B および bfD2C では、この領域にそれぞれ 4 および 33 アミノ酸残基の欠失が見られた。これらのことから、同定されたウシガエル D2 受容体の各アイソフォーム間には、分泌細胞内での情報伝達機構や、仲介する生理機能などに相違があると推測される。

続いて、変態期における PRL の分泌制御機構を明らかにするため、ウシガエル幼生脳下垂体前葉における D2 受容体 mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した。その結果、前変態期から変態始動期、さらに変態最盛期までのいずれの変態段階においても、3 種全てのアイソフォーム mRNA が発現しており、その発現パターンに明確な変化は認められなかった。同様に、TRH 受容体各サブタイプ (TRHR1 ~ 3) mRNA の発現も検討したところ、いずれの変態段階においても TRHR3 mRNA の発現が確認されたのに対し、TRHR1 および TRHR2 mRNA の発現は、ほとんど認められなかった。また TRHR3 mRNA の発現量は、前変態期では低く、変態始動期から変態最盛期にかけて増加した。これらのことから、ウシガエルの変態最盛期に見られる血中 PRL レベルの顕著な上昇は、DA による分泌抑制系の開放よりは、むしろ TRHR3 サブタイプを介した、TRH による分泌促進系の発達に依存しているものと推測される。

本研究では、両生類 PRL の分泌制御機構に関して、DA と TRH の各受容体に着目し解析を進めた。その結果、ウシガエル脳下垂体前葉からの PRL 分泌に対する DA の抑制作用は、D2 受容体サブタイプにより仲介されていることを明らかにした。またウシガエル D2 受容体として、3 種のアイソフォームの同定に成功した。さらに、ウシガエル幼生の変態最盛期に観察される血中 PRL レベルの顕著な上昇は、TRHR3 を介した TRH による分泌促進系の発達に起因している可能性を示した。

## 論文の審査結果の要旨

当学位審査委員会は、平成 23 年 2 月 7 日（月）13 時 30 分より理工学研究科棟 7 階国際セミナー室において公開で発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

両生類の脳下垂体前葉から分泌されるプロラクチン（PRL）は、成体では電解質代謝や生殖活動の調節に、また幼生では、尾ひれや鰓の発達、さらに変態の抑制など、多様な生理作用に参与している。この両生類 PRL の分泌は、主にドーパミン（DA）により抑制され、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）により刺激されるが、その分泌制御機構の詳細は明らかにされていない。本論文は、分泌調節因子である DA と TRH の各受容体に着目し、両生類 PRL の分泌制御機構について解析を行った研究成果を 3 章に分けて論じている。

第 1 章ではウシガエル脳下垂体前葉から分泌される PRL に対し、分泌抑制作用を仲介する DA 受容体サブタイプについて論じている。DA の作用を仲介する DA 受容体は、構造的及び機能的な違いから D1 と D2 の 2 つのサブタイプに大別されているが、両生類では、PRL の分泌抑制に参与する DA 受容体サブタイプは同定されていない。この同定ため、ウシガエル脳下垂体前葉の組織灌流培養系、及びウシガエル PRL に対する酵素免疫測定法を用いた薬理的解析を進めた。組織灌流培養系において、TRH は PRL の分泌を刺激し、DA は TRH により誘導される PRL の分泌増加を濃度依存的に抑制した。次に、D2 受容体アゴニスト（Quinpirole）は、DA と同様に、TRH 誘導性の PRL 分泌増加を有意に抑制し、また、D2 受容体アンタゴニスト（L-741,626）は、DA の PRL 分泌抑制作用を打ち消すことを明らかにした。これに対し、D1 受容体アゴニスト（SKF-38393）やアンタゴニスト（SCH-23390）は、PRL 分泌に対して影響を与えないことを示した。これらの結果から、TRH 刺激により誘導される両生類 PRL の分泌増加に対する DA の抑制作用は、D2 受容体により仲介されていると結論づけている。

第 2 章では、ウシガエル PRL の分泌抑制作用を仲介する D2 受容体の構造について論じている。RT-PCR 法及び RACE 法により、ウシガエル D2 受容体 cDNA のクローニングを行い、ウシガエル脳下垂体前葉から 3 種の D2 受容体アイソフォーム cDNA を同定した。これらはそれぞれ、444 (bfD2A)、440 (bfD2B)、及び 411 (bfD2C) アミノ酸残基から成り、7 回膜貫通型受容体であること、また DA との結合に関わるアミノ酸残基が保存され、報告されている他の D2 受容体と高い相同性を示すことなどを明らかにした。各アイソフォーム mRNA の発現分布を RT-PCR 法により解析し、脳や脳下垂体では 3 種全てが発現しているが、末梢組織では主に bfD2C が発現し、bfD2A 及び bfD2B の発現はほとんど認められないことを示した。

D2 受容体の第 3 細胞内領域は、G-タンパク質との共役に関与している。bfD2B 及び bfD2C では、この領域にそれぞれ 4 及び 33 アミノ酸残基の欠失が見られることから、各アイソフォーム間には分泌細胞内での情報伝達機構や、仲介する生理機能に相違があると述べている。

両生類において PRL は変態抑制作用を有する。興味深いことに、ウシガエル幼生の血中 PRL 濃度は、前変態期や変態始動期では低く、むしろ変態最盛期の後半に著しく上昇する。第 3 章では、この変態期における PRL の分泌制御機構を明らかにするために、DA 受容体及び TRH 受容体の発現動態について検討した。ウシガエル幼生の脳下垂体前葉を用いて D2 受容体と TRH 受容体の mRNA 発現を、RT-PCR 法により半定量的に検討した。その結果、いずれの変態段階においても、前葉には D2 受容体の 3 種のアイソフォーム

全ての mRNA が発現しており、その発現パターンに明確な変化が認められないことを示した。同様に、所属研究室における先行研究により同定された 3 種のウシガエル TRH 受容体各サブタイプ (TRHR1 / 2 / 3) の mRNA の発現についても検討を加え、どの変態段階においても TRHR1 及び TRHR2 の mRNA の発現はほとんど認められないが、TRHR3 mRNA の発現量は、前変態期では低く、変態始動期から変態最盛期にかけて増加することを見出した。これらの結果より、ウシガエル幼生の変態最盛期に見られる血中 PRL 濃度の顕著な上昇は、DA による分泌抑制系の開放よりは、むしろ、TRHR3 サブタイプを介した TRH による分泌促進系の発達が関与していると推測している。

以上、本論文では、両生類 PRL の分泌制御機構について、分泌を抑制する DA と刺激する TRH の各受容体に着目し解析を進めた結果を述べている。その結果、ウシガエル脳下垂体前葉からの PRL 分泌に対する DA の抑制作用は、D2 受容体サブタイプにより仲介されていることを示し、同受容体のクローニングと 3 種のアイソフォームの同定に成功した。さらに、変態最盛期に観察される血中 PRL 濃度の上昇は、TRHR3 サブタイプを介した TRH による分泌促進系の発達がその一因であることを示した。これらの研究成果は、両生類における脳下垂体ホルモンの分泌制御機構に加え、変態の内分泌制御機構の解明においても重要な知見を含むものと言える。なお、本論文の内容の一部は、既に査読付きの国際学術専門誌に発表されている。これらの成果から、本学位審査委員会は、本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値すると判断し、学位論文審査を「合格」と判定した。