

## 転写因子 Pit-1 の下垂体外組織における発現と下垂体ホルモンの発現制御

谷内 秀輔・高橋 純夫・竹内 栄

岡山大学大学院自然科学研究科生体統御学グループ

### はじめに

成長ホルモン(GH), プロラクチン(PRL), 甲状腺刺激ホルモン(TSH)は, 主に下垂体で産生・分泌され, 内分泌的に標的器官の生体機能を制御する。近年, これらの下垂体ホルモンが下垂体外組織においても産生され, 局所性ホルモンとして機能する可能性が提唱された。特にニワトリでは, Harvey らのグループを中心として, 胚性神経性網膜をはじめとする様々な下垂体外組織における GH, PRL, TSH の発現が報告されている(1-8)。

哺乳類の下垂体における GH, PRL, TSH $\beta$ サブユニット(TSH $\beta$ )遺伝子の発現は, POU ファミリーに属する転写因子 Pit-1(POU1F1/GHF-1)により制御されている。Pit-1 には選択的スプライシングに由来する複数種のバリエーションが存在し, それぞれ固有の転写活性化能をもつことが示されている。さらに, Pit-1 はこれらの下垂体ホルモンの産生細胞の分化や増殖にも必須であることが, Pit-1 遺伝子変異マウス(*dw*, *dw-J*) から明らかにされている(9)。

鳥類では, シチメンチョウおよびニワトリの下垂体において, Pit-1 $\alpha$ , Pit-1 $\beta$ , Pit-1 $\omega$  という 3 種類のバリエーションが報告されている(10-12)。Pit-1 $\alpha$  と Pit-1 $\beta$  は選択的スプライシングバリエーションであり, Pit-1 $\beta$  は, Pit-1 $\alpha$  の第 1 エクソンと第 2 エクソンの間に 28 個のアミノ酸配列をコードする付加的エクソンをもつ mRNA にコードされている。一方, Pit-1 $\omega$  mRNA は Pit-1 $\alpha$  の第 2 エクソンの上流から転写される選択的プロモーター由来のバリエーションであり, Pit-1 $\omega$  は上述の 28 個のアミノ酸配列と 11 個の特異的アミノ酸配列を含む独特な N 末端構造をもつ。ニワトリの下垂体では Pit-1 $\alpha$  が最も多く発現しており, Pit-1 $\omega$  は Pit-1 $\alpha$  の 1/3 から 1/2, Pit-1 $\beta$  は非常にわずかな mRNA 発現が報告されている。

近年, ニワトリの網膜と精巣で GH と Pit-1 の共発現が報告され(6, 7), 下垂体外組織における下垂体ホルモンの発現の制御にも Pit-1 が関与する可能性が示唆された。しかし, ニワトリ Pit-1 の機能は明らかにされておらず, 下垂体外組織に発現する Pit-1 バリエーションも同定されていない。

本研究では, 下垂体外組織における GH, PRL, TSH $\beta$  の発現に Pit-1 バリエーションが関与する可能性を検討することを目的とし, Pit-1 バリエーションと GH, PRL, TSH $\beta$  の発現の相関を RT-PCR 解析で調べた。また, 各 Pit-1 バリエーションの GH, PRL, TSH $\beta$  遺伝子に対する転写活性化能をレポーター解析により調べた。

### 材料と方法

#### 実験材料

本実験において, ニワトリ胚およびヒヨコは, 福田種鶏場(岡山県岡山市福富原西 2 丁目 23 番地 48 号)から購入した Rock Cornish 種(チャンキー)を用いた。全ての実験は岡山大学動物実験ガイドラインに従って行われた。

#### RNA 抽出

孵卵 7 日目(ED7), ED9, ED11, ED13, ED15, ED17, ED19, 生後 1 日目(D1), D2, D3, D7 の神経性網膜, D3 の大脳, 中脳, 小脳, 下垂体, 心臓, 肺, 肝臓, 筋胃, 脾臓, 膵臓, 腎臓, ファブリキウス嚢を摘出し, TRIzol Reagent (Invitrogen) を使用して全 RNA を抽出した。抽出した RNA は DEPC 処理した蒸留水に溶かして -80°C で保存した。

#### RT-PCR 解析

全 RNA 1  $\mu$ g を Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen) で処理した後, ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。PCR 反応は, TaKaRa Taq DNA polymerase (Takara) を用いて Gene Amp PCR System 9600 (Applied Biosystems) で行った。PCR のサイクル数は, GAPDH が 22 サイクル, それ以外の遺伝子については 35 サイクルであった。用いたプライマー対は以下の通りである。Pit-1 $\alpha$  (FP: 5'-GAG AGT GCC TGC CCG TTT CTA A-3', RP: 5'-GGT CTG GTG CAT GGG TGT GAA-3'), Pit-1 $\omega$  (FP: 5'-GGA GAA CGA GAT ACG AGG ATA C-3', RP: 5'-GGT CTG GTG CAT GGG TGT

GAA-3'), GH (FP: 5'-AGG AAT GGC TCC AGG CTC G-3', RP: 5'-GGT TTA TTC CTC GTG TTT TTG GTG-3'), PRL (FP: 5'-ATG CTC AGG GTC GGG GTT TCA TTA-3', RP: 5'-TTT TGT GGG AAT CTC TGC GGT G-3'), TSH $\beta$  (FP: 5'-ATG AGT CCC TTC TTC ATG AT-3', RP: 5'-CAT GTT ACA GAG CTT CTG TGG CTT-3'), GAPDH (FP: 5'-GTG TTA TCA TCT CAG CTC CCT CAG-3', RP: 5'-AAA GGT GGA AGA ATG GCT GTC ACC-3').

### サザンハイブリダイゼーション

RT-PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動した後、Hybond-N+ (Amersham)に転写し、<sup>32</sup>P-dCTP 標識された Pit-1 $\alpha$ , Pit-1w, GH, PRL, TSH $\beta$ の cDNA プロブとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、洗浄を行い、X線フィルムに感光させた。

### レポーター解析

HEK293 細胞は  $8 \times 10^4$  cells/well となるように、トランスフェクションの 24 時間前に、24 穴プレートに播種した。Pit-1 バリエント発現ベクターとして pcDNA-Pit1 $\alpha$  と pcDNA-Pit-1w を、レポーターベクターとしてニワトリ GH, PRL, TSH $\beta$ のプロモーター領域を pGL3-Basic に挿入したものを用いた。コントロール実験には pcDNA3 を使用した。内部標準には phRL-TK ベクターを用いた。導入試薬には Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いた。トランスフェクション 24 時間後、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) と Luminometer (TD-20/20, Turner Design Instruments)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。実験は 3 組で行い、結果はホタルルシフェラーゼの発光値をウミシイタケルシフェラーゼの発光値で割った相対値を算出後、コントロール実験の相対値を 1 としてデータを標準化した。実験結果の有意差検定には両側の Student の t 検定を用いた。

## 結果

### 神経性網膜における Pit-1 バリエントの mRNA 発現

Pit-1w は ED7 から検出され、ED13 には検出量が急増し、ED17 頃にピークに達した(図 1)。その後の Pit-1w の検出量に目立った変化は見られなかつ

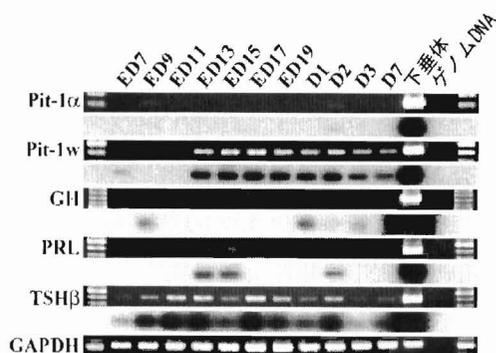


図 1 ニワトリ神経性網膜の発生段階における Pit-1 バリエントと GH, PRL, TSH $\beta$  mRNA の発現変化

上段が RT-PCR 解析, 下段が RT-PCR 産物に対するサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。内部標準として GAPDH, ポジティブコントロールとして下垂体, ネガティブコントロールとしてゲノム DNA を用いた。

た。一方、Pit-1 $\alpha$ は下垂体で豊富に検出されたが、神経性網膜では極めてわずかししか検出できなかった。

### 神経性網膜における GH, PRL, TSH $\beta$ の mRNA 発現

GH と PRL はわずかに検出された(図 1)。一方、TSH $\beta$ はほぼ全ての時期で検出されたが、その発現パターンは Pit-1w とは一致しなかった(図 1)。

### 下垂体外組織における Pit-1 バリエントの mRNA 発現

Pit-1 $\alpha$ は調べた全ての組織において検出されなかった。一方、Pit-1w は大脳, 中脳, 小脳, 脾臓, 膵臓において検出された(図 2)。

### 下垂体外組織における GH, PRL, TSH $\beta$ の mRNA 発現

GH は筋胃においてわずかに検出された。PRL は肺でわずかに検出された。TSH $\beta$ は肺と筋胃以外の解析対象とした組織において検出され、特に脾臓では多く検出された(図 2)。

### レポーター解析による Pit-1 バリエントの機能解析

GH プロモーターを含むレポーター遺伝子の転写活性は、Pit-1 $\alpha$ により約 1.5 倍まで有意に増加した(図 3A)。一方、Pit-1w は転写活性を変化させなかった。PRL プロモーターを含むレポーター遺伝子の

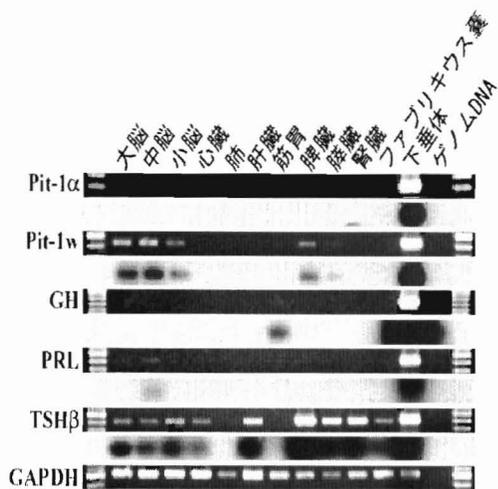


図2 ニワトリ下垂体外組織における Pit-1 バリエーションと GH, PRL, TSH $\beta$  mRNA の発現変化

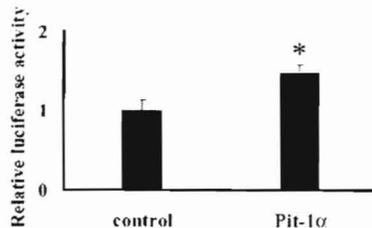
上段が RT-PCR 解析, 下段が RT-PCR 産物に対するサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。内部標準として GAPDH, ポジティブコントロールとして下垂体, ネガティブコントロールとしてゲノム DNA を用いた。

転写活性は, Pit-1 $\alpha$  で約 6.5 倍, Pit-1w で約 1.8 倍まで有意に増加した(図 4)。TSH $\beta$  プロモーターを含むレポーター遺伝子の転写活性は, Pit-1 $\alpha$  で約 1.4 倍まで有意に増加した(図 5A)。Pit-1w は TSH $\beta$  のプロモーター活性に影響を及ぼさなかった(図 5B)。

## 考察

ニワトリの下垂体外組織における GH, PRL, TSH $\beta$  の発現に Pit-1 が関与するか否かは不明であった。本研究では, 下垂体外組織における Pit-1 $\alpha$ , Pit-1w と GH, PRL, TSH $\beta$  の発現の相関を RT-PCR 法により解析した。下垂体では Pit-1 $\alpha$  が主要なバリエーションであることが知られていたが, 神経性網膜をはじめとする下垂体外組織ではその発現は極めて低く, Pit-1w が主要なバリエーションであることが分かった。個体発生に伴った神経性網膜における Pit-1w の発現は時間的制御を受けたパターンを示すのに対し, GH と PRL の発現はほとんど検出されず, TSH $\beta$  の発現パターンも Pit-1w とは一致しなかった。このことは, Pit-1w が神経性網膜において GH, PRL, TSH $\beta$  の発現を制御しないこと, および神経性網膜における TSH $\beta$  の発現は Pit-1 非依存的である可能性を示唆する。

## A



## B

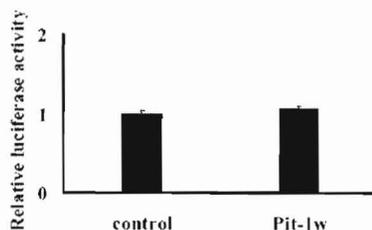


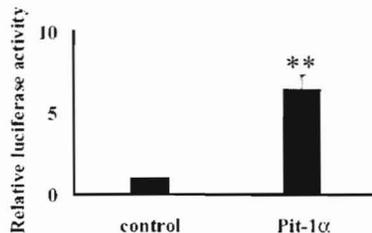
図3 Pit-1 $\alpha$  と Pit-1w のニワトリ GH プロモーターに対するレポーター解析

(A) Pit-1 $\alpha$  が GH のプロモーター活性に与える影響

(B) Pit-1w が GH のプロモーター活性に与える影響

\*:  $p < 0.05$ , 対照群との有意差

## A



## B

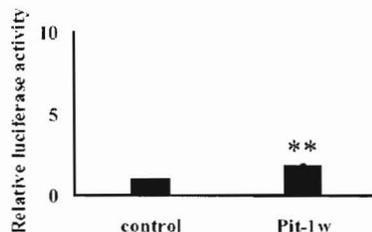


図4 Pit-1 $\alpha$  と Pit-1w のニワトリ PRL プロモーターに対するレポーター解析

(A) Pit-1 $\alpha$  が PRL のプロモーター活性に与える影響

(B) Pit-1w が PRL のプロモーター活性に与える影響

\*\* :  $p < 0.01$ , 対照群との有意差

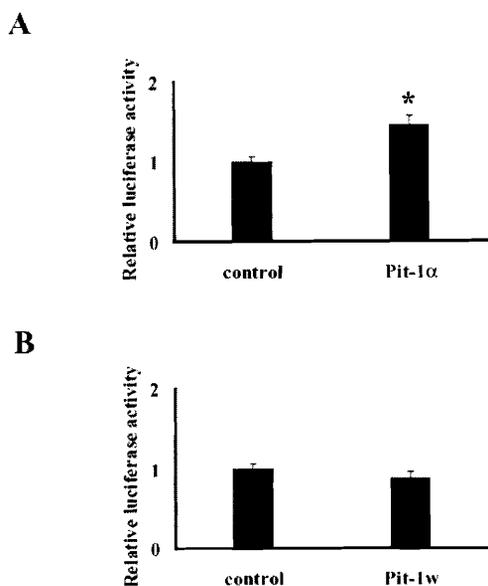


図5 Pit-1αと Pit-1w のニワトリ TSHβプロモーターに対するレポーター解析

(A) Pit-1αが TSHβのプロモーター活性に与える影響

(B) Pit-1wが TSHβのプロモーター活性に与える影響

\*:  $p < 0.05$ , 対照群との有意差

神経性網膜以外の下垂体外組織においても GH, PRL の発現はごく微量である一方, TSHβの発現は豊富に見られた。しかし, Pit-1w と TSHβの発現には相関が見られなかった。下垂体隆起部で発現する TSHβは Pit-1 非依存的に発現することが知られており(13, 14), それと同様に下垂体外組織における TSHβの発現も Pit-1 非依存的であるのかもしれない。また, Pit-1w は, GH, PRL, TSHβの発現に関与しない可能性が考えられた。

Pit-1αと Pit-1w の GH, PRL, TSHβ遺伝子のプロモーターに対する転写活性化能を調べたところ, Pit-1αは全てのプロモーター活性を有意に上昇させたが, Pit-1w は PRL プロモーターのみでわずかな転写活性化能を示した。この結果は, Pit-1αの発現が極めて少ない下垂体外組織では GH や PRL の発現が微量であることや, Pit-1w と TSHβの発現パターンが一致しないことと符合する。したがって, Pit-1αが GH, PRL, TSHβの活性を上げる主要なアイソフォームであり, Pit-1w は別の機能を担っている可能性が考えられた。本研究では下垂体外組織における GH の発現量は非常に少なかったが,

Harvey らのグループは神経性網膜をはじめとする様々な下垂体外組織では GH が mRNA およびタンパク質レベルで高発現していると報告している(2, 6, 7)。彼らは, 本研究とは異なり, White Leghorn 種を用いている。White Leghorn 種(卵用種)では Rock Cornish 種(肉用種)とは異なり, Pit-1αが下垂体外組織でも高発現し, その結果として GH や PRL の発現を高めているのかもしれない。

Pit-1w は従来, 鳥類特異的なバリエーションであると考えられてきたが, 我々は Pit-1w が哺乳類の下垂体および精巣に存在することを見出しており, その GH, PRL, TSHβ遺伝子に対する転写活性化能はニワトリの場合と同様であるという結果を得ている(未発表)。種を超えて存在する Pit-1w の下垂体外組織における機能の解明は Pit-1 の機能の多様性を考える上で極めて興味深い。

## 引用文献

1. Harvey S, Azumaya Y, Hull KL 2000 Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence? *Can J Physiol Pharmacol* 78:1013-1028
2. Harvey S, Johnson CD, Sanders EJ 2000 Extra-pituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *J Endocrinol* 166:489-502
3. Prada JA, Verastegui C, Perez-Rios N, Gonzalez-Moreno M, Fdez-Trujillo FJ 2000 Thyrotropin-like immunoreactivity in the developing chicken retina. *European journal of morphology* 38:34-40
4. Murphy AE, Harvey S 2001 Extrapituitary beta TSH and GH in early chick embryos. *Mol Cell Endocrinol* 185:161-171
5. Murphy AE, Harvey S 2002 Extrapituitary TSH in early chick embryos: Pit-1 dependence? *J Mol Neurosci* 18:77-87
6. Harvey S, Kakebeeke M, Murphy AE, Sanders EJ 2003 Growth hormone in the nervous system: autocrine or paracrine roles in retinal function? *Can J Physiol Pharmacol* 81:371-384
7. Harvey S, Baudet ML, Murphy A, Luna

- M, Hull KL, Aramburo C 2004 Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 139:158-167
8. Harvey S, Rattray D, Baudet ML, Sanders EJ eds. 2005 Ocular pituitary hormones in the chick embryo
  9. Andersen B, Rosenfeld MG 2001 POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocrine reviews* 22:2-35
  10. Kurima K, Weatherly KL, Sharova L, Wong EA 1998 Synthesis of turkey Pit-1 mRNA variants by alternative splicing and transcription initiation. *DNA and cell biology* 17:93-103
  11. Tanaka M, Yamamoto I, Ohkubo T, Wakita M, Hoshino S, Nakashima K 1999 cDNA cloning and developmental alterations in gene expression of the two Pit-1/GHF-1 transcription factors in the chicken pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 114:441-448
  12. Van As P, Buys N, Onagbesan OM, Decuypere E 2000 Complementary DNA cloning and ontogenic expression of pituitary-specific transcription factor of chickens (*Gallus domesticus*) from the pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 120:127-136
  13. Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG 1994 Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development* 120:515-522
  14. Bockmann J, Bockers TM, Winter C, Wittkowski W, Winterhoff H, Deufel T, Kreutz MR 1997 Thyrotropin expression in hypophyseal pars tuberalis-specific cells is 3,5,3'-triiodothyronine, thyrotropin-releasing hormone, and pit-1 independent. *Endocrinology* 138: 1019-1028