

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

両生類甲状腺刺激ホルモンの
分泌調節機構に関する研究

(Studies on regulatory mechanisms
of thyroid-stimulating hormone
secretion in amphibians)

		申請者	
氏名		岡田	令子
		Reiko	Okada

専攻・研究指導
(課程内のみ)

生命理工学専攻・内分泌学研究

2003 年 11 月

両生類の変態は主として甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモンおよびプロラクチンにより制御されている。すなわち甲状腺ホルモンは成体器官を新たにつくり出した幼生器官を消滅させあるいはつくりかえることにより変態を進行させる。副腎皮質ホルモンは甲状腺ホルモンの作用を強化するはたらきを示す。一方プロラクチンは前変態期には幼生器官の発達を促し、変態期に入ると甲状腺ホルモンに拮抗し変態の急激な進行にブレーキをかける。甲状腺ホルモンの分泌は脳下垂体から分泌される甲状腺刺激ホルモン(TSH)によって制御されている。それ故 TSH は、両生類の変態の鍵を握ると考えられる。しかしながらこれまでいくつかの研究室が両生類の TSH の単離を試みたにもかかわらず、純化標品が得られないか、得られてもごく少量で、放射免疫測定(RIA)法を確立するには十分でなかった。そのため、このホルモンの変態期における動態も不明であり、またその放出因子の同定も不可能であった。申請者は TSH の RIA 系の確立と TSH 分泌の制御因子の同定を旨として研究を行った。

第 1 章では両生類 TSH の放出制御に関するこれまでの研究について述べている。さらに本研究の目的について述べている。すなわち、両生類 TSH を直接的に測定することを可能にし、TSH 放出を制御している視床下部因子を同定すること、その反応性が幼生と成体で異なるかどうかを明らかにすること、甲状腺ホルモンによる負のフィードバックが甲状腺ホルモンレベルのいちじるしい上昇が見られる変態期にも存在するか否かを明らかにすることなどである。

第 2 章ではウシガエル TSH β サブユニット(TSH β)をコードする cDNA のクローニングおよび変態期のウシガエル下垂体中での TSH β mRNA の発現量の変動について述べている。ウシガエル下垂体前葉より抽出したトータル RNA から作製した cDNA ライブラリーより、シグナルペプチドと成熟した TSH β の両方をコードする cDNA をクローニングした。この cDNA 配列より推定されるアミノ酸配列は他の脊椎動物の TSH β と 40? 61% の相同性があること、得られた cDNA をプローブとして用いたノーザン解析により TSH β mRNA が下垂体前葉に特異的に発現していることが確かめられたこと、以前我々の研究室でごく少量得られた TSH β 標品を用いて決定された N 末端 10 残基の配列と cDNA より推定されるアミノ酸配列が完全に一致していることから、得られた cDNA がウシガエル TSH β をコードする cDNA であることを証明した。また変態期間のウシガエル幼生および成体の下垂体前葉で発現している TSH β mRNA をノーザン解析により定量した。TSH β mRNA は変態始動期でその発現量が上昇し、変態最盛期の終盤に低下すること、成体では発現量が極めて低いことがわかった。両生類の血中甲状腺ホルモン濃度は変態最盛期中盤に最高値に達することが知られているが、TSH β mRNA の変動もほぼ甲状腺ホルモン濃度の変動と一致するという結果が得られた。なお、TSH は α と β の二つのサブユニットが結合した形の糖タンパク質ホルモンであるが、 α サブユニットは他の下垂体ホルモン黄体形成ホルモンと α 胎刺激ホルモンと共通であり、 β サブユニットによってそれぞれのホルモンの性質が特徴づけられていることから、 β サブユニットに的をしばって研究を進めた。

第 3 章ではウシガエル TSH の RIA による測定系の確立について述べている。前章で得られたウシガエル TSH β cDNA より推定されるアミノ酸配列のうちその C 末端 24 残基の配列を

持つペプチドを合成し、ヘモシアニンをカップリングさせたものを抗原としてウサギに投与し抗血清を得た。この抗血清を用いて免疫組織化学的にウシガエル下垂体切片を染色したところ、ヒトTSH β 抗血清が認識する細胞と同一の細胞が染色された。合成したTSH β C末端ペプチドおよび得られた抗血清を用いて、RIAによる測定系を開発した。ウシガエル幼生および成体の下垂体抽出物、血漿、ウシガエル成体下垂体細胞培養液をいくつかの段階に希釈したものを測定すると、標準曲線に平行な濃度依存的な曲線が得られた。ウシガエルの他の下垂体ホルモン(プロラクチン、成長ホルモン、黄体形成ホルモン、 α 胎刺激ホルモンおよび α サブユニット)はこの測定系で反応しなかった。一方ウシガエル下垂体細胞培養液にウシガエルTSH β 抗血清、ウシガエル α サブユニット抗血清をそれぞれ別々に加えて免疫沈降を行った上清中には、TSH免疫陽性物質が含まれていなかった。このことから、下垂体細胞培養液に含まれるTSH免疫陽性物質は、TSH β および α サブユニットが結合した形で存在することが確かめられた。また下垂体細胞より培養液中に放出されたTSH β 免疫陽性物質はその濃度に応じてウシガエル幼生の甲状腺からのサイロキシン(T_4)分泌を促進することを明らかにし、このRIAにより生理活性を持つウシガエルTSHの測定が可能であることを確かめた。さらにウシガエルTSHの T_4 放出促進効果は、ウシTSHに比べて約50倍高いこともわかった。このRIA系の確立により今まで不可能だった両生類TSHの直接的な測定を可能にした。

第4章では既知の視床下部因子が下垂体細胞からのTSH放出におよぼす効果について述べている。ウシガエル成体および幼生の下垂体細胞に副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)、およびソマトスタチン(SRIH)を加えて培養し、培養液中に放出されるTSHをRIAにより測定した。成体下垂体細胞でのTSH放出はCRH、TRH、GnRHにより促進されること、特にCRHの効果が強いことがわかった。また、CRHにより引き起こされるTSH放出はSRIHにより抑えられることが明らかになった。一方、幼生の下垂体細胞からのTSH分泌はCRHによって促進されるが、TRHおよびGnRHは効果を示さなかった。これらの結果とこれまで間接的な方法により調べられてきた結果から、両生類のTSH放出の促進的な調節はおもにCRHによりなされていることが示唆された。

第5章ではウシガエル視床下部抽出物がTSH放出におよぼす効果について述べている。ウシガエル幼生および成体の視床下部の酸抽出物を幼生または成体の下垂体細胞に加えて培養し、培養液中に放出されるTSHを測定した。幼生、成体どちらの視床下部抽出物も幼生、成体両方の下垂体細胞からのTSH放出促進効果を示した。幼生の視床下部抽出物の方が、成体視床下部抽出物よりもTSH放出促進効果が強かった。これらの結果よりウシガエル視床下部中には下垂体からのTSH放出を促進する因子が含まれていることが明らかになった。第4章で述べたようにCRHが強いTSH放出活性を有していることから、視床下部抽出物中の主たるTSH放出活性はCRH由来のものであるかどうかをさぐるための実験を行った。すなわちCRHの拮抗物質 α -helical CRH₉₋₄₁によりどの程度放出活性が低下するかをしらべた。その結果 α -helical CRH₉₋₄₁により視床下部抽出物の活性がかなり低下す

ることがわかり 視床下部に含まれるTSH 放出因子 (群)による主たる活性はCRH に由来することが示唆された。

第6章では甲状腺ホルモンによるTSH 分泌のネガティブフィードバックによる調節について述べている。ウシガエル幼生および成体の下垂体細胞に甲状腺ホルモントリイオドサイロニン(T_3)または T_4 を加えて、TSH 放出におよぼす影響を調べた。幼生ではTSH の基礎的な分泌は T_3 により抑制されるが、成体では効果がみられなかった。幼生と成体の下垂体細胞の反応性の違いについては、幼生と成体での細胞密度の違い、TSH 放出能の違いのいずれかまたは両者によるもので成体では基礎的分泌量が低いためと考えられた。そこで培養液にCRH を加えてTSH 放出を高めたうえで T_3 、 T_4 の効果をみたところ幼生、成体のどちらの下垂体細胞でも、CRH によって引き起こされるTSH 分泌は T_3 、 T_4 を加えることで抑制された。 T_4 よりも T_3 の方が抑制効果は強かった。

第7章では本研究により得られた結論と今後の研究の進め方について述べている。すなわちウシガエルTSH 分泌は視床下部ホルモン、特にCRH により強く促進されることが明らかになった。またTSH 放出におよぼす視床下部因子の効果が幼生と成体の下垂体では異なることより、下垂体細胞が変態により変化することが示唆された。当面の課題としては、視床下部抽出物よりTSH 放出を制御する因子 (群)を単離・同定することである。