

プロラクチンの子育て行動 およびストレス耐性増強作用の分子機構

田 中 実

日本獣医生命科学大学 応用生命科学部 動物科学科 動物生理制御学教室

要 約 プロラクチンは主に脳下垂体前葉から分泌されるホルモンであり、乳腺発育の促進作用をはじめ多様な生理作用を有している。プロラクチンの脳への作用として、動物の子育て行動およびストレス耐性の増強作用が知られる。その分子機構を解明するためラットおよびマウスの脳におけるプロラクチン受容体遺伝子の発現調節機構を調べた。その結果、子育て行動に伴い脳下垂体から血中に分泌されたプロラクチンは、脳の脈絡叢に多量に存在するプロラクチン受容体に作用してプロラクチン受容体自身の遺伝子発現を促進し、増加した受容体が輸送体として働いて血中プロラクチンを脳脊髄液中に取り込み、脳内の標的神経細胞に作用するという仕組みが推定された。また、筆者らが作成したプロラクチンノックアウトマウスは不妊であったが、仮子に対して子育て行動を示した。一方、他のグループの作成したプロラクチン受容体のノックアウトマウスは子育て行動を示さなかった。両マウスの子育て行動の相違から、胎児期における母親由来のプロラクチンおよび胎盤性ラクトゲンあるいは乳児期における母乳中プロラクチンの脳への作用が成体期の子育て行動に必要な神経回路基盤の形成に必須であることが推察された。

キーワード：プロラクチン，子育て行動，ストレス耐性

日獣生大研報 63, 1-5, 2014.

1. はじめに

プロラクチンは主に脳下垂体前葉で産生・分泌されるタンパク質ホルモンで、魚類から哺乳類まですべての脊椎動物に存在し多様な生理作用を示す。哺乳類におけるプロラクチンの生理作用として乳腺の発育促進作用、卵巣の機能制御、免疫機能亢進作用、浸透圧調節作用等が知られるが、さらに脳神経系への作用として子育て行動およびストレス耐性の増強作用、性行動の抑制作用を有している¹⁾。こうしたプロラクチンの生理作用は標的細胞のプロラクチン受容体を介して発揮される。本稿ではプロラクチンの脳への作用としての子育て行動とストレス耐性の増強作用に着目し、ラットおよびマウスにおけるプロラクチン受容体遺伝子の構造と発現調節機構、さらにプロラクチンの子育て行動およびストレス耐性増強作用の分子機構について、これまでの筆者らの研究により明らかになったことを中心に紹介する。

2. プロラクチン受容体の分子構造

プロラクチンの生理作用は標的細胞の細胞膜を貫通して存在するプロラクチン受容体を介して発揮される。哺乳類のプロラクチン受容体にはプロラクチンが結合する細胞外領域は同じで、細胞内領域の長いロングフォームと細胞内

領域の短いショートフォームが存在する¹⁾。プロラクチン受容体はちょうどボールを両手でキャッチするように同じ分子が2量体となってプロラクチンと結合する(図1)。これまで明らかになっているほとんどのプロラクチンの作用はロングフォーム受容体を介したものである。その細胞内情報伝達経路には主に JAK2-STAT5a/b 系のリン酸化経路が関与している。すなわち、ロングフォーム受容体にプロラクチンが結合すると細胞内領域で受容体と会合している JAK2 がリン酸化されて活性化し STAT5a または STAT5b をリン酸化する。リン酸化された STAT5a/b はそれぞれ2量体となって核内に移行し、転写因子として各細胞の標的遺伝子の発現を誘導する。例えば、乳腺細胞であればβ-カゼインやα-ラクトアルブミン等の乳汁に含まれるタンパク質の遺伝子発現を STAT5a が活性化する。ショートフォーム受容体は肝臓に多く存在しているが、その受容体としての役割は未だ不明である。最近、マウスにおいてショートフォーム受容体が卵巣機能の制御に関与していることが報告されている²⁾。

3. プロラクチン受容体遺伝子の発現調節機構

哺乳類のプロラクチン受容体の遺伝子には複数の第1エクソンが存在し、各第1エクソンの転写調節により組織特異的な発現調節がなされている(図2)。ラットのプ

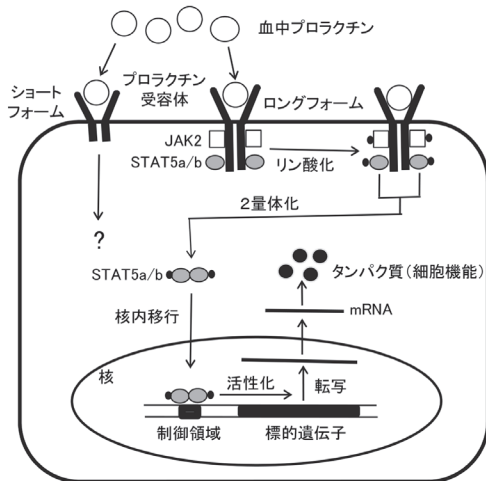


図1. プロラクチンのロングフォーム受容体を介した標的遺伝子活性化の分子機構の概略

プロラクチンがロングフォーム受容体に結合すると細胞内で受容体と会合していた JAK2 と STAT5a/b タンパク質が順次リン酸化される。リン酸化により活性化された STAT5 は 2 量体となって核内に移行し、転写因子として標的遺伝子の転写を活性化する。その結果産生したタンパク質が機能しプロラクチンの生理作用が発揮される。

プロラクチン受容体遺伝子には当初 E1-1, E1-2, E1-3 の 3 種類の第 1 エクソンが見いだされ、E1-1 は卵巣と精巣で、E1-2 は肝臓と腎臓で、E1-3 は広汎な組織で発現していることが報告された³⁾。その後、筆者らは新たに E1-4 と E1-5 の第 1 エクソンを発見し、E1-4 は脳の脈絡叢で、E1-5 は脳、肝臓、腎臓で主に発現していることを明らかにした^{4,5)}。こうした第 1 エクソンの組織特異的な発現は各第 1 エクソン上流に存在する転写調節領域に作用する転写因子により制御されている。E1-1 の生殖組織特異的な発現には Steroidogenic factor-1 (SF-1)、E1-2 の肝臓における発現は Hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4)、E1-3 のジェネリックな発現は C/EBP β と SP-I といった転写因子が関与している。E1-4 と E1-5 の発現を制御する調節領域および転写因子は未だ明らかになっていない。プロラクチン受容体遺伝子の他にも、成長ホルモン受容体やエストロゲン受容体等の広範囲の組織で発現する遺伝子にも複数の第 1 エクソンが存在し、組織特異的な発現制御がなされている。

4. メスラットの子育て行動とプロラクチン

ラットにおいて血液中のプロラクチン濃度は出産前に急激に増加し、授乳中は高濃度に保たれる。出産前から授乳中の脳におけるロングフォームとショートフォームのプ

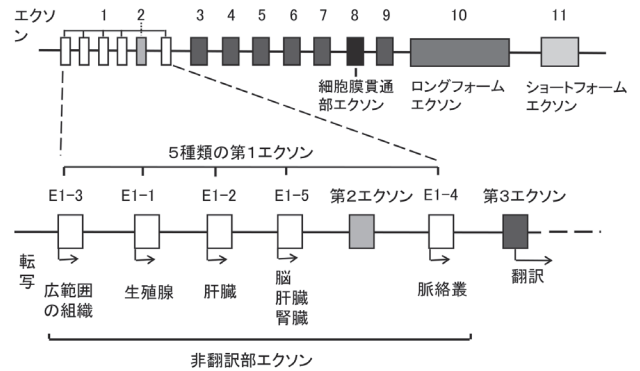


図2. 多重第 1 エクソンを有するラットプロラクチン受容体の遺伝子構造

各組織におけるプロラクチン受容体遺伝子の発現は転写される第 1 エクソンの種類によりそれぞれ異なる転写調節を受けている。E1-4 第 1 エクソンは第 2 エクソンの下流に存在するが、蛋白質への翻訳は第 3 エクソンから始まるため合成される受容体タンパク質の構造には影響しない。第 7 エクソンまでが細胞外領域を、第 8 エクソンは細胞膜貫通部を、第 9 エクソンからは細胞内領域をコードする。エクソンの選択的スプライシングにより最後のエクソンとして第 10 エクソンが選ばればロングフォームが、第 11 エクソンが使用されればショートフォームが生成する。

プロラクチン受容体の mRNA の発現量を調べると、ショートフォームの mRNA は変動しないが、ロングフォームの mRNA は血液中のプロラクチン量と平行して変動する⁶⁾。授乳中の高レベルの発現と授乳行動との関連を調べるために、出産後の母親ラットを、産子そのまま授乳させた群、3 日間授乳させたのち産子をすべて取り除き授乳を 5 日間停止させた群、5 日後に産子を戻し授乳を再び開始させた群の 3 群にわけ、脳におけるプロラクチン受容体 mRNA の発現量を比較すると、授乳を停止させた群ではロングフォームの mRNA の発現量が大きく減少し、授乳を回復させた群では授乳継続群と同等のレベルに回復した⁷⁾。すなわち脳におけるプロラクチン受容体ロングフォームの遺伝子発現は授乳と相関して増減する。

未経産のメスラットにおいてもケージに乳子ラットを 1 日 2 時間入れると 1~3 日目には、乳子を舐める (Licking)、巣に連れ戻す (Retrieving)、子の上にかがみ込む (Crouching) といった子育て行動が見られる。こうした行動の 2 時間あたりの回数を毎日カウントすることにより、子育て行動を数値化して定量することができる。子育て行動をフルスコアで示している未経産ラットの脳におけるプロラクチン受容体 mRNA の発現量を子育て行動を示していないラットの発現量と比較すると、子育て行動を示しているラットではロングフォームの mRNA の発現量

が増大していた⁷⁾。したがって脳におけるプロラクチン受容体のロングフォームの遺伝子発現は母親に限らず、未経産のメスにおいても子育て行動時に増加する。

5. オスラットの子育て行動とプロラクチン

オスラットにおいてもケージ内に乳子を毎日2時間入れると6~10日間後にLicking, Crouchingといった子育て行動が観察される。また、乳子と接触させる以前に7日間プロラクチンを投与しておく、乳子と接触させた後すぐに子育て行動を示すようになる。したがってプロラクチンはオスにおいても子育て行動を引き起こす作用を有している。また、オスにおけるこうした子育て行動時においても血中プロラクチン濃度は平常時よりも増加し、脳におけるプロラクチン受容体ロングフォーム mRNA の発現量も授乳中のメスラットと同等のレベルに増加する⁸⁾。すなわちプロラクチンによる子育て行動の誘導作用においては、血中のプロラクチン濃度の増加に伴って脳内のプロラクチン受容体ロングフォームの発現が増加し、プロラクチンの脳への作用が増強する仕組みがオス、メスともに働いていると考えられる。

6. プロラクチンのストレス耐性増強作用

プロラクチンはストレスにตอบสนองして一過性に分泌が増大する。例えば、ラットに推進拘束ストレスを負荷すると30分でプロラクチンの血中濃度はピークとなり以後はストレス負荷が継続していても減少していく。脈絡叢におけるプロラクチン受容体ロングフォーム mRNA の発現はストレス負荷後2時間をピークとして増加し、ストレス負荷を解除すると減少する⁹⁾。ストレス負荷2時間後にはラットの胃粘膜にストレス性胃潰瘍が生じるが、ストレス負荷前にプロラクチンを抹消（皮下）あるいは中枢（脳室内）投与しておく、胃潰瘍の発症度が軽減する。また、プロラクチン投与により、脈絡叢におけるプロラクチン受容体ロングフォーム mRNA の発現量が増加する。さらにプロラクチン投与によりストレス中枢である視床下部室傍核におけるプロラクチン受容体タンパク質とコルチコトリピン放出ホルモン（CRH） mRNA の発現も増加する¹⁰⁾。CRHはストレス応答ホルモンとして知られ、ストレス性胃潰瘍軽減作用も有している。したがって、プロラクチンのストレス性胃潰瘍軽減作用の経路として、脈絡叢の受容体を介して脳内に取り込まれたプロラクチンがストレス中枢である視床下部室傍核のプロラクチン受容体ロングフォームに作用しCRHの遺伝子発現を増強する経路が考えられる。

7. 脈絡叢における受容体を介したプロラクチンの脳内移送機構

血液中に分泌されたプロラクチンは血液・脳関門を通過できないため、脳内の脈絡叢に多量に存在するプロラクチン受容体を介して脳脊髄液中に取り込まれ、神経細胞に作用すると考えられている。先のラットにおける研究結果で、

脳のプロラクチン受容体の遺伝子発現がメス、オスともにプロラクチンの分泌量が上昇する子育て行動時に増加することが明らかになった。脳におけるプロラクチン受容体は脈絡叢で極めて多く、分析した脳におけるプロラクチン受容体の発現量は脈絡叢における発現量を反映していると考えられる。そこでラットの脈絡叢でのプロラクチン受容体遺伝子の発現変動を調べたところ、E1-4 第一エクソンを有するプロラクチン受容体 mRNA の発現が成長段階および授乳期において血中プロラクチンの濃度とともに増加した¹¹⁾。そこでマウスの脈絡叢で特異的に発現する第一エクソンである mE1-4 の発現に対するプロラクチンの影響を、筆者らが作成したプロラクチンノックアウトマウス¹²⁾を用いて調べた。その結果、mE1-4 の発現はノックアウトマウスでは低く、プロラクチンの投与により増加した¹³⁾。したがって脈絡叢における mE1-4 の発現すなわちプロラクチン受容体遺伝子の発現はプロラクチンによって増強されることが明らかになった。こうした知見により、プロラクチンの脳への作用の分子機構を次のように考えることができる（図3）。まず子育て行動時やストレス負荷時に血液中に多量に分泌されたプロラクチンが脈絡叢のプロラクチン受容体に作用することによりプロラクチン受容体自身の遺伝子の発現が促進され、受容体タンパク質の数が増加する。増加した受容体はプロラクチンの輸送体としても働き、血液中的プロラクチンが脳脊髄液中に取り込まれる。

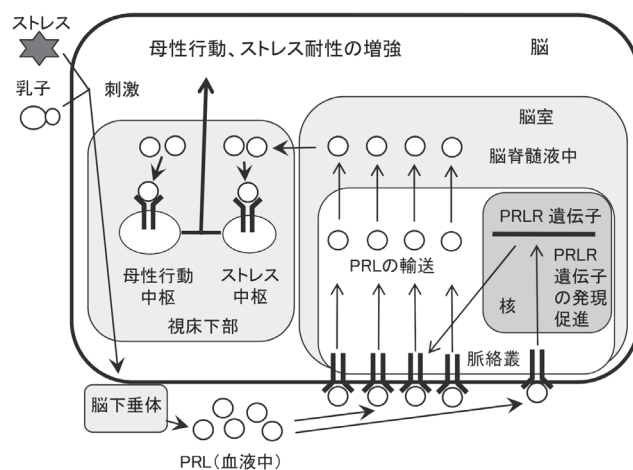


図3. 母性行動およびストレス耐性の増強におけるプロラクチンの脳への作用機構

乳子およびストレス刺激により脳下垂体から血液中に分泌されたプロラクチン（PRL）が脈絡叢のプロラクチン受容体（PRLR）に作用すると受容体自身の遺伝子発現が促進され受容体の数が増加する。脈絡叢のPRLRはPRLの輸送体としても働き脳脊髄液中へのPRLの取り込みが増加する。取り込まれたPRLが視床下部における母性行動およびストレス中枢の神経細胞の受容体に作用し母性行動およびストレス耐性が増強される。

脳脊髄液中すなわち脳内に移行したプロラクチンが視床下部の養育行動中枢およびストレス応答中枢の神経細胞のプロラクチン受容体に作用し、子育て行動の誘導およびストレス耐性の増強が引き起こされる。この過程の神経細胞におけるプロラクチンの受容体を介したシグナル伝達には STAT5b の関与が報告されているが¹⁴⁾、その標的遺伝子は未だ不明であり今後解明すべき課題である。

8. プロラクチンノックアウトマウスによる子育て行動の解析

前述のようにプロラクチンの脳への作用機構を明らかにするために、筆者らはジーンターゲット法によりプロラクチン遺伝子を破壊したプロラクチンノックアウト (PRL-KO) マウスを作成した¹²⁾。PRL-KO マウスで見られる顕著な異常としてメスの不妊と、乳腺の発育不全が認められた。メスの不妊の主な原因としては黄体におけるプロゲステロン合成の不活性化による黄体の機能発達不全であり、また、乳腺においては乳腺胞の発達が認められない。子育て行動に関しては、PRL-KO マウスのメスは不妊であるため出産後の乳子に対する養育行動は観察できない。そこでメスの PRL-KO 成体マウスに野生型マウスの乳子を同居させたとこ、予想に反して野生型マウスと同様 30 分以内に乳子を巣に運び込む子育て行動を示した。このことは未経産のメスマウスの子育て行動にはプロラクチンは不要であることを意味する。一方、他のグループが作成したプロラクチン受容体ノックアウト (PRLR) マウスは同様に不妊であるが里子の乳子に対する子育て行動を示さないことが報告されている¹⁵⁾。

こうした両 KO マウスにおける子育て行動の相違は次のように説明できる (図 4)。両マウスともにメスが不妊の

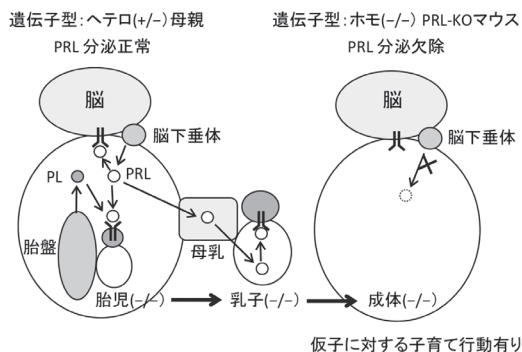


図 4. プロラクチンノックアウト (PRL-KO) マウスの成長過程におけるプロラクチンの作用

PRL-KO マウスは自身では PRL を産生できないが、胎児期には母親由来のプロラクチン (PRL) および胎盤性ラクトゲン (PL) の作用を受け、乳子期には母乳中の母親由来 PRL の作用を受ける。成体期には PRL の作用を受けることはないが仮子に対する子育て行動を行なう。

ため子孫を得るためには遺伝子型がヘテロのメスマウスと遺伝子型がホモのオスマウス (生殖能力は正常) を交配させる。すると生じる子の遺伝子型はヘテロかホモのいずれかである。仮に子は遺伝子型がホモの PRL-KO マウスとする。遺伝子型がヘテロの母親はプロラクチン分泌は正常であるため、胎児は母親由来のプロラクチンの作用を受けることができる。また、胎児期には胎盤から分泌されプロラクチン受容体に作用してプロラクチンと同様の作用を有する胎盤性ラクトゲンの作用も受ける¹⁶⁾。さらに受乳期には母乳中に大量に分泌されている母親由来のプロラクチンの作用も受ける¹⁷⁾。母乳中のプロラクチンの一部は乳子の腸から吸収され循環血中に移行することが知られている¹⁸⁾。したがって、PRL-KO マウスは胎児期に母親由来のプロラクチンおよび胎盤性ラクトゲンの作用を受け、乳子期には母親由来の母乳プロラクチンの作用を受けることができる。一方、PRLR-KO マウスは受容体が機能しないため生涯において全くプロラクチンの作用を受けることがない。したがって両マウスの胎児期および乳子期におけるプロラクチンあるいは胎盤性ラクトゲンの脳神経系への作用の有無が成体期の未経産状態における子育て行動の有無の原因であると推測される¹⁹⁾。最近、低プロラクチン母乳で育てられたラットは成体期における子育て行動の低下することが報告されている²⁰⁾。

9. おわりに

哺乳類において母乳産生を促進するホルモンのプロラクチンが脳にも作用して養育行動を誘導する作用を有していることは極めて合理的なことである。母親がいくら母乳を産生しても子に母乳を与えようとする行動をしなければ母乳は何の役にも立たない。こうした子育て行動はメスに限ったことではなく、オスにおいてもみられ、プロラクチンによって誘導される。子育てには子を育てるというだけではなく子を危険から守るということを伴い、親には大きな負担すなわちストレスがかかる。したがってプロラクチンがストレス耐性の増強に働くことも合理的なことである。子育て行動の促進に働くホルモンとして乳腺での射乳を引き起こすオキシトシンも知られている。哺乳類にとって母乳を与え、子を守り育てることは子孫を残すために必須の行動であり、子育て時にはこうしたホルモンが脳にも作用して養育行動を強める仕組みが備わっている。

引用文献

- 1) FREEMAN, M.E., KANYICKSKA, B., LERANT, A., NAGY, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.*, **80** : 1523-1631.
- 2) DEVI, Y.S., HALPERINM J. (2014). Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **382** : 400-410.

- 3) HU, Z.Z., ZHUANG, L., Dufau, M.L. (1998). Prolactin receptor gene diversity: structure and regulation. *Trends Endocrinol. Metab.*, **9** : 94-102.
- 4) TANAKA, M., HAYASHIDA, Y., IGUCHI, T., NAKAO, N., SUZUKI, M., NAKAI, N., NAKASHIMA, K. (2002). Identification of a novel first exon of prolactin receptor gene expressed in the rat brain. *Endocrinology*, **143** : 2080-2084.
- 5) KOBAYASHI, M., SUZUKI, M., SAITO, T.R., TANAKA, M. (2007). Developmental changes in the expression levels of alternative first exons of prolactin receptor gene in rat brain. *Endocr. Res.*, **32** : 143-151.
- 6) SUGIYAMA, T., MINOURA, H., KAWABE, N., TANAKA, M., NAKASHIMA, K. (1994). Preferential expression of long form prolactin receptor mRNA in the rat brain during the oestrous cycle, pregnancy and lactation: hormones involved in its gene expression. *J. Endocrinol.*, **141** : 325-333.
- 7) SUGIYAMA, T., MINOURA, H., TOYODA, N., SAKAGUCHI, K., TANAKA, M., SUDO, S., NAKASHIMA, K. (1996). Pup contact induces the expression of long form prolactin receptor mRNA in the brain of female rats: effects of ovariectomy and hypophysectomy on receptor gene expression. *J. Endocrinol.*, **149** : 335-340.
- 8) SAKAGUCHI, K., TANAKA, M., OHKUBO, T., DOH-URA, K., FUJIKAWA, T., SUDO, S., NAKASHIMA, K. (1996). Induction of brain prolactin receptor long-form mRNA expression and maternal behavior in pup-contacted male rats: promotion by prolactin administration and suppression by female contact. *Neuroendocrinology*, **63** : 559-568.
- 9) FUJIKAWA, T., SOYA, H., YOSHIZATO, H., SAKAGUCHI, K., DOH-URA, K., TANAKA, M., NAKASHIMA, K. (1995). Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus. *Endocrinology*, **136** : 5608-5613.
- 10) 田中実・藤川隆彦・中島邦夫. (2000). プロラクチンによる保育行動誘導およびストレス性胃潰瘍予防作用の分子基盤. 蛋白質・核酸・酵素. **45** (Suppl) : 346-354.
- 11) HIRAI, J., NISHITA, M., NAKAO, N., SAITO, T.R., TANAKA, M. (2013). Regulation of prolactin receptor gene expression in the rat choroid plexus via transcriptional activation of multiple first exons during postnatal development and lactation. *Exp. Anim.*, **62** : 49-56.
- 12) HORSEMAN, N.D., ZHAO, W., MONTECINO-RODRIGUEZ, E., TANAKA, M., NAKASHIMA, K., ENGLE, S.J., SMITH, F., MARKOFF, E., DORSHKIND, K. (1997). Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.*, **16** : 6926-6935.
- 13) TABATA, H., KOBAYASHI, M., IKEDA, J.H., NAKAO, N., SAITO, T.R., TANAKA, M. (2012). Characterization of multiple first exons in murine prolactin receptor gene and the effect of prolactin on their expression in the choroid plexus. *J. Mol. Endocrinol.*, **48** : 169-176.
- 14) YIP, S.H., EGUCHI, R., GRATTAN, D.R., BUNN, S.J. (2012). Prolactin signalling in the mouse hypothalamus is primarily mediated by signal transducer and activator of transcription factor 5b but not 5a. *J. Neuroendocrinol.*, **24** : 1484-1491.
- 15) LUCAS, B.K., ORMANDY, C.J., BINART, N., BRIDGES, R.S., KELLY, P.A. (1988). Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology*, **139** : 4102-4107.
- 16) 田中実・中島邦夫. (1993). 胎盤由来の新規プロラクチン・成長ホルモンファミリーメンバーとその発現制御. 生化学. **65** : 29-34.
- 17) NAGASAWA H. (1991). Physiological significance of hormones and related substances in milk with special reference to prolactin: an overview. *Endocr. Regul.*, **25** : 90-97.
- 18) WHITWORTH, N.S., GROSVENOR, C.E. (1978). Transfer of milk prolactin to the plasma of neonatal rats by intestinal absorption. *J. Endocrinol.*, **79** : 191-199.
- 19) 田中実. (2003). プロラクチンの脳への作用が母性行動を制御する. 化学と生物. **41** : 490-491.
- 20) MELO, A.I., PÉREZ-LEDEZMA, M., CLAPP, C., ARNOLD, E., RIVERA, J.C., FLEMING, A.S. (2009). Effects of prolactin deficiency during the early postnatal period on the development of maternal behavior in female rats: mother's milk makes the difference. *Horm. Behav.*, **56** : 281-291.