

性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）受容体の

新規シグナル伝達因子の解明

寺島 涼太

平成 25 年度

Novel intracellular factors acting in the signal transduction
pathway of gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor

TERASHIMA RYOTA

2013

学位論文題目

性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）受容体の新規シグナル伝達因子の解明

氏 名 寺島 涼太

審 査 委 員

< 主 査 >

佐々木 宣哉
(実験動物学・教授)

< 副 査 >

宝達 勉
(獣医伝染病学・教授)

< 副 査 >

山脇 英之
(獣医薬理学・准教授)

< 副 査 >

米澤 智洋
(東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻，病態動物医科学講座，獣医臨床病理学研究室・准教授)

平成26年2月20日

北里大学大学院獣医畜産学研究科

目次

第一章	序論	8
第二章	Mx1 遺伝子の新規スプライシングバリエント	11
I.	序論	11
II.	材料と方法	14
1.	試薬	14
2.	実験動物と細胞	17
3.	L β T2 細胞の培養と継代	18
4.	細胞の計数	18
5.	Mx1 遺伝子発現の抑制	19
6.	L β T2 細胞における IFN α の発現	19
7.	L β T2 細胞における LH β mRNA 発現と LH 分泌	20
8.	L β T2 細胞における Mx1 発現の検討	20
9.	マウスへの IFN α 投与	20
10.	マウス卵巣の摘出	21
11.	ラット乳腺の離乳による変化	21
12.	総 RNA 抽出	21
13.	3' Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	22
14.	リアルタイム RT-PCR	23
15.	RT-PCR	24
16.	時間分解蛍光免疫測定法 (DELFIA 、 Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay) による LH 濃度測定	25
17.	発現ベクター及びエレクトロポレーション	26

18. 免疫組織化学	27
19. ウェスタンブロッティング	28
20. 統計解析	31
III. 結果	32
1. 下垂体ゴナドトロフにおける IFN α 及び IFN α 受容体の 発現	32
2. L β T2 細胞の LH 分泌及び LH β mRNA 発現に対する IFN α の作用	32
3. L β T2 細胞の増殖に対する IFN α の作用	33
4. L β T2 細胞における Mx1 転写産物	33
5. 野生型マウス種及び実験動物マウス下垂体における Composite Mx1 発現と Mx1 の分布	35
6. Pseudo Mx1 と Composite Mx1 の発現に対する IFN α の 作用	36
7. Pseudo Mx1 と Composite Mx1 の発現に対する GnRH α の作用	36
8. Composite Mx1 による細胞増殖の抑制作用	37
9. 動物種間における Mx1 アミノ酸配列の比較	37
10. ラット退縮期乳腺における Mx1 の発現動態	38
IV. 考察	40
V. 要約	46
VI. 図表	49
第三章 GnRH-Anxa5 系に連動する新規転写因子の発見	67
I. 序論	67
II. 材料と方法	70

1 . 試薬	70
2 . 実験動物	70
3 . 細胞培養	71
4 . ラット及びマウス性周期の観察	71
5 . DNA マイクロアレイ解析	72
6 . 卵巣の摘出	72
7 . GnRHa 投与	73
8 . L β T2 にへの GnRHa 投与	73
9 . マウス下垂体初代培養	74
10 . Nr4a3 のノックダウン	75
11 . L β T2 細胞の還流培養	75
12 . リアルタイム RT-PCR	76
13 . 免疫組織化学	77
III . 結果	79
1 . 下垂体前葉における Anxa5 の発現動態	79
2 . Anxa5 ^{-/-} マウスにおける下垂体前葉ホルモンの遺伝子発現	79
3 . Anxa5 ^{-/-} マウス下垂体の網羅的遺伝子発現解析	80
4 . 下垂体における GnRH に対する Anxa5 関連遺伝子の反応性	80
5 . 下垂体における Mpz の発現	81
6 . ギナドトロフの Nr4a3 発現に対する GnRH と Anxa5 の作用	81
7 . 蛋白合成阻害薬の Nr4a3 発現に対する影響	82
8 . Nr4a3 ノックダウンによるギナドトロピン遺伝子発現	

に対する影響	82
9. GnRHa のパルス状刺激による Nr4a3 発現に対する影響	83
IV. 考察	84
V. 要約	89
VI. 図表	92
第四章 総括	105
I. 図表	109
謝辞	110
引用文献	111

第一章：序論

哺乳類の雌性生殖機構は、卵巢における配偶子の成熟と排卵を外部環境の変化に適応させるために、動物種ごとに進化した生理機能システムである。環境光の変化を始めとする外部環境を神経系が感知して、下垂体前葉を起点とする液性調節機構に伝えることで、卵巢での卵胞の発育、排卵、黄体形成と維持が調節される。動物種によって、交尾排卵、機能的黄体相の有無などによって生殖周期を型分けすることが出来るが、神経機構と液性機構によって調節が行われる点は種に共通している。

神経系と内分泌系のインターフェースとして機能する神経ホルモンが、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin releasing hormone, GnRH) である。GnRH は、視床下部－下垂体－性腺軸の最上位に位置し、一連の生殖機能を制御するので生殖のマスターホルモンと呼ばれる [12, 59, 86]。アミノ酸 10 個からなる GnRH 分子は、種間でアミノ酸配列の保存性が高く、哺乳類以外にも鳥類、魚類、さらには原索動物であるホヤからも分離同定されている生物学上起源の古いホルモンとしても知られる。

視床下部の GnRH ニューロンの軸索は、正中隆起の下垂体門脈一次毛細血管叢に投射しており、神経終末から放出された GnRH は、下垂体門脈を介して下垂体前葉に到達し、性腺刺激ホルモン産生細胞 (ゴナドトロフ) 細胞膜上の GnRH 受容体に結合する。

GnRH 受容体は、G 蛋白質共役型受容体で、主に $G\alpha_{q/11}$ に共役することで、黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を促す [25, 32, 69]。 $G\alpha_{q/11}$ はフォスホリパーゼ C を活性

化して、ジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール 3 リン酸 (IP3) を産生し、DAG はプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化させる。PKC は MAPK 系を活性化し、IP3 は細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる。

一方、GnRH 受容体が、 $G\alpha_s$ や $G\alpha_i$ に共役する例も知られている [30, 55, 96]。ゴナドトロピンの合成、分泌機能に対しても複数の細胞内機序が同時に働いていることが明らかにされているが [37, 62, 70]、どのように LH と FSH の合成調節を分けて調節しているのかなど未解明な点が多く残されている。

GnRH アナログは、臨床的に広く応用されており、特に前立腺癌や子宮体がんなど性ホルモン依存性腫瘍細胞に対して、GnRH の作用を抑制するスーパーアゴニストとして用いられる。一方、GnRH が、腫瘍細胞の受容体を介して $G\alpha_i$ に共役した直接的な細胞増殖抑制作用を示すことが知られている [22, 34, 47, 53, 54, 60, 109]。正常組織においても、GnRH と GnRH 受容体は、下垂体以外の様々な組織に分布しており [21, 48, 63, 72, 73, 87, 92]、局所で組織特異的な作用をもつことが示唆されているが、その生理的役割はほとんど明らかでない。

GnRH の多岐に分かれる機能を理解する上で、そのシグナルトランスダクション機序の解明が重要である。しかし、ゴナドトロフ細胞株を用いた研究で、GnRH が 200 を超える遺伝子の転写に影響することが明らかにされたように [38]、GnRH 受容体のシグナ

ル機構には未解明な機序が多く残されている。

獣医生理学研究室では、GnRH 受容体に関連する因子として 2 つの細胞内分子を同定した。1 つは、インターフェロン (IFN) α で誘導される Myxovirus (influenza virus) resistance 1 (Mx1) である。GnRH による細胞増殖抑制作用が、ゴナドトロフ細胞株である L β T2 でも観察され、この作用発現過程に G α_i 下流シグナルが関わること、このシグナルによって Mx1 発現の誘導されること、Mx1 の発現を抑制することで GnRH の細胞増殖抑制作用の消失することが明らかにされた [43]。

もう一つの因子は Annexin A5 (Anxa5) である。Anxa5 がゴナドトロフに発現していること、GnRH によって合成の促進されること [40, 41]、GnRH の LH 放出促進作用に関与していること [40] が明らかにされ、GnRH 受容体シグナルトランスダクションとの相互作用が示唆されている。

本研究では、GnRH 受容体下流で働くこれら 2 つの新規シグナル分子について調べることで、Mx1 に由来する増殖抑制活性を示す新規分子を同定し、Anxa5 と相互作用する FSH 分泌を特異的に抑制する新規転写因子を同定した。

第二章：Mx1 遺伝子の新規スプライシングバリエーション

I. 序論

性腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン）の分泌は主に視床下部で産生される GnRH によって調節されるが、その他のホルモン、サイトカイン、成長因子もまた、ゴナドトロピン分泌に影響する[39, 49, 81, 104]。

インターフェロン（IFN） α は主にウイルス感染細胞で産生され、ウイルスに対する自然抵抗性を賦与するサイトカインである。IFN α の作用は免疫機能調節のみならず、様々な生理的プロセスに関与することが示されている[7, 36]。特に、細胞の増殖抑制作用が知られている[36]。ヒトにおける IFN 治療に際して、内分泌機能に影響を与えることも報告されているが、その機序についての詳しい報告はない[16, 98, 108]。IFN α が、下垂体前葉に発現していること[45]、ヒトやウシで LH 分泌を抑制することが報告されているにもかかわらず[2, 31]、ゴナドトロフでの機能と作用機序についての詳しい研究はない。

Mx1 は IFN α に誘導される代表的な遺伝子で、インフルエンザウイルスに対する抗病性に重要な役割を示すことが知られている[84]。Mx1 はインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼサブユニット PB2 と核蛋白質 NP に作用し、初期転写の過程を阻害することにより、ウイルスの増殖を抑制する[107]。一方で、IFN α による Mx1 の合成促進作用はウイルス感染の有無に因らない顕著な細胞応答であるため、Mx1 が抗ウイルス増殖活性以外の IFN α の作用に

関わっている可能性がある。

マウス Mx1 蛋白質は 3 つの GTP 結合部位をもつ N 末端の GTPase domain、central region、C 末端の GTPase effector domain (GED) の 3 つのドメインから構成される 631 アミノ酸残基の G 蛋白質である [50, 106]。C 末端の GED は Mx1 蛋白質のオリゴマー化に必要であり、ホモ多量体を形成することによってウイルス認識が可能になる [29]。しかし、BALB/c や C57BL/6 などの多くの実験動物マウス種の Mx1 遺伝子には翻訳領域内に欠損があり、フレームシフトが起き、翻訳領域が極めて短縮されている [95]。A2G 系統や MSM/Ms のような正常な Mx1 をもつ野生型マウス種はインフルエンザウイルス感染を耐過する一方で、実験動物マウス種はウイルス感染によって死亡してしまう [1, 33, 65, 95]。多くの実験動物マウスの Mx1 遺伝子は機能を消失した所謂偽遺伝子であると考えられてきた [1, 95]。

北里大学獣医生理学研究室では、GnRH がゴナドトロフにもたらす増殖調節作用について研究を進めてきた。GnRH は生殖機能を中枢レベルで支配する最も重要な因子であるが、その機能はそれだけにとどまらず、子宮がん、卵巣がん、前立腺がん由来の細胞に直接作用して増殖を抑制することが示されている [46, 67, 88]。この増殖抑制作用はゴナドトロフ由来の L β T2 細胞においても観察される。GnRH のゴナドトロピン分泌刺激と細胞増殖抑制作用はどちらも GnRH 受容体を介した作用だが、GnRH が G α_i サブユニット下流で Mx1 の発現を調節し、細胞増殖に影響することが示唆されている。ところが、L β T2 細胞は BALB/c と C57BL/6 の F1 から樹立された細胞株であり、欠失型の Mx1 しか存在しないはず

であり、Mx1 の機能に興味を持たれる。

本章では、GnRH の細胞増殖抑制作用に関わる候補分子として、偽遺伝子型 Mx1 に由来する細胞内分子の発現調節と作用を検討した。まず、Mx1 を誘導する代表的な因子として IFN α を用い、ゴナドトロフにおける発現および作用を調べ、その作用と Mx1 発現との関連を検討し、次に Mx1 転写産物を詳細に調べた。

Ⅱ．材料と方法

1．試薬

本研究で使用した試薬を入手先別に列記した。

Acris Antibodies (Herford, Germany)

- Anti-LH-RH receptor mouse monoclonal antibody (A9E4)

Applied Biosystems (Foster City, CA)

- BigDyeTerminater v3.1 Cycle Sequencing Kit
- High Capacity cDNA Reverse Transcription kit
- Power SYBR Green PCR Master Mix
- TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent VICTM Probe
- TaqMan Universal PCR Master Mix

BioRad Laboratories (Hercules, CA)

- CertifiedTM Molecular Biology Agarose

CALBIOCHEM (San Diego, CA)

- Bovine γ -globulin

GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)

- ECL Plus Western Blotting Detection System
- Eu-DDT chelate

ICN Biomedicals (Aurora, OH)

- Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG

Invitrogen (Carlsbad, CA)

- antibiotic-antimycotic (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 100 ng/ml amphotericin)
- DNase I (deoxyribonuclease I, Amplification Grade)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Fetal bovine serum (FBS)
- Lipofectamine 2000 reagent
- pcDNA3.1 (-)
- SuperScriptTM III Reverse Transcriptase
- TRIzol reagent
- Trypsin (1:250)

Nagase medicals (Hyogo, Japan)

- GnRH agonist (GnRHa, Des-Gly10 [Pro9]-GnRH ethylamide; Conceral)

NIDDDH (Bethesda, MD)

- LH for Eu-labeling (rat LH-I-9)
- LH standard (rat LH-RP-3)
- Rabbit anti-rat LH serum (Anti-rat LH-S-11)

Perkin Elmer (Branchburg, NJ)

- Enhancement Solution

QIAGEN (Valencia, CA)

- Gel Extraction kit
- HotStarTaq DNA Polymerase
- Plasmid Maxi Kit
- RNeasy Mini kit

Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)

- DAB substrate

Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

- anti- β -actin monoclonal antibody (C4)
- anti-MxA goat polyclonal antibody

Sigma-Aldrich (St Louis, MO)

- Albumin from bovine serum (BSA)
- Interferon α A (IFN α), Mouse, Recombinant
- N⁶,2'-O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (db-cAMP)

TaKaRa BIO (Shiga, Japan)

- *E. coli* JM109 Competent Cells
- Mighty Mix
- TaKaRaExTaq

Vector Laboratories (Burlingame, CA)

- Impress reagent anti-goat IgG POD kit

自家製

- Goat anti-rabbit γ -globulin

2. 実験動物と細胞

C57BL/6J マウスは、Charles River Laboratories Japan (Yokohama, Japan) から購入した。MSM/Ms マウス (RBRC00209) は、National Bio-Resource Project を経由し、RIKEN BioResource center から購入した。マウスは SPF 動物室で 14 時間点灯 (0500~1900 時)、10 時間消灯の照明条件、室温 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ の環境下で、固形飼料 (CE-2, 日本クレア, 東京) と水を不断給餌して飼育した。

Wistar-Imamichi ラットは北里大学コンベンショナル動物飼育施設で上記と同様の環境下で飼育した。

本研究で行った動物実験は、すべて北里大学獣医学部動物実験及び動物管理マニュアルに沿って行われた。実験計画は北里大学動物実験委員会に承認を受けた。

本研究に用いたマウス下垂体ゴナドトロフ由来株化細胞 L β T2 は、カリフォルニア大学サンディエゴ校医学部の Dr. P. Mellon から供与された。この細胞は、ラット LH β プロモーター領域の 11.8kb に Simian Virus 40 T antigen 遺伝子を結合して作成したトランスジーンをマウスに導入し、導入遺伝子によって誘発された下垂体腫瘍から樹立された細胞株である

[99]。

3. L β T2 細胞の培養と継代

L β T2 細胞の培養と継代を次の方法で行った。

DMEM に NaHCO₃ 3.7 g を加えて pH 7.4 に調整し、超純水で 1L にメスアップした。10% FBS と antibiotic-antimycotic を加えて培養液とした。L β T2 細胞を組織培養用フラスコ (75 cm² Canted Neck Flask, Corning; Corning, NY) 内で 5% CO₂、37°C の環境下で培養した。

細胞が 100%コンフルエントに達する前に継代を行った。まず培養液を除去し、トリプリン溶液 (0.25% Trypsin、10 mM EDTA を加えた DMEM 溶液) を 4 ml 加え、2 分間、37°C で静置した。剥離した細胞浮遊液に 16 ml の培養液を加えて酵素反応を止め、800 rpm、10 分間遠心分離した。上清を除去した後、細胞に 20 ml の培養液を加え、その 4 ml に 16ml の DMEM を加えて培養を継続した。

4. 細胞の計数

培養用 96 well プレート (Iwaki, Chiba, Japan) に L β T2 細胞を 2.0×10^4 cells/well で播種し、37°C で 24 時間培養した。培養後、培養液をアスピレーターで吸引し、0-1,000 IU/ml の IFN α を各群 5 well ずつ 200 μ l 加え 24 時間培養した。培養後、培養液をアスピレーターで吸引し、0.25% Trypsin 溶液を 50 μ l 加え、2 分間、37°C

で静置した。次に培養液を 100 μ l 及び 0.4% Trypan blue 溶液を加え、十分なピペッティングを行い、細胞を単離し、自動セルカウンター (TC10, BioRad Laboratories) を用いて生細胞を計数した。

5. Mx1 遺伝子発現の抑制

Mx1 遺伝子発現抑制の影響を評価するために、RNA 干渉法で遺伝子発現を抑制した。

培養用 96 well プレートで抗生物質を含まない培養液を用いて L β T2 細胞を 2.0×10^4 cells/well で培養し、24 時間置いた。培養後、Lipofectamine 2000 reagent を用い、Mx1 siRNA およびコントロール siRNA を各々 10 nM の濃度で形質転換した。使用した siRNA の配列を次に示した。

QIAGEN (Valencia, CA)

- Mx1 siRNA

sense: r(CUGUUAUAUCCAACUGGAA)dTdT

antisense: r(UUCCAGUUGGAUAUAACAG)dGdT

- 対照には、AllStars Negative Control siRNA を用いた。

24 時間後、IFN α (500 IU/ml) を含むあるいは含まない培養液に交換し、24 時間培養した。培養後、細胞を計数した。

6. L β T2 細胞における IFN α の発現

24 well プレートに L β T2 細胞を 5.0×10^5 cells/well で播種し、24 時間培養後、GnRHa (10^{-7} M)、IFN α (500 IU/ml)、KCl (50 mM)

あるいは db-cAMP (1 mM) を含む培養液に交換し、3 時間培養後、TRIzol reagent で細胞を溶解し、RNA を抽出した。

7. L β T2 細胞における LH β mRNA 発現と LH 分泌

24 well プレートに L β T2 細胞を 5.0×10^5 cells/well で播種し、24 時間培養後、IFN α (500 IU/ml) を含むあるいは含まない GnRHa (0、 10^{-11} - 10^{-7} M) 培養液に交換した。6、24 時間培養後、培養液を回収し、LH 測定に供し、細胞は TRIzol reagent で RNA を抽出した。

8. L β T2 細胞における Mx1 発現の検討

24 well プレートに L β T2 細胞を 5.0×10^5 cells/well で播種し、24 時間培養した。培養後、IFN α (0-1,000 IU/ml) を含む培養液に交換し 3 時間、IFN α (500 IU/ml) を含む培養液に交換し 0-24 時間、あるいは GnRHa (10^{-7} M) を含む培養液に交換し 0-180 分間培養した。培養後、TRIzol reagent ですぐに細胞を溶解した。

9. マウスへの IFN α 投与

8 週齢の雌 C57BL/6 マウスをジエチルエーテルで麻酔し、IFN α (1,000 IU/50 μ l) あるいは生理食塩水 (50 μ l) を尾静脈投与した。投与 1 時間後に下垂体、胸腺、肺、脾臓を摘出し、すぐに液体窒素で凍結し、RNA 抽出に用いるまで -80°C で保存した。

10. マウス卵巢の摘出

8週齢の雌 C57BL/6 マウスをジエチルエーテルで麻酔し、卵巢を摘出した。対照群として卵巢を摘出しない偽手術群を設けた。手術2週間後に下垂体を採取し、すぐに液体窒素で凍結し、RNA抽出に用いるまで-80°Cで保存した。

11. ラット乳腺の離乳による変化

退縮期乳腺における GnRH、GnRH 受容体、Mx1 の発現を調べた。

分娩日を0日(D0)とし、21日目(D21)に離乳し、20から29日(D20-29)まで毎日乳腺を採取した。組織はすぐに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存、あるいは、4% PFAで固定した。別に、泌乳10日目(D10)に強制離乳し、2日後に乳腺を採取する群を設けた。

凍結した組織は RNA 抽出あるいは SDS-PAGE に供した。

12. 総 RNA 抽出

RT-PCR あるいはリアルタイム RT-PCR を行うために採取した細胞あるいは組織は全て TRIzol reagent で RNA を抽出した後、DNase I で処理した。

3' Rapid amplification of cDNA ends (RACE) に用いる総 RNA の抽出は次の方法で行った。まず、LβT2 細胞を 35 mm ディッシュ

に 10^6 cells/dish で播種した。24 時間培養後、IFN α (500 IU/ml) を含むあるいは含まない培養液に交換し、3 時間後に細胞を回収し、RNeasy mini kit を用いて RNA を抽出し、DNase I で処理した。

1 3 . 3' RACE

L β T2 細胞から抽出した mRNA 中の Mx1 mRNA 変異体を 3' RACE 法で調べた。

1 μ g の総 RNA を用いた。SuperScriptTM III Reverse Transcriptase 及び 0.5 μ M の Adaptor-oligo(dT)₃₀ プライマー (Table 2-1) を用いて、55°C、1 時間の逆転写反応を行い、70°C、15 分で反応を止めた。

RACE 産物は Table 2-1 に示したプライマーを用いた次の条件の 1 次および Nested PCR 反応で増幅した。1 次 PCR 反応は TaKaRaExTaq、Nested PCR 反応には HotStarTaq DNA Polymerase を用いて以下の条件で行った。

1 次 PCR : 94°C 2 分、[98°C 10 秒、70°C 5 分] 23 サイクル、72°C 7 分

Nested PCR : 95°C 15 分、[94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 5 分] 35 サイクル、72°C 7 分

増幅した PCR 産物を 1.2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、UV トランスイルミネーターで検出した。

検出した産物はアガロースゲルから切り出し、Gel Extraction kit を用いて抽出した。抽出した DNA は BigDye Terminator v3.1 Cycle

Sequencing Kit を用いて、次の条件でシーケンス PCR を実行した。

シーケンス PCR : 96°C 1 分、[96°C 10 秒、60°C 4 分] 25 サイクル

産物は精製した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer で塩基配列を解析した。

1 4 . リアルタイム RT-PCR

L β T2 細胞における IFN α の発現調節、LH β 発現に対する IFN α の作用、各種臓器における Mx1 発現の調節、L β T2 細胞における IFN α 、GnRH α による Mx1 発現に対する作用及びラット乳腺における GnRH、Mx1 発現の調節を検討するため、リアルタイム RT-PCR を行った。

L β T2 細胞あるいは組織から抽出した総 RNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription kit のプロトコルに従い逆転写反応を行い、cDNA を作製した。リアルタイム PCR に使用した各種特異的プライマー及びプローブを Table2-3 に列挙した。StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使い、Power SYBR Green PCR Master Mix 及び TaqMan Universal PCR Master Mix による PCR 反応を次の条件で行った。

Power SYBR Green PCR Master Mix :

95°C 10 分、[95°C 15 秒、60°C 1 分] 50 サイクル

TaqMan Universal PCR Master Mix :

50°C 2 分、95°C 10 分、[95°C 15 秒、60°C 1 分] 50 サイクル

mRNA 発現量はデルタデルタ Ct ($\Delta\Delta Ct$) 法を用い、対象群に対する相対値として計算した。値は内部標準として 18S rRNA あるいはラット Ribosomal protein L19 (RPL19)を用いて標準化した。

1 5 . RT-PCR

L β T2 細胞あるいはマウス下垂体における I 型 IFN 受容体 1 (IFNAR1) の発現及びラット乳腺における GnRH 受容体 (GnRH-R) の発現を検討するため、RT-PCR を行った。

L β T2 細胞あるいは各臓器から抽出した総 RNA を用い、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit のプロトコルに従い逆転写反応を行い、cDNA を作製した。PCR 反応に使用した各プライマーを Table2-2 に列記した。HotStarTaq DNA Polymerase による PCR 反応を次の条件で行った。

IFNAR1 : 95°C 15 分、[94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 5 分] 27 サイクル、72°C 7 分

GnRH-R : 95°C 15 分、[94°C 30 秒、58°C 30 秒、72°C 5 分] 35 サイクル、72°C 7 分

RPL19 : 95°C 15 分、[94°C 30 秒、58°C 30 秒、72°C 5 分] 23 サイクル、72°C 7 分

増幅した PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、UV トランスイルミネーターで検出した。

1 6 . 時間分解蛍光免疫測定法 (DELFI A、Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay) による LH 濃度測定

LβT2 細胞の培養液中 LH 濃度を DELFIA で測定した。

1 6 — 1 . LH の Eu-標識

ラット LH (1 mg/ml) 5 μl に、0.1 M NaHCO₃ (pH 9.8) 10 μl を加え、更に、これに Eu-DDT キレート 10 μl を加えて、37°C で一晩反応させた。

反応溶液を 0.1% CHAPS-TBS とともにセファデックス G50 カラム (BioRad Laboratories) によるゲルろ過に供した。30 滴を 1 分画として、20 分画をフラクションコレクターで回収し、全ての分画を 100 倍希釈した後、蛍光強度を測定した。測定カウント数の高い 2-3 分画を Eu-標識 LH とし、適切な濃度に希釈した後、以下の LH 測定に供した。

1 6 — 2 . LH 濃度の測定

予め、二次抗体 Goat anti-rabbit γ-globulin を固相化した蛍光測定用 96well マイクロプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) にアッセイバッファー (50 mM Tris, 145 mM NaCl, 0.5 mg/L Bovine γ-globulin, 5 g/L BSA, 7.8 mg/L DTPA, 0.5 g/L NaN₃) で希釈した一次抗体 Rabbit anti-rat LH serum (1:80,000) を 100 ml ずつ分注し、4°C で一晩震盪した。

マイクロプレートを洗浄した後、2 倍階段希釈した LH 標品 (0.078125-5 ng/ml) 及び試料を 100 μ l ずつ分注し、4°C で一晩震盪した。

マイクロプレートを洗浄した後、Eu-標識 LH を 100 μ l ずつ分注し、室温で一晩震盪した。再度、洗浄した後、Enhancement Solution を 100 μ l ずつ分注し、室温で 5 分間震盪し、ARVO 2030 Multilabel Reader (Perkin Elmer) で蛍光強度を測定した。

1 7 . 発現ベクター及びエレクトロポレーション

細胞内 Mx1 バリアントの作用を評価するため、2 つの Mx1 バリアント発現ベクターを構築し細胞に導入した。

1 7 - 1 . 発現ベクターの構築

L β T2 細胞から作製した cDNA を用い、以下に示すプライマーで 2 種類の Mx1 バリアント (Pseudo Mx1-1 及び Composite Mx1、Figure. 2-5) のオープンリーディングフレームを増幅した。

- Pseudo Mx1-1 及び Composite Mx1 Forward Primer :

5'-CACGGATCCACCATGGATTCTGTGAATAATCT-3'

- Pseudo Mx1-1 Reverse Primer :

5'-CACAAAGCTTACCTTACGAAGGCAGTTTGGAC-3'

- Composite Mx1 Forward Primer :

5'-CACAAAGCTTACCCTATGTCTCCAAACTGGGAA-3'

増幅した産物は、制限酵素で処理した後、Mighty Mix を用い、

pcDNA3.1 にライゲーションし、コンピテントセルに形質転換した。形質転換した大腸菌を大量培養し、Plasmid Maxi Kit を用い、プラスミドを抽出した。

1 7 - 2 . エレクトロポレーション

2 つの Mx1 バリアントの発現ベクターとコントロール用の空ベクター (pcDNA3.1) を NEPA21 エレクトロポレーター (NEPA GENE, Chiba, Japan) を用いて、L β T2 細胞に導入した。専用のキュベットに 10 μ g の発現ベクターを含む 10⁶/100 μ l の無血清培養液に懸濁した細胞を入れ、以下の条件でエレクトロポレーションを行った。

Poring Pulse :

Voltage: 175V、Width: 5 ms、Interval: 50 ms、Time: 2, Danping rate: 10%

Transfer Pulse :

Voltage: 20V、Width: 50 ms、Interval: 50 ms、Time: \pm 5, Danping rate: 40%

pCMV-EGFP を用いた評価法で 67% のトランスフェクション効率、95% 以上の生存率であることを確かめた。

トランスフェクションした細胞は計数した後、 2.0×10^4 cells/well で 96 well プレートに播種し、6 日間培養した。培養後、上記の方法で細胞を計数した。

1 8 . 免疫組織化学

下垂体及び乳腺における Mx1 の分布を観察するため、Mx1 の N 末端を認識する特異抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。

1 8 — 1 . 標本の作製

C57BL/6 と MSM/Ms マウスの下垂体及び各時期のラット乳腺組織を 4% PFA で 4°C 一晩固定した後、エタノール・キシレン系列で脱水し、パラフィンに包埋した。包埋したサンプルをミクロトームで 4 μ m の厚さに薄切し、スライドグラス上で乾燥した後、キシレン・エタノール系列で再水和した。スライドグラスは EDTA 溶液 (1 mM, pH 8.0) に浸し、圧力なべで 2 分間抗原を賦活化し、免疫染色に供した。

1 8 — 2 . 免疫組織化学染色

組織標本をまず、2.5% normal horse serum で室温 1 時間ブロッキングした。PBS で洗浄した後、一次抗体 anti-MxA goat polyclonal antibody (1:200) を加え、4°C で一晩静置した。二次抗体は Immpress reagent anti-goat IgG POD kit を用いた。PBS で洗浄した後、二次抗体を加え、2 時間室温で静置した後、DAB substrate を用いて発色反応を行った。対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。

1 9 . ウエスタンブロッティング

ラット乳腺における GnRH 受容体蛋白質の発現を SDS-PAGE とウエスタンブロット法で解析した。

1 9 — 1 . 試薬の調整

SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティングに使用した試薬を次の様に調整した。

(a) 30% Acrylamide/Bis

- 29.2% Acrylamide (Bio-Rad)
- 0.8% N,N'-Methylene-bis-acrylamide (Bio-Rad)

(b) 1.5M Tris-HCl pH8.8

(c) 0.25M Tris-HCl pH6.8

(d) 10% SDS (Bio-Rad)

(e) Sample Buffer

- 0.25M Tris-HCl 2.0 ml
- Glycerol 0.8 ml
- 10% SDS 3.2 ml
- 2-Mercaptoethanol (Bio-Rad) 0.4 ml
- 0.05% BPB 0.2 ml
- Distilled Water 3.4 ml

(f) Electrophoresis Buffer (使用時に 5 倍希釈)

- 1.5% Tris
- 7.2% Glycine
- 0.5% SDS

(g) Blotting Buffer

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycine
- 20% Methanol

1 9 — 2 . SDS-PAGE

乳腺組織をサンプルバッファー内でホモジナイズし、超音波破碎した。細胞溶解液を 95°C で 5 分間煮沸し、次に 14,000rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を泳動用サンプルとした。

SDS-PAGE に使用したポリアクリルアミドゲルを次の様に調整した。

(a) separating gel (10%)

- 375 mM Tris-HCl
- 0.1% SDS
- 10% Acrylamide/Bis

(b) stacking gel (4%)

- 62.5 mM Tris-HCl
- 0.1% SDS
- 4% Acrylamide/Bis

これらの試薬を混合した後、15 分間脱気し、0.05% APS、0.1% TEMED を加えて重合した。

各サンプルを 20 μ l/well で添加し、20mA で電気泳動した。

1 9 — 3 . ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 終了後のゲルを、ブロッティングバッファーに浸し、30 分攪拌した。同時に濾紙、PVDF 膜 (Immuno-Blot™ PVDF Membrane, BIO-RAD) をゲルとは別の容器で、同様に 30 分間ブロッティングバッファーに浸した。ゲルに展開されたタンパク質を転写装置 (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories, Inc.) を用いて 30V、一晩 PVDF 膜に転写した。

転写後、PBS-T (0.1% Tween 20、0.01M PBS) で洗浄し、5%スキムミルクに浸して、室温で 1 時間震盪した。一次抗体 Anti-LH-RH receptor mouse monoclonal antibody (1:200) あるいは Anti- β -actin monoclonal antibody (1:5,000) に浸して、4°Cで一晩反応させた。反応後、PBS-T で洗浄し、二次抗体 Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG (1:20,000) に浸して、室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS-T で洗浄し、ECL Plus Western Blotting Detection System を膜上に満遍なく載せて、室温で 5 分間静置した後、X 線フィルムへ 5 分間露光させた。

2 0 . 統計解析

本研究において得られた各群の測定値は、平均値及び標準誤差を算出し、平均値の有意差を検定した。2 群間の平均値の比較には Student's *t*-test、多重比較には分散分析の後、Tukey-Kramer test を用いて検定した。P<0.05 をもって有意な差があると判定した。

Ⅲ．結果

1．下垂体ゴナドトロフにおける IFN α 及び IFN α 受容体の発現

下垂体に IFN α の発現していること、IFN α がゴナドトロピン分泌に影響することから、下垂体局所で IFN α の作用することが容易に推定される。本研究ではまず、下垂体ゴナドトロフにおける IFN α の自己分泌あるいは傍分泌調節機序を想定し、IFN α 及び IFN α 受容体遺伝子の発現を調べた。リアルタイム PCR によって L β T2 細胞で IFN α の発現していることが明らかになり、GnRH α 、IFN α 、高カリウム刺激、あるいは db-cAMP 刺激によって IFN α 発現が増加し、特に db-cAMP によって有意に増加することが明らかになった (Fig. 2-1-A)。

IFN α 受容体の有無を PCR 法で調べると、マウス下垂体、L β T2 細胞の両方で IFN α 受容体の発現を示すバンドが検出された (Fig. 2-1-B)。

2．L β T2 細胞の LH 分泌及び LH β mRNA 発現に対する IFN α の作用

IFN α の LH 合成と分泌に対する作用を検討した。GnRH α は用量依存的に LH 分泌及び LH β mRNA 発現を促進した (Fig. 2-2-A,B,C,D)。この時、IFN α を同時に投与すると、6 時間で GnRH α による LH 分泌作用を抑制し (Fig. 2-2-A)、この作用は 24 時間後には消失した (Fig. 2-2-B)。LH β mRNA 発現に対しても有意な差

は無いものの、IFN α が6時間で抑制する傾向を示した(Fig. 2-2-C)。

3. L β T2 細胞の増殖に対する IFN α の作用

IFN α がゴナドトロフの増殖に影響するか否かを検討するために、L β T2 細胞に IFN α を投与し、24 時間後に細胞を計数した。細胞数は IFN α の用量依存的に減少し、500、1,000 IU/ml でその差は有意となった (Fig. 2-3-A)。

以前の研究で、GnRH α による L β T2 細胞の増殖抑制作用が Mx1 を介していることが明らかにされている。そこで次に、IFN α による細胞増殖抑制作用が Mx1 と関連しているのか否かを検討するために、RNA 干渉法で Mx1 mRNA をノックダウンした。コントロール siRNA を導入した場合、IFN α によって細胞増殖は有意に抑制されるが、Mx1 mRNA をノックダウンすると、IFN α による増殖抑制作用が阻止された (Fig. 2-3-B)。

4. L β T2 細胞における Mx1 転写産物

L β T2 細胞で Mx1 に細胞増殖抑制活性のあることが示された。一方、一般的な実験動物の Mx1 遺伝子は欠損のある偽遺伝子である。そこで、次に、3' RACE 法で Mx1 転写産物を詳しく解析した。

L β T2 細胞の 3' RACE 解析によって 5 つの転写産物 (product 1-5) が検出された (Fig. 2-4)。それぞれの DNA 配列を解析したところ、これらの産物がエクソン IX から XI までが欠損している C57BL/6 マウスの Mx1 遺伝子 (NC_000082.6) に由来するバリエーションであ

ることが明らかになった。この遺伝子の最も大きな産物 (product 1) はエクソン II から VIII、XII、XIII で構成されており (Fig. 2-5)、多くの実験動物マウスで偽遺伝子型として知られている BALB/c マウスの Mx1 遺伝子 (M21039.1) に一致していた [95]。product 2 から 4 はエクソン V から VIII が様々に欠損したスプライシングバリエーションであることが明らかになった (Fig. 2-5)。product 2 と 3 に見られる欠損パターンはそれぞれ EU638328.1 (L929 細胞株)、NR_003520.1 (C57BL/6) として報告されていた。これら 4 つの転写産物はエクソン XIII にポリアデニレーション (PolyA) サイトが存在する。product 1 及び 2 はそれぞれ 309、288 アミノ酸残基のポリペプチドに翻訳されるオープンリーディングフレーム (ORF) を形成する一方で、product 3 と 4 にはストップコドンが認められなかった (Fig. 2-5)。

最も小さい産物 (product 5) はエクソンの II、III 及びイントロン 3 の一部で構成されていた。ストップコドンと PolyA サイトがイントロン 3 内に存在し、この mRNA からは 285 塩基の新たな ORF が形成され、94 アミノ酸残基のペプチドに翻訳されることが示唆された。IFN α の投与により 5 つの産物の中でも特に product 5 の発現が増加した (Fig2-4)。

野生型マウス種における完全な Mx1 遺伝子 (NM_010846.1) は 14 のエクソンからなる一方で、C57BL/6 マウスにおける Mx1 遺伝子はエクソン IX から XI にわたる領域が完全に欠損している (Fig. 2-5)。また、転写開始点に違いはないが、5'側の非翻訳領域であるエクソン I の長さが 179 塩基延長している (Fig. 2-5)。C57BL/6 のリファレンス RNA (NR_003520.1) としてデータベースに登録

されている配列はエクソンの VII と VIII の欠損した product 3 の転写産物と同じ配列であったが、RT-PCR によって C57BL/6 における主要な Mx1 転写産物が product 1 であることを確かめている。エクソン IX から XI の欠損をもつ 4 つの Mx1 転写産物をそれぞれ Pseudo Mx1-1 から 4 と表記した。これらの 4 つのバリエントをまとめて表す場合は、以後 Pseudo Mx1 と表記した。product 5 は、最終エクソンがエクソン III とイントロン 3 の一部で構成される複合エクソン (composite exon) であるため、Composite Mx1 と表記した。

5. 野生型マウス種及び実験動物マウス下垂体における Composite Mx1 発現と Mx1 の分布

下垂体組織に Composite Mx1 が発現しているか否かを調べるために、野生型マウス種 MSM/Ms と C57BL/6 及び L β T2 から調整した cDNA を使って、Composite Mx1 特異的プライマーを用いた RT-PCR を行った。MSM/Ms、C57BL/6 及び L β T2 の全てで Composite Mx1 の発現を示すバンドが検出された (Fig. 2-6-A)。Fig. 2-5 で観察された転写産物の ORF から翻訳される蛋白質は、GTPase domain、Central domain、GED の 3 つのドメインのうち、GTPase domain のみを残した配列である (Fig. 2-6-B)。特に Composite Mx1 は、N 末端側に 1 つの GTP 結合部位を含む短いペプチドになることが示唆される。

次に Pseudogene に由来する Mx1 蛋白質をまとめて検出する Mx1 の N 末端配列を認識するペプチド抗体を用いて、MSM/Ms 及

び C57BL/6 下垂体の Mx1 免疫組織化学染色を行った。両方のマウス種において、Mx1 は多くの下垂体細胞に分布していることが示されたが、MSM/Ms では、多くの細胞の核内に陽性反応が認められた一方で、C57BL/6 の核内にはほとんど認められなかった (Fig. 2-7-A,B)。

6. Pseudo Mx1 と Composite Mx1 の発現に対する IFN α の作用

Pseudo Mx1 と Composite Mx1 の発現に対する IFN α の作用を調べるために、まず、C57BL/6 マウスに IFN α を投与し、それぞれの発現をリアルタイム RT-PCR で調べた。投与 1 時間後の下垂体、胸腺、肺、脾臓の Mx1 発現を調べると、Pseudo Mx1 と Composite Mx1 mRNA レベルは下垂体、肺、脾臓で同程度に増加した (Fig. 8-A,B)。一方で、胸腺の Pseudo Mx1 と Composite Mx1 mRNA レベルには共に変化が認められなかった。

次に、IFN α を L β T2 細胞に投与すると、投与 3 時間で Pseudo Mx1 と Composite Mx1 mRNA レベルは用量依存的に増加したが、Pseudo Mx1 の増加割合の大きいことが明らかになった (Fig. 9A)。そこで、mRNA 発現動態を投与 24 時間後まで経時的に観察すると、IFN α は Pseudo Mx1 と Composite Mx1 mRNA を共に急速に増加させることが明らかになった (Fig. 2-9-B)。しかし、Pseudo Mx1 mRNA が 24 時間まで高いレベルを維持したのに対し、Composite Mx1 mRNA は投与 3 時間で減少した。

7. Pseudo Mx1 と Composite Mx1 の発現に対する GnRH α の作用

下垂体ゴナドトロフの Mx1 発現に対する GnRH の作用を検討するために、まず、卵巣を摘出し下垂体 Mx1 遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で調べた。卵巣を摘出すると、下垂体の Pseudo Mx1 mRNA レベルは顕著に増加した一方で、Composite Mx1 mRNA レベルに変化は認められなかった (Fig. 2-10-A,B)。GnRH α を L β T2 細胞に投与すると、IFN α とは異なり、Pseudo Mx1 mRNA のみが一過性に増加し、Composite Mx1 mRNA レベルはほとんど変化しなかった (Fig. 2-10-C)。

8 . Composite Mx1 による細胞増殖の抑制作用

Mx1 の細胞増殖抑制作用にバリエーションが関わるのか否かを検討するため、発現ベクターを構築し、L β T2 細胞に導入した。Pseudo Mx1-1、Composite Mx1 それぞれの発現ベクターを形質転換すると、空ベクターを形質転換した細胞と比較して、細胞増殖は顕著に抑制され、特に Composite Mx1 を形質転換した細胞でより顕著だった (Fig. 2-11)。

9 . 動物種間における Mx1 アミノ酸配列の比較

ラット (NC_005110.3)、ヒト (NC_000021.8)、アカゲザル (NC_007860.1)、ブタ (NC_010455.4)、ヒツジ (NC_019458.1)、ウシ (AC_000158.1)、ニワトリ (NC_006088.3) のゲノム配列を調べると、調べた全ての動物種において、イントロン 3 上のスト

ップコドンを利用した ORF の形成され得ることが明らかになった。翻訳されるアミノ酸配列を比較すると、エクソン 2 およびイントロン 3 に由来する領域にはほとんど相同性が認められなかったが、エクソン 3 に由来する 55 アミノ酸領域は哺乳類間で相同性が特に高く、その内 53 アミノ酸残基は 100% 配列が一致した (Fig. 2-12)。

各動物種の完全長 Mx1 蛋白質の相同性を比較すると、エクソン 3 に由来する 55 アミノ酸は Mx1 分子の中でも特に保存されていることが明らかになった (Fig. 2-13)。

10. ラット退縮期乳腺における Mx1 の発現動態

以上の本研究の結果から、GnRH によっても合成の促進される Mx1 がゴナドトロフの増殖に関与することが示された。以前の研究で、離乳後の乳腺退縮に乳腺局所で産生される GnRH の関与することが明らかにされている [78]。そこで、この時の Mx1 の発現動態を調べると、GnRH が離乳後翌日から顕著に増加し、Mx1 発現がそれに遅れて増加することが明らかになった (Fig. 2-15-A,B)。発現のピークである離乳後 3 日目の乳腺組織の Mx1 免疫組織化学染色を行うと、離乳直後の乳腺と比較して一部の細胞核に、明らかな Mx1 の増加が認められた (Fig. 2-15-C)。一方、乳腺における GnRH 受容体 mRNA の発現量は極めて低かった。そこで、RT-PCR を用い、GnRH 受容体の転写を検討すると、強制離乳後 2 日目の乳腺で明らかな増加が認められた (Fig. 2-16-A)。さらに、ウエスタンブロッティングによって GnRH 受容体蛋白質量を調べると、

離乳後に増加することが明らかになった (Fig. 2-16-B)。

IV. 考察

IFN α は、抗ウイルス増殖活性、抗細胞増殖活性、免疫修飾活性を示すサイトカインである[7, 36]。数百に及ぶ IFN 誘導性遺伝子 (ISGs) の中で、Mx1 は、代表的な抗ウイルス遺伝子の 1 つであり、インフルエンザウイルスに対する抵抗性に直接関わることを示されている[84]。獣医生理学研究室では、ゴナドトロフ由来株化細胞である L β T2 に GnRH 作動薬 (GnRH α) を持続的に投与すると、細胞の増殖が抑制されること、この細胞増殖抑制作用に Mx1 遺伝子の発現が関わっていることを明らかにした。この結果は、IFN α がウイルス感染の有無に関わらず、ゴナドトロフの増殖に影響し得る可能性を示唆している。

IFN 産生機構は、ほぼ全ての体細胞に備わっており、核酸、脂質、LPS、蛋白質など様々な刺激に応じて産生され、自己分泌、傍分泌的な調節に関与する[7]。ヒト下垂体前葉の免疫組織化学染色で抗 IFN に強く染まる細胞があることも報告されている[45]。そこでまず、ゴナドトロフに IFN α と IFN 受容体が発現していることを調べると、L β T2 細胞において、高カリウム負荷や db-cAMP 投与によって、細胞内セカンドメッセンジャーである Ca²⁺や cAMP 増加をもたらすことで IFN α の誘導されること、マウス下垂体前葉と L β T2 細胞の両方で受容体の発現していることを確認できた。ゴナドトロフ株化細胞で IFN α と IFN 受容体両方を確認できたこと、また生理的な刺激によって IFN α 合成の増加したことから、IFN α の自己分泌による調節機序の存在することが考えられた。

L β T2 細胞に IFN α を投与すると、LH 分泌と細胞増殖が抑制され

た。IFN α がゴナドトロフの増殖を抑制したという報告はなく、この作用が RNA 干渉法で Mx1 発現を抑制することで消失することも明らかになった。これらの本研究の結果から、ゴナドトロフで産生される IFN α が自己分泌、傍分泌的に作用し、ホルモン分泌や細胞増殖を調節していることが示唆された。ゴナドトロフは、性周期と共に増殖とアポトーシスを繰り返すことが示されており [13]、GnRH と共に様々な増殖調節因子の影響下にあることが示唆された。

IFN α の増殖抑制作用は他の細胞種でも報告があり、ウイルス抵抗性遺伝子である Mx1 の細胞増殖抑制への関与は大変興味深い。しかし、一般的な実験動物マウス系統の Mx1 は、ゲノム DNA に部分的な欠失があり、そのため、ウイルス抵抗性を示さない偽遺伝子であるとされている [1, 95]。L β T2 細胞は C57BL/6 と BALB/c の F1 から樹立された細胞であり、これらの系統は、A2G や MSM/Ms などの野生型マウス種のような正常な Mx1 をもたない。野生型マウス種がインフルエンザウイルス感染に抵抗性を示す一方で、Mx1 の部分的欠失は、インフルエンザウイルスに対する易感染性をもたらす。本研究では、L β T2 細胞の Mx1 偽遺伝子から少なくとも 5 つの転写産物の産生されることが明らかになった。翻訳領域の一部に欠損があるにも関わらず、複数の Mx1 mRNA バリエントの転写されることが示された。

また、IFN α 投与後に 3'RACE をすることで、Mx1 バリエントの転写が、IFN α によって促進されることが明らかとなった。5 つの転写産物の配列解析から、Pseudo Mx1-2 から 4 がエクソンの V から VIII の選択的欠損に由来するバリエントである一方で、IFN α に

よってもっとも発現の増加した Composite Mx1 は全く異なる機序で産生されており、エクソン II 及びエクソン III とイントロン 3 からなる複合エクソンから構成される mRNA であることが明らかになった。興味深いことに、この配列は、イントロン 3 内の終止コドンまでで新たなオープンリーディングフレーム (ORF) を形成し、ポリ A 付加部位もイントロン 3 内にあることが分かった。この Composite 型転写産物から 94 アミノ酸残基のペプチドの翻訳されることが示唆された。Composite 型転写産物は、野生型マウス種 MSM/Ms の下垂体でも発現の認められたことから、少なくとも Mx1 の欠失部分の有無に関わらず、生理的な条件下で合成されることが示唆された。

本研究の結果は、たとえ、欠失により抗ウイルス活性が消失していても、Mx1 の転写バリエーションに機能のあることを示している。正常な Mx1 蛋白質は N 末端側に 3 つの GTP 結合部位を含む GTPase domain、C 末端側にホモ多量体形成に関わる GTPase effector domain (GED) を有する [50, 106]。本研究で認められた転写産物の ORF は、どれも N 末端側の GTPase domain のみが残されたペプチドになり、Composite Mx1 は GTP 結合部位一つを有するに過ぎない。過去の研究によると、Mx1 蛋白質の GTPase 活性化には GED の分子内バックフォールディングが必要であることが示唆されており [35, 91]、本研究結果は GTPase 活性化とは異なる作用機序、あるいは Mx1 の GTPase 活性に関わる細胞内共役因子の存在を示唆している。更に、Composite Mx1 はそれ自体に GTPase 活性部位が無いので、全く異なった作用機序を有するものと考えられた。

マウス Mx1 蛋白質は、C 末端側にある核局在シグナルによって核内に分布すると報告されている [28]。C57BL/6J と MSM/Ms マウスの下垂体前葉における Mx1 の分布を調べると、予想した通り、C57BL/6J マウスに比べて MSM/Ms マウスで Mx1 の核内の免疫陽性反応が強かった。Composite Mx1 を含む Mx1 偽遺伝子に由来する蛋白質は、細胞質内で機能することが示唆された。

短時間の IFN α 投与が、様々な組織で、Pseudo Mx1 と Composite Mx1 の発現を同程度に促進することが明らかになった。Mx1 のエクソン III、イントロン 3 間のスプライシング回避が常に一定の割合で起きるのか、それとも Composite Mx1 の産生を調節する機構が存在するのか興味深い。マウス下垂体の Mx1 発現に対する卵巢摘出の影響を調べたところ、GnRH 分泌の亢進していると考えられる卵巢摘出マウスでは、Pseudo Mx1 のみの増加することが明らかになった。更に、L β T2 細胞に GnRH α を作用させると、Pseudo Mx1 発現の増加が明らかに優勢であった。このことは、GnRH 受容体下流シグナルによる Mx1 の誘導に選択性のあることを示唆している。一方で、IFN α を L β T2 細胞に作用させると、Composite Mx1 の発現を一過性に増加させた。これらの結果は、少なくとも IFN α と GnRH の Mx1 転写に対する細胞内シグナルがクロストークすることを示す一方で、異なるスプライセオソームの利用を促進する機序の存在を示唆している。

発現ベクターを用いて、細胞内で Mx1 バリエントを増加させると、Pseudo Mx1 と Composite Mx1 のどちらも細胞の増殖を抑制することが明らかになった。特に Composite Mx1 には強力な増殖抑制作用が認められ、このことから、Mx1 蛋白質の N 末端側の非常

に限られた領域だけで十分に細胞増殖抑制作用を発揮することが明らかになった。

参照可能な動物種のゲノム配列を調べたところ、全ての動物でイントロン内に ORF の伸長できることが分かり、様々な動物にわたってこの Composite エクソンを利用した ORF の発現している可能性が示された。動物種間でアミノ酸配列を比較すると、マウス Mx1 のエクソン III に相当する領域は非常によく保存されている一方で、続くイントロン内に ORF が延長した領域には相同性のないことが明らかになった。このことは、高い保存性を持つエクソン III の配列を特に残して発現するための機序としてイントロン 3 が利用されることを示唆している。

データベース上の解析で、ヒトでは、およそ 20% の遺伝子に少なくとも 1 つ以上のイントロン上 Poly A 付加配列の存在することが報告されている [102]。このうちのほとんどの配列は新たな翻訳領域を形成し、別の蛋白質を産生し得るにも関わらず、イントロン内の配列には種間の相同性がほとんど認められない。イントロン領域が保存されていなくとも、選択的なプロセシングが誘導されると考えられる。興味深いことに、マウス Mx1 のエクソン III に由来する領域は Mx1 蛋白質全体の配列の中でも特に高度に保存された領域であることが示され、この領域が生理的に重要な役割をもつことが示唆された。

本研究の結果は、Mx1 の新規バリエーションを明らかにしたばかりでなく、GnRH による Mx1 を介した作用の存在を示した。そこで、当研究室によって GnRH の関与が示されている泌乳後乳腺の退縮過程で、Mx1 の変動があるのか、未だ存在が疑問視されている乳

腺の GnRH 受容体と併せて検討した。すると離乳後乳腺に GnRH 受容体が急激に誘導されること、それに伴って Mx1 の発現も亢進することが明らかになった。これはラットを用いた結果であり、Mx1 が主に核内に認められたことなど、マウスで得られた知見をすぐに敷衍することは出来ないが、生理的に GnRH-Mx1 系が機能する証拠と考えられた。

以上のごとく本研究では、まず IFN α が Mx1 遺伝子発現を介してゴナドトロフの増殖を抑制すること、IFN α と GnRH のゴナドトロフ細胞内シグナルが一部クロストークすることが明らかとなった。さらに、Composite Mx1 mRNA の存在を明らかにし、その産生には IFN α で優先的に調節される特異的な機序のあることが明らかになった (Fig. 2-14)。一方で、ラット乳腺での観察結果から、GnRH-Mx1 系が生理的機序として機能していることが示唆された。

ゲノム配列の解析により、Mx1 の Composite エクソンは様々な動物種で産生され得ることを明らかにし、この配列は Mx1 蛋白質の中でも特に遺伝的保存性の高い領域を残し、強い細胞増殖抑制活性のあることを明らかにした。Composite エクソンを含む Mx1 のウイルス感染に因らない新規生理機能の存在が示唆された。

V. 要約

本章では、IFN α を用い、ゴナドトロフにおける作用及びその作用と Mx1 発現との関連を明らかにした。次いで、発現している偽遺伝子型 Mx1 分子の詳細、GnRH と IFN α による Mx1 の発現調節機序を調べ、ゴナドトロフの増殖調節に関わる候補分子として、偽遺伝子型 Mx1 に由来する転写バリエーションの存在を明らかにした。

まず、下垂体および L β T2 に IFN α とその受容体の発現していること、生理的な刺激によって IFN α 合成の増加することを明らかにした。更に、L β T2 細胞に IFN α を投与すると、LH 分泌と細胞増殖が抑制された。これらの結果から、ゴナドトロフで産生される IFN α が自己分泌、傍分泌的に作用し、ホルモン分泌や細胞増殖を調節していることが示された。また、この細胞増殖抑制作用が RNA 干渉法で Mx1 発現を抑制することで消失することも明らかにした。このことから、IFN α と GnRH のシグナルトランスダクションがゴナドトロフ内でクロストークすること、少なくとも Mx1 の発現によってゴナドトロフの増殖の抑制されることが明らかになった。

L β T2 細胞を用いて Mx1 の転写産物を調べたところ、少なくとも 5 つの転写産物の産生されることが明らかになった。ゲノムの欠失を反映した転写産物（偽遺伝子型 Mx1、Pseudo Mx1）と 3 つのスプライシングバリエーションの他に、エクソン II、III からイント

ロン 3 内に延長した新たなオープンリーディングフレーム (ORF) を形成する転写産物 (コンポジット型 Mx1、Composite Mx1) の発現していることが明らかになった。Composite Mx1 mRNA は完全長 Mx1 遺伝子をもつ野生型マウス種 MSM/Ms の下垂体にも発現していることが明らかになり、普遍的な選択的転写後修飾機序の存在することが明らかになった。

MSM/Ms マウスにおける下垂体細胞の Mx1 は主に核内に分布する一方で、C57BL/6J マウスの細胞核にはあまり分布していないことが明らかになり、Composite Mx1 を含む Mx1 偽遺伝子に由来する蛋白質は、細胞質内で機能することが示唆された。

更に、IFN α はマウス組織の Pseudo Mx1 および Composite Mx1 発現を増加させること、Composite Mx1 の発現は一過性であること、GnRH は Pseudo Mx1 の発現をより強く誘導することを明らかにした。IFN α が選択的に促進する Mx1 の転写後修飾機序の存在することが示唆された。

偽遺伝子型と Composite 型の Mx1 発現ベクターを L β T2 細胞に導入すると、特に Composite Mx1 で細胞数を減少させたことから、Composite Mx1 に細胞増殖抑制活性のあることが明らかになった。

データベース解析によってヒト、ラット、ウシ、ブタ、ヒツジ、サル全てで Composite Mx1 mRNA が形成され得ること、エクソン III 部分に由来する 55 アミノ酸領域は保存性が高く、53 アミノ酸残基は種間で 100% 相同だった。

ラット乳腺での観察結果から、GnRH-Mx1 系が生理的機序として機能していることが示唆された。

以上の如く、細胞増殖調節に関わる新規の細胞内生理活性分子として、Mx1 の特に遺伝的保存性の高い領域からなるペプチドを発現させる Composite Mx1 の存在が明らかになった。

Table. 2-1 3' RACE用プライマー配列

3' RACE for Mx1	Primer (5'-3')
adaptor-oligo (dT) ₃₀	AAGAATTCGCGCCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAGG-AATTC-(dT) ₃₀ VN
1 st PCR	Forward: CCCCAGTGGCAAGGCTTCCAGATTCTTC Reverse: AAGAATTCGCGCCTCTGAAGGTTCCAGAATCG
Nested PCR	Forward: CCAACTGGAATCCTCCTGGAAAACATACA Reverse: CCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAGGAATTC

Table. 2-2 RT-PCR用プライマー配列

Gene	Primer (5'-3')
mouse IFNAR1	Forward: GGCACAGTGGCTTCCTGGCT Reverse: GCAAGGTGTCACTCATGGCGG
mouse Composite Mx1	Forward: GAGGAGAGCCAGACAATGGA Reverse: CTGGGAAGGGACCTGTTTCT
rat GnRH-R exon 1	Forward: CCGTCCTTGGAGAAATATGG Reverse: AGCGGCATGACGATTAGAGT
rat GnRH-R exon 2	Forward: TCTTCAGGATGATCTACCTAGCC Reverse: CCTGATGAAGGACTCGTGTG
rat GnRH-R exon 3	Forward: CCAAGAATAATATCCCAAGAGCA Reverse: TCCCGTATATGGGTTTCAGC
rat RPL19	Forward: CTGATCAAGGATGGGCTGAT Reverse: TTCAGCTTGTGGATGTGCTC

Table. 2-3 リアルタイムRT-PCR用プライマー配列

Gene	Primer (5'-3')
mouse IFN α	Forward: CCTGAGAA/GAGAAGAAACACAGCC Reverse: GGCTCTCCAGAC/TTTCTGCTCTG
mouse LH β	Forward: GTCTGCATCACCTTCACCAC Reverse: GTAGGTGCACACTGGCTGAG
mouse Pseudo Mx1	Forward: CTGTGCTGGAAGCACTGTCT Reverse: GCCTCTCCACTCCTCTCCTT
mouse Composite Mx1	Forward: TGGAAGCACTGTCTGGAGTG Reverse: AACTGGGAAGGGACCTGTTT
rat GnRH	Forward: CTCAGGCCATCTTGGAGAAG Reverse: TCGGAGAGAAGTCTGGCAGT
rat Mx1	Forward: TGCGAAATGAGTTTCTTGCT Reverse: TCCATCTGGCTGTGTTTCTC
rat RPL19	Forward: CAGGAGATACCGGGAATCTAAG Reverse: TGCCTTCAGTTTGTGGATGTG

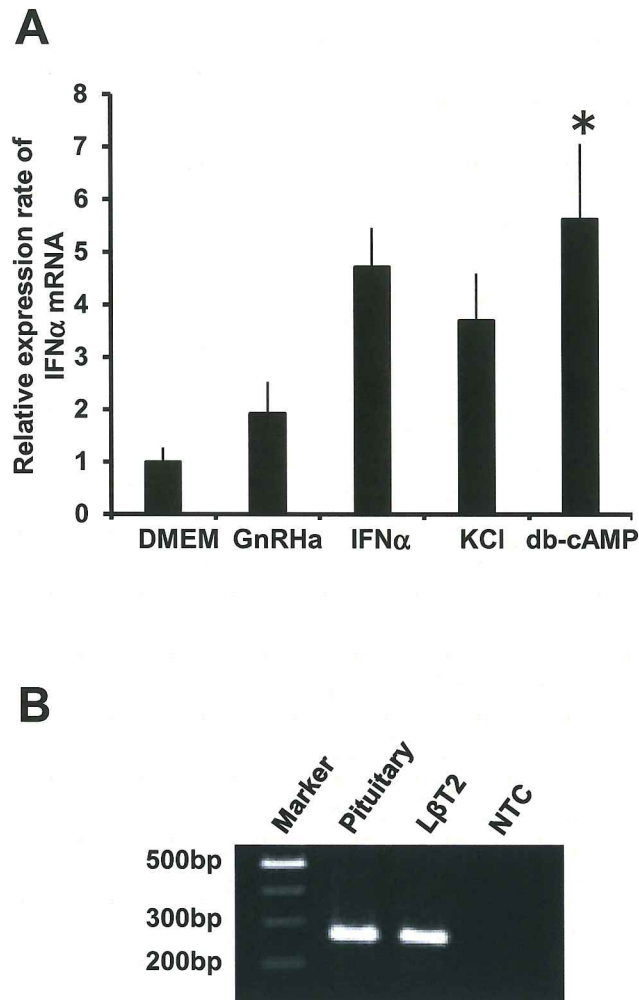


Fig. 2-1 ゴナドトロフにおけるIFNαおよびIFN受容体の発現

(A) LβT2細胞におけるIFNαの発現 LβT2細胞を24wellプレートに播種し、24時間培養後、GnRHa (10^{-7} M)、IFNα (500 IU/ml)、塩化カリウム (KCl, 50 mM)、db-cAMP (1 mM) を含む培養液に交換し、3時間後に総RNAを抽出した。IFNαの発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値+標準誤差で示し(n = 4)、DMEM群の発現量を1として変化率を示した。DMEM群との有意差 ($P < 0.05$) を*で示した。

(B) 下垂体ゴナドトロフにおけるIFN受容体の発現 マウス下垂体及びLβT2細胞から調整したcDNAを用い、IFNAR-1に特異的なプライマーでPCRを行った。NTC: No Template Control。

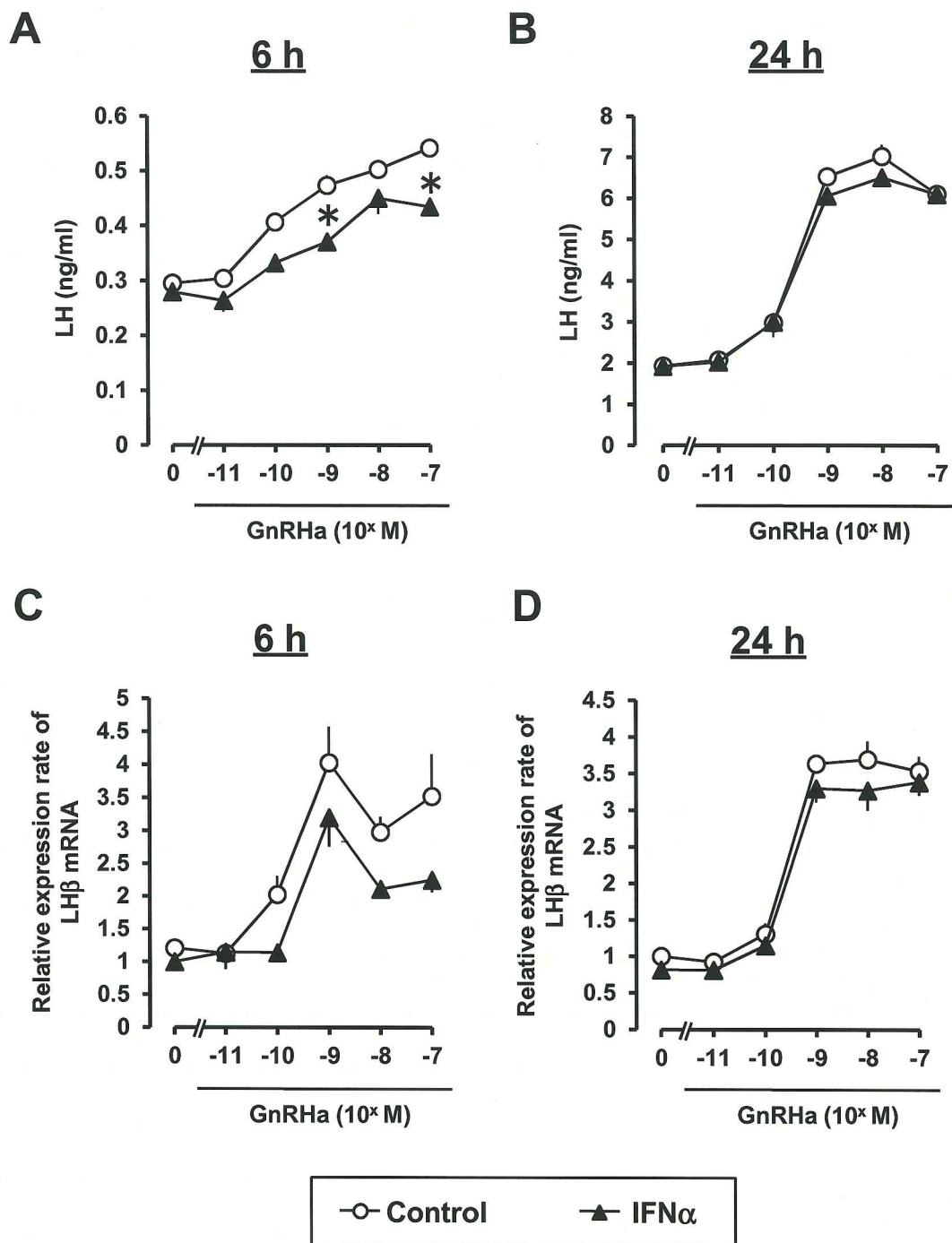


Fig. 2-2 LβT2細胞のLH分泌とLHβ mRNA発現に対するIFNαの作用
 LβT2細胞を24wellプレートに播種し、24時間培養後、IFNα (500 IU/ml)を含むあるいは含まないGnRHα (0、10⁻¹¹ - 10⁻⁷ M)培養液に交換した。6、24時間後に培養液を回収し、LH濃度の測定に供した(A、B)。培養液のLH濃度は、平均値±標準誤差で示し(n=4)、IFNα非投与(Control)群との有意差(P<0.05)を*で示した。細胞の総RNAを抽出し、LHβ mRNAの発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した(C、D)。値は、平均値±標準誤差(n=4)で示した。

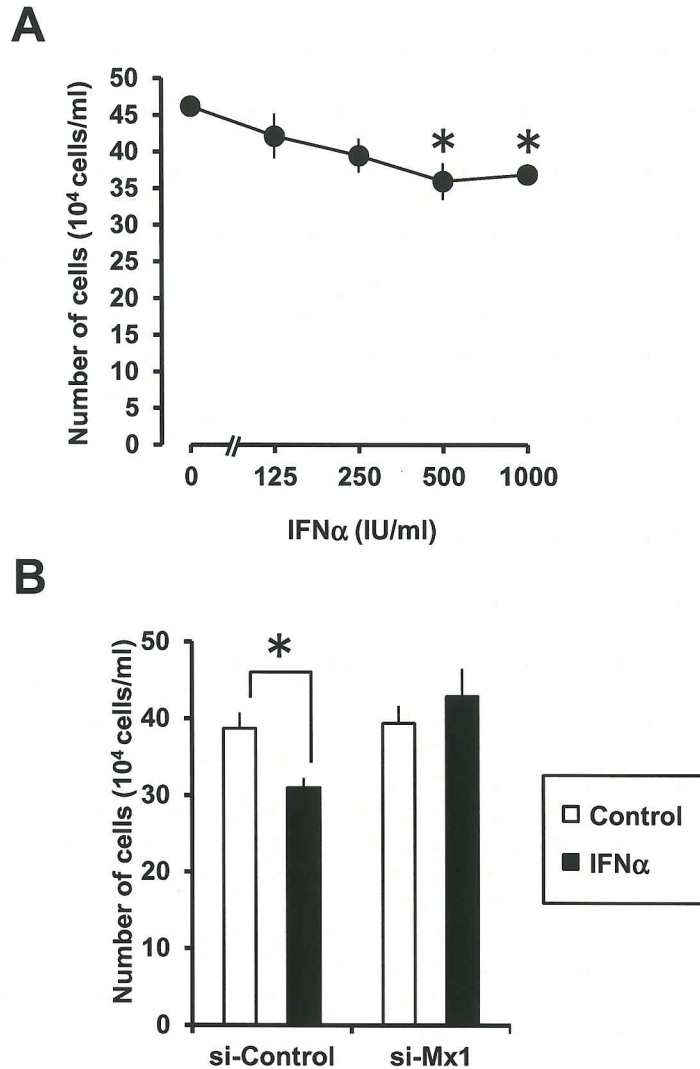


Fig. 2-3 L β T2細胞の増殖に対するIFN α の作用とMx1ノックダウンの影響

(A) IFN α によるL β T2細胞増殖の抑制作用 L β T2細胞を96wellプレートに播種し、24時間培養後、IFN α (0-1,000 IU/ml)を含む培養液に交換した。24時間後にトリプシンで細胞を分散し、細胞を計数した。値は、平均値+標準誤差で示し(n = 5)、IFN α 非投与(0 IU/ml)群との有意差(P < 0.05)を*で示した。

(B) Mx1ノックダウンによるIFN α の細胞増殖抑制作用の消失 L β T2細胞を96wellプレートに播種し、24時間培養後、Mx1特異的siRNAをトランスフェクションした。48時間培養後、IFN α (500 IU/ml)を含むあるいは不含の培養液に交換し、24時間後にトリプシンで細胞を単離し、細胞を計数した。値は、平均値+標準誤差で示し(n = 5)、IFN α 非投与(Control)群との有意差(P < 0.05)を*で示した。

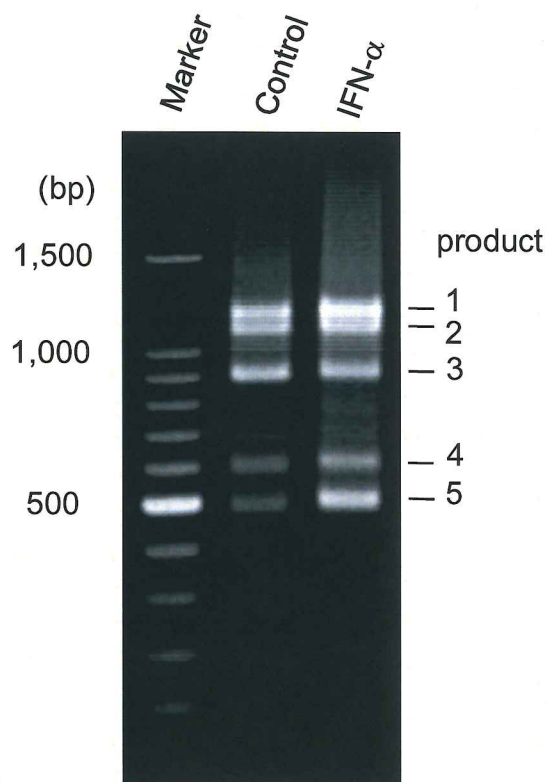


Fig. 2-4 3' RACEによるLβT2細胞のMx1転写産物の解析
 LβT2細胞を35 mmディッシュに播種し、24時間培養後、IFN α (500 IU/ml)を含むあるいは含まない培養液に交換し、3時間後に総RNAを抽出し、3' RACEに供した。1.2%アガロースゲル電気泳動像により、5つの増幅産物(product 1-5)が認められた。

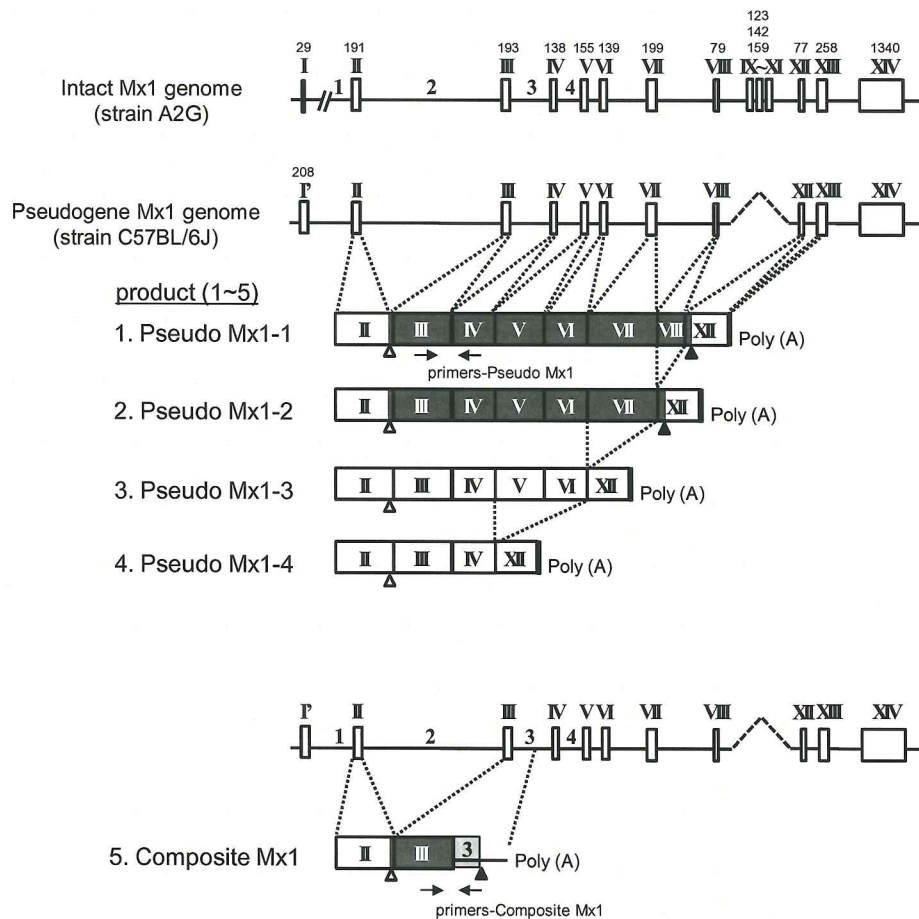
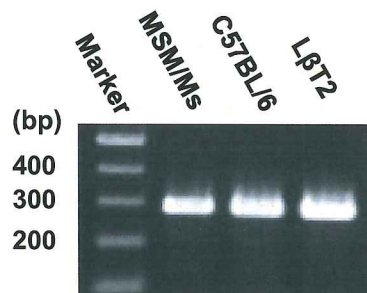


Fig. 2-5 マウスMx1ゲノムマップと β T2細胞に認められた5つの転写産物の配列の模式図
 3' RACEにより検出されたMx1転写産物を完全長Mx1ゲノム配列 (Intact Mx1 genome, NM_010846.1) あるいはMx1偽遺伝子型ゲノム配列 (Pseudogene Mx1 genome, NC_000082) にマッピングした。完全長のMx1遺伝子は14個のエクソン (I to XIV) から構成される。イントロンはアラビア数字 (1-4) で表記した。白矢頭、黒矢頭はそれぞれ、開始コドン、終止コドンの位置を示している。灰色に塗りつぶした領域はオープンリーディングフレームを示し、product 5のイントロン部分まで延長したオープンリーディングフレーム領域は薄い灰色で示した。以降のリアルタイムPCRに使用する2種類のプライマーの増幅範囲を矢印で示した。

A



B

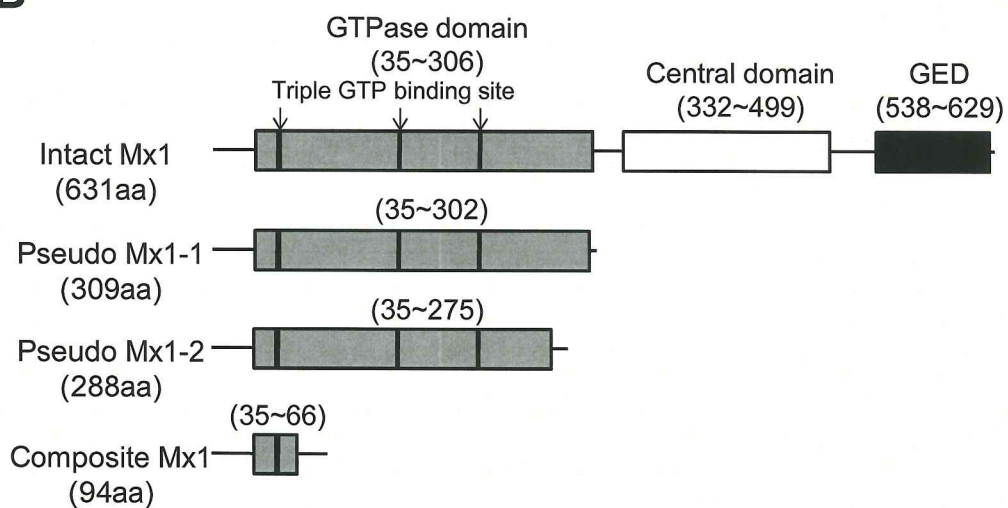
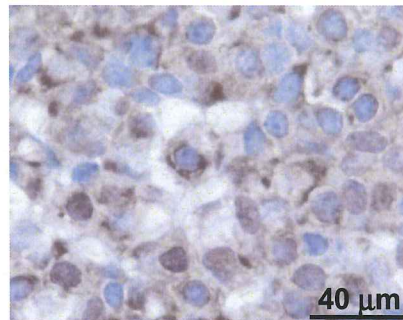


Fig. 2-6 (A)下垂体におけるComposite Mx1の発現
MSM/MsマウスあるいはC57BL/6マウス下垂体、LβT2細胞から作製したcDNAを用い、
Composite Mx1 mRNAに特異的なプライマーでPCRを行った。
(B)アミノ酸配列から推定されるMx1蛋白質モチーフ
完全長Mx1はGTPase domain、Central domain、GED (GTPase effector domain)の3つのドメインから構成される。

A



B

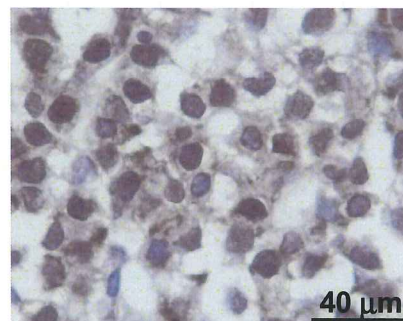


Fig. 2-7 免疫組織化学による下垂体におけるMx1の分布
C57BL/6マウス(A)あるいはMSM/Msマウス(B)下垂体をパラフィン包埋、薄切後、Mx1ペプチド抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。Mx1の分布は赤茶色で示される。ヘマトキシリンによる対比染色により核は青色に染色される。

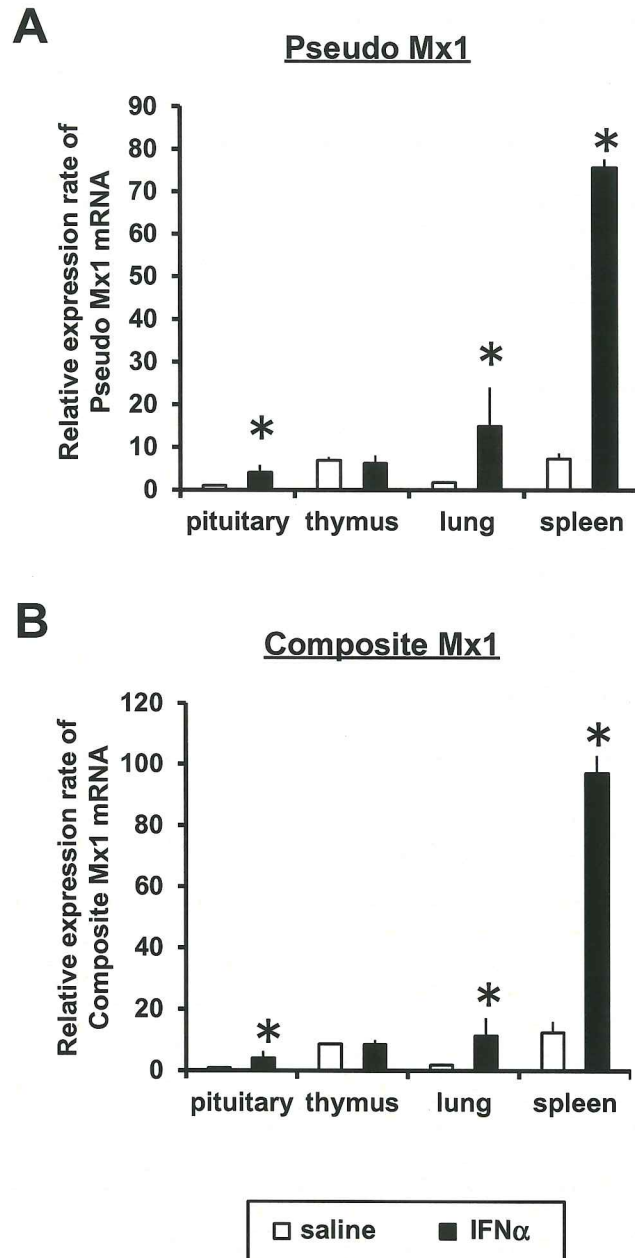
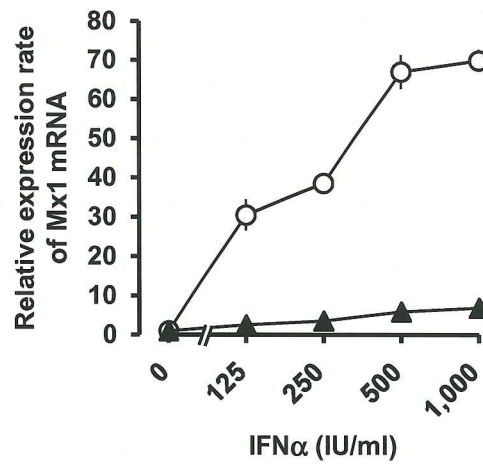
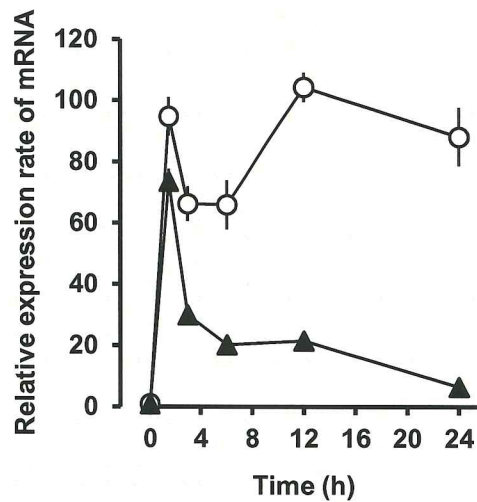


Fig. 2-8 IFN α 投与による各組織におけるMx1遺伝子発現の変化
C57BL/6マウスにIFN α (1,000 IU/50 μ l)あるいはsaline (50 μ l)を尾静脈投与し、1時間後、下垂体、胸腺、肺、脾臓から総RNAを抽出した。Pseudo Mx1 (A)あるいはComposite Mx1 (B)mRNAの発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値+標準誤差で示し(n = 5)、saline投与群下垂体の発現量を1として変化率を示し、saline投与群との有意差(P < 0.05)を*で示した。

A



B



—○— Pseudo Mx1 —▲— Composite Mx1

Fig. 2-9 L β T2細胞におけるIFN α によるMx1遺伝子発現に対する作用
L β T2細胞を24wellプレートに播種し、24時間培養後、IFN α (0-1,000 IU/ml)を含む培養液に交換し、3時間後(A)、あるいは、IFN α (500 IU/ml)を含む培養液に交換し、0、1.5、3、6、12、24時間後(B)に総RNAを抽出した。Pseudo Mx1あるいはComposite Mx1 mRNAの発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値 \pm 標準誤差で示した(n=4)。

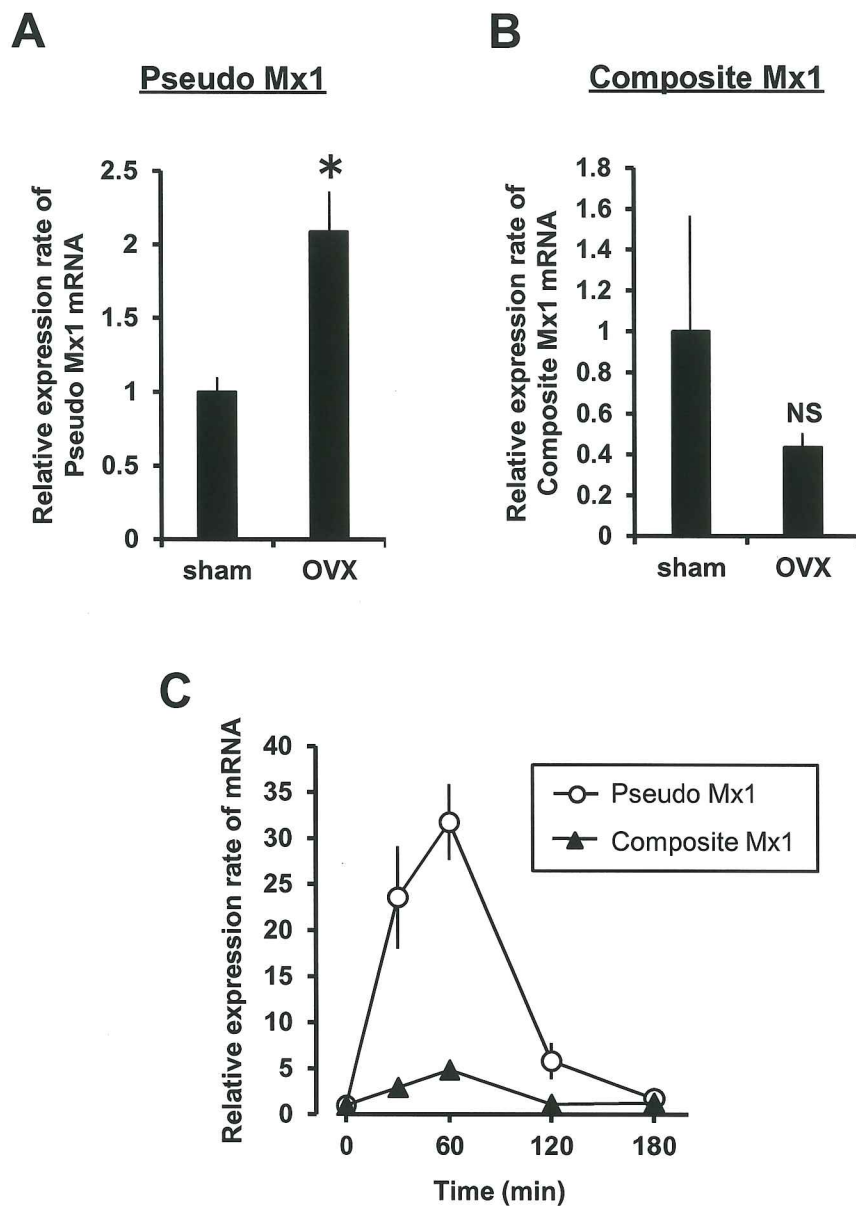


Fig. 2-10 Mx1遺伝子発現に対するGnRHの作用

(A、B) 卵巣摘出による下垂体Mx1遺伝子の変化 卵巣摘出(OVX)あるいは偽手術(sham)を施し、2週間後のC57BL/6マウス下垂体を採取し、総RNAを抽出した。Pseudo Mx1(A)あるいはComposite Mx1 (B) mRNAの発現量をリアルタイムRT-PCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値+標準誤差で示し(n=5)、偽手術群との有意差(P<0.05)を*で示した。NS: no significant difference

(C) GnRHαによるMx1遺伝子発現に対する作用 LβT2細胞を24wellプレートに播種し、24時間培養後、GnRHα (10⁻⁷ M)を含む培養液に交換し、0、30、60、120、180分後に総RNAを抽出した。Pseudo Mx1あるいはComposite Mx1 mRNAの発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値±標準誤差で示した(n=4)。

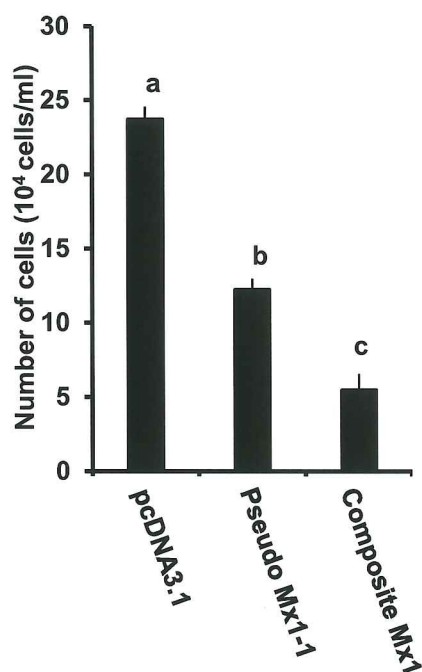


Fig. 2-11 Mx1バリエントによる細胞増殖に対する作用

Pseudo Mx1-1 (product 1, Fig. 2-2)あるいはComposite Mx1 (product 5, Fig. 2-2)のオープンリーディングフレームを挿入したpcDNA3.1発現ベクターを構築した。これらの2種類の発現ベクター及びコントロール用の空ベクターをエレクトロポレーションにより、L β T2細胞にトランスフェクションし、96wellプレートに播種し、6日間培養後、細胞を計数した。値は、平均値+標準誤差で示した(n = 5)。各群間における有意差(P < 0.05)は異なるアルファベットで示した。

Translated from exon II

[illegible]

Translated from exon III

Mouse	D	SVNNLCRHYE	EKVRPCIDLI	DTLRALGVEQ	DLALPAIAVI	GDQSSGKSSV	LEALSGVALP	RGS
Rat	E	SVNDLCSQYE	EKVRPCIDLI	DSLRALGVEQ	DLALPAIAVI	GDQSSGKSSV	LEALSGVALP	RGS
Human	V	AENNLCSQYE	EKVRPCIDLI	DSLRALGVEQ	DLALPAIAVI	GDQSSGKSSV	LEALSGVALP	RGS
Macaca	V	AENNLCSQYE	EKVRPCIDLI	DSLRALGVEQ	DLALPAIAVI	GDQSSGKSSV	LEALSGVALP	RGS
Pig	G	FENNLISQYE	EKVRPCIDLI	DSLRALGVEQ	DLALPAIAVI	GDQSSGKSSV	LEALSGVALP	RGS
Sheep	E	SKGNLSQYE	EKVRPCIDLI	DSLRALGVEQ	DLALPAIAVI	GDQSSGKSSV	LEALSGVALP	RGS
Cattle	E	SKSNLSQYE	EKVRPCIDLI	DSLRSLGVEQ	DLALPAIAVI	GDQSSGKSSV	LEALSGVALP	RGS
Fowl	A	AACSLDNQYD	RRKRPCIDLV	DSRLKLDIGN	DLMLPAIAVI	GRDNGSKSSV	LEALSGVALP	RDK

Translated from intron 3

[illegible]

Fig. 2-12 各動物種におけるComposite Mx1ペプチド配列の相同性
マウス、ラット、ヒト、アカゲザル、ブタ、ヒツジ、ウシ、ニワトリのゲノム配列からComposite Mx1配列を予測し、相同性を調べた。調べた全ての哺乳類間あるいはニワトリを加えた動物種間で一致する部分を黄色で示した。

Region from exon III

[illegible]

Fig. 2-13 各動物種におけるMx1蛋白質の比較

マウス、ラット、ヒト、アカゲザル、ブタ、ヒツジ、ウシ、ニワトリのMx1蛋白質配列の相同性を調べた。調べた全ての哺乳類間あるいはニワトリを加えた動物種間で一致する部分を黄色で示した。アスタリスク(*)はGTP結合領域を示す。

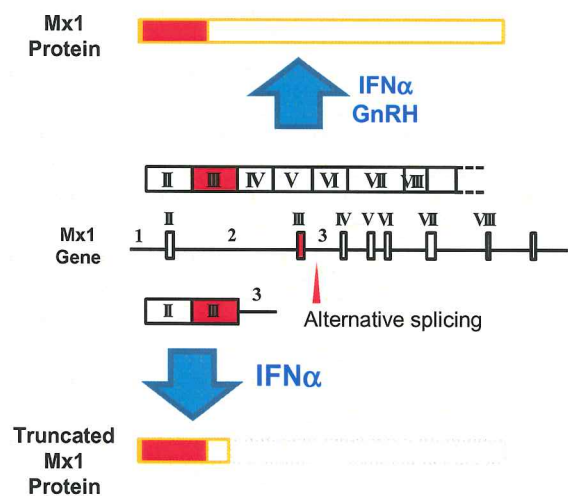


Fig. 2-14 IFN α 及びGnRHによる選択的なスプライシング調節の模式図
Mx1の偽遺伝子は複数の転写産物を産生する。主要な転写産物はIFN α 及びGnRHの刺激により増加する一方で、イントロン3を含む新規転写産物の発現はIFN α によってのみ促進される。

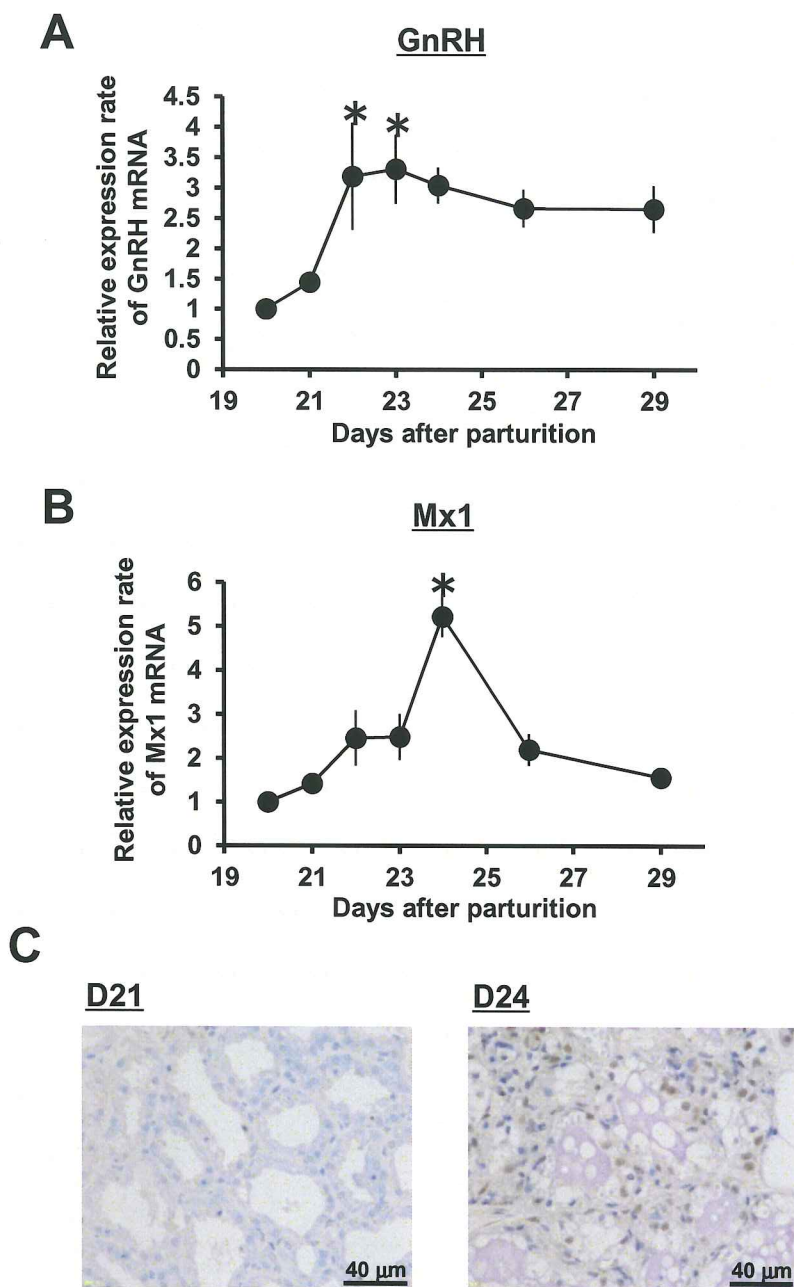


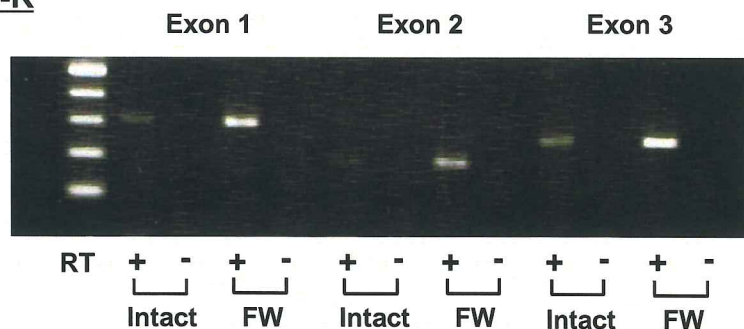
Fig. 2-15 ラット退縮期乳腺におけるGnRH及びMx1発現の変化

(A、B)ラット乳腺における離乳後のGnRH(A)及びMx1(B)遺伝子発現の変化 分娩後21日目(D21)に離乳させ、図に示した時期の乳腺を採取し、総RNAを抽出した。GnRH及びMx1遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定し、RPL19で標準化した。値は、平均値±標準誤差で示し(n=5)、離乳前日(D20)の乳腺の発現量を1として変化率を示し、有意差(P<0.05)のある群を*で示した。

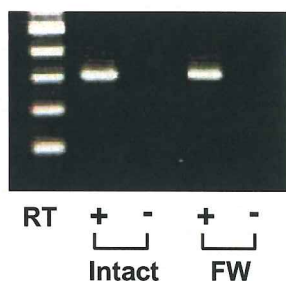
(C)ラット退縮期乳腺におけるMx1の分布 離乳直後(D21)あるいは離乳後3日目(D24)の乳腺をパラフィン包埋、薄切後、Mx1ペプチド抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。Mx1の分布は赤茶色で示される。ヘマトキシリンによる対比染色により核は青色に染色される。

A

GnRH-R



RPL19



B



Fig. 2-16 ラット退縮期乳腺におけるGnRH受容体の発現

(A) 強制離乳後のGnRH受容体(GnRH-R)遺伝子の発現 泌乳10日目に強制離乳(FW, forced weaning)させ、2日後に乳腺を採取した。対照群(Intact)として、泌乳12日目の乳腺を採取し、それぞれから作成したcDNAを用いてPCRを行った。コントロールとして逆転写酵素を抜いたサンプルを用意した(RT-)。GnRH-R特異的プライマーはエクソン毎に設計し、内部標準遺伝子としてRPL19を用いた。

(B) 乳腺における離乳後のGnRH-R蛋白質の増加 分娩後21日目(D21)に産子を離乳させ、図に示した時期の乳腺を採材し、ウエスタンブロットによりGnRH-R蛋白質発現量を比較した。

第三章：GnRH-Anxa5 系に連動する新規転写因子の発見

I. 序論

Annexin は、哺乳類に 12 種類が報告されている、 Ca^{2+} 依存性にリン脂質結合親和性を示す蛋白質ファミリーである [3, 11, 51, 66, 75]。Annexin ファミリーに属する蛋白質は、植物から哺乳類まで生物界に広く分布し、動物種間の相同性が極めて高いことから、重要な機能を担った蛋白質であると推定されている [3, 23, 103]。中でも、Annexin A5 (Anxa5) は、比較的発現量の多い蛋白質として知られる。Anxa5 は、分子内に相同性の高い 4 回の繰り返し構造をもち、この部分が Ca^{2+} とリン脂質への結合能を示し [3, 11, 66, 71, 89]、フォスホオリパーゼ A_2 (PLA₂) の抑制作用、PKC の抑制作用、血液凝固抑制作用のあることが示されている [75, 76, 90, 93]。また、Anxa5 は細胞膜との相互作用によって、 Ca^{2+} チャネルとして機能することも報告されている [82, 83]。様々な機能が報告されているが、生理的な役割はよく分かっていない。

獣医生理学研究室の一連の研究で、Anxa5 がゴナドトロフに発現していること、GnRH によって合成の促進されること [40, 41]、GnRH の LH 放出促進作用に関与していることが明らかにされた [40]。さらに、下垂体以外の組織でも、GnRH によって Anxa5 合成の促進されることが明らかにされ、卵巣では黄体細胞のアポトーシスに深く関わること [42]、離乳後乳腺で乳腺上皮細胞の退縮に関与することが示唆されている [79, 80]。これらの結果から、様々な組織の GnRH 受容体下流で Anxa5 が細胞内機能の調節に関

与している可能性が極めて高い。

Anxa5 ノックアウト ($Anxa5^{-/-}$) マウスが作製され、内分泌研究をする目的で獣医生理学研究室に分与された。 $Anxa5^{-/-}$ マウスは、最初に様々な解剖学的変化を中心に表現型解析が行われてきたが、目立った変化は認められなかった[9, 10]。我々は独自に、 $Anxa5^{-/-}$ マウスの妊娠後期に胎盤内に血栓が生じ、一部の胎子の発育不全および胎子死の起こることを発見した[105]。Anxa5 は母体胎盤のらせん動脈内皮 (合胞体性栄養膜細胞) 表面に結合し、血小板の凝集を抑制することで血液凝固を防いでいることが明らかになった[105]。これは、細胞膜外表面で機能を発揮している例と考えられる。同様の作用機序と推定されるが、Anxa5 が崩壊した細胞膜上に集積することにより、骨格筋の細胞膜修復に関与することが示唆されている[8]。これらは Anxa5 の生理的な役割を示す新しい知見と考えられるが、細胞内で GnRH によって合成される Anxa5 の動態や機能に関しては未だに分かっていない。

ゴナドトロピンに対する作用から、 $Anxa5^{-/-}$ マウスでは、生殖機能に何らかの障害のあることが期待されたが、性周期、排卵数、妊娠期間および妊娠中プロジェステロン濃度は正常なこと[105]、プロラクシン (PRL) 分泌能はむしろ低く、乳腺の発達の悪いことが明らかになってきた[80]。これらの事実は、 $Anxa5^{-/-}$ マウスでは、何らかの代償的な機序の働いている可能性を示唆する。

視床下部正中隆起で、GnRH は 20-60 分間隔のパルス状に分泌される。LH と FSH の分泌は、下垂体門脈血中に放出される GnRH の分泌パターンによって調節される。高頻度の GnRH パルスは FSH よりも LH の合成と放出を促進する傾向があり、一方で、低

頻度のパルスは FSH を促進する傾向のあることが多くの研究で示されている [6, 61, 94, 101, 112]。

本章では、まず Wild type (Wt) マウスと *Anxa5*^{-/-}マウスの下垂体に発現する遺伝子を DNA マイクロアレイで網羅的に比較し、*Anxa5* の欠失によって発現の変化する遺伝子を明らかにした。さらにその中で GnRH に反応性のある因子を絞り込み、*Anxa5* のゴナドトロフ細胞の機能調節に関わる因子を探索した。

Ⅱ．材料と方法

1．試薬

本章で新たに使用した試薬を入手先別に列記した。

Abcam (Tokyo, Japan)

- Anti-myelin protein zero rabbit polyclonal antibody

Invitrogen

- Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium [low glucose] (DMEM)

Pharmacia AB (Uppsala, Sweden)

- Cytodex3

QIAGEN

- RNase-Free DNase Set

Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)

- DNase I

Vector Laboratories (Burlingame, CA)

- VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI

2．実験動物

Annexin A5 ノックアウト (Anxa5^{-/-}) マウスは、University of East Anglia, School of Biological Science の Dr. Ernst Pöschl から供与された。Wild type (Wt) 及び Anxa5^{-/-} マウスは、SPF 動物室で 2 章に記述した通り飼育した。

Wistar-Imamichi ラットは 2 章に記述した通り飼育した。

3. 細胞培養

本研究に使用した L β T2 細胞株の培養については 2 章に記述した。

4. ラット及びマウス性周期の観察

性周期各ステージの下垂体を採取するため、ラット及びマウスの膣スメアを少なくとも 2 週間観察し、性周期を判定した。

2-3 か月齢の雌ラットの下垂体を以下に示す各時刻に採取した。

発情休止期 1 日目 (D1) : 1100、1700 (h)

発情休止期 2 日目 (D2) : 1100、1700、2000、2300 (h)

発情前期 (P) : 0500、1100、1400、1700、2000、2300 (h)

発情期 (E) : 0200、1100、1700 (h)

8-10 週齢の雌 Wt マウスの下垂体を以下に示す各時刻に採取した。

発情休止期 (D) : 1000 (h)

発情前期 (P) : 1000、1700 (h)

発情期 (E) : 1000 (h)

採取した下垂体はすぐに液体窒素で凍結し、RNA 抽出に用いるまで -80°C で保存した。

5 . DNA マイクロアレイ解析

Wt 及び Anxa5^{-/-}下垂体の遺伝子発現を網羅的に比較するため、DNA マイクロアレイを行った。

5 — 1 . 総 RNA の抽出

8 週齢の雌 Wt 及び Anxa5^{-/-}各 5 匹分を合わせた下垂体前葉を集め、RNeasy Mini kit を用いて、RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供した。

5 — 2 . GeneChip 解析

マイクロアレイ解析は、株式会社ジェネティックラボ (Hokkaido, Japan) に委託した。

6 . 卵巣の摘出

視床下部からの GnRH 分泌の増加を目的として、マウス卵巣を摘出した。

8 週齢の雌 Wt あるいは Anxa5^{-/-}をジエチルエーテルで麻酔し、卵巣を摘出した。対照群として卵巣を摘出しない偽手術を行った。

手術1、2週間後、下垂体を採取し、すぐに液体窒素で凍結し、RNA抽出に用いるまで-80°Cで保存した。

7. GnRHa 投与

下垂体における GnRH に対する Anxa5 関連遺伝子の反応性を調べるために、Wt に GnRHa の腹腔内投与を行った。

8週齢の雌 Wt に GnRHa (50 ng/50 μ l) を30分間隔で10回、あるいは1時間間隔で5回投与し、最終投与30分後に下垂体を採取し、すぐに液体窒素で凍結し、RNA抽出に用いるまで-80°Cで保存した。

8. L β T2 への GnRHa 投与

ゴナドトロフにおける Anxa5、Myelin protein zero (Mpz)、Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (Nr4a3) 発現に対する GnRH の作用を検討するため、L β T2 に GnRHa を投与した。

24 well プレートに L β T2 細胞を 5.0×10^5 cells/well で播種し、24時間培養した。培養後、GnRHa (10^{-8} M) を含む培養液に交換して0-180分間、あるいは0-8時間培養した。培養後、TRIzol reagent で細胞を融解し、RNA抽出に供した。

細胞を、Cycloheximide (CHX, 50 μ M) を含むあるいは含まない培養液で2時間前培養し、CHX (50 μ M) 及び GnRHa (10^{-8} M) を含むあるいは含まない培養液に交換して更に1時間培養した。培養後、TRIzol reagent を用いて RNA を抽出した。

9. マウス下垂体初代培養

Wt 及び *Anxa5*^{-/-} の下垂体細胞における Nr4a3 発現に対する GnRH の直接的な作用を調べるために、下垂体細胞の初代培養を行った。

9-1. 培養液の調整

初代培養に用いる培養液は以下の様に調整した。

DMEM 溶液 (DMEM [low glucose] 13.4 g、NaHCO₃ 3.7 g を超純水で 1L にメスアップ、HEPES 20 mM、pH 7.4) に 10% FBS と antibiotic-antimycotic を加えたものを培養液とした。

9-2. マウス下垂体細胞の分離

下垂体細胞の分離作業は全て無菌的に行った。2-3 か月齢雌の Wt 及び *Anxa5*^{-/-} の下垂体を採取し、細切後、トリプシン溶液 (0.25% Trypsin、10 mM EDTA を加えた DMEM 溶液) 中で 37°C、40 分間、静かに攪拌した。次に、余分なトリプシン溶液を除去した後、培養液を 2ml 加え、ピペッティングで細胞を懸濁し、0.1 % トリプシンインヒビター及び 0.1 % DNase I を加えた。細胞懸濁液を 4 % BSA 上に重層し、800 rpm、10 分間遠心分離し、上清を除去した。沈殿した細胞に培養液を加え、細胞を計数した後、培養用 96 well プレートに 5.0×10^4 cells/well で播種し、37°C で 24 時間培養した。培養後、GnRH α (0、 10^{-11} - 10^{-7} M) を含む培養液に

交換し、1、3 時間後、TRIzol reagent を用いて RNA を抽出した。

1 0 . Nr4a3 のノックダウン

Nr4a3 のゴナドトロピン遺伝子に対する作用を評価するために、RNA 干渉法による Nr4a3 のノックダウンを行った。

24 well プレートに L β T2 細胞を 2.5×10^5 cells/well で播種し、24 時間培養した。培養後、Lipofectamine 2000 reagent を用い、下記の Nr4a3 siRNA およびコントロール siRNA を各々 50 nM の濃度で導入した。

Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX)

- Nr4a3 *Silencer*® Select siRNA (ID: s70687)
- *Silencer*® Select Negative Control #1 siRNA

導入 48 時間後に GnRHa (10^{-8} M) を含む培養液に交換し、0-8 時間培養した。培養後、TRIzol reagent を用いて RNA を抽出した。

1 1 . L β T2 細胞の灌流培養

GnRH のパルス頻度によるゴナドトロピン及び Nr4a3 遺伝子発現の変化を観察するために、L β T2 の灌流培養実験を行った。

1 1 - 1 . L β T2 細胞のマイクロキャリア吸着培養

Cytodex3 beads 0.3 g を加えた培養液に L β T2 細胞を 2.0×10^7 cells/50 ml となるように加え、スピナーフラスコ内で 30 分毎に 1

分間の断続的な攪拌をしながら培養した。3 時間後に持続的な攪拌培養に切り替えて更に 48 時間培養した。

1 1 — 2 . 灌流培養

Swinnex Filter Holder (Millipore, Tullagreen, Ireland) 内に設置したニトロセルロース膜上に Cytodex ビーズに吸着した L β T2 細胞を播種し、チューブポンプで持続的に培養液を灌流した。30 分間隔あるいは 2 時間間隔で GnRHa (10^{-8} M) を含む培養液を 5 分間灌流した。GnRHa の投与開始から 10 時間まで灌流培養し、最終投与 30 分後に、TRIzol reagent で細胞を溶解し、RNA 抽出に供した。

1 2 . リアルタイム RT-PCR

下垂体あるいは L β T2 細胞から抽出した総 RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription kit のプロトコルに従い逆転写反応を行い、cDNA を作製した。リアルタイム PCR に使用した各種特異的プライマー及びプローブを Table3-1,2 に列記した。StepOnePlus Real-Time PCR System を使い、Power SYBR Green PCR Master Mix 及び TaqMan Universal PCR Master Mix による PCR 反応を次の条件で行った。

Power SYBR Green PCR Master Mix :

95°C 10 分、[95°C 15 秒、60°C 1 分] 50 サイクル

TaqMan Universal PCR Master Mix

50°C 2 分、95°C 10 分、[95°C 15 秒、60°C 1 分] 50 サイクル

cDNA の 10 倍階段希釈列で相対的検量線を作成し、mRNA の相対発現量を求めた。値は内部標準として 18S rRNA あるいはラット Ribosomal protein L19 (RPL19) を用い、標準化した。

1 3 . 免疫組織化学

下垂体における Mpz の分布を調べるため、蛍光免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Carl Zeiss, Freistaat Thüringen, Germany) で観察した。

1 3 — 1 . 標本の作製

8 週齢の雌 Wt あるいは Anxa5^{-/-}下垂体を 4% PFA で 4°C 一晩固定した後、エタノール・キシレン系列で脱水し、パラフィンで包埋した。4 μm の厚さに薄切し、スライドグラス上で乾燥した後、キシレン・エタノール系列で脱パラフィンと再水和を行った。スライドグラスは EDTA 溶液 (1 mM, pH 8.0) に浸し、圧力なべを用い、2 分間抗原を賦活化し、免疫染色に供した。

1 3 — 2 . 免疫組織化学染色

組織標本をまず、5 % normal goat serum で室温 1 時間ブロッキングした。PBS で洗浄した後、一次抗体 Anti-myelin protein zero rabbit polyclonal antibody (1:100) を加え、4°C で一晩静置した。

二次抗体は AlexaFluor®488 goat anti-rabbit IgG (1:1,000) を用いた。PBS で洗浄した後、二次抗体を加え、2 時間室温で遮光して静置した後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 で観察した。

Ⅲ．結果

1．下垂体前葉における *Anxa5* の発現動態

性周期における下垂体 *Anxa5* の発現動態を詳しく調べるために、各時刻にラット下垂体前葉を採取し、リアルタイム RT-PCR で遺伝子発現率を測定した。

下垂体前葉の *Anxa5* 発現は特に発情前期の午後に増加することが明らかになった (Fig. 3-1)。この時間帯は GnRH サージの起こる時間帯であり、*Anxa5* の変動は FSH β mRNA の増加する経過に類似していた。LH β の mRNA 発現には明らかな変動は認められなかった。GnRH-R mRNA は、発情前期夕刻に減少し発情休止期 1 日目まで低い値で推移した。

2．*Anxa5*^{-/-}マウスにおける下垂体前葉ホルモンの遺伝子発現

卵巣摘出後の下垂体前葉ホルモン遺伝子発現に及ぼす *Anxa5* の影響を調べるために、卵巣摘出後に C57BL/6 (Wt) と *Anxa5*^{-/-} の下垂体を採取し、リアルタイム RT-PCR で遺伝子発現量を比較した。

正常動物を比較すると、FSH β mRNA と GH mRNA の発現が、*Anxa5*^{-/-} で有意に低かった。この差は卵巣を摘出することで消失した (Fig. 3-2)。PRL、 α サブユニット (α GSU)、TSH β も *Anxa5*^{-/-} で低い傾向を示したが、その差は有意でなかった。

3. Anxa5^{-/-}マウス下垂体の網羅的遺伝子発現解析

Anxa5^{-/-}マウス下垂体における遺伝子発現の違いを調べるために、Wt 及び Anxa5^{-/-}マウス下垂体前葉を用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行った。

23,304 のプローブを用いて、Wt 及び Anxa5^{-/-}で発現量を比較した結果、16 の遺伝子において、4 倍以上の発現量の違いが認められた (Table 3-3)。これら 16 の遺伝子のうち、Anxa5 とミトコンドリア由来遺伝子を除く 13 の遺伝子について、リアルタイム RT-PCR で遺伝子発現量を比較したところ、Slitrk3、1700112Rik、Nr4a3、Mme の発現が有意に増加、Mid1 の発現が有意に減少し、マイクロアレイとの整合性が認められた (Fig. 3-3)。

4. 下垂体における GnRH に対する Anxa5 関連遺伝子の反応性

マイクロアレイで検出された 13 の Anxa5 関連遺伝子のうち、GnRH の作用に関わる遺伝子を探索するために、Wt マウスに GnRH α を腹腔内投与し、下垂体における遺伝子発現量の変化を検討した。

Wt マウスに GnRH α を 30 分毎に 10 回投与すると、Nr4a3 の発現が 2 倍以上増加し、Akr1c18 の発現が半分以下に減少した (Fig. 3-4-A)。また、GnRH α を 1 時間毎に 5 回投与すると、Mpz の発現が増加した (Fig. 3-4-B)。

卵巣を摘出すると、Nr4a3 及び Mpz 発現の有意に増加することが明らかになった (Fig. 3-5-A,B)。

5. 下垂体における Mpz の発現

下垂体における Mpz の分布を調べるために、Wt マウス下垂体を用い、Mpz の蛍光免疫組織化学染色を行った。

Mpz の発現している細胞は下垂体前葉、中葉、後葉でそれぞれ認められたが、主に中葉の細胞に発現していることが明らかになり、ゴナドトロフの存在する前葉で発現している細胞はごくわずかであった (Fig. 3-6-A,B,C)。一方、ゴナドトロフ由来の L β T2 細胞株に GnRHa を投与すると、Mpz mRNA の発現が投与 3 時間で有意に増加し、少なくともゴナドトロフの GnRH 受容体下流シグナルで Mpz 発現の促進されることが明らかになった (Fig. 3-6-D)。

6. ゴナドトロフの Nr4a3 発現に対する GnRH と Anxa5 の作用

Nr4a3 と Anxa5 は共に GnRH によって発現が促進された。一方で、Anxa5^{-/-} マウスでは Nr4a3 発現が高く、Nr4a3 発現に Anxa5 の影響していることは明らかである。GnRH と Anxa5、Nr4a3 の関係を更に調べるため、L β T2 細胞に GnRHa を投与し、遺伝子発現を経時的にリアルタイム RT-PCR で測定した。

L β T2 細胞に GnRHa を作用させると、Nr4a3 の mRNA 発現は一過性に増加したのに対し (Fig. 3-7-A)、Anxa5 mRNA は、Nr4a3 発現の後に増加することが明らかになった (Fig. 3-7-B)。次に、Anxa5 発現のない下垂体で Nr4a3 発現がどのように変化するか

を調べるために、Wt と *Anxa5*^{-/-}下垂体初代培養細胞に GnRH α を投与し、Nr4a3 mRNA 発現を測定した。

GnRH 刺激のない条件では、Wt と *Anxa5*^{-/-}下垂体細胞の Nr4a3 発現量に違いはなかったが (Fig. 3-8-A,B)、GnRH α を作用させると、作用 1 時間で Wt に比べ *Anxa5*^{-/-}下垂体細胞で有意に高い Nr4a3 発現の増加が認められた。一方、3 時間後には Nr4a3 発現は基底レベルまで低下した (Fig. 3-8-A,B)。これらの結果は、細胞内の *Anxa5* が、GnRH による Nr4a3 発現を抑制することを示唆している。

7. 蛋白合成阻害薬の Nr4a3 発現に対する影響

GnRH による Nr4a3 発現促進作用が、他の蛋白質合成を介しているか否かを調べるために、蛋白合成阻害薬 Cycloheximide (CHX) を L β T2 細胞に作用させてから、Nr4a3 mRNA 発現を調べた。

GnRH α による Nr4a3 発現の増加作用は CHX の有無に関わらず認められたことから、Nr4a3 が GnRH 受容体の最初期遺伝子であることが明らかになった (Fig. 3-9)。

8. Nr4a3 ノックダウンによるゴナドトロピン遺伝子発現に対する影響

GnRH による Nr4a3 増加がゴナドトロピン遺伝子発現に影響するか否かを検討するために、RNA 干渉法により L β T2 細胞におけ

る Nr4a3 をノックダウンし、GnRH のゴナドトロピン発現に対する作用を調べた。

Nr4a3 特異的 siRNA (siNr4a3) をトランスフェクションした細胞の Nr4a3 mRNA 発現量はコントロール siRNA をトランスフェクションした細胞に比べ、GnRH 投与後の各時刻において 30-50%減少した (Fig. 3-10-A)。この時の LH β 、FSH β 、 α GSU、Anxa5 mRNA 発現量を比較すると、siNr4a3 をトランスフェクションした細胞で FSH β mRNA の発現が明らかに亢進していた (Fig. 3-10-C)。一方、LH β mRNA は一時的に 40%程度の低下が認められたが、その差はすぐに消失し (Fig. 3-10-B)、 α GSU の発現に対してはほとんど影響しなかった。Anxa5 発現は、GnRHa 投与 8 時間後の siNr4a3 をトランスフェクションした細胞で有意に高かった (Fig. 3-10-E)。

9. GnRHa のパルス状刺激による Nr4a3 発現に対する影響

LH β と FSH β の発現は GnRH の刺激頻度によって異なることが知られている。この時の Nr4a3 及び Anxa5 発現の変化を調べるために、L β T2 細胞の灌流培養を行った。

LH β mRNA の発現は 30 分間隔の GnRHa 刺激で顕著に増加した。一方、FSH β mRNA の発現は 2 時間間隔の GnRHa 刺激によって顕著に増加した (Fig. 3-11)。Nr4a3 mRNA の発現量は GnRHa 刺激の頻度に関わらず、最終刺激後 30 分の時点で同程度の増加が認められた。また、Anxa5 mRNA 発現にも同程度の増加が認められた。

IV. 考察

ラットの発情前期の夕刻に GnRH によって LH と FSH 分泌のサーージが起こり、GnRH 受容体発現の変化することが知られている [4, 14, 85]。本研究では、発情前期の 1700 から 2000 時に FSH β mRNA が増加し、GnRH 受容体 mRNA の減少することを観察した。これらの変化は、発情前期夕刻に出現するゴナドトロピンサーージに同調した変化と理解できる。この時、LH β mRNA の遺伝子発現に顕著な変動は認められなかった。

LH サーージ出現時に下垂体の LH 含量の 80%以上が放出され、大きな分泌量の変化が認められるにもかかわらず、LH β mRNA の顕著な変化の認められないことがヒツジで報告されている [17-20]。また、Haisenleder らによると、エストラジオールを投与し、実験的に LH サーージを誘起したラットにおいて、血中 LH レベルが顕著に増加するにも関わらず、LH β mRNA はわずか 30 分間の増加傾向しか認められない [26]。これらの結果は、GnRH による LH の大量放出は LH β 遺伝子発現にほとんど依存しないことを示唆している [61]。本研究の結果は、ラットの生理的な LH 大量放出時にも LH β 合成が同時に促進されることのないことを示している。

Anxa5 mRNA の発現は発情前期の午前中に低下し、その後、ゴナドトロピンサーージの前から後にかけて増加することが示された。この推移は FSH β mRNA の発現動態と類似していた。LH β mRNA、FSH β mRNA 及び Anxa5 mRNA の全てが、in vitro 実験で GnRH によって増加することが示されているが、生理的条件下ではその動態は必ずしも同じでなく、GnRH の放出パターンや他の

液性因子の関与が想像された[41, 44]。本研究では、ゴナドトロピン分泌に関与することが知られており、GnRH によって合成の促進されるゴナドトロフ内 *Anxa5* の役割に着目した。

Anxa5^{-/-}マウス下垂体の遺伝子発現を調べると、FSH β mRNA 発現率の低いことが明らかになった。卵巢を摘出すると、FSH β mRNA 発現率は Wt マウスと同程度まで顕著に増加し、差はなくなった。下垂体の *Anxa5* が、性周期中の基底レベルの FSH β mRNA 発現率の調節に関わっていることが示唆される。一方、春機発動期に至らない 3 週齢の雄 *Anxa5*^{-/-}マウスにおいても、下垂体前葉ホルモン遺伝子のうち、FSH β 発現の特異的に低いことが既に報告されている[64]。この結果も、*Anxa5* が基底レベルの FSH 分泌に関与しているという推察を支持していると考えられた。

Anxa5^{-/-}マウスの GH mRNA の発現が有意に低いことも明らかになった。PRL と POMC mRNA も *Anxa5*^{-/-}マウスで低い傾向だった。以前の我々の研究では、*Anxa5*^{-/-}マウスの血中 PRL 濃度が低く、乳腺の発達の悪いことが明らかになっており、下垂体の *Anxa5* はゴナドトロピン以外にもこれらの前葉ホルモン分泌に影響することが示唆された[80]。そこで次に *Anxa5*^{-/-}マウス下垂体の遺伝子発現を網羅的に調べた。

遺伝子発現の網羅的解析によって、*Anxa5*^{-/-}マウス下垂体で Wt に比べて 4 倍以上変動する 13 の遺伝子が明らかになった。リアルタイム RT-PCR でこれら遺伝子の発現量を比較すると、*Slitrk3*、*1700112Rik*、*Nr4a3*、*Mme*、*Mid1* が有意な変化を示し、マイクロアレイの結果が再現された。これら以外 8 種類の遺伝子については傾向のあるものもあったが、有意な差は認められなかった。

DNA マイクロアレイは 1 例の差を見ているので、群で解析するリアルタイム PCR での確認が必要と考えられた。下垂体におけるこれら 5 種類の遺伝子についての報告はほとんどなく、これら遺伝子同士の関連についても不明である。Anxa5 はこれら 13 種類の遺伝子に関わる未知の機序で下垂体機能の調節に関わっている可能性が考えられた。そこで、最初に検出された 13 種類の遺伝子のどれが GnRH によって影響を受けるのかを調べると、Nr4a3 と Mpz が GnRH 刺激によって増加した。GnRHa 投与頻度を変えると、反応が異なったことから、GnRH パルス頻度の変化によるゴナドトロピンの反応性の変化に関わっていることが示唆された。一方、Akr1c18 は GnRH 刺激によって低下した。Akr1c18 は 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD) と呼ばれ、主に黄体のプロジェステロンの異化酵素として働くことで有名だが [110, 111]、下垂体での機能には興味を持たれる。

Mpz は末梢神経のミエリン鞘（髄鞘）を構成する主要な蛋白質として知られており [24, 57]、また、Taguchi らによって、ラット下垂体前葉の一部の細胞膜上に発現することが報告されている [97]。Mpz は卵巣摘出と GnRHa 投与によって有意に増加した。本研究の免疫組織化学染色によると、下垂体の Mpz は主に中葉の細胞に分布しており、Mpz の発現している前葉細胞は極めて稀で、10-20%といわれているゴナドトロフ細胞の割合を明らかに大きく下回っていた。一方で、L β T2 細胞に GnRHa を作用させると、Mpz の増加することから、もしかしたら Mpz 発現の変動は極めて大きく、無処置正常マウスでの発現は極めて低いのかも知れない。

本研究は、GnRH によってゴナドトロフで転写因子 Nr4a3 の誘導されることを明らかにした。Nr4a3 は Nr4a1 及び Nr4a2 を含む核内オーファン受容体ファミリーの 1 つに分類され、Neuron-derived orphan receptor 1 (Nor1)とも呼ばれている[56, 58]。Anxa5 が最終的に Nr4a3 発現に関わることは明らかだが、Nr4a3 は最初期遺伝子であり、少なくとも GnRH による Anxa5 の増加は Nr4a3 発現には必要がない。一方で、興味深いことに、Anxa5^{-/-}下垂体細胞は GnRH 刺激による Nr4a3 発現の大きいことが示された。これらの結果から、ゴナドトロフの Anxa5 は恒常的に GnRH によって促進される Nr4a3 発現を抑制する効果のあることが示唆された。

本研究の RNA 干渉を用いた結果は、Nr4a3 が FSH β 遺伝子発現に対して特異的な抑制性作用を持つことを明らかにした。持続的な GnRH 刺激は劇的な Nr4a3 発現の増加を導き、FSH β 転写を抑制することが示唆された。Nr4a ファミリーの一員である Nr4a1 (Nur77) がゴナドトロフに発現すること、未分化のゴナドトロフで抑制されている FSH β サブユニット発現の抑制解除に関わっていることが示されている[38, 52, 68]。同じファミリーの Nr4a3 が FSH β サブユニット発現に抑制的に作用するという本研究の結果は、オーファン受容体ファミリーとして知られる Nr4a の GnRH を介する機能の存在を示唆している。

下垂体門脈からパルス状に放出される GnRH は、そのパルス頻度によってゴナドトロフの反応を変化させることが知られている[27, 100, 101]。in vitro と in vivo において、GnRH は高頻度（～30 分間隔）のパルスで LH β 遺伝子を、低頻度（～2 時間間隔）の

パルスで FSH β 遺伝子発現を誘導する [101, 112]。本研究では、L β T2 細胞を用いた灌流実験を行い、GnRH α の投与頻度を変化させて遺伝子発現への影響を観察した。本研究の結果でも、2 時間に 1 回の低頻度条件でのみ FSH β mRNA 発現率の顕著な増加が認められた。これに対して LH β mRNA 発現率は、30 分に 1 回の刺激で有意に増加した。Nr4a3 mRNA 発現率は、GnRH α の高頻度刺激、低頻度刺激どちらによっても促進された。RNA サンプルは、最終刺激の 30 分後に回収しており、頻度にかかわらず GnRH α 刺激 1 回あたりの Nr4a3 発現量に違いがないことを示している。Nr4a3 は GnRH 刺激で一過性に増加したことから、GnRH パルスに一致して発現率が上昇していたものと考えられた。刺激回数の増加は、或いは細胞内に Nr4a3 を蓄積させ、それが FSH β 遺伝子の発現を抑制すること、即ち高頻度パルスで GnRH α を投与したときに FSH β mRNA 発現率が低くなっていたのかも知れない。

本研究の結果をまとめると、まず、下垂体における Anxa5 関連因子を 13 種類確認した。13 種類の Anxa5 関連因子のうち、Nr4a3、Mpz、Akr1c18 は GnRH シグナルに関わる遺伝子であることが示された。中でも Nr4a3 は、FSH β 発現を特異的に抑制する転写因子であること、GnRH 受容体シグナルが FSH β 抑制性の新規転写因子の発現を介して、LH β と FSH β 遺伝子発現の違いを生み出している可能性が示唆された。

V. 要約

本章ではまず、ラット性周期の下垂体での遺伝子発現を観察した。発情前期の LH サージに伴って、FSH β 、Anxa5、GnRH 受容体 mRNA 発現が変動したが、LH β mRNA に明らかな変化は認められなかった。FSH β と Anxa5 mRNA 発現率は、LH サージ前から終了後に増加した。下垂体ホルモン分泌への Anxa5 の関与を Anxa5^{-/-}マウスを用いて検討することとした。

Anxa5^{-/-}マウス下垂体では、FSH β mRNA 発現率の低いことが明らかになった。一方、卵巣を摘出すると発現率は顕著に増加し、発現量の差は消失した。観察された Anxa5^{-/-}マウスでの発現率の減少が GnRH によって回復することが示され、基底レベルの GnRH によって維持される FSH 合成に、Anxa5 が大きく影響するものと思われる。

次に、Anxa5^{-/-}マウスの下垂体前葉における遺伝子発現の網羅的解析により、Anxa5 に関連する 13 種の遺伝子を明らかにした。更にリアルタイム RT-PCR でこれら遺伝子の変化を確認すると、Slitrk3、1700112Rik、Nr4a3、Mme、Mid1 の 5 遺伝子に有意な変化が認められた。

Anxa5 関連 13 遺伝子の発現に対する GnRH の影響を調べると、GnRHa の 30 分間隔 10 回投与によって、Nr4a3 が増加し、Akr1c18 が減少した。一方で、1 時間間隔 5 回の投与では、Mpz が増加した。GnRH の刺激頻度に対応してこれら遺伝子の誘導されることが明らかになった。卵巣摘出を施したところ、Nr4a3 と Mpz 発現が有意に増加した。

下垂体における Mpz の発現と分布を調べた。免疫組織化学染色で Mpz は主に中葉の細胞に見出され、Mpz の発現している前葉細胞は極めて稀だった。また、L β T2 細胞に GnRHa を作用させると Mpz の発現は増加した。このことから、Mpz はゴナドトロフの GnRH 受容体下流で誘導される一方で、その発現量は下垂体細胞の中でも比較的低いことが示唆された。

L β T2 細胞に GnRHa を作用させると Nr4a3 の発現は一過性に増加した。また、Anxa5^{-/-}の下垂体初代培養細胞は GnRH 刺激時の Nr4a3 発現が Wt 下垂体細胞に比べて多いことが観察された。タンパク合成阻害薬シクロヘキシミドを処置しても、GnRHa は Nr4a3 を誘導することから、Nr4a3 が GnRH シグナルの最初期遺伝子であることが明らかになった。これらの結果から、Anxa5 が GnRH による Nr4a3 発現に対して抑制的に機能することが示唆された。

Nr4a3 のゴナドトロフにおける機能を調べるために、siRNA を用いて Nr4a3 発現を抑制し、GnRH によるゴナドトロピン遺伝子の発現促進作用に対する影響を調べた。Nr4a3 特異的な siRNA は LH β 、FSH β 、 α サブユニット発現のうち、FSH β 遺伝子の特異的に増加させた。このことから、Nr4a3 は FSH β 遺伝子の発現に抑制的に機能することが明らかとなった。L β T2 細胞の灌流培養を行い、GnRHa をパルス状に添加すると、高頻度刺激（ ~ 30 分）で LH β mRNA が、低頻度刺激（ ~ 2 時間）で FSH β mRNA 発現が促進された。どちらの条件でも、Nr4a3 mRNA 発現は最終刺激 30 分後に増加していた。Nr4a3 は GnRH 刺激で一過性に増加することから、パルス状刺激条件下では GnRH 刺激に一致したパルス状に発現することが示唆された。

以上の如く、FSH β 発現の特異的な抑制作用を示す新規転写因子 Nr4a3 を発見し、GnRH による Nr4a3 誘導作用に Anxa5 が抑制的に関与することが明らかとなった。

Table. 3-1 下垂体ホルモン、Anxa5、GnRH-R、RPL19 mRNAのリアルタイム RT-PCR用プライマー及びプローブ配列

Gene	Primer (5'-3') and Probe (5'FAM-TAMRA3')
rat LH β	Forward: GTCTGCATCACCTTCACCAC Reverse: GTAGGTGCACACTGGCTGAG
rat FSH β	Forward: TGGTGTGAGGGCTACTGCTA Reverse: CTCGTACACCAGCTCCTTGA
rat Anxa5	Forward: AAGTTCTTCGGAAGGCCATG Reverse: CTCAGCAATCTGCTGGCG Probe: CGACGAGGACAGCATCCTGAACCTGTT
rat GnRH-R	Forward: GAACGGTCTATGACCAGCCTG Reverse: GGTCACACATTGCGAGAAACTG Probe: TCAGCATTGTCTTTGCGGGACCACAGTT
rat RPL19	Forward: CAGGAGATACCGGGAATCTAAG Reverse: TGCCTTCAGTTTGTGGATGTG
mouse LH β	Forward: GTCTGCATCACCTTCACCAC Reverse: GTAGGTGCACACTGGCTGAG
mouse FSH β	Forward: CTGCTGCCATAGCTGTGAAT Reverse: GAGCTGGGTCCTTATACACCA
mouse α GSU	Forward: ATCACCTGCCCAGAACACAT Reverse: ACATGGACAGCATGACCAGA
mouse TSH β	Forward: CCATCAACACCACCATCTGT Reverse: CCTGGTATTTCCACCGTTCT
mouse GH	Forward: GTGGACAGATCACTGCTTGG Reverse: GGAAAAGCACTAGCCTCCTG
mouse PRL	Forward: CTCAGGCCATCTTGGAGAAG Reverse: TCGGAGAGAAGTCTGGCAGT
mouse POMC	Forward: GGCCACTGAACATCTTTGTC Reverse: GGAAAAGCACTAGCCTCCTG
mouse Anxa5	Forward: GGTACCGATGAGGACAGCAT Reverse: TCCCTGCCAAACAGAGTCTT

Table. 3-2 Anxa5関連因子のリアルタイムRT-PCR用プライマー配列

Gene	Primer (5'-3')
Slitrk3	Forward: CTGAGGACTCTGCCAACTGA Reverse: AATGGCATTTCAGGTGTTCAA
1700112Rik	Forward: TACCCCACTTGACACACCTTA Reverse: AGCTTCTGGACACGTCAATG
Nr4a3	Forward: CCGAGCTTTAACAGATGCAA Reverse: AGCTTCTGGACACGTCAATG
Gm7120	Forward: CGGGATTTTTAGCGTCTGTT Reverse: ATGGGTATCACAGTGGAGCA
Mme	Forward: TTCTGTGGCCAGACTGATTC Reverse: ATTGGGTCATTTCCGGTCTTC
Gm5148	Forward: CACGAACGCTGTGATCTTCT Reverse: CTCATGCAAAGGGAATTGTG
Mpz	Forward: TCCTTCTGGTCCAGTGAATG Reverse: AAGGTTGTCCCTTGGCATAG
Mid1	Forward: CACCATATTCACCGGACAAG Reverse: GTGGTTCTGCTTGATGTTGG
Fabp6	Forward: ACCATTGGCAAAGAATGTGA Reverse: GACCTCCGAAGTCTGGTGAT
Akr1c18	Forward: GATAGGCCAGGCCATTCTAA Reverse: AATTTTCCAAGCTGGGTCTG
Pdk4	Forward: CACCACATGCTCTTCGAACT Reverse: CTA CTGGGGTCAAGGAAGGA
Cetn4	Forward: ACAACTGATCGCTGAAATCG Reverse: CCGTAGCATCGTCATCAAAT
Grp	Forward: TCAGTCTCCAGCCTACTTGG Reverse: TCCTCCCTTTTCCTTGAGAA

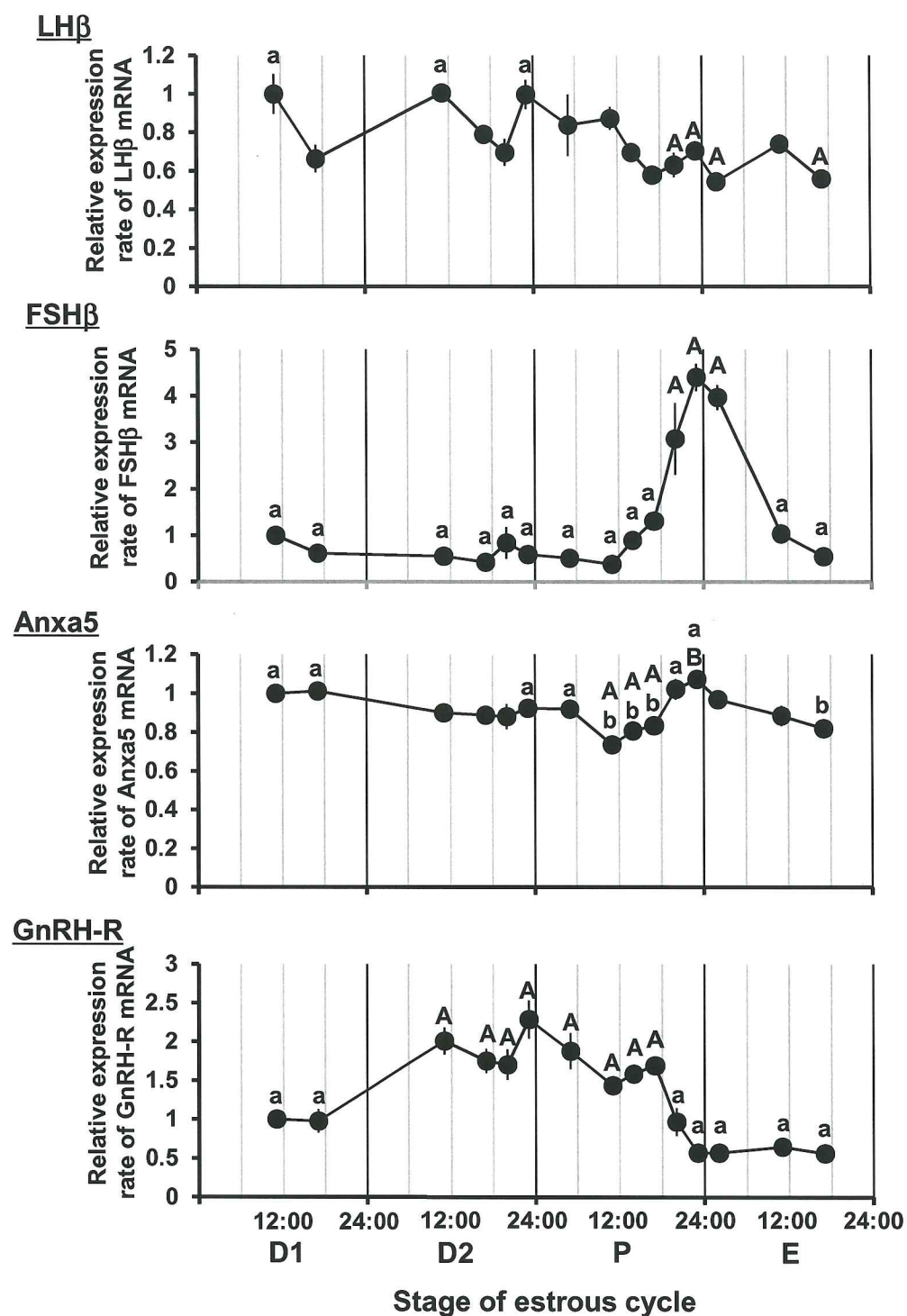


Fig. 3-1 性周期におけるラット下垂体のLHβ、FSHβ、Anxa5、GnRH-R mRNA発現の動態
 各性周期ステージの図に示した時間で下垂体前葉を採取し、総RNAを抽出した。D1:発情
 休止期1日目、D2:発情休止期2日目、P:発情前期、E:発情期。LHβ、FSHβ、Anxa5、GnRH-
 R mRNAの発現量をリアルタイムPCRで測定し、RPL19で標準化した。値は、平均値±標準
 誤差で示し(n=5)、D1期11時の発現量を1として変化率を示した。有意差(P<0.05)の
 ある群間は同一アルファベットの大文字-小文字(A-a、B-b)で示した。

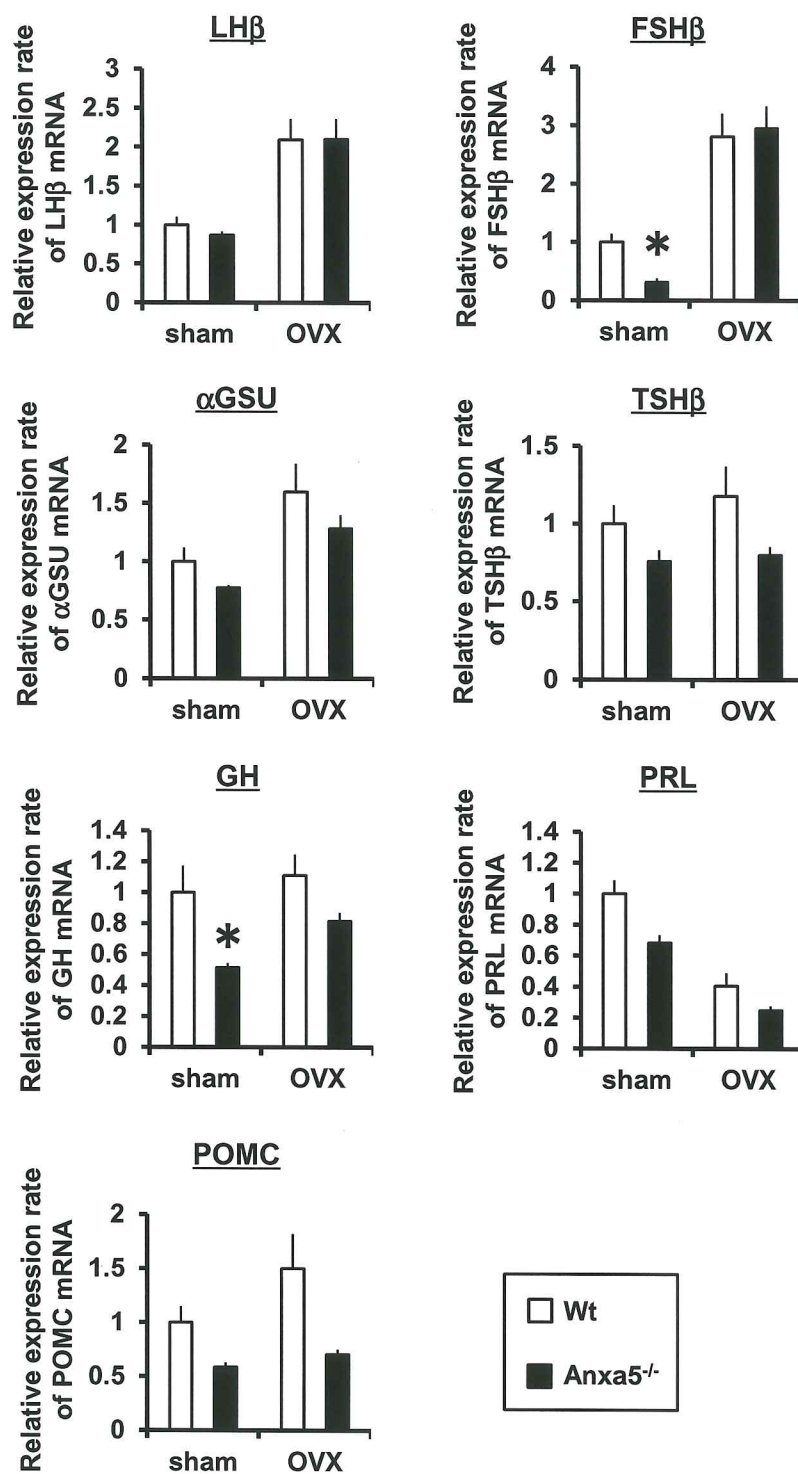


Fig. 3-2 Anxa5^{-/-}マウス下垂体における各種前葉ホルモン遺伝子の発現
 卵巢摘出(OVX)あるいは偽手術(sham)を施し、1週間後のC57BL/6J(Wt)あるいはAnxa5^{-/-}マウス下垂体を採取し、総RNAを抽出した。下垂体前葉ホルモン各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値+標準誤差で示し(n=8)、Wtの偽手術群の発現量を1として変化率を示し、Wt群との有意差(P<0.05)を*で示した。

Table. 3-3 Anxa5^{-/-}マウスにおける網羅的遺伝子発現の解析

Gene description	Gene symbol	GenBank #	Fold change
SLIT and NTRK-like family, member 3	Slitrk3	NM_198864	2.842371
RIKEN cDNA 1700112E06 gene	1700112Rik	NM_028275	2.641442
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Nr4a3	NM_015743	2.282417
predicted gene 7120	Gm7120	NM_001039244 NM_001177666	2.091698
membrane metalloendopeptidase (CD10)	Mme	NM_008604	2.018432
predicted gene 5148	Gm5148	NM_198657	-4.7134
myelin protein zero	Mpz	NM_008623	-4.20025
NC_005089 (mitochondrial gene)		NC_005089	-3.20452
midline 1 (Tripartite motif protein 18)	Mid1	NM_010797 NM_183151	-3.16296
fatty acid binding protein 6 (gastrotropin)	Fabp6	NM_008375	-2.73333
aldo-ketoreductase family 1, member C18	Akr1c18	NM_134066	-2.45519
pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	Pdk4	NM_013743	-2.45503
annexin A5	Anxa5	NM_009673	-2.19349
NC_005089 (mitochondrial gene)		NC_005089	-2.08386
centrin 4	Cetn4	NM_145825	-2.01841
gastrin releasing peptide	Grp	NM_175012	-2.00023

C57BL/6J (Wt)あるいはAnxa5^{-/-}マウス各5匹分の下垂体前葉を合わせて採取し、総RNAを抽出した。23,304のプロブを用いたDNAマイクロアレイ解析を行い、Wtの発現量と比較し、4倍以上発現量に違いのある遺伝子を示した。

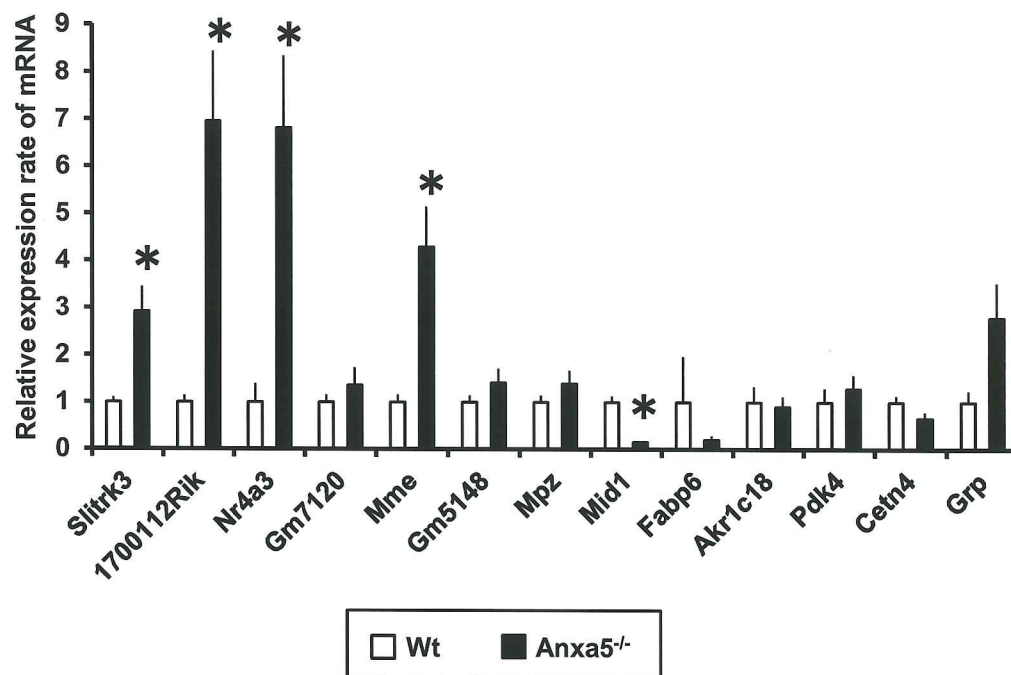


Fig. 3-3 Anxa5^{-/-}マウスにおける遺伝子発現の変化
C57BL/6J (Wt)あるいはAnxa5^{-/-}マウス下垂体の各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値±標準誤差で示し(n = 5)、Wt群の発現量を1として変化率を示し、有意差(P < 0.05)を*で示した。

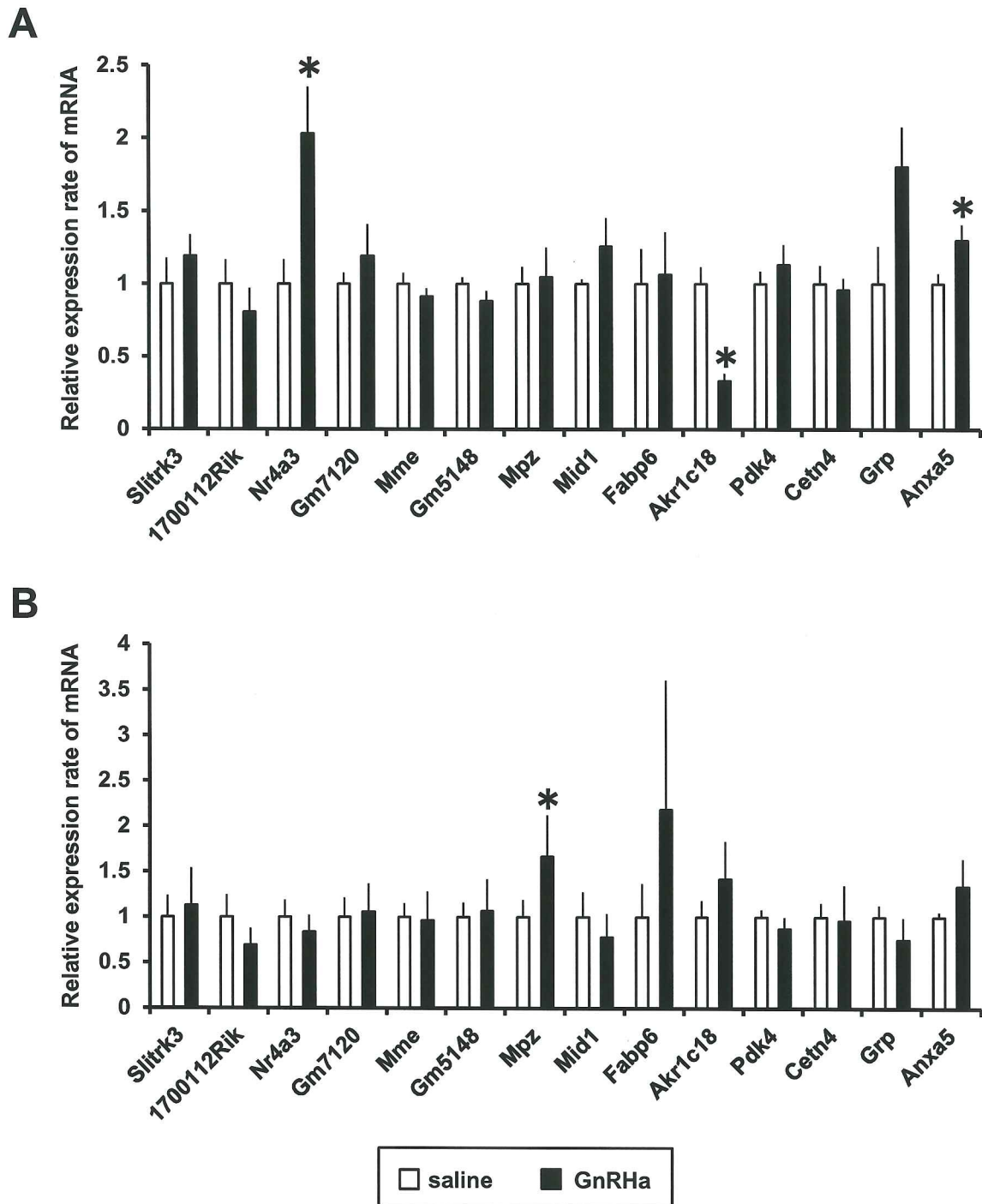


Fig. 3-4 GnRHa投与によるAnxa5関連遺伝子発現の変化
C57BL/6J (Wt) マウスにGnRHa 50ng/50μlあるいはsaline 50μlを30分間隔10回(A)、あるいは1時間間隔5回(B)腹腔内投与し、最終投与の30分後に下垂体を採取し、総RNAを抽出した。各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値+標準誤差で示し(n=5)、saline投与群の発現量を1として変化率を示し、有意差(P<0.05)を*で示した。

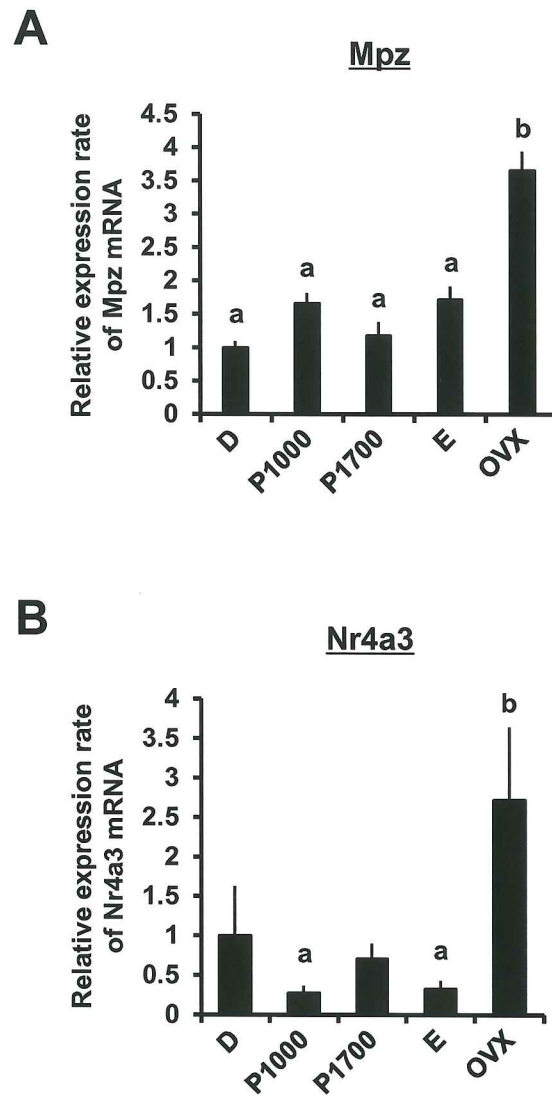


Fig. 3-5 卵巣摘出によるマウス下垂体Mpz及びNr4a3 mRNA発現の変化
 各性周期のステージ及び卵巣摘出後2週目のC57BL/6J(Wt)マウス下垂体を採取し、総RNAを抽出した。D:発情休止期、P1000:発情前期10時、P1700:発情前期17時、E:発情期、OVX:卵巣摘出2週。Mpz (A)あるいはNr4a3 (B)の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値+標準誤差で示し(n = 5)、D期の発現量を1として変化率を示した。各群間における有意差(P < 0.05)を異なるアルファベットで示した。

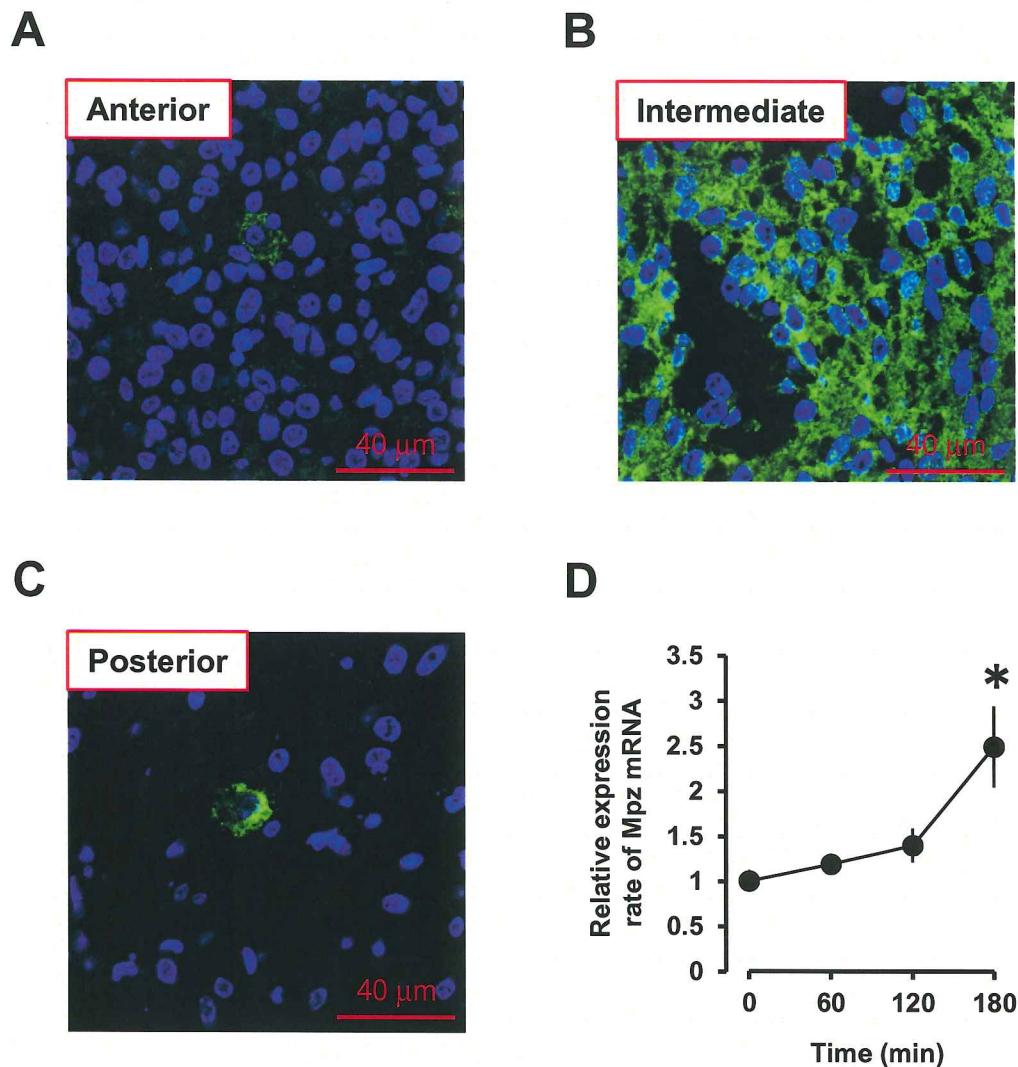
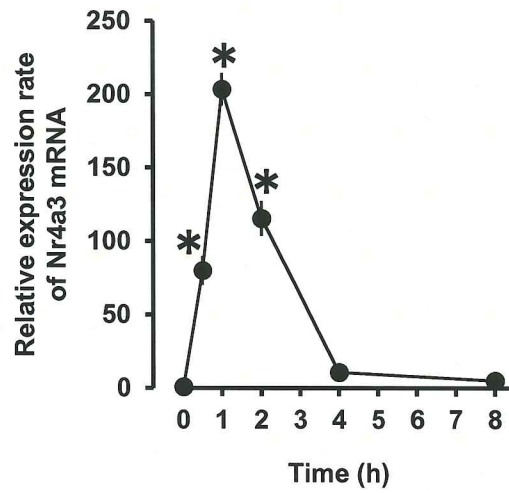


Fig. 3-6 下垂体におけるMpzの発現

(A、B、C) マウス下垂体におけるMpzの局在 C57BL/6J(Wt)マウス下垂体をパラフィン包埋、薄切後、Mpzの蛍光免疫組織化学染色を行った。図は、抗Mpz抗体を用いた下垂体前葉(Anterior, A)、中葉(Intermediate, B)、後葉(Posterior, C)の免疫組織像。Mpzの分布は緑色蛍光で示される。青色はDAPIによる核染色。

(D) GnRHaのMpz mRNA発現に対する作用 LβT2細胞を24wellプレートに播種し、24時間培養後、GnRHa (10^{-8} M)を投与し、0、60、120、180分後に総RNAを抽出した。発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値±標準誤差で示し(n=4)、投与0時間群の発現量を1として変化率を示し、有意差(P<0.05)を*で示した。

A



B

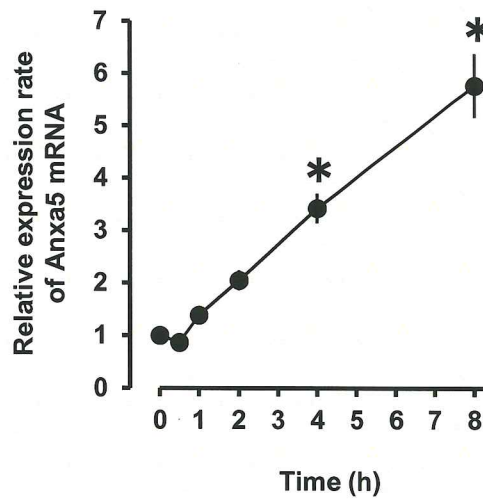


Fig. 3-7 GnRHaのNr4a3及びAnxa5 mRNA発現に対する作用
LβT2細胞を24wellプレートに播種し、24時間培養後、GnRHa (10^{-8} M)を投与し、0、0.5、1、2、4、8時間後に総RNAを抽出した。Nr4a3(A)あるいはAnxa5(B)の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値±標準誤差で示し(n=4)、投与0時間群の発現量を1として変化率を示し、有意差($P < 0.05$)を*で示した。

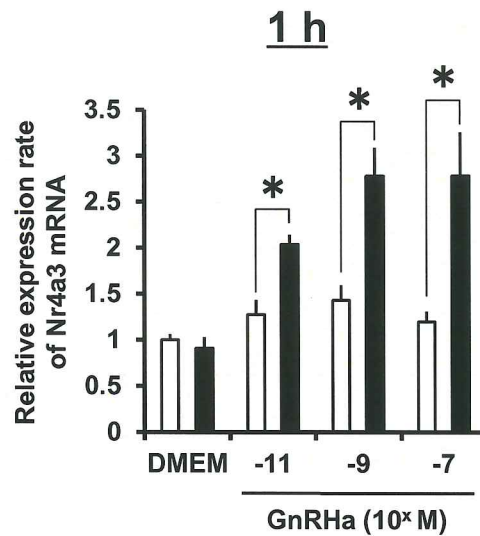
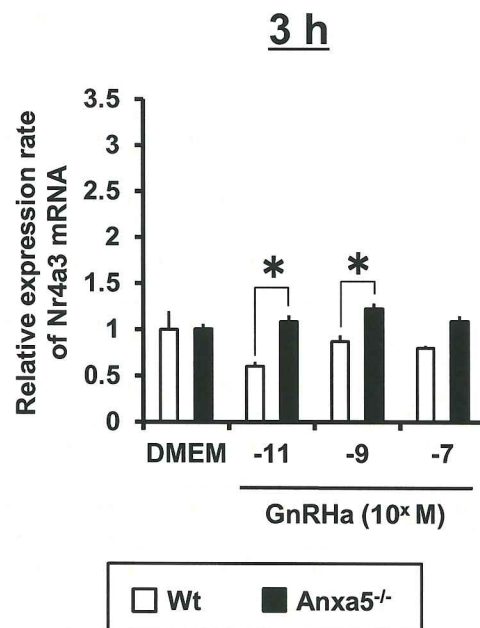
A**B**

Fig. 3-8 Anxa5^{-/-}下垂体初代培養細胞におけるGnRHa刺激によるNr4a3発現
C57BL/6J(Wt)あるいはAnxa5^{-/-}マウス下垂体初代細胞を96wellプレートに播種し、24時間培養後、GnRHa (10⁻⁸ M)を投与し、1時間後(A)、あるいは3時間後(B)に総RNAを抽出した。Nr4a3の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値+標準誤差で示し(n = 5)、GnRHaを1時間投与したWt群の発現量を1として変化率を示し、有意差(P < 0.05)を*で示した。

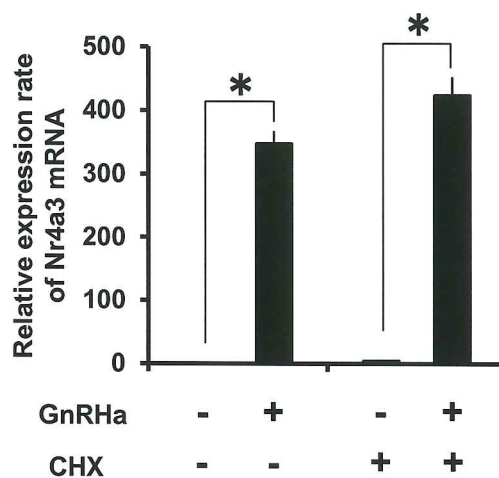


Fig. 3-9 蛋白合成阻害薬のNr4a3発現に対する影響

LβT2細胞を24wellプレートに播種し、24時間培養後、Cycloheximide (CHX, 50 μM)を含むあるいは含まない培養液に交換した。2時間培養後、CHXを含むあるいは含まないGnRHa (10⁻⁸ M)を投与し、1時間後に総RNAを抽出した。Nr4a3の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値+標準誤差で示し(n = 4)、CHX及びGnRHa非投与群の発現量を1として変化率を示した。GnRHa投与群との有意差(P < 0.05)を*で示した。

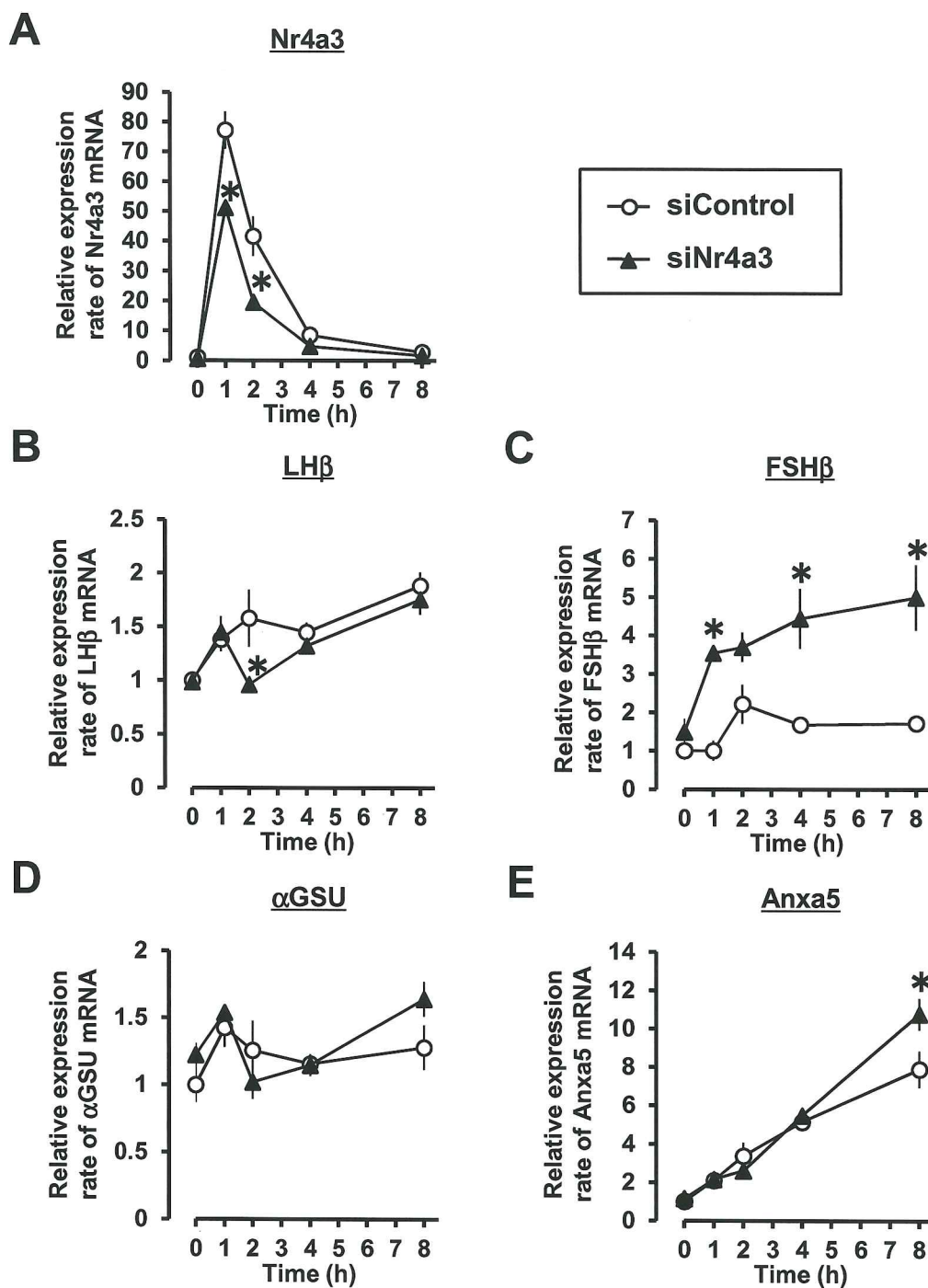


Fig. 3-10 Nr4a3ノックダウンのゴナドトロピン及びAnxa5 mRNA発現に対する影響
 LβT2細胞を24wellプレートに播種し、24時間培養後、Nr4a3特異的siRNA (siNr4a3)あるいはコントロールsiRNA (siControl)をトランスフェクションした。48時間培養後、GnRHa (10^{-8} M)を投与し、0、1、2、4、8時間後に総RNAを抽出した。各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値±標準誤差 (n = 4)で示し、投与0時間の発現量を1として変化率を示した。各時間におけるsiControl群との有意差 (P < 0.05)を*で示した。

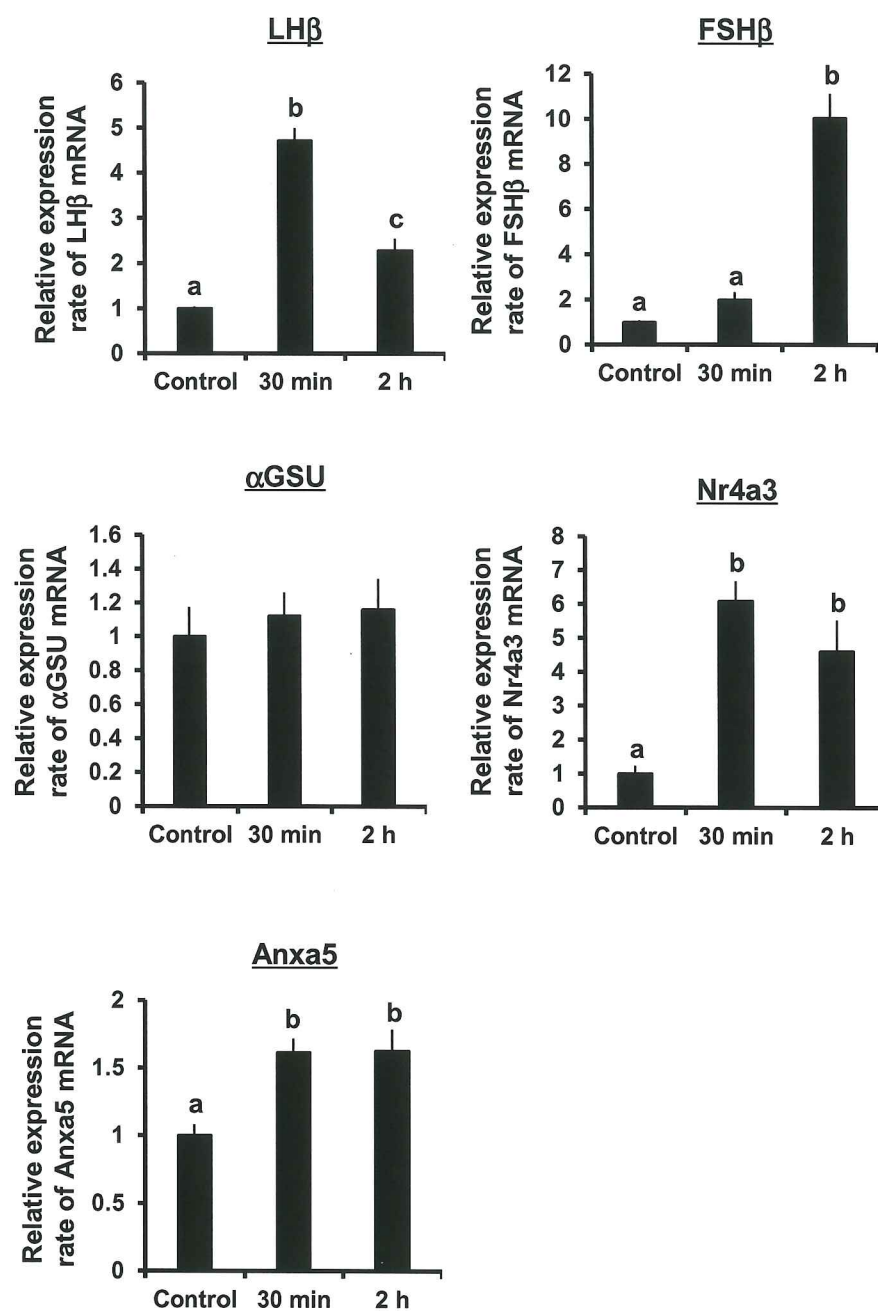


Fig. 3-11 GnRHaのパルス状刺激によるゴナドトロピン、Nr4a3及びAnxa5 mRNA発現に対する影響

細胞培養用ビーズに付着させたLβT2細胞を還流培養し、30分間隔あるいは2時間間隔で5分間のGnRHa (10^{-8} M) 刺激を行った。投与開始10時間後の最終投与から30分間後に総RNAを抽出し、各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定し、rRNAで標準化した。値は、平均値±標準誤差で示し(n = 4)、GnRHa非投与群の発現量を1として変化率を示した。各群間における有意差(P < 0.05)を異なるアルファベットで示した。

第四章：総括

GnRH はゴナドトロピン分泌を調節する視床下部神経ペプチドホルモンである。GnRH 受容体は、G 蛋白質共役型受容体で、主に $G\alpha_{q/11}$ に共役することで、2 種類の性腺刺激ホルモン LH と FSH の分泌を促す[32, 69]。一方、GnRH は、細胞周期や増殖の調節など生殖系以外の作用も示す[46, 67, 88]。この様な例では、GnRH 受容体は $G\alpha_s$ や $G\alpha_i$ に共役する例も知られ、リガンドと受容体の結合様式あるいは細胞種の違いによって駆動される細胞内機序の変化する[30, 37, 55, 62, 70, 96]。体内に広く分布する GnRH 受容体の機能を明らかにするためには、GnRH 受容体以下の細胞内過程が明らかにされねばならない。本研究では、ゴナドトロフの GnRH 受容体下流で機能する 2 つの新規細胞内分子の存在を明らかにした。

ゴナドトロフの機能は飢餓、感染症など様々なストレスによって低下する[5, 39, 49, 81, 104]。本研究によって IFN α と GnRH のシグナルが細胞内でクロストークすることが明らかになったことで、ストレスによる機能低下との関連が想像された。本研究の結果、IFN α と GnRH が共に Mx1 の転写を促進することが示された。IFN α は Jak/Stat 経路を活性化し、Stat1/2/IRF9 複合体の形成を促す。この複合体が Mx1 プロモーターの ISRE に結合することで Mx1 の転写を活性化することが知られている[7, 33, 84]。一方、獣医生理学研究室では、GnRH 受容体の $G\alpha_i$ サブユニット下流シグナルの最初期遺伝子として Mx1 を発見した[43]。GnRH と IFN α が如何なる目的で同じ遺伝子の転写を促進するのか、シグナルト

ランスダクションの過程でクロストークするのか、全く違う仕組みで GnRH が Mx1 の転写を促進するのかは分からない。転写後に形成される mRNA 変異体に GnRH と IFN α で差が認められたことから、Mx1 の GnRH と IFN α による転写調節の詳細に興味を持たれる。GnRH と IFN α は Mx1 の転写後修飾過程を調節し、種間相同性の非常に高い Composite Mx1 の発現に対して異なる制御をしていることが示された。GnRH は明らかに Composite Mx1 遺伝子発現の促進程度が少なかった。マウス Mx1 のエクソン III -イントロン 3 間を特異的に切断するスプライセオソームの存在とその利用を調節する機序のあることが示唆された。

Pseudo Mx1 と Composite Mx1 の双方に細胞増殖抑制活性のあることが示された。特に Composite Mx1 に強い作用の認められたことから、Composite Mx1 を誘導する機序が、組織の退縮やリモデリングに関わる可能性が考えられた。GnRH 受容体は様々な組織やがん細胞で発現することがわかっており、それら細胞における GnRH の作用と本実験で明らかになった Composite Mx1 の関連を解明する必要がある。

Anxa5 関連因子の探索によって、GnRH のゴナドトロピン合成に関わる新たな転写因子 Nr4a3 の存在を明らかにした。Anxa5 は常態でこの転写因子 Nr4a3 の発現を抑制していることが示唆された。Nr4a ファミリー (Nr4a1、Nr4a2、Nr4a3) は、様々なリガンド-受容体系で最初期遺伝子であることが知られており [74]、実際に Nr4a3 は GnRH 受容体の最初期遺伝子だった。

Nr4a3 は、RNA 干渉法で FSH β サブユニットを特異的に抑制していることが示された。Anxa5^{-/-} マウス下垂体では、Nr4a3 の増加に

よって FSH β サブユニット発現の低下がもたらされていたものと考えられる。FSH は卵胞に作用し、顆粒層細胞の増殖を促進し、卵胞を発達させ、同時にエストロジェン合成に必須なアロマターゼ合成を促進する[77]。以前の研究で Anxa5^{-/-}マウスの性周期期間、排卵数に違いのないことが示されており[105]、Anxa5^{-/-}マウスで観察された FSH 合成能の低下は、生理的な FSH 分泌量に影響するまでには至らないのかも知れない。

FSH β サブユニットの発現は、GnRH の刺激頻度に大きく影響される[6, 61, 94, 112]。刺激頻度が高い時には、むしろ発現は低くなる。近年、パルス頻度依存性 FSH β 転写調節に cAMP 応答配列結合蛋白質 (CREB) の関与することが報告された[15, 100]。高頻度 (~30 分間隔) の GnRH 刺激は、CREB の活性抑制性因子である Inducible cAMP early repressor (ICER) の発現を強く誘導し、CREB 依存性の FSH β 転写活性を抑制することが示された[15]。ICER と Nr4a3 に関連があるか否か不明だが、FSH β サブユニット発現に対する抑制機序の存在することは興味深い。本研究で明らかになった Nr4a3 の FSH 抑制作用についても、その生理的意義の解明が必要である。

以上の本研究の成果を模式図で示した (Fig. 4)。まず、① GnRH 受容体の G α_i 下流シグナルと IFN α のシグナルトランスダクションがクロストークし、共に Mx1 の転写を促進すること、② 種間相性の高いコンポジット型 Mx1 ペプチドの生成を調節する機序の存在することを明らかにし、コンポジット型 Mx1 は細胞増殖を抑制することから、この調節機序は細胞増殖調節に関わることが示唆された。③ GnRH は最初期遺伝子として新規転写因子 Nr4a3

の発現を誘導すること、GnRH は Anxa5 を促進するものの、④ Anxa5 は Nr4a3 誘導シグナルに対し抑制的に関与すること、⑥ Nr4a3 は FSH β 発現に対して特異的な抑制作用を持つことが明らかになった。この作用は、LH と FSH の分泌が異なることを説明する重要な要素となることが示唆された。本研究の成果は以上の如くであり、GnRH 受容体下流で機能する新規分子の存在を明らかにした。

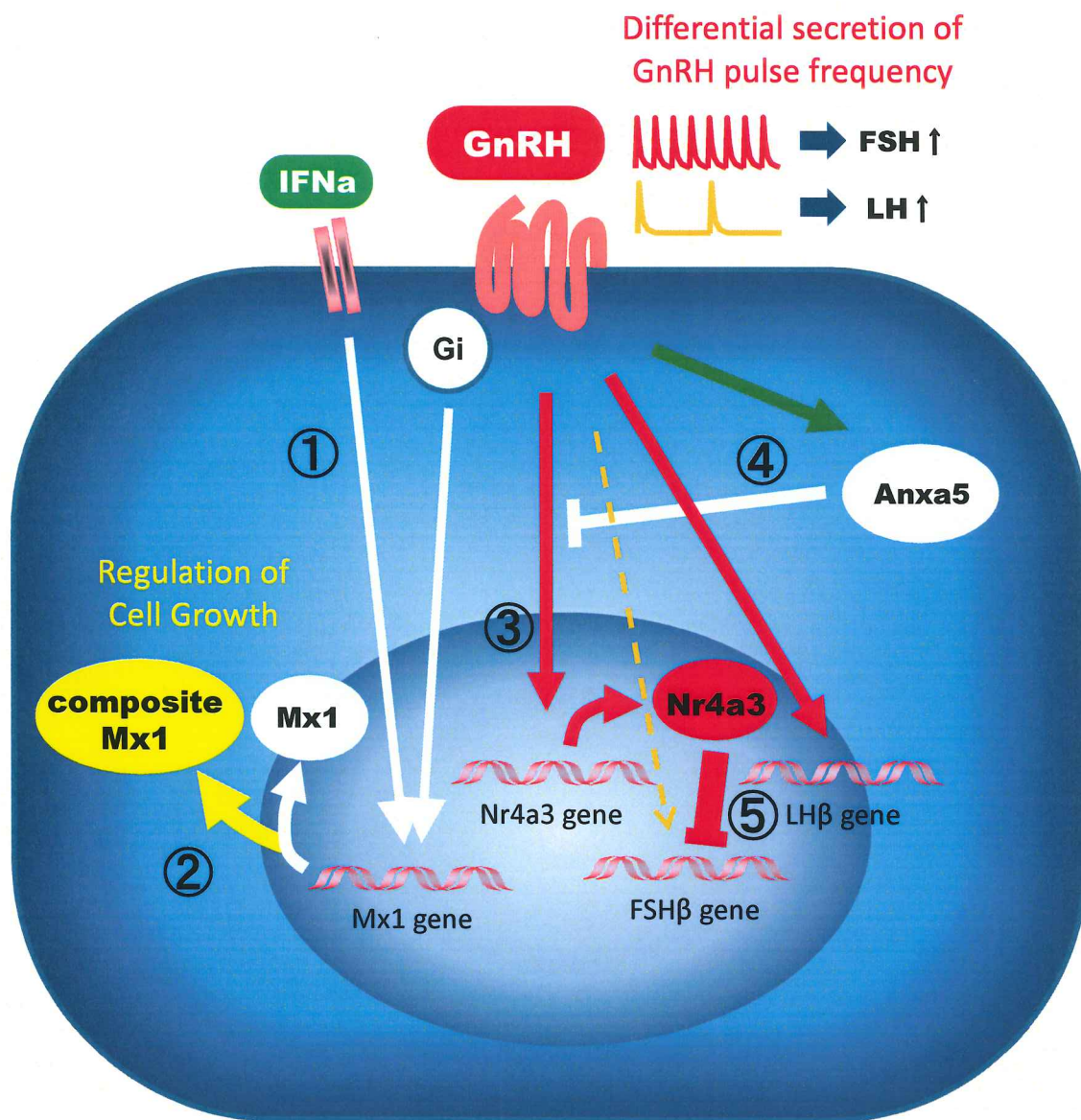


Fig. 4 ギナドトロフにおける2つの新規シグナル分子の調節と作用

①GnRH受容体Gαi下流シグナルとIFNαのシグナルトランスダクションはクロストークし、共にMx1の転写を促進する、②コンポジット型Mx1ペプチドの生成を調節する機序が存在する、③GnRHは最初期遺伝子として新規転写因子Nr4a3の発現を誘導する、④Anxa5はNr4a3産生を抑制する、⑤Nr4a3はFSHβ発現を抑制する。

謝 辞

本研究の遂行及び論文の作成にあたり御懇意な御指導、御検討を賜った汾陽光盛教授、並びに研究の遂行にあたり多大な御配慮を戴きました久留主志朗准教授に謹んで感謝の意を表します。また、適切な御助言と温かい励ましを戴きました東京大学大学院農学生命科学研究科米澤智洋准教授に謹んで感謝の意を表します。また、細やかな御心遣いを下さった中田美代子技能職員に心より御礼申し上げます。

また、発現ベクターの作製及びシーケンス解析、並びに本研究の遂行にあたり、寛大な御指導と御協力を戴きました明治大学農学部加藤幸雄教授、加藤たか子研究員並びに遺伝情報制御学研究室の皆様には深く御礼申し上げます。

そして、4年間の長きにわたり研究室内で苦楽を共にした Titaree Laoharatchatathanin さん並びに実験環境を整えてくださった獣医生理学研究室の学生の皆様には重ねて御礼申し上げます。

最後に、本研究のために犠牲となった実験動物に対し、深い感謝と追悼の意を表します。

引用文献

1. Arnheiter H, Skuntz S, Nøtboen M, Chang S and Meier E 1990 Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell* **62**:51-61
2. Barros CM, Betts JG, Thatcher WW and Hansen PJ 1992 Possible mechanisms for reduction of circulating concentrations of progesterone by interferon-alpha in cows: effects on hyperthermia, luteal cells, metabolism of progesterone and secretion of LH. *J Endocrinol* **133**:175-82
3. Barton GJ, Newman RH, Freemont PS and Crumpton MJ 1991 Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *Eur J Biochem* **198**:749-60
4. Bauer-Dantoin AC, Weiss J and Jameson JL 1995 Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology* **136**:1014-9
5. Bedrak E, Chap Z 1980 Serum concentrations of gonadotrophins and the hypothalamic content of gonadotrophin releasing hormone in male rats exposed to 35 degrees C. *J Endocrinol* **84**:9-16
6. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ and Knobil E 1978 Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* **202**:631-3
7. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR and Stark GR 2007 Interferons at age 50: past, current and

- future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* **6**:975-90
8. Bouter A, Gounou C, Bérat R, Tan S, Gallois B, Granier T, d'Estaintot BL, Pöschl E, Brachvogel B and Brisson AR 2011 Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun* **2**:270
 9. Brachvogel B, Welzel H, Moch H, von der Mark K, Hofmann C and Pöschl E 2001 Sequential expression of annexin A5 in the vasculature and skeletal elements during mouse development. *Mech Dev* **109**:389-93
 10. Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, von der Mark K, Hofmann C and Pöschl E 2003 Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* **23**:2907-13
 11. Brisson A, Mosser G and Huber R 1991 Structure of soluble and membrane-bound human annexin V. *J Mol Biol* **220**:199-203
 12. Burgus R, Butcher M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Amoss M, Blackwell R, Vale W and Guillemin R 1971 [Molecular structure of the hypothalamic factor (LRF) of ovine origin monitoring the secretion of pituitary gonadotropic hormone of luteinization (LH)]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **273**:1611-3
 13. Childs GV, Unabia G 2001 Epidermal growth factor and gonadotropin-releasing hormone stimulate proliferation of enriched population of gonadotropes. *Endocrinology* **142**:847-53
 14. Ching M 1982 Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus. Effect of

- anesthetics. *Neuroendocrinology* **34**:279-85
15. Ciccone NA, Xu S, Lacza CT, Carroll RS and Kaiser UB 2010 Frequency-dependent regulation of follicle-stimulating hormone beta by pulsatile gonadotropin-releasing hormone is mediated by functional antagonism of bZIP transcription factors. *Mol Cell Biol* **30**:1028-40
 16. Corssmit EP, Endert E, Sauerwein HP and Romijn JA 2000 Acute effects of interferon-alpha administration on testosterone concentrations in healthy men. *Eur J Endocrinol* **143**:371-4
 17. Crawford JL, Currie RJ and McNeilly AS 2000 Replenishment of LH stores of gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH after the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. *J Endocrinol* **167**:453-63
 18. Crawford JL, McNeilly AS 2002 Co-localisation of gonadotrophins and granins in gonadotrophs at different stages of the oestrous cycle in sheep. *J Endocrinol* **174**:179-94
 19. Crawford JL, McNeilly JR and McNeilly AS 2004 No evidence for pituitary priming to gonadotropin-releasing hormone in relation to luteinizing hormone (LH) secretion prior to the preovulatory LH surge in ewes. *Biol Reprod* **71**:224-35
 20. Currie RJ, McNeilly AS 1995 Mobilization of LH secretory granules in gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH during the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. *J Endocrinol* **147**:259-70
 21. Emons G, Ortmann O, Schulz KD and Schally AV 1997

- Growth-inhibitory actions of analogues of Luteinizing Hormone Releasing Hormone on tumor cells. *Trends Endocrinol Metab* 8:355-62
22. Emons G, Müller V, Ortmann O and Schulz KD 1998 Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:199-206
 23. Giambanco I, Pula G, Ceccarelli P, Bianchi R and Donato R 1991 Immunohistochemical localization of annexin V (CaBP33) in rat organs. *J Histochem Cytochem* 39:1189-98
 24. Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P and Schachner M 1992 Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71:565-76
 25. Grosse R, Schmid A, Schöneberg T, Herrlich A, Muhn P, Schultz G and Gudermann T 2000 Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G(q/11) proteins. *J Biol Chem* 275:9193-200
 26. Haisenleder DJ, Barkan AL, Papavasiliou S, Zmeili SM, Dee C, Jameel ML, Ortolano GA, el-Gewely MR and Marshall JC 1988 LH subunit mRNA concentrations during LH surge in ovariectomized estradiol-replaced rats. *Am J Physiol* 254:E99-103
 27. Haisenleder DJ, Katt JA, Ortolano GA, el-Gewely MR, Duncan JA, Dee C and Marshall JC 1988 Influence of gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude, frequency, and treatment duration on the regulation of luteinizing hormone (LH) subunit messenger

- ribonucleic acids and LH secretion. *Mol Endocrinol* **2**:338-43
28. Haller O, Kochs G 2002 Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**:710-7
29. Haller O, Gao S, von der Malsburg A, Daumke O and Kochs G 2010 Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J Biol Chem* **285**:28419-24
30. Hawes BE, Barnes S and Conn PM 1993 Cholera toxin and pertussis toxin provoke differential effects on luteinizing hormone release, inositol phosphate production, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor binding in the gonadotrope: evidence for multiple guanyl nucleotide binding proteins in GnRH action. *Endocrinology* **132**:2124-30
31. Hofland LJ, de Herder WW, Waaijers M, Zuijderwijk J, Uitterlinden P, van Koetsveld PM and Lamberts SW 1999 Interferon-alpha-2a is a potent inhibitor of hormone secretion by cultured human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:3336-43
32. Hsieh KP, Martin TF 1992 Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol* **6**:1673-81
33. Hug H, Costas M, Staeheli P, Aepli M and Weissmann C 1988 Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter. *Mol Cell Biol* **8**:3065-79
34. Imai A, Horibe S, Takagi A and Tamaya T 1997 Gi protein activation of gonadotropin-releasing hormone-mediated protein

- dephosphorylation in human endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* **176**:371-6
35. Janzen C, Kochs G and Haller O 2000 A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J Virol* **74**:8202-6
 36. Jonasch E, Haluska FG 2001 Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* **6**:34-55
 37. Jorgensen JS, Quirk CC and Nilson JH 2004 Multiple and overlapping combinatorial codes orchestrate hormonal responsiveness and dictate cell-specific expression of the genes encoding luteinizing hormone. *Endocr Rev* **25**:521-42
 38. Kakar SS, Winters SJ, Zacharias W, Miller DM and Flynn S 2003 Identification of distinct gene expression profiles associated with treatment of LbetaT2 cells with gonadotropin-releasing hormone agonist using microarray analysis. *Gene* **308**:67-77
 39. Kalra PS, Fuentes M, Sahu A and Kalra SP 1990 Endogenous opioid peptides mediate the interleukin-1-induced inhibition of the release of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone and LH. *Endocrinology* **127**:2381-6
 40. Kawaminami M, Etoh S, Miyaoka H, Sakai M, Nishida M, Kurusu S and Hashimoto I 2002 Annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in pituitary gonadotropes is induced by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and modulates GnRH stimulation of gonadotropin release. *Neuroendocrinology* **75**:2-11
 41. Kawaminami M, Tsuchiyama Y, Saito S, Katayama M, Kurusu S and

- Hashimoto I 2002 Gonadotropin-releasing hormone stimulates annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in the anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **291**:915-20
42. Kawaminami M, Shibata Y, Yaji A, Kurusu S and Hashimoto I 2003 Prolactin inhibits annexin 5 expression and apoptosis in the corpus luteum of pseudopregnant rats: involvement of local gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **144**:3625-31
43. Kawaminami M, Onoyama I, Yonezawa T and Kurusu S 2008 Gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor stimulation of Mx1 gene expression causes suppression of L β T2 gonadotrope cell growth. In: Annual meeting of Endocrine Society. San Francisco
44. Kawaminami M, Uematsu N, Funahashi K, Kokubun R and Kurusu S 2008 Gonadotropin releasing hormone (GnRH) enhances annexin A5 mRNA expression through mitogen activated protein kinase (MAPK) in LbetaT2 pituitary gonadotrope cells. *Endocr J* **55**:1005-14
45. Khan NU, Pulford KA, Farquharson MA, Howatson A, Stewart C, Jackson R, McNicol AM and Foulis AK 1989 The distribution of immunoreactive interferon-alpha in normal human tissues. *Immunology* **66**:201-6
46. Kimura A, Ohmichi M, Kurachi H, Ikegami H, Hayakawa J, Tasaka K, Kanda Y, Nishio Y, Jikihara H, Matsuura N and Murata Y 1999 Role of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res* **59**:5133-42

47. Kraus S, Levy G, Hanoch T, Naor Z and Seger R 2004
Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: role of c-Jun NH2-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer Res* **64**:5736-44
48. Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Arora KK and Catt KJ 2003
An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2969-74
49. Lackey BR, Gray SL and Henricks DM 1999 The insulin-like growth factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* **10**:201-17
50. Lee SH, Vidal SM 2002 Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Res* **12**:527-30
51. Liemann S, Lewit-Bentley A 1995 Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* **3**:233-7
52. Lim S, Luo M, Koh M, Yang M, bin Abdul Kadir MN, Tan JH, Ye Z, Wang W and Melamed P 2007 Distinct mechanisms involving diverse histone deacetylases repress expression of the two gonadotropin beta-subunit genes in immature gonadotropes, and their actions are overcome by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Biol* **27**:4105-20
53. Limonta P, Moretti RM, Dondi D, Marelli MM and Motta M 1994

- Androgen-dependent prostatic tumors: biosynthesis and possible actions of LHRH. *J Steroid Biochem Mol Biol* **49**:347-50
54. Limonta P, Moretti RM, Montagnani Marelli M and Motta M 2003 The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol* **24**:279-95
55. Liu F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM and Webster NJ 2002 Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *J Biol Chem* **277**:32099-108
56. Martinez-Gonzalez J, Badimon L 2005 The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res* **65**:609-18
57. Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP and Schachner M 1995 Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* **11**:281-6
58. Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bando S, Hosono T and Yamaguchi K 1998 The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int J Oncol* **12**:1237-43
59. Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A and Schally AV 1971 Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **43**:1334-9
60. Maudsley S, Davidson L, Pawson AJ, Chan R, López de Maturana R

- and Millar RP 2004 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a Galphai-coupling state of the type I GnRH receptor. *Cancer Res* **64**:7533-44
61. McNeilly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nicol L and McNeilly JR 2003 The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod Suppl* **61**:463-76
 62. Melamed P 2010 Hormonal signaling to follicle stimulating hormone beta-subunit gene expression. *Mol Cell Endocrinol* **314**:204-12
 63. Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K and Maudsley SR 2004 Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* **25**:235-75
 64. Mittag J, Oehr W, Heuer H, Hämäläinen T, Brachvogel B, Pöschl E and Bauer K 2007 Expression and thyroid hormone regulation of annexins in the anterior pituitary. *J Endocrinol* **195**:385-92
 65. Moritoh K, Yamauchi H, Asano A, Yoshii K, Kariwa H, Takashima I, Isoda N, Sakoda Y, Kida H, Sasaki N and Agui T 2009 Generation of congenic mouse strains by introducing the virus-resistant genes, Mx1 and Oas1b, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res* **57**:89-99
 66. Mosser G, Ravanat C, Freyssinet JM and Brisson A 1991 Sub-domain structure of lipid-bound annexin-V resolved by electron image analysis. *J Mol Biol* **217**:241-5
 67. Nagai N, Oshita T, Mukai K, Shiroyama Y, Shigemasa K and Ohama K 2002 GnRH agonist inhibits human telomerase reverse

- transcriptase mRNA expression in endometrial cancer cells. *Int J Mol Med* **10**:593-7
68. Nakajima Y, Yamada M, Taguchi R, Shibusawa N, Ozawa A, Tomaru T, Hashimoto K, Saito T, Tsuchiya T, Okada S, Satoh T and Mori M 2012 NR4A1 (Nur77) mediates thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of transcription of the thyrotropin beta gene: analysis of TRH knockout mice. *PLoS One* **7**:e40437
 69. Naor Z, Azrad A, Limor R, Zakut H and Lotan M 1986 Gonadotropin-releasing hormone activates a rapid Ca^{2+} -independent phosphodiester hydrolysis of polyphosphoinositides in pituitary gonadotrophs. *J Biol Chem* **261**:12506-12
 70. Naor Z 2009 Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol* **30**:10-29
 71. Ohsawa K, Imai Y, Ito D and Kohsaka S 1996 Molecular cloning and characterization of annexin V-binding proteins with highly hydrophilic peptide structure. *J Neurochem* **67**:89-97
 72. Oikawa M, Dargan C, Ny T and Hsueh AJ 1990 Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* **127**:2350-6
 73. Palmon A, Ben Aroya N, Tel-Or S, Burstein Y, Fridkin M and Koch Y 1994 The gene for the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone is expressed in the mammary gland of lactating rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4994-6
 74. Pearen MA, Muscat GE 2010 Minireview: Nuclear hormone receptor

- 4A signaling: implications for metabolic disease. *Mol Endocrinol* **24**:1891-903
75. Pollard HB, Guy HR, Arispe N, de la Fuente M, Lee G, Rojas EM, Pollard JR, Srivastava M, Zhang-Keck ZY and Merezhinskaya N 1992 Calcium channel and membrane fusion activity of synexin and other members of the Annexin gene family. *Biophys J* **62**:15-8
 76. Reutelingsperger CP, Hornstra G and Hemker HC 1985 Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem* **151**:625-9
 77. Richards JS 1994 Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* **15**:725-51
 78. Rieanrakwong D 2009 The function of mast cells in post-lactational involution of mammary glands. In: *Veterinary medicine: Kitasato University*
 79. Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S and Kawaminami M 2010 Immunohistochemical localization of annexin a5 in the mammary gland of rats: up-regulation of expression by pup removal. *J Vet Med Sci* **72**:19-22
 80. Rieanrakwong D, Ueki H, Ozaki Y, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Brachvogel B, Pöschl E and Kawaminami M 2011 Annexin A5 is required for the development of the mammary gland. In: *International conference on annexins. Barcelona*
 81. Rivier C, Erickson G 1993 The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 beta alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. II. Induction

- of pseudopregnant-like corpora lutea. *Endocrinology* **133**:2431-6
82. Rojas E, Pollard HB, Haigler HT, Parra C and Burns AL 1990
Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across
acidic phospholipid bilayer membranes. *J Biol Chem* **265**:21207-15
83. Rojas E, Arispe N, Haigler HT, Burns AL and Pollard HB 1992
Identification of annexins as calcium channels in biological
membranes. *Bone Miner* **17**:214-8
84. Sadler AJ, Williams BR 2008 Interferon-inducible antiviral
effectors. *Nat Rev Immunol* **8**:559-68
85. Sarkar DK, Chiappa SA, Fink G and Sherwood NM 1976
Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*
264:461-3
86. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW,
Nair RM, Debeljuk L and White WF 1971 Gonadotropin-releasing
hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and
follicle-stimulating hormones. *Science* **173**:1036-8
87. Schally AV 1999 Luteinizing hormone-releasing hormone analogs:
their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides* **20**:1247-62
88. Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K,
Plonowski A, Varga JL and Halmos G 2001 Hypothalamic hormones
and cancer. *Front Neuroendocrinol* **22**:248-91
89. Schlaepfer DD, Mehlman T, Burgess WH and Haigler HT 1987
Structural and functional characterization of endonexin II, a
calcium- and phospholipid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S*
A **84**:6078-82

90. Schlaepfer DD, Jones J and Haigler HT 1992 Inhibition of protein kinase C by annexin V. *Biochemistry* **31**:1886-91
91. Schwemmle M, Richter MF, Herrmann C, Nassar N and Staeheli P 1995 Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J Biol Chem* **270**:13518-23
92. Seeburg PH, Adelman JP 1984 Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* **311**:666-8
93. Shibata S, Sato H and Maki M 1992 Calphobindin I (annexin V) inhibits protein kinase C. *Tohoku J Exp Med* **166**:479-81
94. Smith MA, Vale WW 1981 Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on Cytodex beads. *Endocrinology* **108**:752-9
95. Staeheli P, Grob R, Meier E, Sutcliffe JG and Haller O 1988 Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol* **8**:4518-23
96. Stanislaus D, Ponder S, Ji TH and Conn PM 1998 Gonadotropin-releasing hormone receptor couples to multiple G proteins in rat gonadotrophs and in GGH3 cells: evidence from palmitoylation and overexpression of G proteins. *Biol Reprod* **59**:579-86
97. Taguchi K, Kumanogoh H, Nakamura S, Miyata S and Maekawa S 2007 Myelin protein zero is one of the components of the detergent-resistant membrane microdomain fraction prepared from rat pituitary. *J Mol Histol* **38**:79-85

98. Then Bergh F, Kümpfel T, Yassouridis A, Lechner C, Holsboer F and Trenkwalder C 2007 Acute and chronic neuroendocrine effects of interferon-beta 1a in multiple sclerosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* **66**:295-303
99. Thomas P, Mellon PL, Turgeon J and Waring DW 1996 The L beta T2 clonal gonadotrope: a model for single cell studies of endocrine cell secretion. *Endocrinology* **137**:2979-89
100. Thompson IR, Ciccone NA, Xu S, Zaytseva S, Carroll RS and Kaiser UB 2013 GnRH pulse frequency-dependent stimulation of FSHbeta transcription is mediated via activation of PKA and CREB. *Mol Endocrinol* **27**:606-18
101. Thompson IR, Kaiser UB 2013 GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol Cell Endocrinol*
102. Tian B, Pan Z and Lee JY 2007 Widespread mRNA polyadenylation events in introns indicate dynamic interplay between polyadenylation and splicing. *Genome Res* **17**:156-65
103. Towle CA, Treadwell BV 1992 Identification of a novel mammalian annexin. cDNA cloning, sequence analysis, and ubiquitous expression of the annexin XI gene. *J Biol Chem* **267**:5416-23
104. Turnbull AV, Rivier C 1997 Inhibition of gonadotropin-induced testosterone secretion by the intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta in the male rat. *Endocrinology* **138**:1008-13
105. Ueki H, Mizushina T, Laoharatchatathanin T, Terashima R, Nishimura Y, Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y,

- Brachvogel B, Pöschl E and Kawaminami M 2012 Loss of maternal annexin A5 increases the likelihood of placental platelet thrombosis and foetal loss. *Sci Rep* **2**:827
106. van der Blik AM 1999 Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* **9**:96-102
107. Verhelst J, Parthoens E, Schepens B, Fiers W and Saelens X 2012 Interferon-inducible protein Mx1 inhibits influenza virus by interfering with functional viral ribonucleoprotein complex assembly. *J Virol* **86**:13445-55
108. Vitale G, Caraglia M, van Koetsveld PM, Maroni P, Marra M, Colao A, Lamberts SW, Cavagnini F and Hofland LJ 2009 Potential role of type I interferons in the treatment of pituitary adenomas. *Rev Endocr Metab Disord* **10**:125-33
109. White CD, Stewart AJ, Lu ZL, Millar RP and Morgan K 2008 Antiproliferative effects of GnRH agonists: prospects and problems for cancer therapy. *Neuroendocrinology* **88**:67-79
110. Wiest WG 1968 On the function of 20 alpha-hydroxypregn-4-en-3-one during parturition in the rat. *Endocrinology* **83**:1181-4
111. Wiest WG, Kidwell WR and Balogh K 1968 Progesterone catabolism in the rat ovary: a regulatory mechanism for progestational potency during pregnancy. *Endocrinology* **82**:844-59
112. Wildt L, Häusler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE and Knobil E 1981 Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin

secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* **109**:376-85