

学 位 論 文 要 旨

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

Novel intracellular factors acting in the signal transduction  
pathway of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) receptor

北里大学大学院獣医畜産学研究科  
獣医学専攻 博士課程

寺島 涼太

TERASHIMA RYOTA

指導教授 汾陽 光盛

平成 2 5 年 度

2 0 1 3

1. 序論：性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）は、視床下部－下垂体－性腺軸の最上位に位置し、性腺の発達、排卵、妊娠の維持など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も呼ばれる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（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。一方、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によっても駆動される細胞内機序が変化する。GnRH と GnRH 受容体は、下垂体以外の組織にも発現しており、GnRH 受容体のシグナルトランスダクション経路及び動員される転写因子については未解明な点が多く残されている。マウスの性腺刺激ホルモン産生細胞（ゴナドトロフ）細胞株 L $\beta$ T2 に GnRH 作動薬を投与すると、細胞増殖が抑制される。この作用の発現過程で myxovirus resistance 1 (Mx1) の誘導されることが見出され、新規の GnRH シグナルトランスダクション因子であることが示唆された。同様に、Annexin A5 (Anxa5) が下垂体ゴナドトロフに多量に発現していること、GnRH シグナルで発現の促進されること、LH 分泌に促進的に関わることが明らかにされ、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。これら本研究室で新規に GnRH 受容体関連因子として同定された 2 つの細胞内分子のシグナルトランスダクションにおける役割、作用とその機序は明らかでない。そこで本研究では、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、その実体と相互作用する分子について解析した。

2. Mx1 遺伝子の新規スプライシングバリエント：Mx1 は、インターフェロン（IFN） $\alpha$ によって誘導される抗ウイルス遺伝子として知られる。まず、下垂体および L $\beta$ T2 に IFN $\alpha$ とその受容体の発現していること、IFN $\alpha$ が LH 分泌を抑制することを明らかにした。更に IFN $\alpha$ は、L $\beta$ T2 の細胞数を減少させ、Mx1 のノックダウンによりこの作用の消失することが明らかとなった。IFN $\alpha$ 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。実験動物マウスの Mx1 ゲノムには、部分的な欠失があり、抗ウイルス性は消失している。そこで、L $\beta$ T2 細胞を用いて Mx1 の転写産物を調べたところ、欠失を反映した転写産物（偽遺伝子型 Mx1 mRNA）と 3 つのスプライシングバリエントの他に、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 mRNA）の発現していることが明らかになった。コンポジット型 Mx1 mRNA は完全長 Mx1 遺伝子をもつ野生型マウス種 MSM/Ms やラット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。更に、IFN $\alpha$ はマウス組織の偽遺伝子型およびコンポジット型 Mx1 発現を増加させること、コンポジット型 Mx1 の発現は一過性であること、GnRH は偽遺伝子型 Mx1 の発現をより強く誘導することが明らかになった。偽遺伝子型とコンポジット型の Mx1 発現ベクターを L $\beta$ T2 に導入すると、特にコンポジット型 Mx1 で細胞数を減少させたことから、コンポジット型 Mx1 に細胞増殖抑制活性のあることが明らかになった。マウスの

コンポジット型 Mx1 mRNA は 94 アミノ酸残基のペプチドとなる。データベース解析によってヒト、ラット、ウシ、ブタ、ヒツジ、サル全てでコンポジット型 Mx1 mRNA が形成され得ること、エクソン III 部分に由来する 53 のアミノ酸残基は 100% 相同であることが明らかになった。以上の如く、IFN $\alpha$  がコンポジット型の Mx1 変異体の誘導を介して増殖調節をしていることが示唆された。

**3. GnRH-Anxa5 系に連動する新規転写因子の発見：**ラット下垂体前葉における Anxa5 遺伝子の発現動態を調べると、性周期中には FSH $\beta$  遺伝子の発現動態に類似することが観察された。更に、Anxa5 ノックアウトマウス (Anxa5<sup>-/-</sup>) 下垂体の遺伝子発現を調べると、Wild type (Wt) に比べ FSH $\beta$  と GH の発現の低いことが明らかになった。これらの結果は、ゴナドトロフにおいて Anxa5 が少なくとも FSH $\beta$  遺伝子発現に関わっていることを示唆している。Anxa5 に関連する因子を探すため、Wt および Anxa5<sup>-/-</sup> 下垂体前葉から cDNA を調製し、DNA マイクロアレイ解析を行った。Anxa5<sup>-/-</sup> 下垂体で 2 倍以上変化のある 16 の遺伝子を同定した。更に、GnRH に応答して、Nr4a3 と Mpz 遺伝子発現が増加すること、Akr1c18 が低下することを観察した。また、卵巣を摘出すると、Nr4a3 および Mpz の発現は有意に増加し、GnRH シグナルに誘導される新規の遺伝子を明らかにした。発現量と GnRH に対する反応性の高い Nr4a3 について更に解析を進めた。Nr4a3 は核内オーファン受容体として知られる転写因子である。まず、GnRH 作動薬を L $\beta$ T2 に作用させると Nr4a3 が一過性に増加すること、下垂体初代培養系で、Wt に比べ Anxa5<sup>-/-</sup> 細胞で GnRH の Nr4a3 誘導作用の亢進していることが明らかになり、ゴナドトロフの Anxa5 は GnRH によ

る Nr4a3 誘導を抑制していることが示唆された。この増加は蛋白合成阻害薬で抑制されないことから、Nr4a3 が最初期遺伝子であることも明らかになった。siRNA で Nr4a3 発現を抑えると、LH $\beta$ 、FSH $\beta$ 、共通の $\alpha$ サブユニット遺伝子の発現のうち、FSH $\beta$ を特異的に増加させることが明らかになり、Nr4a3 が FSH $\beta$ 転写を抑制することが明らかになった。更に、還流培養系を行い、GnRH の頻度を変えた拍動性刺激を与えたところ、Nr4a3 発現は同程度に増加したことから、刺激頻度に依存して細胞内 Nr4a3 量が増加し、FSH $\beta$ 転写を抑制することが示唆された。以上の如く、GnRH による FSH $\beta$ 転写調節に関わる新規シグナルトランスダクション因子として、Nr4a3 を発見した。

4. 総括：GnRH と IFN $\alpha$ のクロストークによって誘導される Mx1 遺伝子の転写後修飾によって作られるコンポジット型エクソンは、種間で構造の完全に一致するエクソン III の 53 アミノ酸残基を含む。この新規ペプチドの生成はほ乳類に共通の機序であることが示唆された。また、Anxa5<sup>-/-</sup>下垂体の遺伝子解析によって、GnRH 誘導性の FSH $\beta$ 特異的抑制因子として Nr4a3 を発見した。Nr4a3 は、GnRH の分泌パターンによって 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。

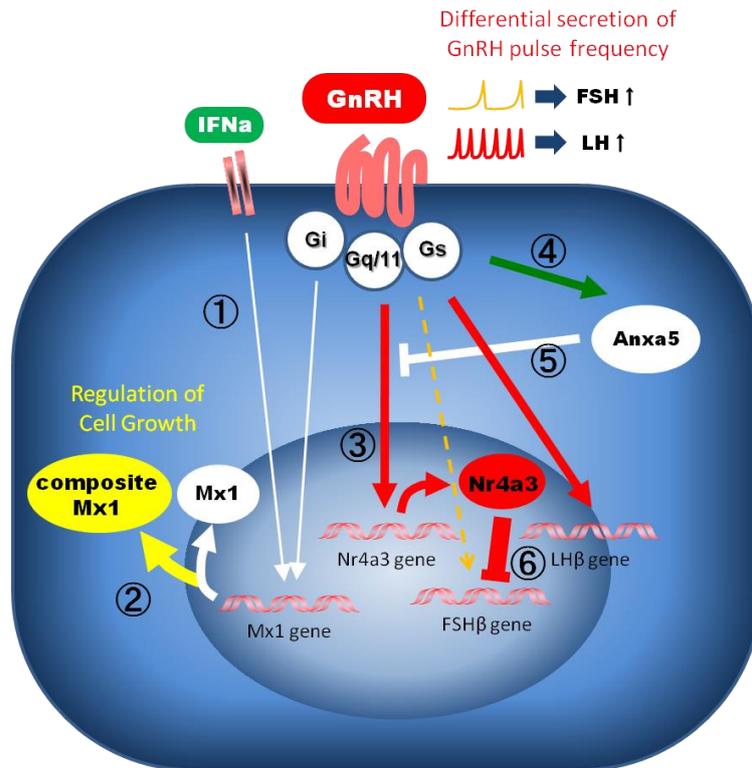


Fig. 4 ゴナドトロフにおける2つの新規シグナル分子の調節と作用  
 ①GnRH受容体G<sub>q</sub>11下流シグナルとIFN $\alpha$ のシグナルトランスダクションはクロストークし、共にMx1の転写を促進する、②コンボジット型Mx1ペプチドの生成を調節する機構が存在する、③GnRHは最初期遺伝子として新規転写因子Nr4a3の発現を誘導する、④GnRHはAnxa5合成を促進する。⑤Anxa5はNr4a3産生を抑制する、⑥Nr4a3はFSH $\beta$ 発現を抑制する。