

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07772

研究課題名(和文) OGR1ファミリー受容体に着目した生殖調節の修飾機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of modification mechanism of reproductive regulation focusing on OGR1 family receptor

研究代表者

戸村 秀明 (Tomura, Hideaki)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：70217553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生殖は視床下部-下垂体-性腺軸経路に沿って制御される。今回我々は、OGR1がラット下垂体のゴナドトロフ細胞、マウスゴナドトロフ細胞株に発現していること。またゴナドトロフ細胞株におけるpH低下に伴う遺伝子プロモーターの活性化にOGR1が関与することを明らかにした。さらにpH低下によるホルモン分泌応答にOGR1が関与する可能性を示唆する結果を得た。これらの結果は、OGR1が生殖調節に関与する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Reproductive regulation is controlled along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis pathway. Here we show that OGR1 is expressed in rat pituitary gonadotropic cells and a mouse gonadotropic cell line. We also revealed that OGR1 is involved in activation of gene promoter accompanying pH decrease in the gonadotropic cell line. Furthermore, it was suggested that OGR1 may be involved in hormone secretion response due to pH decrease. These results suggest that OGR1 may be involved in reproductive regulation.

研究分野：生理化学

キーワード：OGR1 ゴナドトロフ プロトン 生殖調節

### 1. 研究開始当初の背景

生殖とは関わりなく研究されてきた因子とその受容体が生殖調節に関与することが、遺伝子欠損マウスの解析により明らかとなりつつある。

たとえば、主にガン領域で研究されてきたリゾフォスファチジン酸 (LPA) に対する受容体 (LPA3) 欠損マウスでは、着床の異常が報告されている (Nature 2005)。また生理活性脂質やプロトンに対する受容体とされる GPR4 に対する欠損マウスでは、産仔数の減少が報告されている (Mol Cell Biol 2007)。生殖は、視床下部-下垂体-性腺軸に沿って制御される生殖刺激ホルモンや生殖ホルモンによって調節されているが、これらの因子が受容体を介して、どのように視床下部-下垂体-性腺軸を修飾しているのかに関しては、未解明の部分が多い。

我々はこれまで、上記 LPA の他、スフィンゴシン 1 - リン酸 (S1P)、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC)、リゾフォスファチジルコリン (LPC)、サイコシンなどの生理活性脂質に着目し、研究を進めてきた。これらの生理活性脂質は、G 蛋白共役型受容体 (GPCR) に作用後、種々の細胞内情報伝達系を活性化し、生理作用を発揮する。生理活性脂質に対する GPCR は、Edg ファミリーと、OGR1 ファミリーとに大別される。

Edg ファミリーに関して我々は、S1P が高密度脂質リポ蛋白 (HDL) に濃縮して存在すること (Biochemical J., 2000)、この HDL 中の S1P が Edg 受容体ファミリーを介して、内皮細胞の遊走促進作用 (Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2003)、内皮保護作用 (J Biol Chem., 2001)、平滑筋細胞の遊走阻害作用 (Atherosclerosis., 2005) を引き起こしていることを示してきた。

一方、GPR4 を含む OGR1 ファミリーは、生理活性脂質の受容体として最初に同定された。しかしながら、その再現性に関しては未だ議論が多い。ところが Ludwig, MG et al (Nature, 2003) は、この OGR1 ファミリーの中で OGR1, GPR4 が、Murakami, N. et al (J Biol Chem., 2004) は G2A が、我々 (J Biol Chem., 2004) は TDAG8 が、細胞外プロトンも感知し細胞内シグナル系を活性化することを見出した。

すなわち OGR1 ファミリーは、生理活性脂質の他、プロトンも感知するユニークな GPCR ファミリーである。さらに我々は、TDAG8 のアゴニストと報告されたサイコシンが、プロトンに対してアンタゴニストとして作用することも見出した (J Biol Chem., 2004)。サイコシンのこのアンタゴニスティックな作用は、TDAG8 に限らず OGR1, GPR4 受容体に対しても発揮される (J Biol Chem., 2004)。

今回我々は、「OGR1 がゴナドトロフ細胞に発現している」ことを見出した。また「GPR4 が子宮内膜に発現している」との情

報を得た。ホルモンの分泌・作用と OGR1 ファミリーの関連に関して我々は、臍島に発現する OGR1 がインスリン分泌を修飾し、血糖調節に影響を与えていることを見出している (Endocrinology., 2012)。これらの結果は、OGR1 ファミリーがホルモンの産生・作用を修飾し、生殖機能を調節している可能性を示唆している。現在までに生殖調節の観点から、OGR1 ファミリーを解析した報告は見当たらない。

### 2. 研究の目的

生殖は、視床下部-下垂体-性腺軸経路に沿って制御される、生殖刺激ホルモンや生殖ホルモンによって調節されている。今回我々は、OGR1 ファミリーがゴナドトロフ細胞や子宮内膜に発現するという予備知見を得た。しかしながら OGR1 ファミリーがどのようにこのメイン経路を修飾しているのかに関しては未解明の部分が多い。本研究では OGR1 ファミリーがこのメイン経路を調節しているとの仮説を立て、この仮説の検証を試みる。

### 3. 研究の方法

「ゴナドトロフ細胞株における OGR1 ファミリーの機能解析」

マウスゴナドトロフ細胞株では OGR1 が発現していることを今回、見出した。我々は OGR1 を介したこれらのシグナル系の活性化が、ゴナドトロフ細胞の FSH, LH の合成・分泌を修飾していると、推定している。

そこでこのゴナドトロフ細胞を用いて、

- (1) 低 pH メディウム、生理活性脂質単独、または GnRH と共に刺激し、CRE-, SRE-, NFAT-プロモーターの活性化 (レポーターアッセイ)、FSH, LH の発現 (RT-PCR)、FSH, LH の分泌 (蛍光標識、蛍光標識を利用した分泌量の測定) を未処理細胞のものと比較する。
- (2) OGR1 の過剰発現または特異的 siRNA を用いて OGR1 の発現を抑制した条件下で、低 pH メディウム、生理活性脂質単独、または GnRH と共に刺激し、CRE-, SRE-, NFAT-プロモーターの活性化、FSH, LH の発現、FSH, LH の分泌応答をコントロール細胞のものと比較する。
- (3) 上記細胞応答に関与する細胞内シグナル伝達経路を、各種シグナル伝達系阻害剤を用いて解析する。
- (4) ラット下垂体初代細胞を用いて細胞株で観察された応答がネイティブな細胞でも再現されるかどうかを検証する。

「子宮内皮細胞における OGR1 ファミリーの機能解析」

ラット子宮内皮細胞では GPR4 の発現を観察している。

そこで各種子宮内皮細胞株を用いて、

(1) GPR4 の発現を RT-PCR 法で確認する。  
(2) 発現が確認されれば、低 pH メディウム、生理活性脂質で刺激し、DNA 合成(細胞増殖)、細胞遊走(ボイデンチャンパー法)、エストロゲンによる PR の発現抑制(RT-PCR, ウェスタン)を未処理細胞のものと比較する。GPR4 の発現が認められた細胞株に対して

(1) GPR4 特異的 siRNA を用いて GPR4 の発現を抑制した条件下で、低 pH メディウム、生理活性脂質で刺激し、DNA 合成、細胞遊走、エストロゲンによる PR の発現抑制をコントロール細胞のものと比較する。

(2) 内皮細胞の増殖、遊走、PR の発現修飾の細胞内シグナル伝達経路を、各種シグナル伝達系阻害剤を用いて解析する。

GPR4 の発現が観察されているラット子宮内膜細胞を用いて、

(3) 低 pH メディウム、生理活性脂質で刺激し、DNA 合成(細胞増殖)、細胞遊走(ボイデンチャンパー法)、エストロゲンによる PR の発現抑制(RT-PCR, ウェスタン)を未処理細胞のものと比較する。

(1) GPR4 特異的 siRNA を用いて GPR4 の発現を抑制し、低 pH メディウム、生理活性脂質で刺激し、DNA 合成、細胞遊走、エストロゲンによる PR の発現抑制をコントロール細胞のものと比較する。

(2) 内皮細胞の増殖、遊走、PR の発現修飾の細胞内シグナル伝達経路を、各種シグナル伝達系阻害剤を用いて解析する。

#### 4. 研究成果

マウスゴナドトロフ細胞株に OGR1 が発現していることを RT-PCR で確認した。そこでメディウムの pH の低下によって、SRE-, NFAT-, CRE-プロモーターが活性化するのはどうかを、レポーターアッセイを用いて測定した。その結果、pH の低下にともない各プロモーターが活性化する傾向が見られた。この活性化が OGR1 を介しているのかどうかを調べるため、この細胞株に OGR1 を過剰発現させた。その結果、これらプロモーターの活性化が観察された。このことは、pH の低下は OGR1 を介してゴナドトロフの遺伝子発現を促進する可能性を示唆している。さらに本年度はこのゴナドトロフ細胞株からの GnRH 刺激によるホルモン分泌応答に対する OGR1 の影響について調べた。GnRH 刺激によるホルモン分泌は、メディウム pH の低下に伴い減少する傾向が観察された。この細胞株に OGR1 を過剰発現させると分泌の減少が促進されることから、OGR1 は GnRH によるホルモン分泌を抑制する機能を有する可能性が示唆された。

OGR1 が実際にネイティブな細胞に発現しているのかどうかを調べた。ラット下垂体を用いて、OGR1 の発現細胞を in situ hybridization を用いて、また LH の発現細胞(ゴナドトロフ細胞を表す)を、免疫組織染色を用いて検出した。その結果、LH 発現細胞

の一部の細胞が OGR1 を発現していた。この結果は、ゴナドトロフ細胞株だけでなく、実際にネイティブなゴナドトロフにも OGR1 が発現していることを示している。また下垂体内の LH 発現細胞は一種類ではなく、OGR1 陽性の細胞と陰性の細胞の 2 種類が存在することが明らかとなったが、その機能の差は不明である。本年度は、子宮内膜細胞における OGR1 ファミリーの解析も行った。まずラット子宮内膜より RNA を調整し、OGR1 ファミリー遺伝子の発現を調べたところ、GPR4 の発現が検出された。しかしながら、ヒト子宮内膜細胞他、調べたすべての子宮内膜細胞株において GPR4 の発現を検出できなかった。そこで子宮内膜細胞株への GPR4 の強制発現、またラット子宮内膜細胞への GPR4 に対する siRNA の導入を試みたが、ほとんど導入がなされていない。現在、導入効率を上げる方法を検討中である。

OGR1 のゴナドトロフ機能への関与をさらに調べるため、マウスゴナドトロフ細胞株からのホルモン分泌を簡易的またリアルタイムに測定できる系の開発と、OGR1 のさらなるキャラクタリゼーションを行った。その結果、ガウシアルシフェラーゼを利用すると受容体刺激によるホルモン分泌を経時的、かつ簡便に測定できることを明らかとした。この結果はガウシアルシフェラーゼをホルモン分泌経路の解析に使用できることを示している、また OGR1 はプロトン以外に金属によっても活性化されることが報告されたが、本研究で GPR4 は金属によって活性化しないこと、すなわち金属を用いることにより、プロトン刺激では区別できない OGR1 と GPR4 を介した応答が区別できることを明らかとした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Mochimaru Y, Negishi J, Murakami S, Musha S, Sato K, Okajima F, and Tomura H. Metals differentially activate ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 in various species. *Zoolog Sci.* 35, 109-114 (2018) 査読有
2. Negishi J, Omori Y, Shindo M, Takanashi H, Musha S, Nagayama S, Hirayama J, Nishina H, T. N, Mogi C, Sato K, Okajima F, Mochimaru Y and Tomura H. Manganese and cobalt activate zebrafish ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 but not GPR4. *J Recept Signal Transduct Res.* 37, 401-408 (2017) 査読有
3. Satou K, Mochimaru Y, Nakakura T, Kusada T, Negishi J, Musha S, Yoshimura N, Kato Y and Tomura H. Easy detection of hormone secretion from LbetaT2

- cells by using *Gussia luciferase*. *J Reprod Dev.* 63, 199-204 (2017) 査読有
4. Ichijo Y, Mochimaru Y, Azuma M, Satou K, Negishi J, Nakakura T, Oshima N, Mogi C, Sato K, Matsuda K, Okajima F and Tomura H. Two zebrafish G2A homologs activate multiple intracellular signaling pathways in acidic environment. *Biochem Biophys Res Commun.* 469, 81-86 (2016) 査読有
  5. Tobo A, Tobo M, Nakakura T, Ebara M, Tomura H, Mogi C, Im DS, Murata N, Kuwabara A, Ito S, Fukuda H, Arisawa M, Shuto S, Nakaya M, Kurose H, Sato K, and Okajima F. Characterization of Imidazopyridine Compounds as Negative Allosteric Modulators of Proton-Sensing GPR4 in Extracellular Acidification-Induced Responses. *PLoS One.* 10 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0129334. 査読有
- [学会発表](計20件)
1. 村上奨, 持丸雄太, 東野瑚子, 吉村名央, 戸村秀明 金属イオンによる OGR1 活性化の差を生む部位の探索. *Conbio2017* 2017年12月6-9日, 神戸ポートアイランド(神戸)
  2. 武者詩織, 根岸潤, 永山純礼, 持丸雄太, 戸村秀明 金属イオンによる OGR1, GPR4 を介した応答解析. *Conbio2017* 2017年12月6-9日, 神戸ポートアイランド(神戸)
  3. Mochimaru Y, Murakami S, Yoshimura N, Tomura H. Metal ions may modulate protoninduced OGR1 activation Fourth World Congress of Reproductive Biology 2017年9月27-29日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄)
  4. Negishi J, Musha S, Nagayama S, Tomura H. Effect of metal ions on the activation of zebrafish ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 Fourth World Congress of Reproductive Biology 2017年9月27-29日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄)
  5. 武者詩織, 根岸潤, 永山純礼, 持丸雄太, 戸村秀明 ゼブラフィッシュ OGR1, GPR4 の金属による応答解析 第32回日本下垂体研究会学術集会 2017年8月2-4日 鬼怒川グランドホテル(栃木)
  6. 持丸雄太, 戸村秀明 OGR1 の金属応答性は生物種間で異なる 2017年8月2-4日 鬼怒川グランドホテル(栃木)
  7. 村上奨, 持丸雄太, 戸村秀明 ACTH 産生細胞株における GPHR の機能解析 2017年8月2-4日 鬼怒川グランドホテル(栃木)
  8. 高梨颯, 根岸潤, 大森由花, 武者詩織, 永山純礼, 戸村秀明 ゼブラフィッシュ OGR1 は金属イオンにより活性化される 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30-12月5日 パシフィコ横浜(横浜)
  9. 鳥海拓也, 持丸雄太, 金子涼, 吉村名央, 東野瑚子, 戸村秀明 生物種による各金属イオンによる OGR1 活性化様式の多様性 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30-12月5日 パシフィコ横浜(横浜)
  10. 持丸雄太, 根岸潤, 大森由花, 高梨颯, 武者詩織, 戸村秀明 生物種間における金属イオンによる OGR1 活性化の比較 第109回日本繁殖生物学会大会 2016年9月11-15日 麻布大学(東京)
  11. Negishi J, Omori Y, Nagayama S, Tomura H. Effect of metal ions on the activation of zebrafish ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016年9月1-5日, ホノルル(ハワイ)
  12. Mochimaru Y, Azuma M, Negishi J, Tomura H. Proton activates OGR1, GPR4 and G2A homologs of zebrafish International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016年9月1-5日, ホノルル(ハワイ)
  13. Mochimaru Y, Azuma M, Negishi J, Tomura H. Proton activates OGR1, GPR4 and G2A homologs of zebrafish. International Society for Stem Cell Research 2016年6月22-25日 サンフランシスコ(カリフォルニア)
  14. Negishi J, Omori Y, Takanashi H, Kusada T and Tomura H. Metals activate ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 of zebrafish *CompBiol* 2015 広島大会 2015年12月11-13日 JMS アステールプラザ(広島)
  15. Mochimaru Y, Satou K, Shindo M, Kato Y and Tomura H. Analysis of LbT2 cell responses through ovarian cancer G-protein coupled receptor 1 *CompBiol* 2015 広島大会 2015年12月11-13日 JMS アステールプラザ(広島)
  16. 佐藤一裕, 根岸潤, 中倉敬, 草田智之, 加藤幸雄, 戸村秀明 ガウシアルシフェラーゼを利用した高感度ホルモン分泌アッセイ系の構築の試み 第108回日本繁殖生物学会 2015年9月17-20日 宮崎大学(宮崎)
  17. 佐藤一裕, 根岸潤, 中倉敬, 草田智之, 加藤幸雄, 戸村秀明 ガウシアルシフェラーゼを利用した高感度ホルモン分泌アッセイ系の構築の試み 第108回日本繁殖生物学会 2015年9月17-20日 宮崎大学(宮崎)

18. 持丸雄太, 新堂真実, 西田真実, 金子諒, 加藤幸雄, 戸村秀明 プロトン刺激による性腺刺激ホルモン産生細胞株の応答解析 第 108 回日本繁殖生物学会 2015年9月17-20日宮崎大学(宮崎)
19. 持丸雄太, 新堂真実, 西田真実, 金子諒, 加藤幸雄, 戸村秀明 プロトン刺激によるマウス下垂体細胞株 L T2 の応答解析 第 30 回日本下垂体研究会 2015年8月5-7日 宇奈月国際会館セレネ(富山)
20. 佐藤一裕, 根岸潤, 中倉敬, 草田智之, 大森由花, 加藤幸雄, 戸村秀明 ガウシアルシフェラーゼの L T2 細胞におけるホルモン分泌アッセイ系の構築への利用 第 30 回日本下垂体研究会 2015年8月5-7日 宇奈月国際会館セレネ(富山)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

戸村 秀明 (TOMURA HIDEAKI)  
明治大学・農学部・専任教授  
研究者番号: 70217553