

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17536

研究課題名（和文）ゴナドトロピン分泌へのRNA結合タンパクZFP36の役割について

研究課題名（英文）The role of ZFP36 as RNA-binding protein in gonadotropin secretion system

研究代表者

寺坂 友博 (Terasaka, Tomohiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80721935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：RNA結合タンパクであるZFP36は、mRNAのAU-リッチ領域に特異的に結合しmRNAの代謝を促進させる。ゴナドトロープL T2細胞において、ELAVL1がゴナドトロピン分泌刺激ホルモン(GnRH)受容体およびGnRH刺激による最初期遺伝子mRNAを安定化する。ゴナドトロピンの産生および分泌にLH遺伝子の発現調節を介す影響がわかってきた。それに対して、ZFP36はGnRHの刺激により発現が増加しmRNAの分解に働く。本研究では、ZFP36の作用を検討することにより、ELAVL1のmRNA代謝を介するゴナドトロピン調節機構の解明およびZFP36と協調したmRNA代謝機構が明らかになってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RZFP36のゴナドトロープ細胞における機能を研究することにより、これまで不明であったゴナドトロピン産生・分泌機構へのRNA結合タンパクの関連を解明することができる。ELAVL1とZFP36は代表的なRNA結合タンパクであり、安定化と分解の相反する機能を持ち、お互いに成熟mRNAの寿命をコントロールしゴナドトロピンの発現調節を行っている可能性がある。臨床面では下垂体ゴナドトロープ細胞による性腺ホルモン分泌調節のアプローチができる可能性がある。女性の不妊の原因である性腺ホルモン分泌異常症に分類される多嚢胞性卵巣症候群やゴナドトロピン分泌低下症の治療に応用できると考える。

研究成果の概要（英文）：RNA-binding protein specifically binds to the AU-rich elements of mRNA and promotes mRNA metabolism. In the gonadotrope model L T2 cells, ELAVL1 stabilizes gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptors and GnRH-stimulated immediate early gene mRNAs. This action has then been shown to affect gonadotropin production and secretion via regulation of LH gene expression. In contrast, RNA-binding protein ZFP36 is upregulated by GnRH stimulation and specifically works to degrade bound mRNAs. By examining the effects of ZFP36 in gonadotrope cells, the present study provides insight into the mechanism of gonadotropin regulation via ELAVL1 mRNA effect and the mechanism of mRNA metabolism in concert with ZFP36.

研究分野：内分泌学

キーワード：RNA結合タンパク ゴナドトロピン LH 下垂体 LbetaT2細胞 ZFP36

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の下垂体ゴナドトロフ細胞におけるゴナドトロピン(LH, FSH)分泌は、間脳視床下部のゴナドトロピン分泌刺激ホルモン(GnRH)ニューロンによる律動的な分泌刺激により制御される。女性不妊の原因で最も占める割合の高い排卵障害には、生殖内分泌機能不全による排卵障害として代表される多嚢胞性卵巣症候群や視床下部性無月経が含まれ(Thurston et al. J Clin Pathol 72: 579-587, 2019)、視床下部・下垂体機能による生殖内分泌制御が重要な位置を占める。

生殖内分泌機構において RNA 結合タンパクの重要性が示唆され、それを証明するため我々はマウス下垂体ゴナドトロフ細胞株である L T2 細胞の GnRH 刺激による Immediate Early Genes: IEG の発現および同様に AU-リッチ領域をもつ GnRH 受容体(Gnrhr)遺伝子の発現制御を検討した。L T2 細胞において ELAVL1 のノックダウンにより、ゴナドトロピン分泌の低下を認めた。

また、RNA 結合タンパク ZFP36 は、ELAVL1 と同様に mRNA の AU-リッチ領域に結合し、ELAVL1 の安定化作用とは対照的に mRNA の分解を促進する作用を持つ(Lai et al. J Biol Chem 277: 9606-9613, 2002)。L T2 細胞では GnRH 刺激により ZFP36 の発現が増加することがわかっており、現在 ELAVL1 と ZFP36 の協調作用について検討を進めている。

2. 研究の目的

我々は、「RNA 結合タンパク ZFP36 がゴナドトロピン産生・分泌制御に重要な役割を果たす。」と仮説をたて、問い 1) ZFP36 はゴナドトロピン調節遺伝子 mRNA を通して LH/FSH の産生制御を行うか?、問い 2) GnRH 刺激による ZFP36 の発現増加はどのようにして起こるか?、について検討を進めている。

RNA 結合タンパク ZFP36 のゴナドトロフ細胞における機能を研究することにより、これまで不明であったゴナドトロピン産生・分泌機構への RNA 結合タンパクの関連を解明することができると考える。ELAVL1 と ZFP36 は代表的な RNA 結合タンパクであり、安定化と分解の相反する機能を持ち、お互いに成熟 mRNA の寿命をコントロールすることによりゴナドトロピンの発現調節を行っている可能性がある。この両者のゴナドトロピン発現調節機構をひもとくことによって、臨床面では下垂体ゴナドトロフ細胞による性腺ホルモン分泌調節のアプローチができる可能性がある。ひいては、女性の不妊の原因である性腺ホルモン分泌異常症に分類される多嚢胞性卵巣症候群やゴナドトロピン分泌低下症の治療に応用できると考える。

3. 研究の方法

問い 1) ZFP36 はゴナドトロピン調節遺伝子 mRNA を通して LH/FSH の産生制御を行うか? にたいし、FLAG タグ付加 ZFP36 過剰発現 L T2 細胞、ZFP36 ノックアウト L T2 細胞を用いた検討を行う。

レンチウイルス粒子トランスダクションシステム(タカラバイオ)を使用して FLAG 付加 ZFP36 過剰発現 L T2 細胞の安定発現株(ZFP36-FLAG-L T2)を作出した。コントロール発現株である pLVX-L T2 細胞と比較することにより、ZFP36 の L T2 細胞における作用を検討する。具体的には、上記 2 細胞について GnRH の存在下・非存在下でゴナドトロピン遺伝子および関連遺伝子の発現を定量 PCR で比較する。また、GnRH の存在下・非存在下におけるタンパク発現量の解析をウェスタンブロットティング法にて検討する。

ZFP36 非存在下におけるゴナドトロピン(LH/FSH)産生制御の検討として、CRISPR-Cas9 システム(System Biosciences; SBI)を用いたトランスフェクションと蛍光セルソートにより ZFP36 ノックアウト L T2 細胞株を作製する。と同様に定量 PCR とウェスタンブロットティング法にて検討する。

問い 2) GnRH 刺激による ZFP36 の発現増加はどのようにして起こるか? について、ゴナドトロフ細胞の GnRH による ZFP36 の制御のしくみはわかっておらず、具体的には、GnRH シグナルに重要な MAPK 阻害剤(U0126, SB203580, SP600125)、PKC 阻害剤などによるシグナル阻害実験により ZFP36 発現をウェスタンブロットティングにより定量する。

4. 研究成果

1) ZFP36 の発現シグナルの特定について

L T2 細胞を用い、GnRH による ZFP36 の発現シグナルの特定をすすめた。細胞内シグナル阻害剤を用いて GnRH 刺激による ZFP36 発現変化を WB 法にて確認した。L T2 細胞において、GnRH 刺激による ZFP36 発現は、PKC 阻害剤(Gö6983)および ERK 阻害剤(U0126)により選択的に阻害された(図)。ZFP36 は、GnRH 刺激下で PKC-MAPK-ERK パスウェイにより発現制御が行われることが証明された。

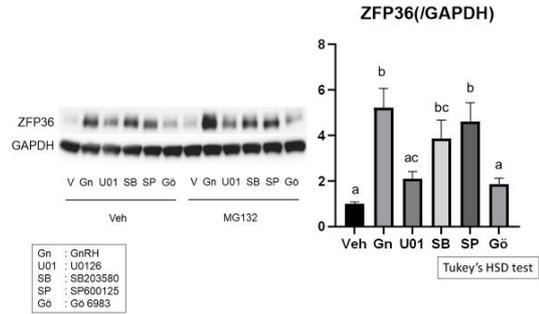
2) パルス状 GnRH 刺激による ZFP36 の発現について

L T2 細胞では、GnRH パルス状刺激(5分間)により ZFP36 の発現および産生が60分をピークとして ZFP36 の一過性発現を認めることがわかった(図)。

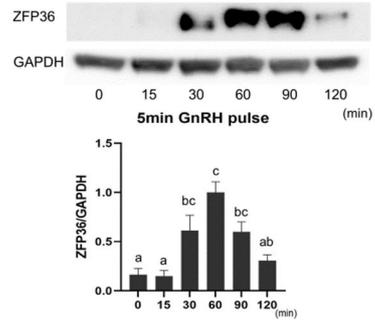
3) ZFP36 による L T2 細胞のゴナドトロピン産生制御について

FLAG タグ付加 ZFP36 の高発現安定株およびセルソーティングを用いた ZFP36 ノックアウト株 L T2 を作製し、ZFP36 高発現株では定量 RT-PCR 法により GnRH による Egr1(IEG の一種)の発現誘導が抑制され、3'UTR に ARE を有する Gnrhr の発現も ELAVL1 ノックダウン細胞と同様にコントロールと比較して低下した。さらに、ウェスタンブロット法にて GnRH の刺激による EGR1 の産生が ZFP36 高発現株では減少することが示された。また、ゴナドトロピン分泌に直接作用する ERK のリン酸化においても ZFP36 高発現株ではコントロール株に比較して抑制されることが分かった。

図① ZFP36タンパク発現にPKC-MAPK-ERKパスウェイが関与する



図② パルス状GnRH刺激が細胞内ZFP36タンパク発現のトリガーとなる



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Esparza LA, Terasaka T, Lawson MA, Kauffman AS	4. 巻 161
2. 論文標題 Androgen suppresses in vivo and in vitro LH pulse secretion and neural Kiss1 and Tac2 gene expression in female mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 bqaa191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endoctr/bqaa191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nicholas Dequina A., Knight Vashti S., Tonsfeldt Karen J., Terasaka Tomohiro, Molinar-Inglis Olivia, Stephens Shannon B. Z., Trejo JoAnn, Kauffman Alexander S., Mellon Pamela L., Lawson Mark A.	4. 巻 10
2. 論文標題 GLUT1-mediated glycolysis supports GnRH-induced secretion of luteinizing hormone from female gonadotropes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69913-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Morimoto E, Inagaki K, Komatsubara M, Terasaka T, Itoh Y, Fujisawa S, Sasaki E, Nishiyama Y, Hara T, Wada J	4. 巻 6
2. 論文標題 Effects of Wnt- Catenin Signaling and Sclerostin on the Phenotypes of Rat Pheochromocytoma PC12 Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Endocr Soc.	6. 最初と最後の頁 bvac121.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvac121.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺坂友博、藤澤 諭、西山悠紀、森本栄作、小松原基志、原 孝行、越智可奈子、Mark A. Lawson、稲垣兼一、和田 淳
2. 発表標題 ゴナドトロープL T2細胞におけるGnRH刺激ZFP36発現のPKC-MAPK-ERKパスウェイの関与とゴナドトロピン発現調節機構について
3. 学会等名 第94回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎貴裕、寺坂友博、藤澤 諭、伊藤慶彦、森本栄作、原 孝行、Mark A. Lawson、稲垣兼一、和田 淳
2. 発表標題 ゴナドトロープL T2細胞におけるGnRH刺激ZFP36発現のPKC-MAPK-ERKパスウェイの関与とゴナドトロピン発現調節機構について
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------