

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月16日現在

機関番号：17102

研究種目：萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659782

研究課題名（和文）生殖制御における未知の分子基盤を解き明かす新規分子の機能

研究課題名（英文）The role of a novel molecule in the regulation of reproductive system

研究代表者

平田 雅人 (HIRATA MASATO)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：60136471

研究成果の概要（和文）：雌の生殖系器官の機能における新規分子 PRIP (phospholipase-C-related but catalytically inactive protein) の役割を明らかにすることを目的として本研究を遂行した。その結果、PRIP は性周期を司る性腺刺激ホルモンの分泌制御に関与し、おそらく、それを介して、卵巣での卵の成熟過程あるいは排卵時の制御に機能していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that PRIP plays an important role in female reproductive system, particularly in gonadotropins secretion and in the regulation of ovarian follicle maturation and/or ovulation processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学、性周期、性腺刺激ホルモン、排卵、卵胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、PRIP (phospholipase-C-related but catalytically inactive protein) を見だし、Ins(1,4,5)P₃ 結合性であることに鑑みて Ca²⁺ シグナリングにおける役割を解明する研究を行うとともに、PRIP と結合する分子を探索し、PP1 (protein phosphatase-1) と GABARAP (GABA_A receptor-associated protein) の2分子を同定した。これらの結合分子が GABA_A 受容体機能への関わりを示唆したので PRIP のノックアウトマウス (PRIP-KO マウス) を作製し、GABA_A 受容体機能に関わる PRIP の役割について検討してきた。

表現型を更に観察していく過程で、野生型に比べて出産頻度や1回当たりの出産仔数、総出産仔数が少ないなどの生殖に関わる異常な表現型が明らかになってきた。これらの現象は、これまでに我々が蓄積した PRIP に関する知見からは予期出来ないことであり、F1 世代で見られたこれらの表現型は世代を進めるに連れて顕著になった。交配実験の結果、この生殖に関わる表現型の原因が、雌にあることが明らかになり、また、雌の膈壁垢を採取し性周期をみる smear test を行ったところ、PRIP-KO マウスでは稀発排卵もしくは無排卵を示唆する性周期の乱れがあった。性腺刺激ホルモンの血中濃度も高値を示した。これらの現象は、PRIP 欠損で生じた異

常であり、PRIP が生殖機構の制御に関わることが強く示唆されたので、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

PRIP 欠損が雌の生殖系器官の何処にどのような異常をもたらすのかを明らかにし、次いでその分子基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

① PRIP の有無によって生じる生殖に関わる器官への影響

野生型、PRIP-KO マウスについて、生後3週、7週、21週の各週齢において、個体毎に体重および下垂体、子宮、卵巣、精巣、副腎などの生殖にかかわる器官の大きさ、形態、重量等を計測し、比較検討した。また、それらの器官についてそれぞれ組織切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色等を行い、得られた組織像について婦人科系の疾患の病理所見も踏まえて比較検討した。

② 下垂体前葉における PRIP の役割

・PRIP 遺伝子について RNA 干渉用のコンストラクトを作製し、この培養細胞において PRIP 遺伝子の RNA 干渉を行い、PRIP の発現を抑制した細胞株を構築した。また、PRIP を過剰発現させた細胞株も構築した。

・この変異細胞と野生型細胞において、各性腺刺激ホルモン (LH, FSH) の産生および分泌量、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化等における差異を、RT-PCR、ウエスタンブロッティング、ELISA などの手法を用いて検討した。

・下垂体前葉細胞において、受容体への GnRH の結合が引き起こすシグナル伝達から性腺刺激ホルモン (LH, FSH) の分泌に至るまでの過程で、PRIP がどのステップに機能しているかを検討するために、ホルモン産生後の輸送や分泌過程に関わる種々の分子との相互作用を生化学的手法にて検討した。

③ 生殖腺への影響

・卵巣、精巣への影響をみるために、野生型、PRIP-KO マウスの血中のエストロゲンやテストステロンなど生殖に関与するホルモンの産生量や分泌量、あるいは組織培養を用いて刺激の有無によるホルモン分泌量の変化などを ELISA 法などで測定し解析した。

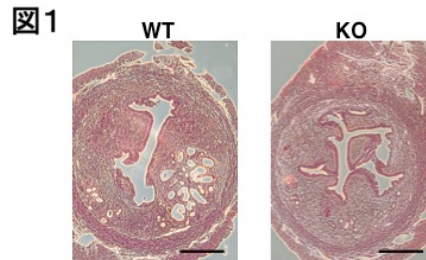
・PMSG や HCG の投与により生体内のホルモン条件を一定にして、排卵数を計測した。

・性周期の各時期の卵巣の切片を作製し、性腺刺激ホルモン受容体などの免疫染色を行った。

4. 研究成果

① PRIP の有無によって生じる生殖に関わる器官への影響

・野生型、PRIP-KO マウスについて、以前の結果から体重および生殖に関わる器官のうち下垂体、卵巣、精巣の大きさ、形態、重量においては差がなかったが、子宮では野生型に比べ PRIP-KO マウスで大きさや重量が小さかった。そこで子宮について週令を追って比較したところ、少なくとも生後3ヶ月までは両遺伝子型で大きな差はなかったが、6ヶ月の頃になると大きさに差が生じることが分かった。その子宮について組織切片を作製し、HE 染色などによる組織学的解析を行ったところ、内膜や筋層、外膜などの厚さや形態に違いは見られなかった (図1)。子宮以外の上記の器官についても組織学的解析を行ったが、顕著な差は見られなかった。

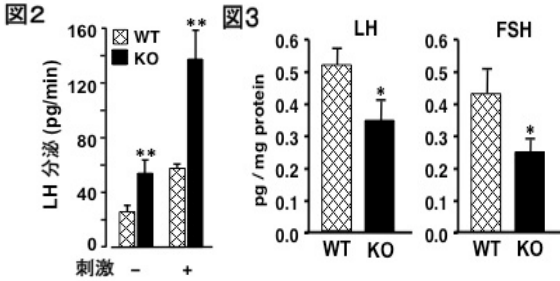


② 下垂体前葉における PRIP の影響

・これまでの解析からメス側の性腺刺激ホルモン (LH, FSH) の分泌異常が見込まれるため、摘出した下垂体前葉を用いて、性腺刺激ホルモンの分泌について検討した。メスの野生型および PRIP-KO マウスの下垂体前葉を組織培養し、無刺激時の性腺刺激ホルモンの分泌量を測定した。野生型に比べ PRIP-KO 下垂体前葉で野生型の2倍以上の分泌量が見られた。さらに、性腺刺激ホルモン放出ホルモン刺激によるホルモン分泌の変化について検討したところ、両者とも刺激後すぐに分泌量が増加するが、その増加量は PRIP-KO においてより高かった (図2)。

・上記の性腺刺激ホルモン分泌量の亢進は、既に解析していた血中のホルモン濃度測定による結果を反映しており、この分泌亢進が、分泌されるホルモン量の違いなのか細胞内でのホルモン産生量の違いによるものなのかを検討した。下垂体前葉から精製した RNA および蛋白質を用いた性腺刺激ホルモンの qRT-PCR および蛋白質量測定を行ったところ、転写レベルでの LH, FSH 量は、野生型および PRIP-KO マウス間で差はなく、蛋白質レベルで下垂体前葉内に残る性腺刺激ホルモン量に差があることが分かった (図3)。

つまり、野生型および PRIP-KO マウスにおいてホルモンが同等量発現しているにもかかわらず分泌量に差があるということで、細胞内でホルモン産生後の分泌に至る過程で PRIP の有無が影響していることが示唆された。



③ 下垂体における PRIP の役割

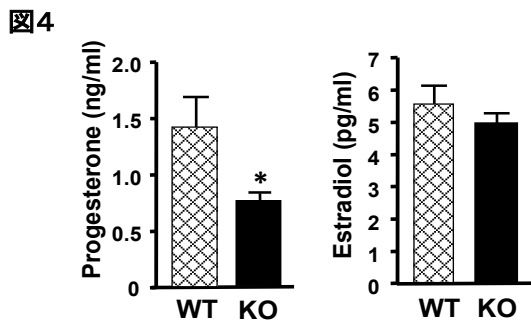
・マウス下垂体前葉由来の培養細胞である LbT2 細胞において、PRIP 遺伝子の発現を抑制した細胞株を構築し、個体や組織培養での結果を再現するかどうか、性腺刺激ホルモンの産生や分泌量の測定をしたところ、変異細胞では性腺刺激ホルモンの分泌が増加することがわかった。

・逆に PRIP 遺伝子を過剰発現させた細胞株を構築し同様の実験を行ったところ、コントロールに比べて変異細胞では性腺刺激ホルモンの分泌量が低下することがわかった。さらに、GnRH のアゴニストである buserelin で刺激したところ、両細胞株とも分泌量が増加したが、PRIP 過剰発現細胞株ではその増加程度が少なかった。

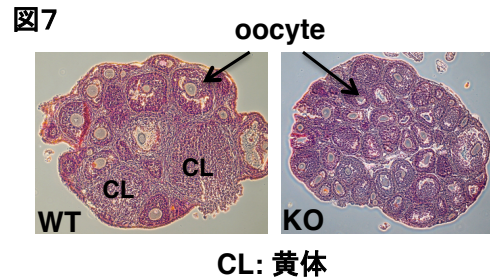
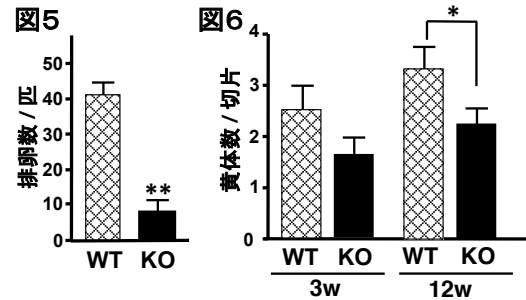
これらのことから、ホルモンの分泌は PRIP 存在下では抑えられ、不在下では増加するということが、個体や組織培養の結果と合わせて、PRIP が性腺刺激ホルモンの分泌抑制に関わっていることが示唆された。

④ 生殖腺への影響

・卵巣から分泌されるエストロゲン、プロゲステロンの血中濃度を測定したところ、KO マウスにおいてプロゲステロンが有意に減少していた (図 4)。



・メスの野生型、PRIP-KO マウスにおいて薬剤投与によって性周期を合わせ、一定時間後に排卵誘発剤を投与したのち排卵数を計測した。3 週齢では野生型に比べ PRIP-KO マウスでは 1/5 程度にまでに減少した (図 5)。また、排卵後の卵巣の黄体数を計測したところ、PRIP-KO マウスで減少した (図 6、7)。これらのことから、出産仔数の減少の原因は、排卵時もしくは排卵に至るまでの卵成熟の過程で異常によるものであることが示唆された。



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 2 件)

① Tsutsumi K., Matsuda M., Kotani M., Mizokami A., Murakami A., Takahashi I., Terada Y., Kanematsu T., Fukami K., Takenawa T., Jimi E. and Hirata M.: Involvement of PRIP, phospholipase C-related, but catalytically inactive protein, in bone formation. J Biol Chem. 286: 31032-31042, 2011 査読有

② Mizokami A., Yasutake Y., Gao J., Matsuda M., Takahashi I, Takeuchi H, Hirata M.: Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. PLoS ONE 8(2): e57375, 2013 査読有

[学会発表] (計 11 件)

松田美穂、平田雅人：生殖機構に欠かせない卵巣の機能における新規分子 PRIP の役割. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 12 月 14-16 日, 2012.

安武 雄、溝上顕子、平田雅人：インクレチンを介したオステオカルシンの代謝への影響. 第 54 回歯科基礎医学学会学術大会, 福島, 9 月 14 日-16 日, 2012.

Matsuda M., Kotani M., and Hirata M.: Involvement of a novel signaling molecule, PRIP in the regulation of reproduction system. The 22nd IUBMB, 37th FEBS Congress, Sevilla, Spain, Sep 4-9, 2012.

Murakami A., Matsuda M., and Hirata M.: Role of a novel protein in alveolar bone remodeling mechanism of tooth movement. The 22nd IUBMB, 37th FEBS Congress, Sevilla, Spain, Sep 4-9, 2012.

溝上顕子、安武 雄、平田雅人：オステオカルシンはインクレチンの分泌を促進する. 第 11 回西日本骨・関節関連疾患懇話会、福岡, 7 月 7 日, 2012.

小谷美穂、松田美穂、平田雅人：骨芽細胞分化における PRIP の機能解析. 日本生化学会九州支部例会, 福岡, 5 月 26-27 日, 2012.

松田美穂、平田雅人：Ovarian Function in PRIP deficient mice. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13-16 日, 2011.

Kotani M., Tsutsumi K., Matsuda M., and Hirata M.: PRIP is implicated in the negative regulation of bone formation. The 10th JBS Biofrontier Symposium -New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, Fukuoka, Japan, Nov 13-15, 2011.

Nishioka T., Mizokami A., and Hirata M.: Osteocalcin triggers incretin secretion. The 10th JBS Biofrontier Symposium -New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, Fukuoka, Japan, Nov 13-15, 2011.

堤康史郎、松田美穂、小谷美穂、溝上顕子、自見英治郎、平田雅人：PRIP 遺伝子欠損マウスで観察された骨の表現型の解析. 第 53 回歯科基礎医学学会学術大会, 岐阜, 9 月 30 日-10 月 2 日, 2011.

小谷美穂、堤康史郎、松田美穂、平田雅人：骨形成制御機構における PRIP の機能解析. 第 84 回日本生化学会年会, 京都, 9 月 21-24 日, 2011.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.mcb.dent.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 雅人 (HIRATA MASATO)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：60136471

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

松田美穂 (MATSUDA MIHO)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：40291520