

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580421

研究課題名(和文) インヒビンの作用機序に関する研究

研究課題名(英文) Studies on mechanisms responsible for inhibin's action

研究代表者

新井 浩司 (Arai, Koji)

東京農工大学・農学部・准教授

研究者番号：70293016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：インヒビンはTGF- β スーパーファミリーに属するホルモンであり、卵胞刺激ホルモン(FSH)の分泌を特異的に抑制することで哺乳類の排卵数を調節している。インヒビンはFSH β mRNAの3'末端非翻訳領域を介してFSH β mRNAの安定性を低下させることによりFSH分泌を抑制していることが示唆されるため、FSH β mRNAの3'非翻訳領域を欠失させた遺伝子改変マウスを作製し、現在その形質を解析中である。また、インヒビンの作用機序を解析するために必要となる組換え型ラットインヒビンをCHO細胞で作製した。

研究成果の概要(英文)：Inhibin, a member of the TGF- β superfamily, regulates ovarian follicular development by specifically suppressing follicle-stimulating hormone secretion. It is suggested that inhibin suppresses FSH secretion by destabilizing FSH β mRNA through its 3' untranslated region (3'UTR). Therefore, we have developed a mouse strain lacking the 3'UTR, and we are now analyzing characteristics of this strain. Furthermore, we developed a CHO cell line secreting rat recombinant inhibin to investigate mechanisms responsible for inhibin's action.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：インヒビン 卵胞刺激ホルモン アクチビン フォリスタチン

1. 研究開始当初の背景

インヒピンは 1980 年代後半に下垂体からの卵巣刺激ホルモン (FSH) 分泌を抑制する因子として卵巣液中から分離・精製された。現在ではその生物活性はアクチピンに対する拮抗作用として理解されているが、インヒピンが生物活性を発揮するメカニズムについては完全には解明されておらず、特にインヒピンが FSH mRNA 発現を抑制するメカニズムについては未解明の点が多く残されている。

(1) インヒピンの作用機序

FSH と黄体形成ホルモン (LH) は性腺刺激ホルモン分泌細胞から分泌され、共に視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモンの作用により分泌が促進されるが、両ホルモンの分泌パターンは必ずしも一致しない。このことから FSH 分泌を特異的に抑制する物質の存在が仮定され、インヒピンと名付けられた。上述のようにインヒピンは卵巣液から分離・精製され、サブユニットとサブユニットからなるヘテロ二量体であることが明らかにされたが、その過程で FSH 分泌促進因子であるアクチピンも分離された [1]。その後、アクチピンはインヒピンサブユニットの二量体であること、また、様々な組織で発現し、発生や分化、組織の正常な機能維持などに重要な役割を果たしていることが明らかにされた [1]。アクチピンレセプターは I 型レセプターと II 型レセプターからなる [2]。インヒピンはアクチピンの II 型レセプターに結合することが示されており、特に細胞膜表面に存在するプロテオグリカンの一つであるベータグリカンと II 型レセプターとの複合体に強い親和性を示す [2]。そのため、インヒピンの作用はアクチピンと II 型レセプターを奪い合うことにより引き起こされるものと考えられている。このようにインヒピンの作用機序については一応の理解がなされているが、これだけでは説明のしにくい現象も観察されている。アクチピンは様々な組織で発現しており、その標的となる細胞も多岐にわたる。また、ベータグリカンも多くの細胞で発現しており、アクチピン II 型レセプターとベータグリカンの両者を発現している細胞は下垂体の性腺刺激ホルモン分泌細胞に限ったことではない。それにもかかわらず、インヒピンの作用が明瞭に観察されるのは下垂体からの FSH 分泌に関してだけであり、この現象はインヒピンがベータグリカン-アクチピン II 型レセプター複合体と結合してアクチピンの作用に拮抗しているとの考え方では説明しきれず、他のインヒピン特異的レセプターが存在する可能性を示唆する。

(2) FSH mRNA の 3' 末端非翻訳領域とインヒピンとの関連

哺乳類の雌の FSH 分泌調節にはインヒピンが重要な役割を果たしており、インヒピンは FSH 分泌抑制作用を通じて排卵数を厳密に調

節していることが知られている。これまでに、性ステロイドホルモンが主に FSH mRNA の転写に作用するのに対し [3]、インヒピンは FSH mRNA の安定性を低下させることにより FSH 分泌を減少させることが Attardi らにより報告されており [4]、Attardi らの結果については申請者も追試を行い同様の結果を得ている。しかしそれ以後、インヒピンによる FSH mRNA 発現調節に関する研究は殆ど進展を見せていない。FSH は、LH および甲状腺刺激ホルモン (TSH) と共に下垂体糖蛋白質ホルモンファミリーに属するが、LH 鎖、TSH 鎖および下垂体糖蛋白質ホルモンに共通の鎖の mRNA がほとんど非翻訳領域 (UTR) を含まないのに対し、FSH mRNA は 3' 末端に長い UTR を含んでおり、この部分の塩基配列は UTR であるにもかかわらず動物種間でかなり保存されている。このような FSH mRNA の長い 3' UTR は哺乳類だけでなく鳥類でも認められる。魚類や両生類にでは一部の種でこのような構造が認められるものの、多くの種では FSH mRNA の 3' UTR はごく短く、哺乳類のように動物種間で保存された長い 3' UTR は存在しない。これらのことは、インヒピンによる FSH 分泌調節と、FSH mRNA 3' UTR との関連を強く示唆するものである。3' UTR を介した mRNA の不安定化はサイトカイン類でよく知られているが、サイトカイン類の mRNA 不安定化と異なりインヒピンによる FSH mRNA の不安定化はアクチノマイシン D のような転写抑制剤の存在下では生じない [4]。このことから、FSH mRNA の不安定化には新たな RNA 不安定化タンパク質の合成が必要であるか、あるいは 3' UTR を標的とした内在性 siRNA のような機構が関与しているものと考えられるが、現在までに FSH mRNA の 3' UTR の役割を明らかにしようとした研究は国内外で行われていなかった。

参考文献

1. Ying SY. *Endocr Rev* 9: 267-293, 1988.
2. Walton KL et al. *Mol Cell Endocrinol*, 359:2-12 2012.
3. Shupnik et al. *Endocrinology* 122, 1842-1846, 1986.
4. Attardi et al. *Mol Endocrinol* 7, 668-680, 1993.

2. 研究の目的

本研究の目的はいまだ明らかにされていないインヒピンの作用機序、特に FSH mRNA 発現抑制のメカニズムを解明することにある。

上述のように FSH mRNA の長い 3' UTR は哺乳類だけでなく鳥類でも認められるが、魚類や両生類では一部の種を除いてこのような構造は存在していない。哺乳類と鳥類ではほぼすべての種で FSH mRNA の 3' 末端に長い UTR を持つが、これらの種では子育てに大きな投資をするため多くの仔を生んでも育てることができず、産仔数を厳密に調節する

必要がある。一方魚類、両生類ではできるだけ多くの卵を産むことが繁殖戦略上有利に働くため、厳密な排卵数の調節は必要でないと考えられる。動物種による FSH 遺伝子の構造の違いは、脊椎動物の進化と繁殖戦略との関連を考える上でも非常に興味深い。FSH mRNA 3' UTR の役割が明らかになれば、脊椎動物の進化と繁殖戦略との関連を分子レベルで解明する足がかりとなり、生物学全般に対する貢献も大きい。また、FSH mRNA の安定性を調節している機構が解明されれば、新たな過排卵処理技術の開発にもつながり、さらに遺伝子組み換え技術により多産の家畜、高能力の産卵鶏等を長い育種期間をかけることなく作り出すことも可能になると期待できる。また、これまでにインヒピン サブユニットノックアウトマウスも作製されているが、このマウスでは比較的若いうちに性腺に腫瘍が形成されるなど、多くの異常がみられる。今回作製するマウスは申請者の予想が正しければインヒピンのフィードバック機構を欠く以外は全くの正常なマウスとなるはずであるが、これまでインヒピンの分泌能を持ちながらインヒピンのフィードバック機構を欠失した哺乳類は存在しておらず、本研究で作製する予定のマウスはインヒピンのフィードバック機構が哺乳類の繁殖戦略に占める重要性を明らかにする上でも非常に有用なモデルとなる。

このように、本研究の目的は、*Fshb* 遺伝子に変異を導入したマウスを作製し、その性状を解析することでこれまで知られていなかったインヒピンによる新たな FSH 分泌抑制機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

インヒピンによる FSH mRNA の発現抑制と FSH mRNA の 3' UTR との関連を明らかにするため、FSH 遺伝子の 3' UTR 部位を LH 遺伝子の 3' UTR 部位で置換した遺伝子改変マウスの作製を試みた。

(1) FSH 遺伝子改変用ターゲティングベクターの作製

FSH mRNA の 3' UTR とインヒピンとの関連を明らかにするため、FSH 遺伝子の終始コドン直後に LH 遺伝子の 3' UTR と poly A 付加シグナルを挿入したターゲティングベクターを作製した。このターゲティングベクターで相同組み換えにより遺伝子改変を行った場合、プロモーター部位およびタンパク質コード領域は正常であるため、長さが短いことを除けば正常な FSH mRNA が下垂体で発現するものと期待できる。ターゲティングベクター作製のもととした FSH 遺伝子は、理化学研究所から供与を受けた BAC クローンに含まれる C57BL/6 マウスの FSH 遺伝子を用いた。ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットおよびネガティブ選択用のジフテリアトキシン発現カセットも理化学研究所から提供されたプラスミドを鋳型に各々のカセッ

ト部位を PCR で増幅して使用した。LH poly A 付加シグナルは C57BL/6 マウスゲノム DNA を鋳型に PCR により作製した。これらの DNA 断片を pBluescript II SK+プラスミドに導入し、ターゲティングベクターを構築した。

(2) 相同組み換えによる ES 細胞への変異 *Fshb* 遺伝子の導入とスクリーニング

前述のターゲティングベクターを用い、NPO 法人発生工学研究会に依頼して相同組み換えにより本来の 3' UTR を含まない FSH 遺伝子を持つ ES 細胞を作製した。まず、ターゲティングベクターを KpnI で直鎖状にし、エレクトロポレーションにより C57BL/6N 由来の ES 細胞 (EGR-101) に導入した。ネオマイシンを含む培地で選択し、形成されたコロニーから 96 クローンを選択、増殖させ、スクリーニング用の DNA を抽出した。抽出した DNA は PCR により変異遺伝子の導入をスクリーニングした。PCR 陽性であったクローンについて、ターゲティングベクターに使用した配列よりも 5' 末端側、3' 末端側、また、ネオマイシン耐性遺伝子のタンパク質コード部位を認識する DNA プローブを用いてサザン解析を行い、目的とする相同組み換えが起きていること、また、ネオマイシン耐性遺伝子のランダムインテグレーションが無いことを確認した。さらに、核型解析を行い、染色体に異常がないことを確認した。

(3) FSH 遺伝子改変マウスの作製

上記の ES 細胞を用い、ES 細胞の作製と同様 NPO 法人発生工学研究会に依頼して ICR マウス胚を宿主としてキメラマウスを作製した。作製したキメラマウスは雌の C57BL/6N マウスと交配し、誕生したマウスのうち毛色が黒いものについてその遺伝子型を PCR 法によりチェックした。

(4) FSH mRNA の 3' UTR を含むレポーターコンストラクトの作製

FSH mRNA の 3' UTR がインヒピンの作用により mRNA の安定性を低下させるか否かを明らかにするため、ルシフェラーゼレポータープラスミドである pGL3 basic のルシフェラーゼコード領域の直後に FSH 遺伝子の 3' UTR 部分と poly A 付加シグナルを含んだ領域を挿入した。また、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流には CMV プロモーターを挿入した。このコンストラクトを下垂体性腺刺激ホルモン分泌細胞由来である T3-1 にトランスフェクションし、インヒピンの添加によりルシフェラーゼ活性が影響を受けるか否かを検討した。また、下垂体以外の細胞由来の株化細胞についても同様の実験を行った。

(5) 組換え型ラットインヒピンの作製

現在インヒピンの純品は市販されておらず、入手が困難になっている。そこで、哺乳類細胞での組み換え型インヒピン作製を試みた。哺乳類細胞発現用コンストラクトの作製には現ワシントン大学教授の Dr. Kelly E. Mayo 博士から供与いただいたラットインヒピンサブユニットと A サブユニットの全長を

コードする cDNA を用いた。これらの cDNA を pdKCR-dhfr プラスミドの EcoRI サイトに挿入し、サブユニットとサブユニット両方の発現ベクターを CHO-dhfr(-)細胞にポリエチレンイミンを用いてトランスフェクションした。ヌクレオシドを含まない -MEM に 10%の牛胎仔血清を添加した培地を選択培地とし、形成されたコロニーをクローニングした。これらのクローンを無血清培地に馴化させた後、培養上清を PVDF 膜上にプロットし、農業資源研究所の金子浩之博士から供与いただいた抗インヒピン血清を用いたイムノプロット法により培養上清中へのインヒピンの分泌を判定した。

4. 研究成果

(1) FSH 遺伝子変異マウスの作製

作製したターゲティングベクターを NPO 法人発生工学研究会に送付し、相同組み換えによる C57BL/6N マウス由来 ES 細胞への変異遺伝子の導入を依頼した。ネオマイシン耐性遺伝子によるポジティブセレクションとジフテリアトキシンによるネガティブセレクションを組み合わせて細胞の選択を行い、選択培地で成長した 96 個のコロニーについて、変異遺伝子を持つ ES 細胞をスクリーニングする目的で PCR を行った。その結果、14 クローンに目的とする変異が導入されていると考えられた(図 1)。そのうち 6 クローンについてサザン解析を行ったところ、すべてのクローンで目的とする相同組み換えが正常に生じていることが確認された。(図 2)

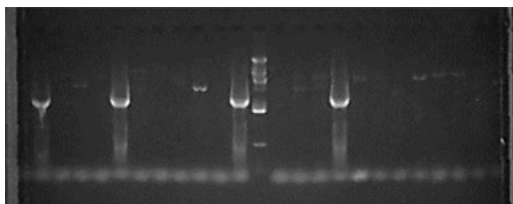


図1 PCRによるES細胞のスクリーニング

クローン 1-1 2, HindIII, クローン 1 3-2 4 を泳動。4 クローンで陽性のバンドを確認。このほか 7 2 クローンについてスクリーニングを行い、合計 1 4 クローンが陽性であった。

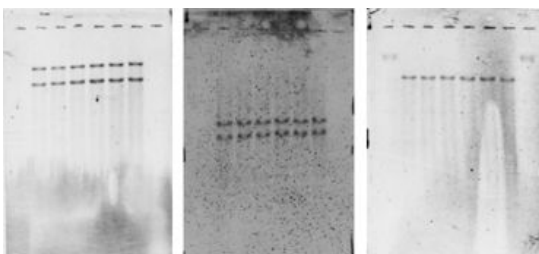


図2 サザンプロットハイブリダイゼーションによる相同組み換えの確認。

5' 末端側プローブによる検出像(左, Apal/HindIII で切断)、3' 末端側プローブによる検出像(中央, EcoRV/KpnI で切断)、NeoR プローブによる検出像(右, Apal/NheI で切断)を示す。すべてのクローンについて、予想されるバンド、つまり、5' 末端側プローブでは 10.8kb の正常アレルと 16kb の変異アレルのバンドが、3' 末端側プローブでは 4.9kb の正常アレルと 3.9kb の変異アレルのバンドが、NeoR プローブでは 12.2kb の変異アレルのバンドが検出された。

また、これらのクローンについて核型解析を行い、正常な 3 クローンについて ICR マウス胚を宿主としてキメラマウスを作製した。その結果、# 6 と # 3 7 の ES クローンに由来するキメラマウスの雄がそれぞれ 8 匹および 3 匹得られた。それぞれのマウスについて C57BL/6N 系統の雌マウスと交配し、PCR により遺伝子型を確認した結果、目的の変異型 *Fshb* 遺伝子ヘテロを持つマウスが複数得られた。現在はこれらのヘテロマウスと C57BL/6N マウスあるいはヘテロマウス同士の交配を行っており、ヘテロマウスは雌雄共に繁殖可能であることを確認している。今後は *Fshb* 遺伝子の変異をホモで持つ個体を作出し、その繁殖能力を確認すると共に、Cre リコンビナーゼマウスと交配して ES 細胞のスクリーニングに使用したネオマイシン耐性遺伝子を変異マウスのゲノム DNA から取り除く予定である。その後は、このマウスを増やし、今回導入した *Fshb* 遺伝子の変異がマウスに与える様々な影響を解析する予定である。このマウスを研究することにより、これまで知られていなかったインヒピンによる *Fshb* mRNA 調節機構が明らかになるものと期待される。

(2) 組換え型ラットインヒピンの作製

ラットインヒピン cDNA を導入した CHO 細胞を選択培地で培養したところ、多数のコロニーが形成された。そのうち 20 のコロニーをクローニングし、培養上清中へのインヒピンの分泌をイムノプロット法により調べたところ、1 クローンで強い陽性反応が得られた。このクローンの培養上清をさらに電気泳動し、抗インヒピン血清を用いたウエスタンプロットにより調べたところ、非還元で 32kDa、還元条件下で 18kDa のバンドが検出され、正常に二量体を形成したインヒピンであることが確認できた。現在金子浩之博士から供与いただいた抗インヒピン血清を用いてアフィニティークラムを作製中であり、このカラムを用いてラットインヒピンを CHO 細胞の培養上清から精製する予定である。

(3) *Fshb* mRNA 3' UTR が mRNA の安定性に与える影響

マウス *Fshb* mRNA の 3' UTR をルシフェラーゼ遺伝子のタンパク質コード領域下流に接続したところ、T3-1 細胞および NIH3T3 細胞においてルシフェラーゼ活性が低下し、*Fshb* mRNA 3' UTR が mRNA の不安定化に関与していることが強く示唆された。しかし、マウス *Fshb* mRNA の 3' UTR を付加したルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクションした T3-1 細胞にインヒピンを作用させてもルシフェラーゼ活性の変化は認められず、T3-1 細胞ではインヒピンによる *Fshb* mRNA の不安定化機構は働いていない可能性が示唆された。

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 6件)

Arai KY, Fujioka A, Okamura R, Nishiyama T. Stimulatory effect of fibroblast-derived prostaglandin E₂ on keratinocyte stratification in the skin equivalent. Wound Repair Regen (査読あり) 22:701-711, 2014.

Sato Y, Arai KY, Nishiyama T, Nomura Y, Kishimoto Y, Aizawa S, Maruyama N, Ishigami A. Ascorbic acid deficiency leads to epidermal atrophy and UVB-induced skin pigmentation in SMP30/GNL knockout hairless mice. J Invest Dermatol (査読あり) 132:2112-2115, 2012.

〔学会発表〕(計 10件)

土屋翔, 原卓也, 永塚豊史, 西山敏夫, 新井浩司. 去勢によるマウス毛包の形態学的変化と毛周期調節関連因子の皮膚における発現変化. 第45回日本結合組織学会学術大会, 第60回マトリックス研究会大会合同学術集会, 2013年6月28日~6月29日, 和歌山県立医科大学, 和歌山県和歌山市.

新井浩司, 藤岡温子, 岡村良子, 八谷有宇子, 常長誠, 西山敏夫. IL-1とプロスタグランジン E₂ を介した表皮-真皮相互作用. 第44回日本結合組織学会学術大会, 第59回マトリックス研究会大会合同学術集会, 2012年6月7日, 日本青年館ホテル, 東京.

ホームページ等

<http://www.collagen-institute.jp/sclero-protein/lab1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 浩司 (ARAI, Koji)

東京農工大学・農学部・准教授

研究者番号: 70293016

(2) 連携研究者

西山 俊夫 (NISHIYAMA, Toshio)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号: 60372455