

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780282

研究課題名(和文) 低血糖をシグナルとした下垂体における性腺機能抑制メカニズム

研究課題名(英文) The mechanism for the hypoglycaemia induced suppression of gonadal function in the pituitary gland

研究代表者

森山 隆太郎 (MORIYAMA, Ryutaro)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：30411573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グルコース利用性の低下がAMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 経路の活性化を介して黄体形成ホルモン サブユニット (LHβ) と卵胞刺激ホルモン サブユニット (FSHβ) 遺伝子の転写調節領域に作用し、LHとFSHの発現を抑制するメカニズムが下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞 (ゴナドトロフ) に存在する可能性をゴナドトロフ株化細胞であるLβT2を用いた実験により明らかとした。この結果は、家畜からヒトに至るまで多くのほ乳類で問題となっている栄養疾患による生殖障害に下垂体のゴナドトロフが関与している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we observed the restriction of glucose availability induced the transcriptional suppression of luteinizing hormone beta subunit (LHβ) and follicle-stimulating hormone beta subunit (FSHβ) genes via AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway in the gonadotropin LβT2 cell line. The result suggests a possibility that gonadotrophs of the pituitary gland participate in nutritional disorders inducing reproductive dysfunction in many mammalian species from cattle to humans.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産・獣医学/応用動物科学

キーワード：低血糖 LH FSH AMPK 下垂体 性腺刺激ホルモン産生細胞 性腺機能 低栄養

1. 研究開始当初の背景

乳牛における離乳後の初回排卵遅延、暑熱環境による摂食量低下が誘起する搾乳量の減少や鶏卵重の低下、さらには過度の運動、ダイエット、肥満などによる性腺機能低下症など、近年、低栄養による生殖機能抑制が大きな問題となっている。そのため、栄養による性腺機能制御メカニズムの解明は重要な研究テーマの1つである。低栄養によるほ乳類の性腺機能抑制は、血中エネルギー基質の濃度変化が脳や末梢でセンシングされた後、視床下部で統合され、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の分泌抑制を促すことで起こると考えられ、国内外で研究が行われてきた。例えば、シバヤギにグルコースの利用阻害剤である 2-deoxy-D-glucose (2DG) を投与することで GnRH のパルス状分泌と同期した多ニューロン発火活動が抑制されること、ラットやヒツジの第4脳室に2DGを微量投与することで血中の黄体形成ホルモン (LH) のパルス状分泌が抑制されることなどが報告されている。しかし、性腺機能は常に最上位である視床下部で制御されているのだろうか。当グループでは、末梢や脳内でのグルコースセンシングに重要な役割を担っている AMP-activated protein kinase (AMPK)、mammalian Target of Rapamycin (mTOR)、グルコキナーゼ、グルコース輸送担体 2 と 4 (GLUT2、GLUT4) 等の mRNA がマウス下垂体や性腺刺激ホルモン産生細胞 (ゴナドトロフ) 株化細胞 L β T2 に発現していること; 2DG に暴露することで AMPK のリン酸化が誘起されると同時に、卵巣刺激ホルモン β サブユニット (FSH β) mRNA 発現量がコントロール群に比べて低下することなどから、低血糖によるグルコース利用性の低下が AMPK 経路の活性化を介して性腺刺激ホルモンの発現を低下させ、ひいては性腺機能を抑制するメカニズムが下垂体のゴナドトロフに存在する可能性を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低血糖シグナルが AMPK 経路の活性化を介して性腺刺激ホルモンの合成・分泌を抑制するメカニズムが下垂体のゴナドトロフに存在するか検討することにある。

3. 研究の方法

(1) AMPK の活性化が性腺刺激ホルモンの mRNA 発現を抑制するか検討する。

ゴナドトロフの AMPK が LH や FSH 合成の抑制に関与しているのか否かは不明である。そこで、AMPK 活性化剤である 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) を L β T2 細胞に暴露した時の黄体形成ホルモン β サブユニット (LH β) と FSH β mRNA 発現量の変化を real-time PCR 法で観察した。

(2) AMPK の活性化を介した性腺刺激ホルモン遺伝子の転写調節メカニズムを検討する。

LH β と FSH β mRNA 発現量の低下が AMPK 経路の活性化により誘起されるメカニズムを明らかにするため、AICAR による転写抑制に関与する LH β と FSH β 遺伝子の転写調節領域を、分泌型アルカリフォスファターゼを用いた reporter assay 法により同定した。

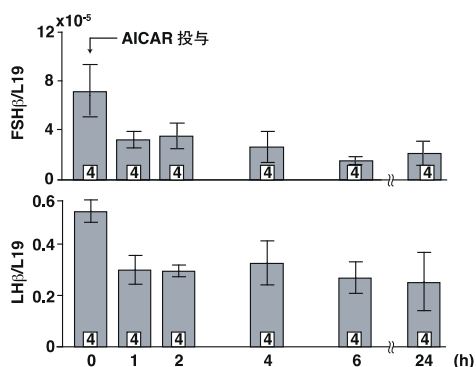
(3) AMPK を介した細胞内情報伝達経路を検討する。

AMPK の活性化には細胞内 Ca²⁺ をシグナル分子とした経路の存在が知られている。そこで、2DG 刺激時の細胞内 Ca²⁺ を L β T2 細胞で検討した。実験には Fura-PE3/AM を使った細胞内 Ca²⁺ 測定システムを用いた。

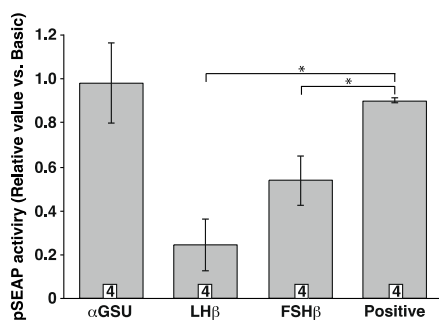
4. 研究成果

(1) AICAR を L β T2 細胞に暴露した時の mRNA 発現量を定量した結果、LH β と FSH β

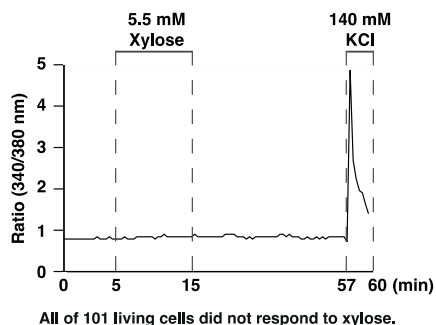
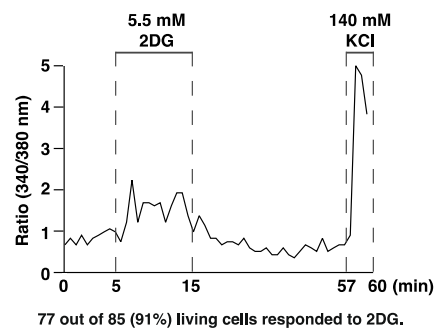
mRNA 発現量が暴露前に比べて減少傾向を示した。AMPK は細胞内 ATP レベルの低下によりリン酸化され、タンパク質合成の抑制などを引き起こす酵素である。本実験の結果は、低血糖による細胞内 ATP レベルの低下が AMPK 経路を介して性腺刺激ホルモンの合成を抑制するメカニズムが下垂体のゴナドトロフに存在することを示唆する。



(2) 上述した結果を踏まえ、転写調節部位を明らかにする目的で、ラット性腺刺激ホルモン遺伝子の転写調節領域断片を導入した LβT2 細胞に AICAR を暴露する実験を行った。その結果、LHβと FSHβ遺伝子の転写調節領域断片を導入した群において、対象と比べて SEAP 活性の有意な抑制が認められた。しかし、α-glycoprotein サブユニット (αGSU) 遺伝子の転写調節領域断片を用いた実験では SEAP 活性に変化は見出せなかった。このことから、AMPK の活性化は LHβと FSHβ遺伝子の転写調節領域に作用することが明らかとなった。この結果は低血糖による AMPK 経路の活性化は LHβと FSHβ遺伝子の特異的な転写調節領域に作用することで LH と FSH の発現を抑制するメカニズムがゴナドトロフに存在することを示唆している。



(3) 5.5 mM 2DG を LβT2 細胞に暴露した結果、細胞内 Ca²⁺の上昇が観察された。それに対して、コントロールとして 5.5 mM xylose を暴露した群では細胞内 Ca²⁺の上昇は観察できなかった。この結果はゴナドトロフにおける低血糖センシングと性腺刺激ホルモン合成の抑制に Ca-calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) を介した AMPK の活性化メカニズムが関与することを示唆する。CaMKK は細胞内 Ca²⁺により活性化され、AMPK 活性を調節する AMPK kinase の 1 つとして知られている。



以上より、下垂体ゴナドトロフには、低血糖による細胞内 Ca²⁺の上昇に伴い AMPK のリン酸化を誘起し、LHβおよび FSHβ遺伝子の転写を抑制するメカニズムの存在が示唆された。

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)

S. M. Popa, R. M. Moriyama, C. S. Caligioni, C. M. Cho, T. L. Concepcion, A. E. Oakley, I. H. Lee, E. Sanz, P. S. Amieux, A. Caraty, R. D. Palmiter, V. M. Navarro, Y.-M. Chan, S. B. Seminara, D. K. Clifton, R. A. Steiner, Redundancy in *Kiss1* Expression Safeguards Reproduction in the Mouse. *Endocrinology*, 査読有, Aug 2013, Vol. 154, Issue 8, 2784-2794
D. Furuta, M. Yamane, T. Tsujiuchi, R. Moriyama, and N. Fukushima, Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA3. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 査読有, Mar 2012, Vol.50, Issue 1, 21-34

〔学会発表〕(計9件)

森山隆太郎、若狭郁美、中川雅子、長鎖脂肪酸への暴露がマウス精子の運動性に与える影響、第106回日本繁殖生物学会大会、府中、東京農工大学、2013年9月13日

森山隆太郎、松本絵美、原玲奈、宮里公子、十河由紀、福嶋伸之、マウス下垂体の α -subunit含有細胞に局在するリゾホスファチジン酸受容体1 mRNAの発現量は去勢により増加する、第28回下垂体研究会学術集会、花巻温泉、ホテル千住閣、2013年8月7日

A. E. Oakley, R. Million, L. W. Organick, R. Moriyama, K. E. Manbeck, J. R. Levin, S. D. Reed, C. Chavkin, D. K. Clifton, R. A. Steiner, A Peripherally-Restricted Kappa Agonist (PRKA) as a Novel Approach to the Treatment of Menopausal Hot Flashes, Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (ENDO2013), San Francisco, California, June17, 2013.

R. Million, A. E. Oakley, R. Moriyama, D.K. Clifton, R.A. Steiner, Metabolic Regulation of Reproduction: The Effects of AgRP Neuronal Ablation on Kiss1 Expression in Leptin-Deficient Mice., 2012 Annual Biomedical Research Conference for Minority Students (ABRCMS), San Jose, California, November8, 2012. B049

S. M. Popa, R. M. Moriyama, C. Cho, T. L. Concepcion, A. E. Oakley, I. H. Lee, E. Sanz, C. S. Caligioni, Yee-Ming Chan, S. B. Seminara, V. M. Navarro, D. K. Clifton, R. A. Steiner, Fertility in the Presence of Minute Levels of Kisspeptin., 2nd World Conference of Kisspeptin signaling in the brain, University of Tokyo, Tokyo, November7, 2012.

A. E. Oakley, I. H. Lee, R. Moriyama, R. Million, R. D. Palmiter, D. K. Clifton, R. A. Steiner, The role of kisspeptin in the restriction of fertility following ablation of Agouti-related peptide (AGRP) neurons in

the leptin-deficient mice. 2nd World Conference of Kisspeptin signaling in the brain, University of Tokyo, Tokyo, November7, 2012.

S. Popa, R. Moriyama, A. Oakley, C. Cho, M. Gottsch, T. Concepcion, D. Clifton, R. Steiner, The requirement of Kiss1 for reproduction is sexually differentiated, Northwest developmental biology meeting, Friday harbor laboratories, Washington, March15, 2012.

R. Moriyama, M. Toyonaga, T. Miyazato, Y. Sogo, N. Fukushima, Gonadal steroids down-regulate the long-chain fatty acid receptor GPR120 mRNA expression levels in gonadotrophs of the mouse anterior pituitary gland. 44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Oregon Convention Center, Portland, Oregon, U.S.A., August2, 2011.

N. Fukushima, D. Furuta, M. Yamane, T. Tsujiuchi, R. Moriyama, Lysophosphatidic acid signaling is involved in neurite branch formation., The 10th International conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases (AD/PD 2011), Barcelona, Spain, March9-13, 2011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.life.kindai.ac.jp/~mory/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 隆太郎 (MORIYAMA Ryutarō)
近畿大学・理工学部・講師
研究者番号：30411573

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし