

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380157

研究課題名(和文) 低栄養による繁殖機能低下を仲介するエネルギーセンサーの解明

研究課題名(英文) Identification of energy sensors mediating suppression of reproductive functions under malnutrition

研究代表者

前多 敬一郎 (Maeda, Kei-ichiro)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30181580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛などでは低栄養により繁殖機能が低下し、分娩後の受胎率の低下を招いている。このメカニズムを解明するため、脳に存在するエネルギーセンサーの候補である後脳の上衣細胞において、どのようにブドウ糖がセンシングされているのか、またこのセンサーからどのような神経経路を辿って、性腺刺激ホルモンの分泌が抑制されるのかをラットを用いて明らかにしようとした。その結果、上衣細胞において、細胞内得年ルギーセンサーであるとされるAMPキナーゼを介したグルコースセンシングが行われていることを明らかにした。また、上衣細胞が視床下部の室傍核を通して情報を伝達している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In lactating cows, gonadal functions are suppressed because of the malnutrition caused by a big milk yield. The suppression is probably due to a decrease in energy levels. Hindbrain ependymocyte is a candidate for energy sensor involved in the suppression of gonadal activities through suppressing gonadotropin secretion in rats. We aimed to get evidence for ependymocytes to sense glucose levels through AMP kinase which is considered to be a energy-sensing molecule in various kinds of cells. In addition, a neural pathway relaying information on the energy level from ependymocytes to the hypothalamic neurons controlling reproduction. As a result, ependymocytes senses extracellular glucose levels through an AMP kinase-mediated mechanism. In addition, the information on energy level might be transmitted from ependymocytes to neurons located in the hypothalamic paraventricular nucleus. The present result would contribute to treatments of reproductive disorders in lactating cows.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：上位細胞 栄養 繁殖

1. 研究開始当初の背景

乳用牛や肉用牛における受胎率の低下は世界の酪農において最も重要な問題の一つである。世界的に見ても乳用牛であるホルスタイン種の初回受胎率が 50%以下となっており、また日本における調査でも 50%を切っている。

この問題を解決するためのアプローチは数多く考えられる。遺伝的に見れば、乳量や体格を中心的な指標とした遺伝的改良により、繁殖能力が劣化してきたと考えられる。またこのような遺伝的特徴を持った牛において、微弱発情を見逃し、授精時期を逃すことによる受胎率低下がある。生理学的に見れば、分娩直後から超生理学的な量の乳の分泌が開始するわけであり、一時的な飢餓とみてもいい状態である。

飢餓あるいは低栄養が性腺機能の低下を引き起こすことは古くから知られている。この主な原因の一つは、栄養低下による性腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌低下によるものであることが明らかにされている。筆者らは、以前より飢餓条件あるいは低血糖が性腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌低下を引き起こすことをラットをモデルとして明らかにし、その神経経路も一部解明してきた。

本研究では、泌乳開始後に見られる低栄養状態が、血糖値の低下やケトosisを引き起こし、その結果として性腺機能が抑制されるという仮説を立てた。ブドウ糖やケトン体など、血液中のエネルギー基質の変化を生体を感じ取るにはこれらエネルギー基質の血中濃度を感じ取るセンサーが必要である。筆者らは、後脳の上衣細胞(第4脳室や中心管)にグルコースセンシングタンパクであるグルコキナーゼ及びケトン体の膜輸送体である MCT1 が局在することを発見し、この細胞がセンサーの候補であるという仮説を提唱した。その後、同細胞の初代培養実験系において、低グルコースあるいはケトン体負荷時に細胞内カルシウム濃度が上昇することなどを発見し、後脳上衣細胞がエネルギーセンサーとして機能することの証拠を積み上げてきた。さらに、ケトン体については、糖尿病における性腺機能抑制を用いて、ケトン体の輸送担体である MCT1 の機能抑制により、糖尿病時の性腺機能抑制が解除されることから、泌乳期における性腺機能抑制の要因の一つがケトosisであることを明らかにした。

近年 AMP キナーゼが生体の様々な場所で細胞のエネルギーセンシングに関与していることが明らかとなっている。脳内におけるエネルギーセンシングにおいても上衣細胞内で AMP キナーゼに由来するメカニズムが機能している可能性がある。さらに得年ルギーセンサーとしての上衣細胞から視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロンへいたる経路も未だに解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、高泌乳牛において飢餓状態と繁殖率の低下を引き起こす栄養シグナルがグルコースあるいはケトン体(負のエネルギーシグナル)であるという仮説を立てた。

上記の仮説を確かめるため、近年細胞のエネルギーセンサーであることが明らかにされつつある AMP キナーゼに着目した。このエネルギーセンシング機構に AMP キナーゼが関与しているかどうかについて、in vivo および in vitro の実験系により検討を行った。

また上衣細胞によって感知された得年ルギーレベルの情報が、視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌調節機構にどのように情報を伝達しているか、その伝達経路を明らかにしようとした。

これにより、低栄養下での血糖値低下あるいは重篤なケトosisが、高泌乳牛において、現在頻発している繁殖障害の原因の一つであることを明らかにし、乳用牛や肉用牛の泌乳期における性腺機能抑制予防や治療への基礎的知見を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

上衣細胞における AMP キナーゼによるセンシングメカニズム

AMP キナーゼによるセンシングの可能性を明らかにするため、同酵素の活性促進剤である AICAR を in vivo でラット第4脳室内に投与し、性腺刺激ホルモン分泌に対する影響を検討した。

免疫組織化学を用い、上衣細胞に AMP キナーゼが存在することを証明した。さらに上衣細胞によるグルコースセンシングが AMP キナーゼ依存性であることを示すため、上衣細胞特異的に蛍光タンパクを発現するマウスを作製した。同マウスを用いて上衣細胞の初代培養細胞を用い、in vitro での AMP キナーゼの役割の検討を行った。

上衣細胞から視床下部への伝達経路の存在の証明

情報伝達経路の同定では、第4脳室への wheat-germ hemagglutinin (WGA) 投与による神経トレーシングを実施した。上衣細胞特異的に WGA を発現するマウスの作製を開始した。

4. 研究成果

【上衣細胞における AMP キナーゼによるセンシングメカニズム】

AICAR による第4脳室上衣細胞内の AMPK 活性を刺激することにより、黄体形成ホルモン分泌が顕著に抑制された(図1)。また、AMP キナーゼと上衣細胞の特異的マーカーである vimentin の二重免疫組織化学によって、第4脳室あるいは中心管壁の上衣細胞に AMP キナーゼタンパクが発現することを明らかにした(図2)。このことから、上衣細胞におけるエネルギーセンシングにおいては、AMPK

を介したメカニズムのあることが明らかとなった。

上衣細胞の特異的マーカーである vimentin のプロモーターに蛍光タンパク Venus の遺伝子をつないだコンストラクトを受精卵に導入し、上衣細胞特異的に Venus を発現するマウスを作製した(図3)。このマウスを用い、上衣細胞に対する AICAR の直接の効果を検討した。同マウス in vitro で検討した結果、AMPK 活性の亢進により、上衣細胞において細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた(図4)。このことから、AMPK を介したエネルギーセンシング機構の存在が証明された。

【上衣細胞から視床下部への伝達経路の存在の証明】

また第4脳室上衣細胞からのトレーシングにより、上位細胞から視床下部室傍核へいたる伝達経路が存在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Minabe S, Deura C, Ikegami K, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H (2015)

Pharmacological and Morphological Evidence of AMPK-Mediated Energy Sensing in the Lower Brain Stem Ependymocytes to Control Reproduction in Female Rodents.

Endocrinology 156: 2278-87. 査読有り
DOI:

<http://dx.doi.org/10.1210/en.2014-2018>

〔学会発表〕(計2件)

Kei-ichiro Maeda (2013) Energetic regulation of reproduction: an energy sensor in the brain. Recent Advances in the Central Control of Reproduction on the occasion of Alain Caraty's retirement, Centre INRA Val de Loire, Nouzilly, France, April 11, 2013

美辺詩織、松本華代、出浦慎哉、池上花奈、後藤哲平、三宝誠、平林真澄、上野山賀久、前多敬一郎、束村博子
性腺機能制御に関わる後脳上衣細胞の AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の役割

日本下垂体研究会第29回学術集会、東京、口頭発表(2014年8月9日)、**優秀発表賞受賞**

美辺詩織、松本華代、出浦慎哉、池上花奈、後藤哲平、三宝誠、平林真澄、上野山賀久、前多敬一郎、束村博子

低栄養による繁殖抑制を担う脳内エネルギーセンシングメカニズム
第107回日本繁殖生物学会大会、北海道、口頭発表(2014年8月22日)

〔産業財産権〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

前多敬一郎 (MAEDA, Kei-ichiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号: 30181580

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
美辺詩織
松田二子

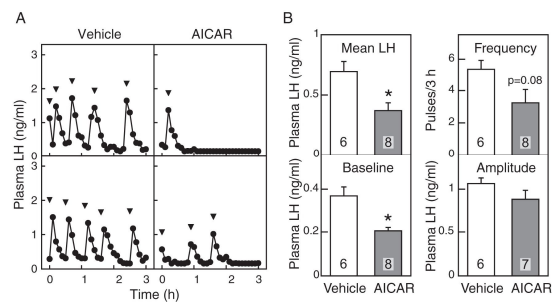


図1 AICARがLH分泌に与える影響。A,各群の代表例。AICARは採血開始直前に第4脳室内に投与した。

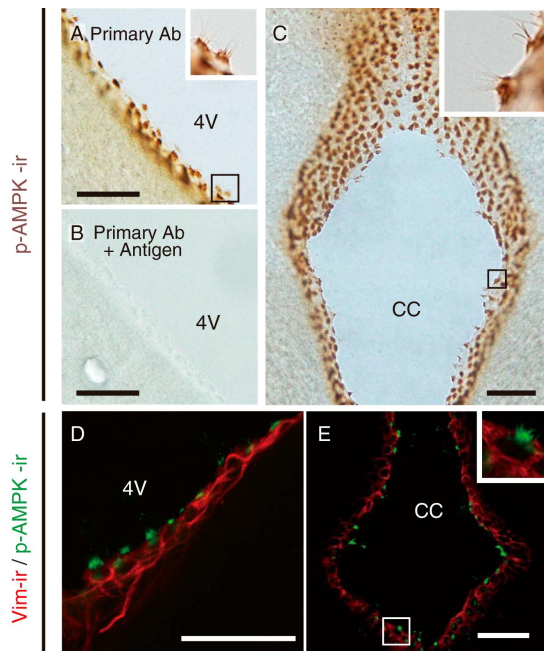


図2 AMP キナーゼの免疫組織化学 .A,B 第4脳室のリン酸化 AMP キナーゼ .C, 中心管付近の AMP キナーゼ .D, E. Vimentin と AMP キナーゼの二重免疫組織化学 .リン酸化された活性化 AMP キナーゼが第4脳室や中心管壁の上皮細胞にあることを示した .

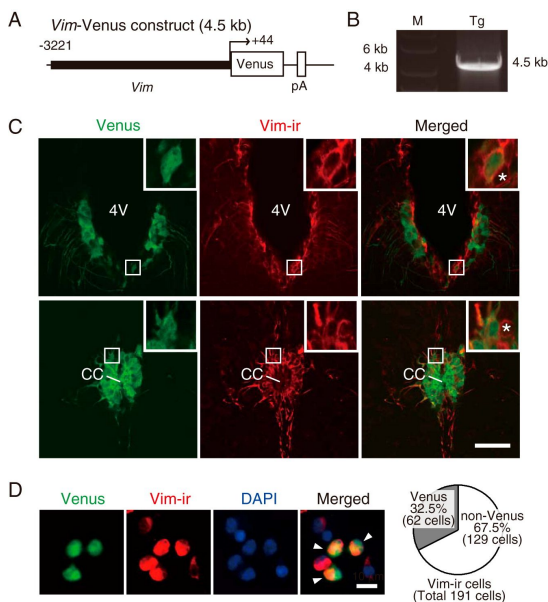


図3 .Vimentin 特異的に蛍光タンパク Venus を発現するトランスジェニックマウス .A, 導入した遺伝子コンストラクト .B, トランスジェニックマウスの後脳に Venus 遺伝子が発現する .C, Venus と vimentin の二重免疫染色 .D, Vimentin 陽性細胞に占める Venus 陽性の割合 .

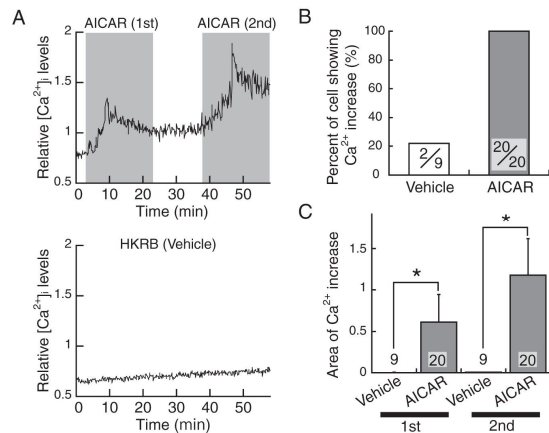


図4 .AICAR を投与した上皮細胞における細胞内カルシウム濃度変化 .A, AICAR を投与した上皮細胞における細胞内カルシウム濃度 .一回目、二回目ともに AICAR の投与がカルシウム濃度の上昇を刺激した .コントロール群 (HKRB) 投与群では、上昇は見られなかった .B, 細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた細胞の割合 .C, 細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた細胞の面積 .