

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780202

研究課題名(和文) 長鎖脂肪酸をシグナル分子とした下垂体における性腺機能制御メカニズム

研究課題名(英文) Gonadal function control mechanism in the pituitary gland through long-chain fatty acids as signal molecules.

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

研究成果の概要(和文)：本研究により長鎖脂肪酸がシグナル分子として下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ)に直接作用することで長鎖脂肪酸受容体 G-protein coupled receptor 120 (GPR120) を活性化すると同時に、性腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体 (GnRH-R) 発現を抑制する可能性が示された。また、ゴナドトロフの GPR120 発現はエストロゲンにより制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Present study showed that long-chain fatty acids such as palmitate may directly activate long-chain fatty acid receptor, GPR120, and down-regulate the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors on gonadotrophs of the mouse pituitary gland as signal molecules. Moreover, it became clear that GPR120 expression levels were controlled by estrogen on the pituitary gland.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 / 応用動物科学

キーワード：下垂体・性腺刺激ホルモン産生細胞・脂肪酸・低栄養・性腺機能・GPR120・GnRH・生殖

1. 研究開始当初の背景

摂食量の減少が誘起する搾乳量の減少や鶏卵重の低下、さらには、高泌乳牛における排卵遅延など、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誘起されると考え

られ、これまで国内外で研究が行われてきた。申請者は下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ)に長鎖脂肪酸の受容体である G-protein coupled receptor 120 (GPR120) が発現していることから、末梢のエネルギー基質である脂肪酸がシグナル分子として視床下部・下垂体・性腺軸を下垂体レベルで制御するメカニズムが存在すると仮説提唱するに至った。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は長鎖脂肪酸をシ

グナル分子としての性腺機能制御メカニズムが下垂体のゴナドトロフに存在することを証明することにある。

3. 研究の方法

(1) GPR120 と GnRH-R mRNA 発現に対する長鎖脂肪酸の役割を *in vitro* で検討

0.1 mM パルミチン酸へ 24 時間暴露したゴナドトロフ株化細胞 LβT2 またはマウス下垂体の初代培養細胞から抽出した mRNA を用いて real-time PCR 法により GPR120 と性腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体 (GnRH-R) mRNA 発現量を定量した。

(2) LH 分泌に対する長鎖脂肪酸の役割を *in vitro* で検討

0.1 mM パルミチン酸を 24 時間前投与した後、10 nM GnRH 投与した培養液中の黄体形成ホルモン (LH) 濃度を調べ、パルミチン酸非投与群と比較した。LH 濃度は ¹²⁵I-LH を用いた RIA 法で測定した。実験には LβT2 を用いた。

(3) GPR120 と GnRH-R mRNA 発現に対する長鎖脂肪酸の役割を *in vivo* で検討

48~72 時間の絶食負荷・30 日間の高脂肪食負荷・頸静脈または下垂体へ留置したカテーテルを介して 0.3% パルミチン酸を投与したマウスの下垂体組織から抽出した mRNA を用いて real-time PCR 法により GPR120 と GnRH-R mRNA 発現量を定量した。

(4) GPR120 mRNA 発現調節因子の検討

卵巣除去(OVX)した成熟雌マウスの皮下にエストロゲン含有シリコンチューブを植え込んだ 1 週間後、下垂体組織から抽出した mRNA を用いて real-time PCR 法により GPR120 と GnRH-R mRNA 発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) LβT2 と成熟マウス下垂体の初代培養細胞を 0.1 mM パルミチン酸に暴露した結果、24 時間の暴露により GnRH-R mRNA 発現量が減少し、GPR120 mRNA 発現量が増加した (Fig.1)。

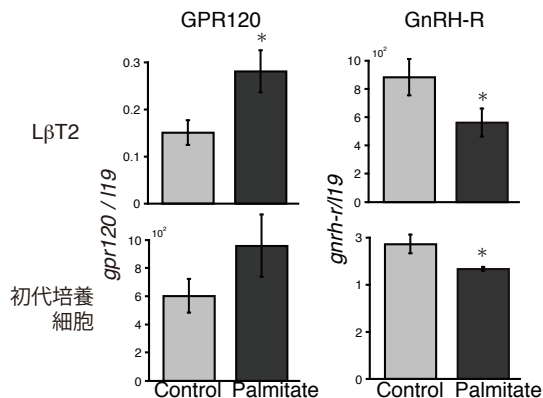


Fig.1

(2) パルミチン酸暴露群とコントロール群の間で GnRH 刺激による LH 分泌量に有意な差は観察出来なかった (Fig.2)。

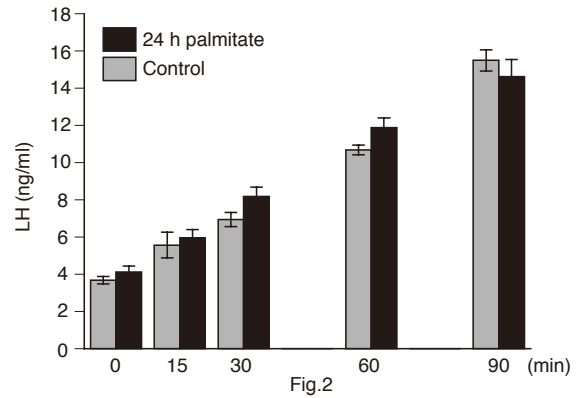


Fig.2

(3-1) 雄マウスに絶食負荷した結果、正常給餌群に比べて、48 時間の絶食で GPR120 mRNA 発現量が増加し、72 時間で GnRH-R mRNA 発現量が減少した (Fig.3)。また、高脂肪食を 30 日間負荷した実験では、低脂肪食給餌群に比べて高脂肪食給餌群において、GPR120 と GnRH-R の mRNA 発現量は増加した (Fig.4)。

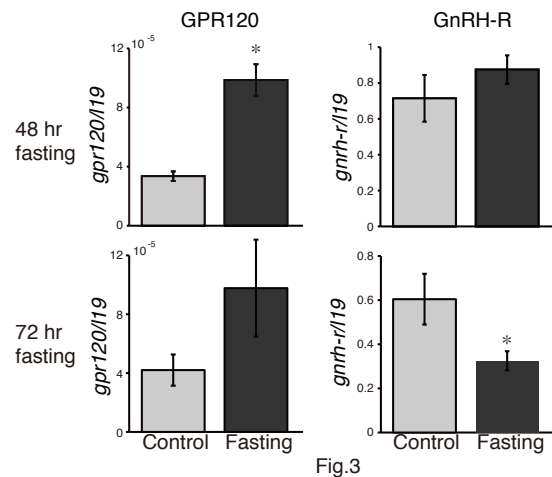


Fig.3

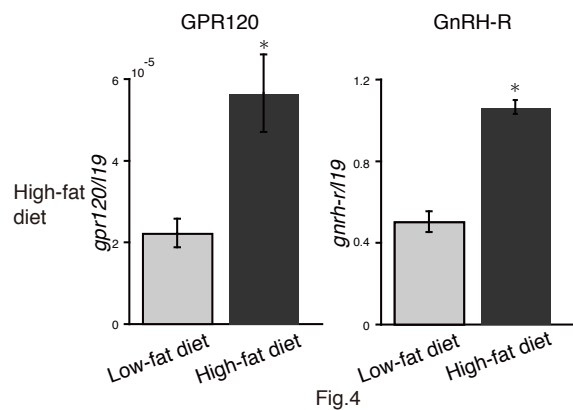
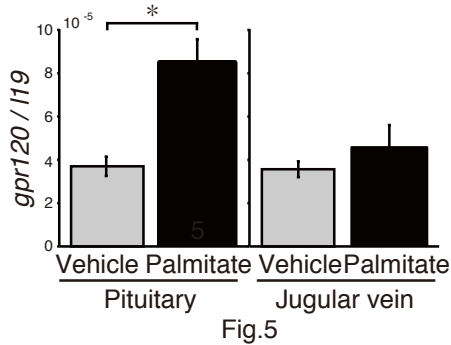


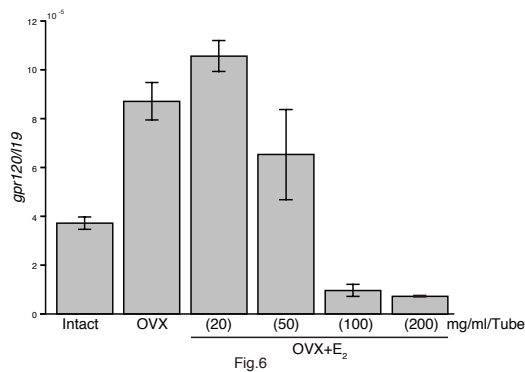
Fig.4

(3-2) 下垂体へ留置したカテーテルを用いて無拘束無麻酔下でパルミチン酸を投与し

た結果、投与 120 分後に下垂体の GPR120 mRNA 発現量の増加が観察された (Fig.5)。しかし、下垂体へ投与したのと同量の微量パルミチン酸を頸静脈へ投与した動物では GPR120 mRNA 発現量の増加は観察できなかった (Fig.5)。また、投与後 120 分の段階では GnRH-R mRNA 発現量に変化は観察出来なかった。この結果から、パルミチン酸は下垂体へ直接作用することで GPR120 mRNA 発現量を増加させることが明らかとなった。



(4) OVX 後、エストラジオール 17β を代償投与した成熟雌マウスを用いて、GPR120 mRNA 発現量の変化を観察した結果、OVX による下垂体での GPR120 mRNA 発現量の増加がエストラジオール 17β の濃度依存的に抑制された (Fig.6)。この抑制はポジティブフィードバックが誘起される高濃度のエストロジェンを投与した群でも観察されたことから、GnRH を介さずエストロジェンが直接的に GPR120 mRNA 発現量を抑制することが明らかとなった。



以上より、長鎖脂肪酸は下垂体のゴナドトロフに直接作用することで GPR120 を活性化すると同時に、GnRH-R 発現を抑制する可能性が示された。また、エストロジェンがゴナドトロフの GPR120 発現調節因子の 1 つであることが明らかとなった。

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)

- ① T. Nishimaru, R. Moriyama, T. Wada, S. Yoshida, K. Shimamoto, M. Nishizawa, S. Ito, Y. Yamaguchi, T. Wakamiya, Analytical study of interaction between spider toxin and glutamate receptors. Peptide Science 2009: K. Okamoto (Eds.), 査読有, Mar 2010, 349-352
- ② N. Fukushima, D. Furuta, Y. Hidaka, R. Moriyama, T. Tsujiuchi, Posttranslational modifications of tubulin in the nervous system, Journal of Neurochemistry, 査読有, May, 2009, Vol. 109, Issue 3, 683-693.
- ③ D. Furuta, R. Moriyama and N. Fukushima, Biochemical re-evaluation of GFP-tubulin expressed in mammalian cells. Science and Technology, 査読無, Feb 2009, Vol. 21, 19-23
- ④ T. Nishimaru, R. Moriyama, T. Wada, S. Yoshida, K. Shimamoto, M. Nishizawa, S. Ito, Y. Yamaguchi, T. Wakamiya, Study directed toward the analysis of interaction between the spider toxin NPTX-594 and glutamate receptors. Peptide Science 2008: M. Nomizu (Eds.), 査読有, Mar 2009, 401-404
- ⑤ S. Shano, K. Hatanaka, S. Ninose, R. Moriyama, T. Tsujiuchi, N. Fukushima, A lysophosphatidic acid receptor lacking the PDZ-binding domain is constitutively active and stimulates cell proliferation. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 査読有, May 2008, Vol. 1783, Issue 5, 748-759.
- ⑥ S. Shano, R. Moriyama, J. Chun, N. Fukushima, Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA(1). Neurochemistry International, 査読有, Jan 2008, Vol. 52, Issue 1-2, 216-220.

[学会発表] (計 27 件)

- ① R. Moriyama, C. Deura, N. Fukusima, Long-chain fatty acids regulate GnRH receptor mRNA expression level in the gonadotrope of the mouse anterior pituitary gland. 43rd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Midwest Airlines Center, Milwaukee, Wisconsin, U.S.A., July 31, 2010.

- ② R. Moriyama, A. Nakai, N. Fukushima, 2-deoxy-D-glucose (2DG) induced glucoprivation suppressed gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) and follicular stimulating hormone β subunit (FSH β) mRNA expression levels in the L β T2 gonadotroph cells. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, March 28, 2010.
- ③ 出浦慎哉、福嶋伸之、森山隆太郎、高脂肪食負荷がゴナドトロフの長鎖脂肪酸受容体 *Gpr120* と性腺刺激ホルモン mRNA 発現に与える影響. 第 102 回日本繁殖生物学会大会、奈良、近畿大学、2009 年 9 月 10 日
- ④ R. Moriyama, C. Deura, N. Fukushima, Palmitate regulates GnRH receptor mRNA expression level in the gonadotrope of the mouse pituitary gland., 第 5 回武田科学振興財団薬科学シンポジウム、東京、グランドプリンスホテル高輪、2009 年 5 月 25 日
他 23 件

[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 RYUTARO)

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