

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570067

研究課題名(和文)キスペプチンをはじめとする脳内ペプチドによる生殖中枢制御機構の解明

研究課題名(英文)Central regulatory system of reproduction by neuropeptides including kisspeptin.

研究代表者

赤染 康久 (Akazome, Yasuhisa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：50302807

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)：キスペプチンは哺乳類の生殖制御においては中心的な役割を果たすが、哺乳類以外の脊椎動物における機能はこれとは異なる可能性があり、未解明である。ヒトでGPR74がKISS1を受容しうるとする報告を踏まえ、メダカのGPR74と、これと関連の深いGPR147に関して、培養細胞系を用いてシグナル伝達機構を解析した。この結果、メダカのGPR74/GPR147は本来のリガンドNPFF/RFRPに対し、濃度により二相性の応答を細胞に惹き起こす可能性が示された。このことからメダカのNPFF/RFRPとGPR74/GPR147の間には、細胞の反応を一定の範囲内に保つ機構が内在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Kisspeptin plays pivotal roles in reproduction in mammals. However, its functions in non-mammalian species remain enigmatic. I therefore analyzed signal transduction of medaka (*Oryzias latipes*) GPR74, which reportedly receives kisspeptin in human, and GPR147, which share common ligands (NPFF/RFRP) with GPR74. At low concentrations, NPFF or RFRP reduced forskolin-induced CRE-luciferase activity in HEK293T cells expressing GPR74/GPR147. However, at higher concentrations, NPFF/RFRP increased CRE-luciferase activity in these cells. Such a concentration-dependent biphasic responsiveness of GPR74/GPR147 to ligands may suggest that medaka GPR74 and GPR147 have an intrinsic ability of maintaining the cellular response within a certain range.

研究分野：神経生物学および比較内分泌学

キーワード：キスペプチン ニューロペプチドFF NPFF GPR74 GPR147 kiss1 kiss2 メダカ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類を用いた研究から、メス動物において卵巣から分泌されたエストロゲンによる視床下部への正負のフィードバックの要はキスペプチンニューロンであり、血中エストロゲン濃度の情報はキスペプチンニューロンから分泌されるキスペプチンによって GnRH ニューロンに伝えられることが明らかにされてきた。

一方、哺乳類以外の多くの脊椎動物ではキスペプチン及びその受容体が 2 種類以上存在し、私が研究対象としてきたメダカにおいてもキスペプチンに kiss1 および kiss2 の 2 種類、受容体にも gpr54-1 および gpr54-2 の 2 種類が存在することが判明した。メダカでは kiss1 のみ発現量が生殖状態・エストロゲンに応じて変動するが、いまのところ kiss1、kiss2 とも直接的には向下垂体性の GnRH ニューロンに作用せず、非哺乳類におけるキスペプチンの機能は不明であった。

このような中で、ヒトのキスペプチンがニューロペプチド FF (NPFF) の受容体 (GPR74、NPFFR2 とともに) を活性化するとする報告があり、キスペプチンの一般的な機能の理解には従来の受容体に関する検討のみでは不十分であり、GPR74 および関連する GPR147 (NPFFR1 とともに) の機能解析も必要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、キスペプチンと関連の深いニューロペプチド FF の受容体 GPR74 および RF アミド関連ペプチドの受容体 GPR147 をメダカでクローニング、機能解析し、キスペプチンをはじめとする脳内ペプチドによる神経内分泌的機能制御に関する理解を深めることを

目的とした。

3. 研究の方法

(1) メダカ kiss1 および kiss2 の新規受容体の検討

キスペプチンが作用する可能性のある受容体として、研究開始時には GPR74 および GPR147 が考えられた。そこでメダカゲノムデータベース上で候補遺伝子配列を検索し、GPR74 に関して 2 種類、GPR147 に関して 1 種類の候補断片を得た。5' および 3' RACE によりこれらの全長配列を決定し、発現ベクターに組み込み、培養細胞系をもちいたルシフェラーゼアッセイにより、リガンド投与時のシグナル伝達の活性を評価した。GPR74、GPR147 は一般に Gi と共役すると考えられるため、forskolin 存在下での cAMP 応答エレメントの活性化を指標とした。

(2) メダカのニューロペプチド FF 受容体の機能解析

メダカの GPR74 および GPR147 に関して、本来のリガンドである NPFF および RFRP による活性化に関してより詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) メダカ kiss1 および kiss2 の新規受容体の検討

ヒトなどの哺乳類においてキスペプチンがニューロペプチド FF (NPFF) 受容体 (GPR74) に作用するとする報告があったことから、メダカの GPR74 に対する kiss1 および kiss2 の効果を検討することとした。この目的から、メダカで NPFF の受容体となり得る NPFF 受容体 (GPR74) および RFRP 受容体 (GPR147) をクローニングすることとした。この結果、メダカにおいて 2 種類の NPFF 受容体

(GPR74-1、GPR74-2)と1種類のRFRP受容体(GPR147)を全長配列決定した。培養細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを利用して、各種受容体を発現させた培養細胞に kiss1 または kiss2 が作用するか否かを検討した。この結果、kiss2 のみが比較的高濃度 (10^{-7} M) で GPR74 および GPR147 を活性化することが判明した。GPR74-1、GPR74-2、GPR147 の in situ hybridization を行ったところ、終神経節の GnRH3 ニューロンに GPR74-1 の発現が認められたため、kiss2 による GnRH3 ニューロン制御の可能性が示唆された。ただし、GnRH3 ニューロンでは NPFF も発現していることが判明したため、GPR74-1 は、むしろ NPFF による GnRH3 ニューロンの自己・傍分泌的な制御に関わる可能性が考えられた。いずれにせよ、終神経の GnRH3 ニューロンは生殖行動等に対する動機付けの調節機能をもつことがよく知られており、これと NPFF の関係が今後の課題である。

真骨魚類にはキスペプチン 1 (kiss1) とキスペプチン 2 (kiss2) が存在し、一部の魚種では kiss1 を失っているが、kiss2 はすべての真骨魚類に保存されていると考えられている。もっとも古く真骨魚類と分岐した現生の条鰭類と考えられるポリプテルス *Polypterus senegals* において kiss1 および kiss2 遺伝子を探索し、kiss2 遺伝子を単離した。すなわち、条鰭類においては kiss2 の保存性が非常に高いことが鮮明となった。

(2) メダカの NPFF 受容体の機能解析

メダカの NPFF 受容体に対する、NPFF 自体の作用を解析することを通じてこれら受容体の機能を解析したところ、予想外の興味深い知見を得た。たとえば GPR74-1 において、

もっとも主要なリガンドである NPFF は低濃度 (10^{-11} ~ 10^{-9} M) では予想通り cAMP 応答エレメントを抑制した。ところが、より高濃度 (10^{-8} ~ 10^{-5} M) では、NPFF は cAMP 応答エレメントを活性化した(図1)。

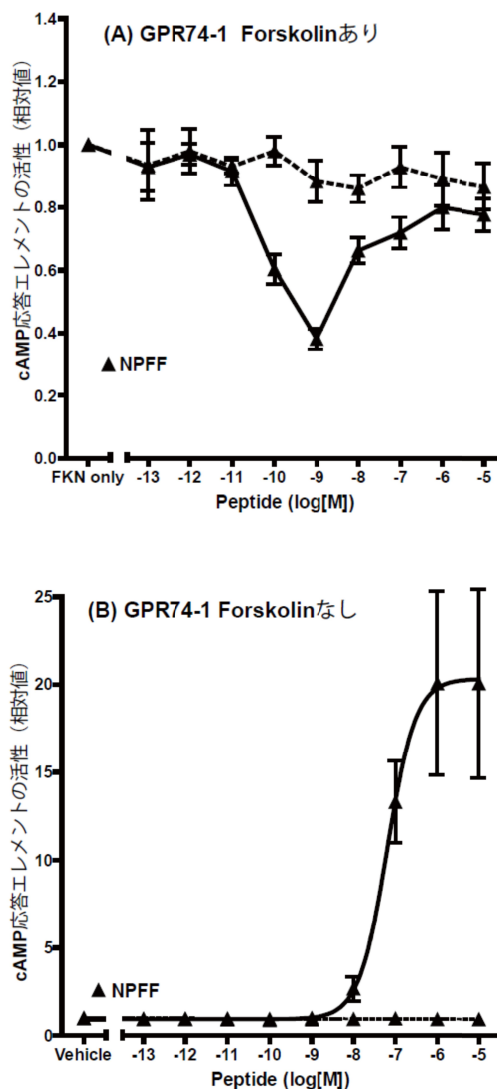


図1. NPFF ()に対する受容体 GPR74-1 の応答。受容体を介した cAMP 応答エレメントの活性化で評価。実線は GPR74-1 発現細胞の、破線は GPR74-1 を発現させていない細胞の反応(対照実験)。上(A)はフォルスコリン存在下、下(B)はフォルスコリン非存在下での結果。横軸はペプチド濃度の常用対数。右側へゆくほど高濃度。

以上は培養細胞 (HEK293T および COS-7) を用いた結果であるが、単一の受容体が、単一のペプチドに対して、濃度に応じて正反対の 2 相性反応を示すことを明らかにした。これにより、単一のリガンドと単一の受容体のセットそれ自体に、過剰な抑制の回避などといった、シグナル伝達を適正な範囲に保つ安全装置としての分子メカニズムが内在されている可能性があることを証明できた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Williams, B.L., Akazome, Y., Oka, Y. and Eisthen, H.L. Dynamic evolution of the GnRH receptor gene family in vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, **14**, 215. (2015) 査読有り

Hasebe, M., Kanda, S., Shimada, H., Akazome, Y., Abe, H., and Oka, Y. Kiss1 neurons drastically change their firing activity in accordance with the reproductive state: insights from a seasonal breeder. *Endocrinology* **155**, 4868-4880. (2014) 査読有り

Kanda, S., Akazome, Y., Mitani, Y., Okubo, K. and Oka, Y. Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulate isotocin and vasotocin neurons. *PLoS ONE* **8** (4): e62776. doi:10.1371/journal.pone.0062776 (2013) 査読有り

Zempo, B., Kanda, S., Okubo, K., Akazome, Y. and Oka, Y. Anatomical distribution of sex steroid hormone receptors in the brain of female medaka. *Journal of Comparative Neurology* **521**, 1760-1780. (2013) 査読有り

[学会発表] (11 件)

森 友紀、善方 文太郎、神田 真司、赤染 康久、岡 良隆 (2015 年 3 月 14 日) 卵巣由来の性フェロモン様物質によるメダカの求愛行動誘起に関する行動学的研究、日本動物学会第 67 回関東支部大会、東京都新宿区早稲田大学

Yasuhisa Akazome, Eri Yamamoto, Yoshitaka Oka (2015 年 3 月 7 日) Ligand dose-dependent switch in G-protein coupling (Gi to Gs) of medaka (*Oryzias latipes*) neuropeptide FF receptors, NPFFR1 (GPR147) and NPFFR2 (GPR74). The Endocrine Society's 97th Annual Meeting & Expo, サンディエゴ (米国)

Akiko Takahashi, Shinji Kanda, Yasuhisa Akazome, Yoshitaka Oka (2015 年 3 月 6 日) Functional analysis of kisspeptin neuronal system in teleosts using knockout medaka. The Endocrine Society's 97th Annual Meeting & Expo, サンディエゴ (米国)

Buntaro Zempo, Shinji Kanda, Yasuhisa Akazome, Yoshitaka Oka (2015 年 3 月 6 日) POA ER alpha neurons transmit estrogen feedback signal to GnRH1 neurons for the hypothalamo-pituitary-gonadal axis regulation." The Endocrine Society's 97th Annual Meeting & Expo, サンディエゴ (米国)

Yuki Mori, Buntaro Zempo, Shinji Kanda, Yasuhisa Akazome, Yoshitaka Oka (2014 年 9 月 20 日) The ovary as an origin of female sex pheromonal substances in medaka. " 第 20 回小型魚類研究会、東京都港区慶應義塾大学

善方文太郎、神田真司、赤染康久、岡 良隆 (2014 年 9 月 11 日) メダカ脳におけるエストロゲン受容体 発現ニューロン

の可視化および神経線維投射の形態学的解析、日本動物学会第 85 回大会、宮城県仙台市、東北大学

Akiko Takahashi, Sadiql Islam, Yasuhisa Akazome, Hideki Abe, Kataaki Okubo, Yoshitaka Oka (2013 年 11 月 9 - 13 日) Morphological analysis of the early development of GnRH neuron systems. The 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, サンディエゴ (米国)

染谷 祐樹、赤染 康久、岡 良隆 (2012 年 3 月 17 日) 原始的条鰭類ポリプテルスにおける GnRH・キスペプチンの分子同定 ” 日本動物学会関東支部第 64 回大会、千葉県習志野市、東邦大学

本多久楽々、赤染 康久、岡 良隆 (2012 年 3 月 17 日) メダカにおける日長依存的な生殖制御機構に関する神経内分泌学的解析 ” 日本動物学会関東支部第 64 回大会、千葉県習志野市、東邦大学

Yasuhisa Akazome, Eri Yamamoto, Yoshitaka Oka (2012 年 11 月 6 - 9 日) Kiss2 may activate receptors for neuropeptide FF (NPFF) / RF amide related peptide (RERP) in medaka. The Second World Conference of Kisspeptin Signaling in the Brain, 東京都文京区、東京大学

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

赤染 康久 (AKAZOME, YASUHISA)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 50302807

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者