
大規模オミックスの活用による生殖内分泌組
織の新たな機能制御法の確立

平成26年度～平成30年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果報告書

2019年（令和元年）5月

学校法人名 学校法人明治大学

大 学 名 明治大学

研究組織名 明治大学
生殖内分泌研究所

研究代表者 戸村 秀明

（明治大学 農学部 教授）

<はしがき>

本プロジェクト「大規模オミックスの活用による生殖内分泌組織の新たな機能制御法の確立」は、平成 26 年度（2014 年度）に文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業として採択され、明治大学特定課題研究所「生殖内分泌研究所」（2018 年 4 月より内分泌研究所）を中心として 5 年計画で研究を推進した。

食料を安定的に確保すること、生物の多様性を確保し環境の維持・向上を図ること、遺伝子改変動物の作成や解析を通じて生命の理解に寄与することなど、農学には重要な使命がある。この使命を果たすためには、家畜、希少動物、繁殖効率の悪い遺伝子改変動物の生殖能力を高めることが必須である。本プロジェクトは生殖機能を調節する下垂体や性腺組織を中心に、大規模オミックスを活用して組織の形成やホルモン生成機構、また精子・卵の形成や成熟の制御因子と機序の網羅的解析に基づき、それらを人為的に制御する方法の開発を目的としている。

本プロジェクトは今年度（2018 年度）で、開始から 5 年目となる最終年度をむかえた。本報告はこれまでの研究成果をまとめたものである。本プロジェクトは、受容体や情報伝達系の研究を行ってきた戸村を中心に、下垂体形成に関与する転写因子群の解析を行ってきた加藤、エピジェネティクスの研究を行ってきた大鐘、オミックスを駆使した研究を行ってきた紀藤、バイオインフォマティクスを専門とする矢野を構成メンバーとする研究体制で臨んできた。この「研究成果報告書」は 6 つの章からなる。まず、第 1 章は「プロジェクトの総括」として、研究代表者が報告している。第 2～6 章では、研究代表者および研究分担者が推進してきた課題についてサブプロジェクトごとに報告する。各サブプロジェクトは、第 2 章では「生殖機能を制御する受容体と情報伝達の同定と

化合物等による生殖機能制御法の確立」、第 3 章は「生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの解明とその制御法の開発」、第 4 章「エピジェネティクスを利用した有用細胞の同定法および樹立法の確立」、第 5 章「新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発」、第 6 章は「システムズバイオロジーによる生体組織形成機構の解明と知識情報統合データベース構築」となっている。

本プロジェクトの推進により、異なる分野を専門とするメンバー間の相互理解が深まるとともに、単独の分野の発展のみでは成しえなかった「生殖内分泌とバイオインフォマティクス」の共同による新たな生命科学研究拠点のひとつに、本学が発展しつつあることを感じている。今後はこれらの研究体制を基盤にさらなる飛躍をはかり、わが国だけでなくグローバルな視点で上記農学に課せられた課題の克服に向けた情報の提供と研究拠点の構築を目指したい。

研究代表者 戸村 秀明 (明治大学農学部・教授)

2019年3月31日

【目次】

1. プロジェクト総括(研究代表者:戸村 秀明)	4
2. 生殖機能を制御する受容体と情報伝達の同定と化合物等による 生殖機能制御法の確立 (戸村 秀明)	37
3. 生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの 解明とその制御法の開発 (加藤 幸雄)	68
4. エピジェネティクスを利用した有用細胞の同定法および 樹立法の確立 (大鐘 潤)	103
5. 新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による 機能調節法の開発(紀藤 圭治)	124
6. システムズバイオロジーによる生体組織形成機構の 解明と知識情報統合データベース構築 (矢野 健太郎)	147

第1章
プロジェクト総括

大規模オミックスの活用による生殖内分泌組織の
新たな機能制御法の確立

戸村秀明、加藤幸雄、矢野健太郎、紀藤圭治、大鐘潤

Establishment of novel methods for functional control of
reproductive endocrine tissues by using of large-scale omics data
Hideaki Tomura, Yukio Kato, Kentaro Yano, Keiji Kito, Jun Ohgane

1. はじめに

質・量ともに十分な食糧を安定的に確保し、食を通して人の健康を維持すること、生物の多様性を確保し、地球規模で環境の維持・向上を計ること、そして人の健康的な生活への貢献など、農学には課せられた重要な使命がある。

本研究では、動物の生殖機能の調節に重要な役割を担う下垂体-性腺に焦点をあて、組織形成、成熟やホルモン産生を制御する因子、経路を網羅的に解析する大規模オミックスを活用し、生殖内分泌組織の新たな機能制御法の確立を目指している。これまで、転写因子、液性因子、ホルモンとその受容体、エピジェネティック修飾などが知られているが、まだ報告のない因子の欠損動物に生殖機能の異常が確認されるなど、依然として未知な制御因子や調節経路の解明が必要である。

これらの成果は、家畜や魚類などの産業動物の繁殖向上と動物資源の安定的な供給への貢献となる。また、絶滅危惧種の繁殖へと応用するこ

とで種の保存と生物の多様性が維持され、地球環境の維持への貢献となる。さらに、人の不妊症や妊娠の改善などの生殖医療にも寄与し、極めて重要な意義をもっている。

本研究は 2014-2018 年度の 5 年間のプロジェクトとして行われた。本年度（2018 年度）は、最終年度となっている。本稿は 5 年分の研究成果をまとめたものである。

2. サブプロジェクトおよびその担当者

本研究では、生殖組織の分子や調節経路を網羅的に解析し、新規の因子や調節経路の制御法の開発を行うことを目的にしている。そこで、本プロジェクトでは以下の担当者のもと、5 つのサブプロジェクトに分けることで互いに有機的に連携した研究を組織し、効率的に研究を推進した。

①下垂体-性腺組織の発生・分化にともなう因子群の同定（加藤）②エピジェネティクス制御感受性遺伝子の同定と疾病モデル細胞の作製（大鐘）③組織形成・ホルモン合成に重要な受容体、情報伝達関連因子群の同定（戸村）④プロテオミクスによる分泌性タンパク質、組織形成因子の網羅的な解析（紀藤）⑤大量のオミックスデータのバイオインフォマティクスを駆使した、変動の大きな因子群の同定、クラスタリング、パスウェイの予測解析と、オミックス情報のデータベース化（矢野）。

3. 研究組織

5 つのサブプロジェクトと担当者をまとめると以下のようなになる。

研究者名	所属・職名	サブプロジェクトでの研究課題	サブプロジェクトでの役割
------	-------	----------------	--------------

戸村 秀明	農学部・教授	生殖機能を制御する受容体と情報伝達の同定と化合物等による生殖機能制御法の確立	下垂体・性腺で機能する細胞内情報伝達系分子を用いた細胞機能調節法の開発
加藤 幸雄	研究・知財戦略機構 客員研究員	生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの解明とその制御法の開発	下垂体・性腺で機能する転写因子等を用いた細胞機能調節法の開発
矢野 健太郎	農学部・教授	システムズバイオロジーによる生体組織形成機構の解明と知識情報統合データベース構築	コンピューター解析による新規有用遺伝子の網羅的探索と応用に向けた選別
紀藤 圭治	農学部・准教授	新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発	下垂体・性腺組織形成における有用分子の同定と機能調節への応用
大鐘 潤	農学部・准教授	エピジェネティクスと非コードRNAを利用した有用細胞の同定法および樹立法の開発	下垂体機能と生殖機能に有用な遺伝子の選抜と遺伝子改変による機能調節法の開発

4. 総合的な達成度、研究成果

本プロジェクトは2016年度に中間評価を受けた。中間評価に至るまでの研究成果と達成度を以下に示す。右欄の総合的な達成度は自己評価であり、◎は目標よりも達成度が高い、○は目標通りに進捗している、△はやや予想より遅れていることを示している。

表1 中間評価まで(2014-2016)における研究目標と具体的な研究成果および達成度

サブプロジェクト	目標 (2014-2016年度)	具体的な研究成果	総合的な達成度
	下垂体・性腺系組織の発生・分化に関わる受容体・情報伝達分子の細胞生物学的機能解析	下垂体ゴナドトロフ細胞株を用いて、受容体・シグナル伝達系を迅速に定量するルシフ	○

	<p>ホルモン産生細胞の受容体、シグナル伝達系の迅速アッセイを可能とする改変細胞の樹立</p> <p>公開データベースからの内分泌機能制御に関わるマイクロアレイ実験データの収集</p> <p>迅速アッセイ系を用いた下垂体・性腺系組織の受容体・情報伝達分子の細胞生物学的機能解析</p> <p>統合データベースの抽出情報に基づくアゴニスト、アンタゴニスト、活性化修飾剤による細胞機能調節法の検討</p>	<p>ェラーゼアッセイ系を構築した。さらに、ホルモン分泌の迅速かつ簡便なアッセイ系の構築に成功した。メンバーの加藤と連携して、公開データベース、文献情報も利用して「下垂体ゴナドトロフに発現する GPCR 情報」を抽出し、候補としてプロトン感知性 GPCR の解析を行った。さらに、金属種や抗不安薬による GPCR の活性化様式が動物種により異なることを、見出した。以上の研究結果をその関連結果と合わせて、業績として報告した。</p>	
<p>生殖内分泌の組織形成を制御する分子プログラムとその制御法の開発</p>	<p>下垂体・性腺系組織の発生・分化に関わる転写因子の機能と標的遺伝子の解析</p> <p>下垂体・性腺系組織の発生・分化に関わる遺伝子のメチル化状態と発現レベルの解析</p> <p>下垂体の幹・前駆細胞性を維持した細胞とその分化誘導の制御法の検討</p> <p>下垂体・性腺組織の発生・分化にともない変動する遺伝子発現プロファイルデータの取得</p> <p>雄性不妊を呈する精子形成異常ラットを用いた精巣発現遺伝子プロファイルの作成</p> <p>精巣発現遺伝子プロファイル解析に基づく精子形成異</p>	<p>DNA メチル化や約 20 の制御因子が PROP1 遺伝子発現の制御に関わる事を報告した。また、下垂体幹・前駆細胞ニッチを形成する細胞塊の単離と、その一部のホルモン産生細胞への分化誘導に成功した。2015 年度は「創薬等支援技術基盤プラットフォーム」支援事業の採択を受けて、幹・前駆細胞塊の RNAseq 解析を開始し、一部の成果を学会発表した。並行して、幹・前駆細胞に関する論文数編を報告した。さらに、神経堤細胞が、発生初期の下垂体に侵入して幹・前駆細胞の一部となりホルモン産生細胞にも分化する論文を発表した。「下垂体・性腺組織</p>	<p>◎</p>

	<p>常原因遺伝子の同定とその作用機序の解析</p> <p>公開データベースからの下垂体と性腺組織の発生・分化に関わるマイクロアレイ実験データの収集</p> <p>下垂体と性腺の組織形成に関わる既知遺伝子の情報収集とアノテーション統合データベースの開発</p>	<p>で発現する遺伝子のデータベース作成」も、メンバーの矢野との連携により、プロトタイプの公開に向けて前進した。</p>	
<p>システムズバイオロジーによる生体組織形成機構の解明と知識情報統合データベース構築</p>	<p>公開データベースからの下垂体と性腺組織の発生・分化に関わるマイクロアレイ実験データの収集</p> <p>取得データと公開データの統合による下垂体と性腺組織の発生・分化関連遺伝子群の探索</p> <p>シグナルの受容、細胞質でのシグナル伝達、核内での転写制御、エピゲノム記憶のオミックス情報の統合化</p> <p>下垂体と性腺の組織形成に関わる既知遺伝子の情報収集とアノテーション統合データベースの開発</p>	<p>本プロジェクトの目的である「下垂体形成に関わる転写因子 PROP1 のターゲット遺伝子探索」のために、ChIP-Chip、ChIP-Seqより得られたオミックス情報を活用し、転写因子 PROP1 のターゲット遺伝子を網羅的に探索した。高速シーケンサーから得られる配列情報のうち高精度な配列領域のみを抽出・解析に活用し、リファレンス配列への詳細なマッピング条件を検討した。また、サンプル間の差異の容易な検出のために、遺伝子発現量や遺伝子間相互作用情報、遺伝子機能情報の統合や、テキストマイニングによる下垂体形成に関わる遺伝子・化合物等の網羅的な抽出を行った。得られた遺伝子・化合物の機能アノテーション情報を容易に操作し、目的情報を迅速かつ円滑に取得可能な Web インターフェースと Web データベ</p>	<p>◎</p>

		<p>ースのプロトタイプを構築した。以上の研究結果をその関連結果と合わせて、業績として報告した。</p>	
<p>新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発</p>	<p>プロテオーム解析に向けた安定同位体標識を用いたタンパク質変動パターンの定量的解析法の検討</p> <p>安定同位体標識を用いたタンパク質変動パターンの定量的プロテミクス解析によるデータ収集</p>	<p>「下垂体・性腺組織形成における機能タンパク質を同定」を担当し、安定同位体標識と質量分析による解析系の確立をするとともに、加藤や学外協力者と連携して、培養細胞分化系を用いて安定同位体標識と質量分析を組み合わせたプロテオーム定量解析を展開した。1) プロテオーム解析に適したタンパク質抽出方法と、2) 培養細胞の安定同位体標識方法を検討し、最低必要細胞数を決定した。マウス下垂体の濾胞星状細胞株 TtT/GF 細胞を用いた同位体標識量を解析し、細胞分化の誘導に関する基本的な実験条件を確立した。TtT/GF 細胞を TGFβ2 で分化誘導したときに発現量が変動するタンパク質の同定を開始した。タンパク質情報の曖昧さを軽減させ、約 1500～2000 種類のタンパク質の比較定量を行い、その内の約 5% の発現量変動を確認した。同条件で採取した mRNA を用いて、その発現変動との関係を調べた。以上の研究結果をその関連結果と合わせて、業績として報告した。</p>	○

<p>エピジェネティクスと非コードRNAを利用した有用細胞の同定法および樹立法の開発</p>	<p>下垂体・性腺系組織の発生・分化に関わる遺伝子のメチル化状態の解析と発現レベルの解析</p> <p>下垂体・性腺系組織で発現する非コードRNAの網羅的解析によりプロファイルデータの取得</p> <p>下垂体・性腺系組織の非コードRNAプロファイルデータと他組織のそれらとの発現ネットワークの解析</p> <p>統合データベースの抽出情報に基づく生殖内分泌組織の非コードRNAによるDNAメチル化改変細胞の作出</p>	<p>脳下垂体、性腺の機能に重要な約 200 遺伝子を選抜し、次世代シーケンサーによるウルトラディープ DNA メチル化解析を行った。その結果、ブタ脳下垂体と肝臓、および成体幹細胞に近い胎仔繊維芽細胞について、アリルごとの DNA メチル化状態に注目した新たな解析により、脳下垂体の幹前駆細胞や各種ホルモン産生細胞の存在比率についての評価法の確立に成功した。幹細胞から生殖内分泌に関連する有用細胞樹立を目指して、幹細胞のエピジェネティック状況に影響を与える化学物質の組み合わせた分化条件や薬剤効果などの成果を発表した。さらに、接着因子 FBN1 の遺伝子の DNA メチル化による発現制御機構及び発生過程でのメチル化状態の確立時期を同定した。培養ディッシュへの接着性の違いを利用した下垂体・性腺系の成体幹細胞と分化上皮細胞などの分離や、有用細胞の作製へと研究を展開した。エピジェネティック制御に関与する非コード RNA を利用した有用細胞作製を目指して、ヒトやマウスとの配列保存性を指標としてデータベースが貧弱なブタの約 6,000 遺伝子の制御領</p>	<p>◎</p>
--	--	--	----------

		域を同定し、今後の非コード RNA の解析を可能とした。以上の研究結果をその関連結果と合わせて、業績として報告した。	
--	--	--	--

次に プロジェクト後半(2017-2018)における研究成果と達成度を示す。

表 2 中間評価後からプロジェクト終了時 (2017-2018) における研究目標と具体的な研究成果および達成度

サブプロジェクト	目標 (2017-2018 年度)	具体的な研究成果	総合的な達成度
生殖機能を制御する受容体伝達情報と化合物等による生殖機能制御法の確立	<p>アゴニスト、アンタゴニスト、活性化修飾剤によるホルモン合成、細胞増殖を指標とした機能改善法の検討</p> <p>アゴニスト、アンタゴニスト、活性化修飾剤によるホルモン合成、細胞増殖を指標とした機能改善法の確立</p>	<p>オミックス情報から得られた候補分子のキャラクタリゼーションの一例として、プロトン感知性 GPCR を用いた解析を行った。その結果、従来のリガンド以外に活性を修飾するリガンドが存在すること、またその修飾様式は、用いる動物種により異なることが明らかとなり、活性修飾候補分子活性の制御に新たな方向性を示すものとなった。また、動物種により同じ候補分子が異なるリガンド特異性を示すことが明らかとなった。用いる動物種が示すリガンド特異性を考慮することでホルモン合成などの機能を改善するための方法が確立できることを明らかにし、成果として報告した。</p>	○

<p>生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの解明とその制御法の開発</p>	<p>下垂体の幹・前駆細胞性を維持した細胞とその分化誘導の制御法および機能調節法の検討と確立</p> <p>精巣特異的発現による精子形成、ウイルス感染防御の制御法の検討</p> <p>精巣特異的発現制御による異常精子形成の防御法と雄性不妊改善法の確立</p>	<p>下垂体幹・前駆細胞の単離に成功し、その細胞塊を使った分化誘導の実験をまとめた。株化細胞を用いた分化誘導についても、その過程で変動するタンパク質の網羅的な解析をまとめた（紀藤と連携）。また、バイオインフォマティクスによる下垂体の発現遺伝子解析の取り組み（矢野と連携）、も予定通り進んでいる。</p>	<p>◎</p>
<p>システムバイオロジーによる生体組織形成機構の解明と知統データベース構築</p>	<p>シグナルの受容、細胞質でのシグナル伝達、核内での転写制御、エピゲノム記憶のオミックス情報の統合化</p> <p>生殖内分泌組織の取得データベースのオミックス統合データベースの構築</p> <p>生殖内分泌組織について、シグナル受容体、細胞質内シグナル伝達分子、核内転写制御、DNAメチル化・非コードRNAのエピゲノム記憶、プロテオミクスなどで構成されるオミックス統合データベースを構築し公開</p>	<p>データベース開発に加えて、特に、オンライン上に蓄積している実験データや文献情報といったビッグデータの活用化を推進した。実験データと文献情報は今後もオンライン上で蓄積していくため、逐次、データ収集を実施し、解析を行う。また研究計画の効率的な推進・達成のため、解析パイプラインを整備した。データベース開発に加えて、特に、オンライン上に蓄積している実験データや文献情報といったビッグデータの活用化も推進した。特に、下垂体における遺伝子や化合物の生物学的機能を収集するために想定以上の精度をもつ自然言語処理技術基盤を開発した。</p>	<p>◎</p>
<p>新規組織形成因子のプロテ</p>	<p>プロテオーム情報に基づいた翻訳後修飾の調節による内分泌細胞機能の制御法の検討</p>	<p>培養細胞分化過程で特異的な発現パターンを示すタンパク質の</p>	<p>◎</p>

<p>オミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発</p>	<p>安定同位体標識を用いた発現パターンの定量解析による下垂体と性腺組織のプロテオミクス解析</p> <p>プロテオーム情報に基づく下垂体と性腺組織における時期特異的発現タンパク質の翻訳後修飾の調節による内分泌細胞機能の制御法の確立</p>	<p>プロテオーム解析を行い、これまでに約 180 種類のタンパク質が分化誘導因子である TGFβ 刺激に依存した発現量の変動を示すことを明らかとした。プロテオーム解析データを整理し、発現量の変動するタンパク質の機能的特徴を明らかにし、これらの成果を公表した。</p>	
<p>エピジェネティクスと非コードRNAを利用した有用細胞の同定法および樹立法の開発</p>	<p>下垂体と性腺の組織形成に関わる非コード RNA を用いた DNA メチル化改変による機能制御と改変細胞の検討・確立</p> <p>下垂体と性腺の組織の疾病モデル細胞の樹立と非コード RNA を用いた機能解析、分化誘導法の検討・確立</p>	<p>アレル毎の DNA メチル化状態に注目した組織などの不均一な細胞集団内で特定の細胞種の存在比を推定する方法を確立し、投稿論文として発表した。これにより下垂体や性腺での有用細胞の分化誘導効率の評価が可能になった。遺伝子の転写調節領域近傍に存在し、エピジェネティックな制御に関与する非コード RNA を同定することを目的として、まずゲノム、転写物のデータベースが貧弱なブタにおいて、ヒトやマウスとの配列保存性を指標としてブタの 6,000 遺伝子ほどの転写開始点およびプロモーター領域を同定した。これによりブタでもプロモーター領域に存在する非コード RNA の解析が可能になり、エピゲノム改変用ベクターの構築に着手することが可能となった。エピゲノム改変用ベクター構築を</p>	<p>◎</p>

		終了し、培養細胞への導入も可能とした。	
--	--	---------------------	--

5. 優れた成果が上がった点

生殖機能を制御する受容体と情報伝達の同定と化合物等による生殖機能制御法の確立

公開データベース、文献情報などのオミックス情報を利用して「下垂体ゴナドトロフに発現する受容体の情報」のうち、特にこれまで戸村が主に解析してきた G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に焦点を絞り、その情報を抽出した。その結果、ゴナドトロフに発現する GPCR の一つとして Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1) を新たに見出した。OGR1 は pH の低下、金属イオンなど多彩な生体情報を感知して活性化するプロトン感知性 GPCR の一種である。またこの GPCR は現在使用されている抗不安薬の標的の一つともなっている。そしてゴナドトロピン産生細胞を用いたホルモン分泌の迅速なかつ簡便な検出を可能とするアッセイ系を構築した。このアッセイ系は Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) を用いており、分泌量を発光量として簡便に測定することが可能である。このアッセイ系は従来のホルモンの検出および定量に汎用されているラジオイムノアッセイ (RIA) および酵素結合免疫アッセイ (ELISA) とは異なり、測定したいホルモンに対する特異的な抗体を必要とせず、かつ細胞からの分泌をリアルタイムに測定することを可能とすることから RIA, や ELISA にはない長所を有している。このアッセイ系を用いて、ホルモン産生細胞からのゴナドトロピン分泌を測定したところ、pH の低下が OGR1 を介してゴナドトロピンの分泌にいたる細胞内情報伝達系が変化し分泌を修飾することが、初めて明らかとなった。またこの GPCR をタ

ーゲットとする抗不安薬は、生殖を制御する新たなツールとなる可能性が示唆された。すなわち本研究の結果は、オミックス情報を利用してゴナドトロフにどのような受容体を発現しているのかを調べることにより、ゴナドトロフが調節を受ける未知の刺激を解き明かすとともに、その受容体のアゴニスト・アンタゴニスト・活性修飾剤の利用が、新たな生殖機能の制御方法の開発へとつながる可能性を示唆するモデル系とすることができた。

生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの解明とその制御法の開発

1) 下垂体組織を恒常的に維持するために必須の幹・前駆細胞について、多数の新知見を見出し報告した。特に、①幹・前駆細胞二特徴的な複数の因子が示す局在を明らかにし、それらの細胞が、②下垂体内で二種のニッチを形成すること、③そのうち実質層を構成する細胞集団(塊)を酵素分散により単離することに成功し、④その細胞塊の特性を解析した。その一部が血管内皮細胞様の分化をすることを明らかにした。また、⑤膜抗原タンパク質 CD9 の抗体を使用し、幹・前駆細胞を分取するユニークな方法を開発し、それらの特性を解析した。⑥さらに、第4の胚葉とされる神経堤細胞由来のP0タンパク質系譜とSOX10系譜の細胞を解析し、⑦それぞれの細胞系譜が、前葉と後葉から、胎仔期初期に外胚葉由来の下垂体に侵入することを初めて観察し、それぞれを論文報告した。一方、分化に関わる遺伝子についての解析も進め、⑧PROP1 遺伝子の発現制御には多数の因子がそのプロモーター上流に作用すること、⑨PROP1の遺伝子のメチル化が発生初期に発現に部分的に関与していること、⑩PROP1 遺伝子が初期の下垂体原基でレチノイン酸の制御を受けること、

を明らかにした。下垂体機能にとって重要な毛細血管形成には PRX1 と PRX2 陽性の細胞が関与している事も、初めて明らかにした。また、霊長類下垂体について初めて幹・前駆細胞の特性を明らかにし、今後のヒトを含めた下垂体研究の展開に貴重な情報をもたらした。2) 下垂体の分化や機能調節に関しても研究を展開した。①本研究で確立した幹・前駆細胞の分取法を使ってホルモン産生細胞に分化する条件を見つけるとともに、②条件を変えることで非ホルモン産生細胞へと分化する事を見出した。また、3種の下垂体由来の株化細胞をつかって、③いずれもが未分化性を持ち、今後「細胞機能調節法の開発」に有用な材料である事を示した。さらに、④そのうちの1つで、非ホルモン産生細胞である骨格筋細胞への分化能を持つとされる Tpit/F1 が、ホルモン産生細胞へも分化しうることを初めて報告し、この細胞の有用性を示した。⑤さらに、もう一つの細胞株 TtT/GF は TFG β の作用により、血管系細胞を構成するペリサイトの特徴を示す細胞へと形質誘導される事を示した。この成果は、下垂体血管系の構築に有用である。⑥残る Tpit/E は、他の細胞と同じ処理では分化誘導が起こらず未分化性を強く保つ細胞である事が判り、幹細胞性の高いものと思われ、今後の下垂体の再生といった課題に重要な材料となる事が期待できた。3) 異所性にヘルペスウイルスのチミジンキナーゼを精巣に発現させることで雄性不妊を呈するラットの解析を進め、①ヘルペスウイルスチミジンキナーゼが、精巣特異に、かつ円形精子細胞で起こっていること、②雄性不妊（精子形成不全）を誘発することを明らかにした。③このことを、ヒト男性不妊患者で解析し、多くの患者でヘルペスウイルス感染を確認した。④感染患者について、精巣におけるチミジンキナーゼ遺伝子の発現とチミジンキナーゼタンパク質の有無を確認し、いずれの存在も同定することを初めて見だし、論

文発表した。この研究成果は、精子形成の機序の解明とその制御法の開発、不妊症の診断、治療法、不妊治療薬の開発などに資することができる知見である。

システムズバイオロジーによる生体組織形成機構の解明と知識情報統合データベース構築

成長・疾患などに関わる遺伝子や化合物の情報をディープランニング手法を用いて解析することによって、迅速かつ高精度に抽出する知能情報基盤整備・人工知能開発・社会実装などが期待される。

新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発

マウス下垂体から単離された TtT/GF 細胞は、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析から未分化能の形質を有することが示唆される細胞株である。そこで、下垂体組織形成の細胞培養系のモデルとしての本細胞株の有用性と本細胞の分化誘導過程において発現量が変動するタンパク質群の同定を目的として研究を行った。TtT/GF 細胞を TGFβにより分化誘導すると、代表的なシグナル伝達分子である SMAD2 が核内に移行すること、また血管周皮細胞で発現する遺伝子群の発現量の上昇がみられたことなどから、本細胞は TGFβにより分化誘導されることが示された。また、様々な組織形成に深く関与している細胞である血管周皮細胞に特徴的なマーカーが、マウス下垂体組織の血管周辺領域の一部で発現していることも確認された。これらのことより本細胞株は下垂体組織形成の詳細や血管周皮細胞の組織形成への関与を調べるうえの細胞培養系のモデルとして有用であるが示された。次に TtT/GF 細胞を用いた分化誘導過程にお

いて発現量が変動する分子群についてプロテオーム解析を行うために、タンパク質抽出方法、プロテオーム定量解析手法である SILAC (stable-isotope labeling by amino acids in cell culture) 法での安定同位体による標識効率、SILAC 法での細胞分化への影響、などを検討した。プロテオーム解析に必要な十分なタンパク質量が回収できること、定量解析に支障のない標識率が実現できること、細胞分化過程への影響も最小限であることが確認され、本研究におけるプロテオーム定量解析手法を確立することができた。実際のプロテオーム解析として、マウス TtT/GF 細胞の TGF β 刺激による分化過程で発現量が変動するタンパク質の同定を行い、約 180 種類のタンパク質が TGF β 刺激に依存して発現量が変動することが明らかとなった。そのなかには分化に伴う細胞形態変化に関わるタンパク質に加え、血管周皮細胞で特徴的に発現がみられる多数のタンパク質も含まれていた。以上の結果より、本細胞株が下垂体組織形成の細胞培養系としての良いモデルとなることを実証するとともに、血管周皮細胞への細胞分化過程でのタンパク質発現変動を明らかにすることができた。本成果はすでに学術論文として発表した。

エピジェネティクスと非コード RNA を利用した有用細胞の同定法および樹立法の開発

脳下垂体および下垂体ホルモン標的組織での DNA メチル化を中心としたエピゲノム解析・改変により、脳下垂体および関連組織の DNA メチル化プロファイルを取得し、下垂体ホルモン標的組織でのエピゲノム改変により以下の知見が得られた。脳下垂体での幹前駆細胞およびホルモン産生細胞で発現する主要遺伝子に注目して、バイサルファイト法による DNA メチル化解析を行った。これにより脳下垂体細胞の増殖・分化やホ

ルモン分泌に関わる遺伝子の細胞種特異的 DNA メチル化パターンを同定した。さらに、脳下垂体で発現する主要遺伝子について、脳下垂体と脳下垂体ホルモンの主要な標的器官である肝臓、精巣などの組織を比較することで DNA メチル化プロファイルを作成し、脳下垂体およびその構成細胞を他の細胞と区別する方法を確立した。確立したアルゴリズムのメチル化状態に注目した DNA メチル化解析法により優性遺伝性疾患の発症原因の推定や環境化学物質によるエピジェネティクスへの影響評価に繋がった。また、下垂体ホルモンの標的組織の一つである骨格筋において、筋分化を抑制するミオスタチン (*MSTN*) 遺伝子のプロモーター上流に同定した長鎖非コード (linc) RNA をアンチセンスオリゴ DNA によって阻害することでエピジェネティックなプロモーター活性阻害が起きることを同定した。以上、脳下垂体の発生および機能に関わる遺伝子群の DNA メチル化プロファイルを取得して他の組織と比較することで脳下垂体に存在する各細胞種の同定法を確立し、下垂体ホルモンの標的組織の一つである骨格筋においては lincRNA を介したエピゲノム制御により筋分化関連遺伝子の転写調節を行うことができることを見出した。これによりエピゲノム改変による有用細胞樹立の基礎を築くことができた。

6. 問題点

生殖機能を制御する受容体と情報伝達の同定と化合物等による生殖機能制御法の確立

これまでの成果は、主にヒトやマウスの細胞を用いて得られた結果である。そこで本研究で得られた結果が、家畜を含む多種多様な動物種においても適応可能であるかどうかを検証した。マウス、ラット、ヒト以外の動物種における OGR1 情報は文献データからは得ることができな

ったので、各種公開データベースを利用して各動物種における OGR1 相同遺伝子情報を取得し、解析した。その結果、調べた動物種（ヒト、ブタ、ラット、マウス、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ）のすべての OGR1 または OGR1 相同遺伝子産物は、細胞外 pH の低下に伴い活性化した。すなわちプロトン⁺は、進化的に OGR1 に対して共通のリガンド作用を示すことが明らかとなった。一方、金属イオンに対するこれらの受容体応答には差が観察された。すなわち、各棒物種由来の OGR1 または相同遺伝子産物を活性化する金属イオンの種類には差があることが本研究により初めて明らかとなった。この結果は、金属イオンをベースとした化合物によって動物の生殖を制御する場合、対象となる動物種により用いる化合物の有効性が異なるという課題が存在することを示している。しかしながら逆にその特性を事前に明らかにすることで、対象となる動物種に特異的な有効性のある化合物への開発へとつながる可能性がある。

生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの解明とその制御法の開発

本研究により、下垂体の組織形成にとって重要なこの組織幹・前駆細胞について多様な特性と、そことで機能する重要な遺伝子が明らかになったが、どの様にホルモン産生細胞や下垂体の内分泌機能維持に関わる細胞群が出現するかという課題は、まだ未解明の課題として残されている。また、第四の胚葉とされる神経堤起源の細胞が下垂体の幹・前駆細胞の一部として定着している事を発見したが、この細胞系譜が下垂体の中でどの様な固有の機能をになっているかは、未解明の課題として残った。また、ヒト雄性不妊の原因の一因としてヘルペスウイルスのチミジ

ンキナーゼの存在を、男性不妊患者の精巣に同定したが、どのような分子機序で不妊となるかを明らかにする課題が残されている。

新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発

本研究のプロテオーム解析で定量されたタンパク質は約 2000 種類ほどである。マウス培養細胞で発現していると思われるタンパク質は少なくとも 10000 種類はあると考えられることから、今回の解析では見落としているタンパク質群も多く残されている。近年のプロテオーム解析では依然として解析装置である質量分析装置の性能向上が、解析タンパク質の網羅性向上に大きく寄与している。したがって、より多くのタンパク質群を定量解析し網羅性を上げるためには、試料調製方法の改善のみならず、より最新の解析装置の導入も求められる。プロテオーム解析ではタンパク質配列のデータベースを活用するが、マウスを含めて高等生物のタンパク質情報は、世界標準のものでも依然として混沌としている。具体的にはスプライシングバリエーションや発現組織が異なるなどのアイソフォームと思われるタンパク質情報が、それぞれ異なるタンパク質名としてデータベースに格納されている。そのため、同定・定量されたタンパク質名を整理する際に本質的には同一のものなのかが判然とせず、本来は同一のタンパク質であるものも別々に扱われるため、その後の Gene Ontology 解析などの信頼性にも影響する。世界的にはそうしたデータベースの整理は、各々の研究グループで目的に応じて整理されているのが現状であり、高等生物のプロテオーム解析にいけるデータベースの問題があらためて明るみに出た。

エピジェネティクスと非コード RNA を利用した有用細胞の同定法および樹立法の開発

エピジェネティクスを中心とした脳下垂体細胞種の同定については、主に DNA メチル化が主となって発現制御が行われているものに限られているため、それ以外のヒストン修飾が主となる遺伝子については、今後解析手法を工夫する必要がある、また、非コード RNA やエピゲノム編集によるエピゲノム改変については、主要遺伝子についての非コード RNA による DNA メチル化制御や、エピゲノム改変ベクターの構築・導入法については確立できたものの、今後は導入する細胞や導入効率、導入後の目的細胞の効果を最大化するための培養法などについて、最適化して行く必要があると考えられる。

7. 評価体制 公開シンポジウム

<自己評価の実施結果と対応状況>

本研究成果は、メンバー間で相互評価し、本学科学技術研究所の年報に掲載誌、農学部ハイテクリサーチ運営委員会の業績書に報告している。また、ホームページに公開している。論文投稿・掲載に関わる費用は別枠で予算化してインセンティブを与えており、成果の公表数は年ごとに増え、確実に効果を上げている。各研究グループでは、ほぼ、毎週1回のペースで班内部の情報交換・打ち合わせを行とともに、適宜、少人数による新規のデータについて討議を進め、実験計画の練り直しと策定を行っている。それらの記録は、班員に公開している。学会等で外部評価を受ける際には、グループ内で数度に亘る事前のチェックを行い、指摘された事項への対応を含めて、研究計画の点検を行っている。

グループ間では、連携した研究推進につとめ、その際に情報交換と点

検・相互評価を行っている。戸村は加藤との連携で、ホルモン分泌の簡易測定系を開発した。加藤は、大鐘と転写因子遺伝子のエピジェネティクス、矢野と下垂体の発現遺伝子の網羅的なオントジェニーを展開した。大鐘は、ブタ下垂体の各種細胞の存在比を加藤の助言のもとに展開して論文発表を行い、さらに、矢野からの哺乳類間のゲノム配列保存性の解析方法の助言にもとづき、ゲノム、転写物データベースの貧弱なブタにおいて、数千の転写開始点およびプロモーター領域の同定に成功した。紀藤は加藤と連携して、下垂体株化細胞の分化機構をプロテオミクスによる解析を進めた。矢野は、加藤と連携して、下垂体の発現遺伝子のデータベースを構築した (http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/KPJ_DB/Ref_Search_ver2a.html)。

<外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

全体の研究プロジェクトの進捗管理・自己点検・改善活動を確実に行うため、研究代表者に加えて、2014年7月にプロジェクトマネージャを設置し、メンバーの加藤がその任についている。また、明治大学では、明治大学研究企画推進本部会議(研究支援事業に係る専門部会)が設置され、多様な面から、研究代表者から提出された、①研究達成度・自己点検表、②私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(研究年度)全体研究計画・ロードマップ、③提出前の私立大学戦略的研究基盤形成支援事業に係る中間評価(研究進捗状況報告書)、について各年度に確認・点検作業を受け、改善点の指摘や進捗度の評価を受け取っている。フィードバックされた項目について、研究代表者とプロジェクトマネージャが対応策を講じて、次年度の研究展開に活かすとともに、その対応を報告している。④また、上記①～③については、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業学内選考及び採択後の進捗管理体制に関する内規を制定し具体的な取り組みについては、本

学の以下のHPに掲載している

(<http://www.meiji.ac.jp/research/promote/index.html>)。

本研究プロジェクトでは、この5年間に106の原著論文、総説を使って成果を世界に発信して、評価や意見を収集している。国外で60回、国内で220回の学会発表を行い、該当する外部の専門家から助言や質疑を通して、これらの成果の中間発表を行い、関連外部研究者からの評価、情報交換を行っている。これらの記録も、本プロジェクトのホームページ上で班員に公開し共有をはかっている。特に進展の激しいバイオインフォマティクスの分野では、メンバーの矢野は活発にシンポジウムや研究集会などを主宰し、開発・解析中のバイオインフォマティクス手法やデータベースについての評価や意見の集約に努めており、本プロジェクトが取り組む「大規模オミックスの活用による生殖内分泌組織の新たな機能制御法の確立」のためのデータベースの基盤づくりに傾注している。

8. 研究期間終了後の展望

生殖機能を制御する受容体と情報伝達の同定と化合物等による生殖機能制御法の確立

本研究により、各種オミックス情報を利用してゴナドトロフに発現するGPCRを解析することにより、生殖制御につながる新たな情報が得られることを、OGR1を例として示すことができた。オミックス情報の結果から、OGR1以外にも未だ解析されていない他のGPCRがゴナドトロフに発現していることを、予備的に得ている。これらのGPCRに関しても、今回と同様の手法を用いて解析することで、新たな生殖制御の開発につながる情報が得られるものと期待できる。今回見出されたOGR1は抗不安薬のターゲットの一つとなっている。この抗不安薬のメインターゲットは

GABA_A受容体である。しかしながら GABA_Aには作用せず OGR 1 特異的に作用する化合物が抗不安薬の分子骨格をもとに開発されている。この化合物が実際に生殖制御に利用できる可能性を秘めている。

生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの解明とその制御法の開発

本研究により、下垂体の組織形成にとって重要なこの組織幹・前駆細胞について多数の特性を明らかにし、そこで機能する重要な遺伝子についても明らかにした。ホルモン産生細胞や下垂体の内分泌機能維持に関わる細胞群の維持に、分化過程の様々な状態の細胞の存在が明らかになり、そのコミットメントに関わる因子もいくつか明らかになったことで、幹・前駆細胞を用いた下垂体の人為的な組織構築への展望が開けた。また、最後の期間に、外胚葉上皮起源とされる下垂体には、第四の胚葉とされる神経堤起源の細胞が下垂体の幹・前駆細胞の一部として定着しているとの発見は、下垂体研究の新展開をもたらした。こうした細胞系譜の解析は、下垂体腫瘍の発症機序の解明に新たな視点を与えるものであり、下垂体研究の新展開が期待される。また、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼが及ぼす精子形成異常の発見に始まった雄性不妊の解析を軸にした性腺系の研究では、このウイルス感染がヒトでも頻発しており、遺伝子とタンパク質レベルで不妊を呈するヒト精巣でチミジンキナーゼの存在を初めて同定したが、このことは、ヒト雄性不妊の原因の一因の可能性を明らかにしたもので、今後の雄性不妊の診断、感染治療、不妊治療などが展望できる。

システムズバイオロジーによる生体組織形成機構の解明と知識情報統合デ

一データベース構築

本研究において実施した学術論文情報に対する網羅的な知識情報解析および発現遺伝子情報解析は、下垂体における分子機能の解明を推進するための基盤情報となり、生殖内分泌組織の制御法の確立を加速化できる。

新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発

本研究により、下垂体組織形成のモデルとしての細胞培養系の有用性を実証するとともに、本細胞が様々な組織形成に関わることが知られている血管周皮細胞への分化すること、またその際に特徴的に発現量が変動するタンパク質群が明らかになった。こうしたタンパク質が、実際の下垂体組織形成に関わる可能性を今後検証していく必要がある。その一つは組織化学的解析であり、複数の発生段階におけるこれらの分子群の発現変動を地道に調べていくことが課題となる。しかしながら、組織で発現している数多くのタンパク質について抗体などを用いて大規模に解析するのは依然として困難である。代替手法として、例えばイメージング質量分析の手法を取り入れることでの実現可能性を探りたい。

エピジェネティクスと非コード RNA を利用した有用細胞の同定法および樹立法の開発

エピジェネティクスを中心とした脳下垂体細胞種の同定では、アレルごとのメチル化状態に注目した細胞種同定法を新たに開発した。これにより脳下垂体細胞のみならず、ハプロ不全優性遺伝病のようなアレルごとのメチル化変動が発症や重篤化の原因になっている疾患について、分

子レベルでの原因究明や治療につながる基礎研究にも繋がった。また、環境化学物質のような微量でエピゲノム改変効果を持つような薬物の影響評価についても感度の高い検出法として確立することができた。以上のように、本研究は脳下垂体細胞について確立したメチル化解析技術をもとに、脳下垂体のみならず、ヒトの遺伝性疾患の発症・重篤化メカニズム解明や化学物質によるエピゲノム改変を介した発生・分化への影響評価にもつながる基礎研究になったと考えられる。

9. 研究成果の副次的効果

生殖機能を制御する受容体と情報伝達の同定と化合物等による生殖機能制御法の確立

オミックス情報を利用して OGR1 相同遺伝子の探索を行った結果、カエルでは 2 種類の OGR1 相同遺伝子が存在することが明らかとなった。これらの相同遺伝子産物を解析したところ、プロトンに対しては 2 種類とも活性化を示したが、金属イオンに関して 1 種類の OGR1 相同遺伝子産物はまったく応答しないという結果が得られた。この 2 種類の受容体構造を比較することにより、金属イオン特異的に活性化部位を特定できる可能性がある。その部位を特定することにより、受容体活性化を制御する新たな化合物の開発に利用できる可能性がある。

生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの解明とその制御法の開発

下垂体から得た細胞塊を形成する幹・前駆細胞の中に、低い増殖性を保ちながら未分化性を維持する細胞集団であった。この細胞塊は、分化を誘導することが困難であり、下垂体幹細胞に近い細胞集団と考えられ

る。この細胞を今後の下垂体の組織再生への活用が考えられる。不妊を呈するヒト精巣でチミジンキナーゼの存在を初めて同定できたことから、今後の雄性不妊の診断、感染治療、不妊治療などへの応用が期待できる。

システムズバイオロジーによる生体組織形成機構の解明と知識情報統合データベース構築

本研究課題を達成するために開発・実施した知識情報解析とデータベース構築のためのアプローチは、動物・植物・微生物など多くの生命科学分野の知識情報集約と活用を牽引するための要素技術となり、ライフサイエンス全般の展開を推進し得る。

新規組織形成因子のプロテオミクス解析とタンパク質間相互作用による機能調節法の開発

本研究で用いた TtT/GF 細胞では、TGF β 刺激により下垂体腺腫で発現していることが知られるタンパク質についても、TGF β 刺激による発現量の低下が観察された。同時に TGF β 刺激により細胞増殖能の低下も観察された。また TGF β 刺激により発現量が増加したタンパク質のなかには、他の腫瘍細胞でその増殖を抑制する働きを有することが知られている分子群も含まれていた。こうした知見は、TGF β 刺激により発現量の変動するタンパク質のなかから下垂体腺腫の良いマーカー分子を探索できる可能性や、さらには TGF β による下垂体腺腫の治療戦略の可能性を示唆するものである。

エピジェネティクスと非コード RNA を利用した有用細胞の同定法および樹立法の開発

エピジェネティクスを中心とした脳下垂体細胞種の同定は、複数細胞種が共存する全ての集団に応用可能であり、これをもとに特定の細胞種の割合推定や各種薬物の影響評価にもつながる基礎技術を確立することができた。

10. シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

1. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「大規模オミックスの活用による生殖内分泌組織の新たな機能制御法の確立」「環境応答機能の解明に基づく高度環境適応植物デザイン研究基盤の確立」合同シンポジウム
(<http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/sympo2016/> :

タイトル:「動物生殖内分泌組織の機能制御と高度環境適応植物のデザインのための研究戦略」

日時: 2016年11月5日(土) 13時00分~17時45分

会場: 明治大学生田キャンパス 中央校舎メディアホール

講演者: 13人

参加人数: 121人

プログラム

「染色体高次構造と転写制御」 白髭 克彦 (東大・分子細胞生物研)

「活性を指標とした新たな植物ホルモン輸送体の探索」 瀬尾 光範 (理研・環境資源科学研究センター)

「新規有用遺伝子探索と遺伝資源高度利用化に向けたシステムズ・バイオロジーの確立」 矢野 健太郎 (明治大学農学部)

「プロテオミクス研究を支える様々な解析手法」 紀藤 圭治 (明治大学農学部)

「キチン受容体を介した植物免疫シグナル制御」 出崎 能丈 (明治大学)

農学部)

「根寄生雑草からみた環境適応戦略とその応用の可能性」 藤 茂雄 (名古屋大・院理)

「ゲノムを切らずに書き換える新規ゲノム編集技術の確立と展開」
荒添 貴之 (神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科)

「脳下垂体細胞種特異的遺伝子についての DNA メチル化解析の新たな試み」 新井 良和 (宮崎大学農学部)

「性腺刺激ホルモン産生細胞株からのホルモン分泌を迅速に検出するアッセイ系の開発」 持丸 雄太 (明治大学農学部)

「下垂体から単離した幹細胞ニッチの解析と分化誘導の試み」
吉田 彩舟 (明治大学農学部)

2. シンポジウム講演

中村幸乃, 工藤徹, 小林正明, 有泉亨, 櫻井哲也, 中村保一, 矢野健太郎. 第 58 回日本植物生理学会年会シンポジウム, 「NGS 解析相談会」, 鹿児島大学, 2017 年 3 月 16-18 日

3. 研究会年会の開催

平成 26 年 第 8 回日本エピジェネティクス研究会 2014 年 5 月東京 (年会長塩田 邦郎、組織委員大鐘 潤ほか 3 名)

4. セミナーの実施

平成 26 年度 (2014 年度)

第 1 回セミナー: 内分泌系におけるマイクロ RNA 2014 年 10 月 20 日

中村和昭 国立成育医療研究センター研究所・室長

第2回セミナー：核内ゲノム高次機能の発現制御 2015年2月3日

富川順子 国立成育医療研究センター研究所・研究員

平成27年度(2015年度)

第1回セミナー：細胞内でタンパク質の発現限界を決める要素はなにか？ 2015年6月22日

守屋央朗 先生（岡山大学・異分野融合先端研究コア）

第2回セミナー：生殖細胞：イツ・ア・スモールワールド！？

2015年11月27日

松居靖久 先生（東北大学加齢医学研究所教授）

平成29年度(2017年度)

発現遺伝子の網羅的解析法について

百合野秀明 先生（金沢大学）

5. ワークショップの開催

平成27年度(2015年度)

第1回ワークショップ「下垂体組織のタイムラプス観察法」 2015年10月26日

堀口幸太郎 先生（杏林大学保健学部臨床検査技術学科解剖学・講師）

第2回ワークショップ「下垂体細胞の培養法」 2015年10月30日

塚田岳大 先生（自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門・助教）

第3回ワークショップ「ラットを用いた組織摘除および移植法」 2016年3月11-12日

藤原研 先生（自治医科大学医学部解剖学・准教授）

平成28年度(2016年度)

第1回ワークショップ「下垂体株化細胞の分化誘導法」 2015年10月

26 日

塚田岳大 先生 (東邦大学・理学部・生物分子科学科・講師)

平成 29 年度 (2017 年度)

細胞分化誘導に関する実技講習 (2-3 回)

6. 新聞による報道

「ヘルペス感染で精子形成異常に」日経産業新聞 2016 年 1 月 29 日 (金)

8 面

加藤幸雄の研究が日経産業新聞で紹介された。

7. シンポジウム

加藤幸雄

第 89 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム「内分泌器官の組織幹細胞
と腫瘍幹細胞」京都・京都国際会館 2016 年 4 月 21-23 日

International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems
(ISPGRS 2016),

Session III Development of the pituitary gland. Honolulu, Hawaii,
2016 年 9 月 1-5 日

矢野健太郎

日本育種学会 130 回講演会 第 58 回シンポジウム, 「データベース講習
会」 鳥取大学, 2016 年 9 月 24 日

第 34 回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会 市民公開シンポジウム,
「バイオインフォマティクス講習会Ⅳ (2016)」 信州大学, 2016 年 9

月 1 日

紀藤圭治

日本プロテオーム学会 2016 年大会. シンポジウム「Interspecific Diversity」 2016 年 7 月

11. 研究員・学生の学会発表における表彰

2017 年 8 月 7 日第 3 2 回日本下垂体研究会学術大会において、遺伝情報学研究室とプロテオミクス研究室（紀藤圭治准教授）の共同研究を発表した磯和幸延氏（明治大学博士研究員）が最優秀発表賞を受賞しました。

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/6t5h7p00000oxfzx.html>

2017 年 8 月 7 日第 3 2 回日本下垂体研究会学術大会において、農学部生命科学科 4 年の武者詩織さんと、村上奨さん（共に指導教員は農学部& 農学研究科・戸村秀明教授）が優秀発表賞を受賞しました。

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/6t5h7p00000oxfzx.html>

2017 年 10 月 10 日 生命科学科遺伝情報制御学研究室の研究成果が、国際誌 Cell and Tissue Research の 2017 年 10 月号に掲載されました

<http://www.meiji.ac.jp/agri/info/2017/6t5h7p00000ph8xr.html>

2017 年 7 月 19 日 学振 PD 研究員（明治大学研究・知財戦略機構）の吉田彩舟さん（2014 年度農学研究科博士後期課程修了）が、第 35 回内分泌代謝学サマーセミナーで、ベストポスター発表賞を受賞しました

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/6t5h7p00000osq36.html>

2017 年 3 月 3 日 博士後期課程 2 年の上春浩貴さんの論文が Journal of Anatomy の表紙の写真を飾りました

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/6t5h7p00000mxbzp.html>

2016年9月9日 博士前期課程2年の西原大翔さんが International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems で最優秀発表賞を受賞しました

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/6t5h7p00000mlaxc.html>

2016年2月2日 遺伝情報制御学研究室（担当：加藤幸雄教授）が行っている研究が、日経産業新聞で紹介されました

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/2015/6t5h7p00000kabqo.html>

2015年8月7日 第30回日本下垂体研究会学術集会にて農学研究科の西村直人さんが最優秀発表賞を受賞しました。

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/2015/6t5h7p00000j9cv2.html>

2015年8月7日 第30回日本下垂体学術集会にて農学研究科の佐藤一裕さんが優秀発表賞を受賞しました。

2015年8月7日 第30回日本下垂体学術集会にて農学研究科の持丸雄太さんが優秀発表賞を受賞しました。

2014年11月5日 大学院博士後期課程3年の吉田彩舟さん（加藤研究室）が第41回日本神経内分泌学会において若手研究奨励賞を受賞しまし

た。

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/6t5h7p00000hzuod.html>

2014年9月3日 大学院博士前期課程2年の上春浩貴さん(加藤研究室)
が第29回日本下垂体研究会学術集会において優秀発表賞を受賞しまし
た。

<http://www.meiji.ac.jp/agri/daigakuin/info/6t5h7p00000ht50g.html>

分担課題：生殖機能を制御する受容体と情報伝達の同定と
化合物等による生殖機能制御法の確立

研究代表者：戸村 秀明

成果の概要

生殖は、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ)から分泌される性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン)によって主に調節されている。ゴナドトロピン (FSH、LH) は性腺に作用して性ホルモン産生を促す。ゴナドトロフからのゴナドトロピンの分泌は、主に視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) によって制御されている。一方、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) など GnRH 以外の刺激もゴナドトロピンの分泌を修飾している。このようにゴナドトロフの機能は単に GnRH 受容体のみならず、ゴナドトロフに発現する他の受容体によっても制御されている。このことからゴナドトロフに発現する受容体を調べることで未知の制御因子を明らかにするとともに、その受容体のアゴニスト、アンタゴニスト、活性修飾剤を開発することが、新たな視点からの生殖機能調節法の開発へとつながる可能性がある。

そこで本研究ではまず始めに、公開データベース、文献情報を利用して「下垂体ゴナドトロフに発現する受容体情報」のうち、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に焦点を絞りその情報を抽出した。その結果、ゴナドトロフに発現する GPCR の一つとして Ovarian cancer G

protein-coupled receptor 1 (OGR1)を見出した。OGR1はプロトンの他、生体微量元素や抗不安薬によっても活性化される多機能型受容体である。

本研究では、OGR1が生殖を制御する受容体として機能する可能性について調べた。その結果、OGR1は代表的なゴナドトロピン産生細胞株（LβT2細胞）において、プロトンにより活性化されること、生体微量元素の一種である銅はその活性化を阻害すること、さらにOGR1はゴナドトロピンの分泌を調節していることを明らかにした。プロトンは体液にあまねく存在しているため、生殖を制御する化合物としては使用しづらい。そこで次にOGR1の他のアゴニストである生体微量元素や抗不安薬に関してさらに検討を行った。その結果、微量元素に関してはOGR1の細胞外領域がその活性化の特異性に関与すること、抗不安薬に関してはまだその領域を絞っていないが、これまでに報告されていない受容体のアミノ酸配列にその活性化の特異性を決定する部位が存在することが明らかとなりつつある。これらの知見は今後、OGR1を標的とした生殖制御化合物を作成するにあたり、重要な知見を提供するものと考えられる。

研究成果

—下垂体・性腺で機能する細胞内情報伝達系分子を用いた細胞機能調節法の開発—

1. 下垂体・性腺系組織の発生・分化に関わる受容体・情報伝達分子の細胞生物学的機能解析を行う

ホルモンは体内の特定の場所に存在するホルモン産生細胞により合成、分泌される。そして血液を介して標的細胞まで運ばれ、作用する。最初に報告されたホルモンはセクレチンであり、十二指腸や小腸上部に存在するS細胞から分泌される。セクレチンはpHが低下することにより分泌され、十二指腸からの重炭酸塩の分泌を亢進し、同時にガストリンや胃液の分泌を抑制する作用を有する。すなわちpHとホルモン合成・分泌の間には関係が存在することが古くから示されていた。pHとホルモン分泌との関連はセクレチン以外の他のホルモンにおいても知られている。インスリンは血糖降下作用をもつ唯一のホルモンであり、すい臓に存在するランゲルハンス島のβ細胞から分泌される。このβ細胞からのインスリン分泌は酸性条件下で促進される。このようにホルモンの合成・分泌とpHとの間には関係が存在するが、そのメカニズムに関しては未だ不明の点が多い。すなわちいかにして細胞はpHを感知し、細胞機能を調節しているのかに関しては、未だ多くが謎である。

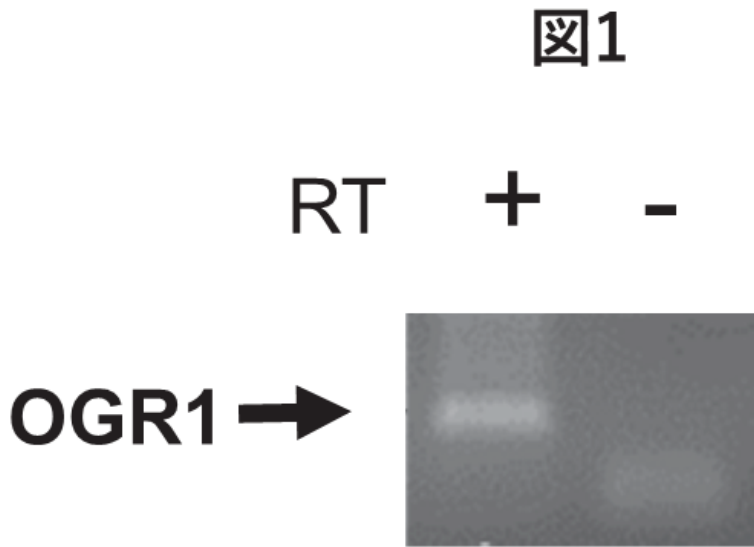
生殖は、下垂体前葉に存在する性腺刺激ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ)から分泌される、性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン)によって主に調節されている。ゴナドトロピン(FSH、LH)は性腺に作用して性ホルモン産生を促す。ゴナドトロピンの欠乏は性腺機能低下症をもたらす、不妊の原因となる。ゴナドトロフからのゴナドトロピンの分泌は、主に視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)によって制御されている。排卵誘発剤は視床下部からのGnRHの分泌を促進させ、ゴナドトロフからのゴナドトロピンの分泌を介して、排卵を促進する。このようにゴナドトロフは、生殖調節に中心的な役割を担っている。ゴナドトロフからのゴナドトロピンの分泌は、上述のよう

に GnRH により主に制御されているが、GnRH 以外の刺激がゴナドトロピンの分泌を修飾していることもしられている。例えば下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)は、その単独刺激によりゴナドトロフよりゴナドトロピンの分泌を促進すること、またそれに加えて PACAP は GnRH 刺激によるゴナドトロピン分泌を促進することも明らかとなっている。このように生殖機能は単に GnRH のみならず、ゴナドトロフに発現する他の受容体がうける刺激によっても制御されている。この事実はゴナドトロフにどのような受容体を発現しているのかを調べることにより、この細胞が機能調節を受ける未知の新たな刺激を解き明かすとともに、その受容体のアゴニスト、アンタゴニスト、活性修飾剤を利用することにより、新たな生殖機能調節法へとつながる可能性がある。

そこで本研究では、公開データベース、文献情報を利用して「下垂体ゴナドトロフに発現する受容体情報」のうち、特にこれまで我々が主に解析してきた G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に焦点を絞り、その情報を抽出した。その結果、ゴナドトロフに発現する GPCR の一つとして Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1) を見出した。

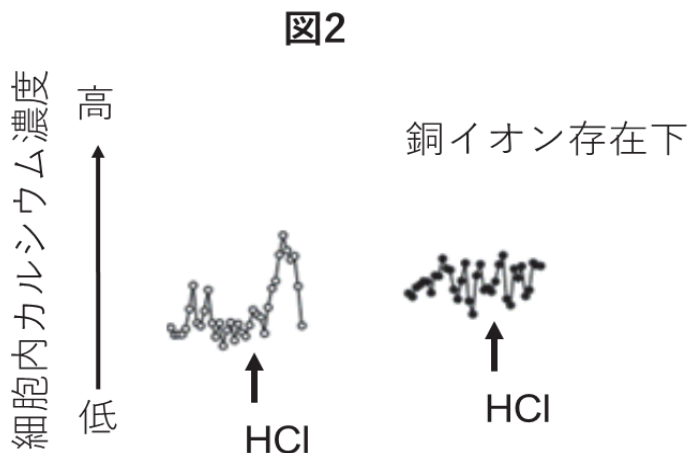
OGR1 は pH の低下を感知して活性化するプロトン感知性 GPCR の一種である。前述したように pH とホルモン合成・分泌との間には密接な関係がある。そこで我々は OGR1 がゴナドトロフの機能に関与するとの仮説を立て、以降の研究を行った。ゴナドトロフの受容体・情報伝達分子の細胞生物学的機能解析には、マウスゴナドトロフ株である L β T2 細胞がよく用いられている。そこでまず最初に、L β T2 細胞に OGR1 が発現しているのかどうかを調べた。その結果、OGR1 の遺伝子発現が

検出された (図 1)。



そこで Lβ T2 細胞を用いて、細胞外 pH の低下による OGR1 の活性化がゴナドトロピンの分泌にどのような影響を及ぼしているのかを調べた。Lβ T2 細胞は下垂

体ゴナドトロフと同様に、GnRH 受容体や LH を発現しており、GnRH に応答して LH を分泌する。このように Lβ T2 細胞はゴナドトロフの特徴を有している。一方 OGR1 はプロトンによって活性化されると、Gq タンパク質を活性化し、細胞内カルシウム濃度を上昇させる。また、このプロトンによる細胞内カルシウム濃度の上昇は、OGR1 ファミリーの pH 感受性のアンタゴニストである銅イオンによって抑制される。そこで Lβ T2 細胞の細胞外 pH を低下させると OGR1 を介したこのような特徴が観察されるのかどうかを調べた。



その結果図 2 に示すように、Lβ T2 細胞の細胞外 pH を低下させると、細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された。またこの細胞外 pH の低下による細胞内カルシウム濃度の

上昇は、銅イオンによって有意に抑制された。

一方銅イオンは、GnRH 刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制しなかった。すなわちこの銅イオンによる pH 低下に伴う細胞内カルシウムの上昇抑制は、銅イオンの細胞への非特異的な毒性の結果ではない。このことは、L β T2 細胞の細胞外 pH を低下させた際に検出される細胞内カルシウム濃度の上昇は、OGR1 を介したものである可能性が示唆された。

2. ホルモン産生細胞の受容体、シグナル伝達系の迅速アッセイを可能とする改変細胞の樹立

前述のように生殖は、下垂体前葉の性腺刺激細胞から分泌されるゴナドトロピンによって主に調節されている。L β T2 細胞に代表されるゴナドトロピン産生細胞株は、ゴナドトロピン産生・分泌がどのように調節されるかのメカニズムを調べるために有用なモデルを提供する。現在までにゴナドトロピン産生および分泌を調節する因子および機構のすべてが明らかとはなっていない。いままで生殖と関係がないと思われていた因子を欠くマウスに生殖調節異常が観察されることなどから、未知の因子や新たな機構がその分泌調節に関わっていることが予想される。これら因子の探索とその機構の解析のためには、ホルモン産生細胞株からのホルモン分泌を検出する簡単で使い易いアッセイ系が必須である。しかしながら今日までその要求に応えうるアッセイ系は存在しなかった。

ホルモン産生細胞株で産生・分泌されるホルモンの検出および定量には、ラジオイムノアッセイ (RIA) および酵素結合免疫アッセイ (ELISA)

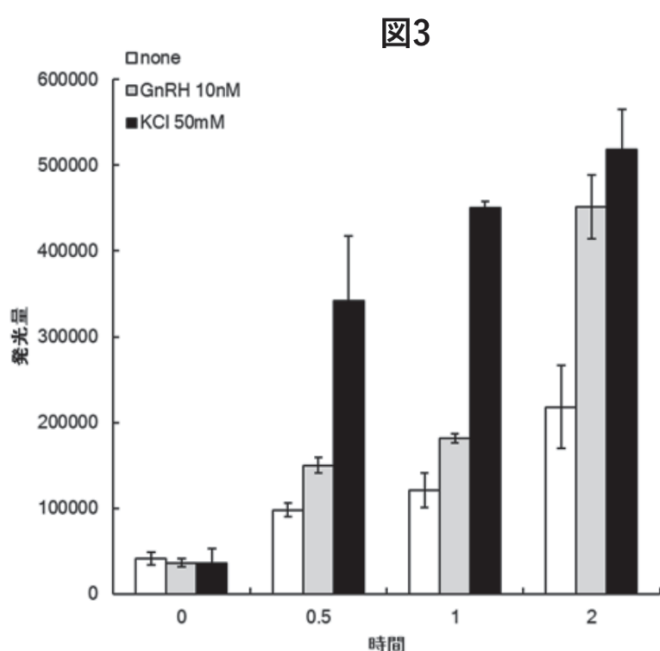
が一般的に使用されている。これらの方法は、標的ホルモンの検出および定量に高い特異性および感度を示す。しかしながらこれらの方法を利用するためには、測定したいホルモンに対する特異的な抗体を事前に準備することが必要である。さらにこれらのアッセイは一般的にコストがかかり、またその分析に多くの時間を要すること、さらに RIA の場合には放射線を使用する必要があるため、簡単で使い易い技術とはなっていないのが現状である。

Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) は、Gaussia princeps によって分泌される発光タンパク質である。このルシフェラーゼは、遺伝子プロモーターの活性、小胞体ストレス、タンパク質 - タンパク質相互作用、および分泌経路のモニタリングなどのレポーターアッセイに広く使用されている。ホルモン分泌に関しては、すいβ細胞株である Min6 細胞からのインスリン分泌をモニターするため、Gluc と融合したインスリン遺伝子を Min6 に導入発現後、Gluc 発光イメージングを用いてインスリン分泌メカニズムの解析を行った例がある。Gluc の利点は、培地中の分泌されたインスリン-Gluc のみが Gluc 基質であるセレンテラジンと反応し発光すること、すなわち細胞外に分泌されたインシュリン-Gluc 分泌をリアルタイムに発光シグナルとして検出できることである。また Gluc はホルモンの分泌量を発光量として検出・定量するので、RIA や ELISA のようにホルモン分泌を検出するための特異的な抗体をあらかじめ準備する必要がない。

今回我々は Lβ T2 細胞において、ホルモンと融合していない野生型の Gluc が GnRH 受容体を介して、GnRH 刺激依存的に細胞外に分泌されること。またその分泌量を発光強度として捉えることに成功した。そこで本研究では、野生型 Gluc を用いたこのアッセイが、ホルモン産生

細胞株からのホルモン分泌を検出するための簡単で使い易い技術として使用できるのかどうか、すなわち「ホルモン産生細胞の受容体、シグナル伝達系の迅速アッセイを可能とする改変細胞の樹立」に使用できるのかどうかに関して、さらに検討を加えた。

LβT2 細胞に Gluc を発現させると、細胞外に分泌された Gluc は、何も刺激をしない状態でも図 3 の白カラムに示すように、2 時間にわたって時間依存的に増加した。さらにこの状態で、細胞を GnRH または

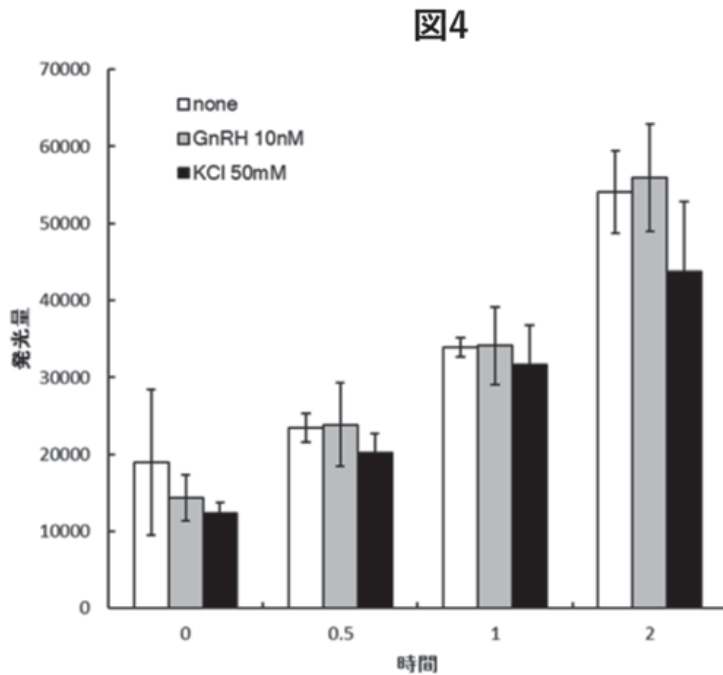


KCl で刺激すると、Gluc の分泌は増強した (図 3 のそれぞれ灰色または黒カラム)。この増強分の Gluc の活性は、GnRH、KCl 刺激依存性のホルモン分泌活性をあらわしているものと考えられる。

この点を確認するため、

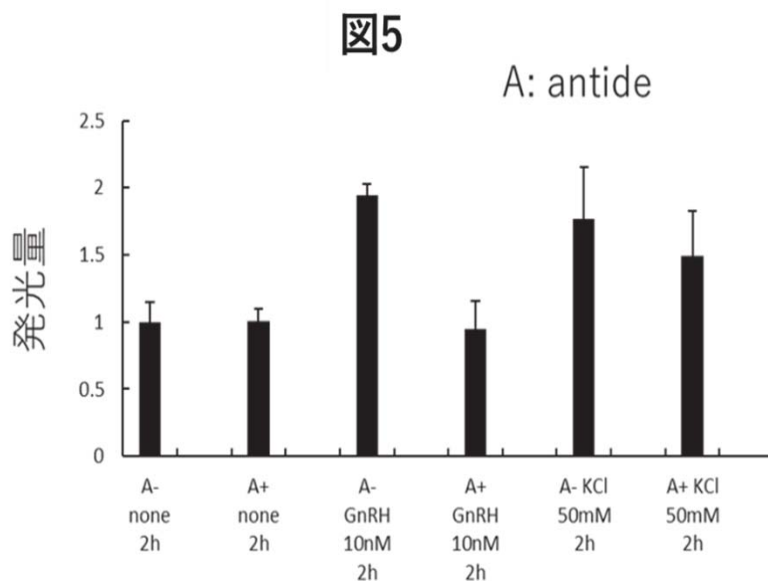
ホルモンを分泌しない細胞である NIH3T3 細胞を用いて同様の実験を行った。NIH3T3 細胞に野生型 Gluc を発現させ、細胞外に分泌される Gluc 活性を測定したところ、LβT2 細胞の場合と同様に何も刺激をしない状態でも図 4 の白カラムに示すように、2 時間にわたって時間依存的に増加した。しかしながらこの状態で細胞を GnRH または KCl で刺激しても、Gluc の分泌は増強しなかった (図 4 のそれぞれ灰色または黒カラム)。NIH3T3 細胞には GnRH 受容体が発現していないので、GnRH 受容体を強制的に発現させた NIH3T3 細胞を用いて同様の実験を

行った。



しかしながら結果は図4と同様であった。すなわちLβT2細胞で監察されたGnRH、KCl刺激依存性のGluc活性の増強はこれらの刺激に対する細胞からのホルモン分泌活性

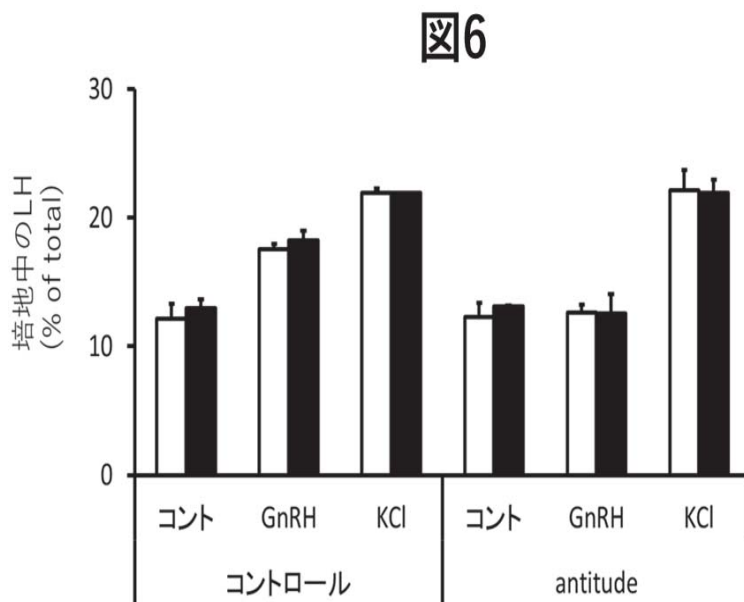
をあらわしているものと考えられた。なおこの刺激依存性のGluc活性の増加が細胞外に分泌されたGluc量の増加を反映したものであることは、Gluc抗体を用いた細胞を培養した培地のウェスタンブロッティングにより確認した。



そこで次にGnRH刺激依存性のGluc活性の増加が、LβT2細胞に発現するGnRH受容体の活性化を介したものであるのかどうかを調べた。図5に示すようにGnRH受容体

アンタゴニストである antide は、GnRH 刺激依存性の Gluc 活性の増強部分を阻害した。KCl は、GnRH 受容体シグナルの下流に存在する電位依存性カルシウムチャンネルを直接刺激し、GnRH 非依存性にホルモン分泌を引き起こす。実際、antide は KCl 刺激依存性の Gluc の活性増強は阻害しなかった（図 5）。この結果は、GnRH 刺激依存性の Gluc 活性の増強は、GnRH 受容体の活性化によるホルモン分泌活性をあらわしていることを示しているものと考えられた。

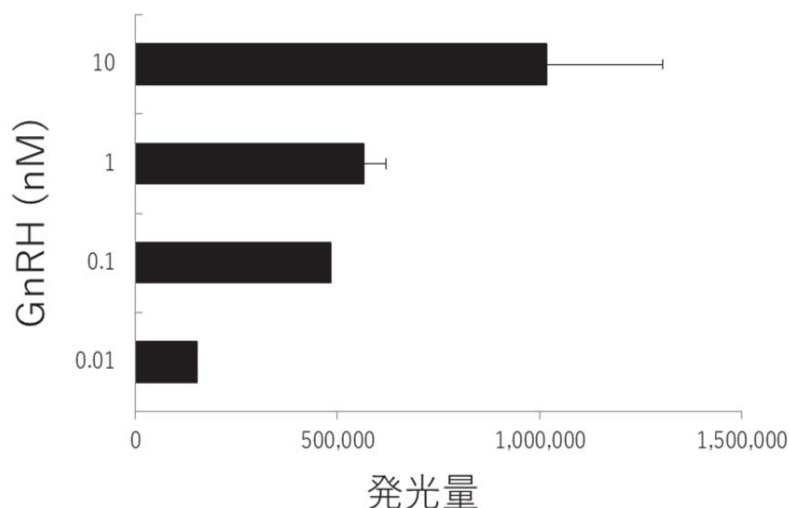
この Gluc の活性増強が実際に、GnRH 受容体を介した GnRH 刺激依存性のゴナドトロピン分泌を反映しているのかどうかを確認した。ELISA を用いて培地中と細胞内の黄体形成ホルモン（LH）量を測定することで、培地中に分泌された LH 量を算出した。



その結果図 6 に示すように antide は、GnRH 刺激依存性の LH 分泌を阻害する結果が得られた。一方 antide 処理により、KCl 刺激依存性の LH 分泌量は変化しなかった。

すなわちこの結果は、Gluc の結果と一致するものであった。すなわちこれらの結果から、GnRH 刺激依存性の Gluc の活性増強は、LβT2 細胞からの GnRH 刺激依存性の LH 分泌を反映していることが明らかとなった。

図7

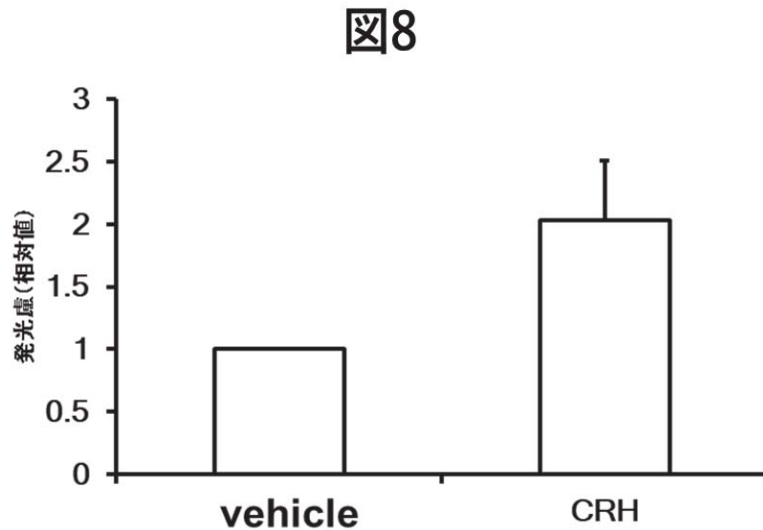


ではこの Gluc を用いたゴナドトロピン分泌の感度はどのようなものであろうか。そこでこの Gluc を用いた GnRH 刺激依存性の分泌活性の測定感度について解析を行った。そ

の結果図 7 に示すように、0.01nM の GnRH 刺激による分泌活性から検出することが可能であり、用量依存的に 10nM まで検出することができた。この測定感度は一般的な ELISA の感度と同等である。すなわち、本測定法が ELISA などのこれまでの方法に劣らない感度を持ち、ホルモン分泌アッセイに利用可能であることが明らかとなった。

このように Gluc を用いて L β T2 細胞からの GnRH 刺激依存性のホルモン分泌応答を測定することが可能であることが明らかとなった。そこで次にこの Gluc を用いたホルモン分泌アッセイが他のホルモン産生細胞にも適応可能であるのかどうかについて解析を行った。コルチコトロフは、ゴナドトロフと同様に下垂体前葉に存在し、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) 刺激により、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を分泌する細胞である。なお ACTH も生殖調節に関係しているとの報告がある。AtT20 は CRH 受容体を発現し、ACTH 産生・分泌能力を有するコルチコトロフ細胞株である。そこでこの細胞株を使用した。Gluc を発現させた AtT20 細胞では、CRH 刺激依存的に細胞外の Gluc

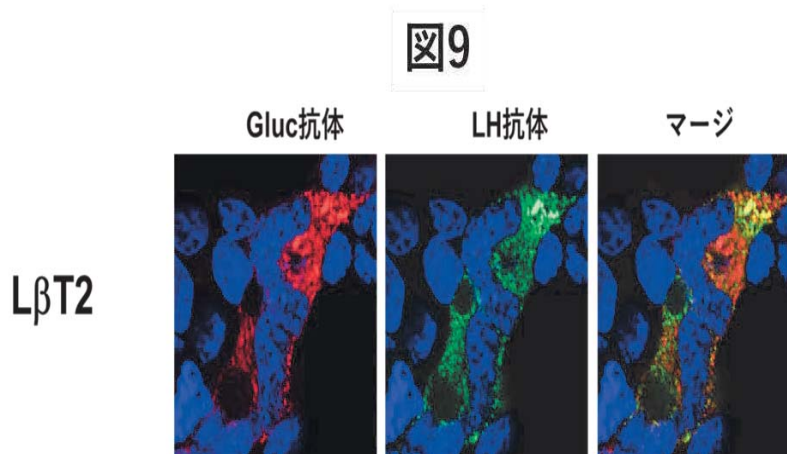
活性の増加が観察された (図 8)。したがってこの Gluc を用いたホル



モン分泌のアッセイ系は、 $L\beta T2$ 細胞に限らず、一般のホルモン産生細胞からのホルモン分泌を検出するために使用可能であることが明らかとなった。

以上の結果は Gluc を用いたアッセイが、ELISA や RIA に必要とされるホルモンに対する特異的な抗体を使用せずに、ホルモン産生細胞株からのホルモン分泌を、容易かつ簡便にまたリアルタイムで検出するために使用可能であることを示している。

最後に Gluc がホルモン産生細胞において、ホルモン分泌顆粒に実際に含まれているのかどうかを解析した。その結果、LH 抗体で染まる分泌顆粒の一部に Gluc 抗体で染まる部分があることが明らかとなった (図 9)。この結果は、Gluc の一部が分泌顆粒に存在し、刺激によりホ



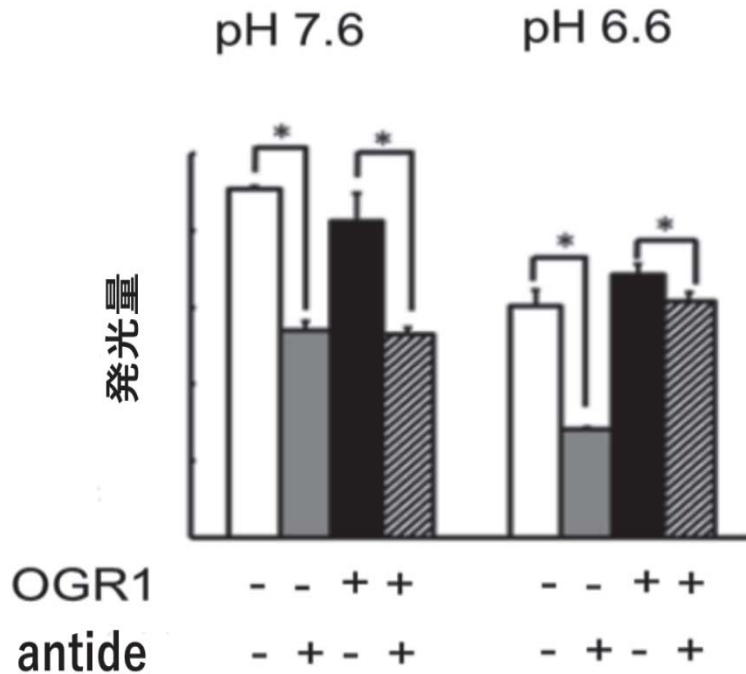
ルモンとともに細胞外に分泌されることを示している。本研究により Gluc が、ホルモン産生細胞株、すなわち $L\beta T2$ および

AtT20 から容易にかつ簡便にまたリアルタイムにホルモン分泌を検出するために使用できることを見出した。本研究における Gluc アッセイは、ホルモンに対する特異的抗体の調製を必要とせず、刺激から 30 分後からホルモン刺激依存性の分泌活性を検出することができる。またそのホルモン分泌の検出感度は、ELISA の検出範囲とほとんど同一である。本研究で見出した Gluc アッセイは、ホルモン産生細胞株からのホルモン分泌を検出するための簡単で使い易い技術として使用できる。すなわち「ホルモン産生細胞の受容体、シグナル伝達系の迅速アッセイを可能とする改変細胞の樹立」に使用できるものである。

3. 迅速アッセイ系を用いた下垂体・性腺系組織の受容体・情報伝達分子の細胞生物学的機能解析を行う

前述の「ホルモン産生細胞の受容体、シグナル伝達系の迅速アッセイを可能とする改変細胞の樹立」の項で述べたように、本研究で新たに開発した Gluc アッセイを用いて L β T2 細胞に発現する OGR1 がゴナドトロピン分泌にどのように関与しているのか、細胞生物学的機能解析を行った。L β T2 細胞に Gluc と OGR1 を過剰発現させ、細胞外 pH を低下させた際の細胞外の Gluc 活性を測定した。また GnRH 刺激に対する分泌応答に対しては、antide を添加したものも用意し、GnRH 受容体を介したホルモン分泌応答と OGR1 を介したホルモン分泌応答を区別できるようにした。

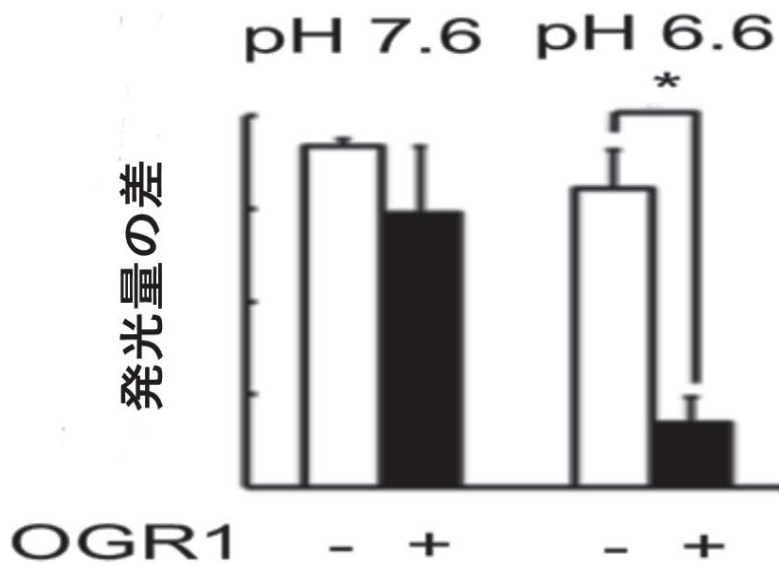
図10



その結果図 10 に示すように、コントロールベクターを導入した L β T2 細胞では、細胞外 pH を低下させた際に細胞外に分泌される Gluc 活性が减弱した (図 10 の白カラム)。この pH 低下に伴

う Gluc の活性減少は OGR1 を過剰発現させた細胞においてもコントロールベクターを導入した細胞と同様に観察された (図 10 黒カラム)。したがってこの pH 低下に伴う Gluc の活性減少は OGR1 によるものではないことがわかる。一方、antide を添加した条件下では、Gluc の活性減少が観察された (図 10 灰色カラム)。すなわちこの Gluc 活性の減少部分が GnRH 受容体を介したホルモンの分泌活性をあらわしている。コントロールベクター導入細胞では細胞外の pH 低下により、この GnRH 依存性の Gluc 活性の低下が観察されるものの、その差は有意なものではなかった (図 11 白カラム)。一方 OGR1 を過剰発現させた細胞では、pH 7.6 の条件下ではコントロールベクター導入細胞と同程度の antide 依存性の Gluc の活性抑制、すなわち GnRH 受容体を介したホルモンの分泌活性を示すが (図 11 pH 7.6 の白カラムと黒カラム)、pH 6.6 の

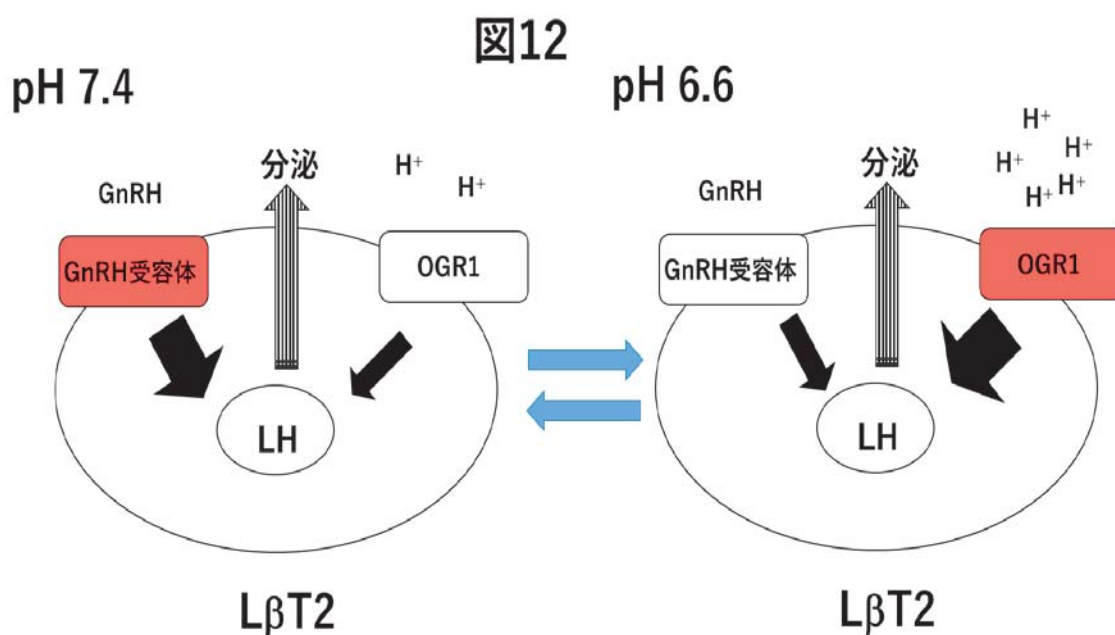
図11



酸性条件下ではコントロールベクター導入細胞に比べて OGR1 過剰発現細胞では、antide 依存性の Gluc の活性抑制の程度が大きく減弱していた(図 11 pH 6.6 の白カラムと黒カラム)。

この結果は細胞外 pH が低下した状態では、LβT2 細胞からの OGR1 依存的なホルモン分泌量が相対的に増加したことを示している。すなわち、細胞外 pH 低下時に GnRH 受容体を介さない経路によって分泌が促されている可能性を示唆している。前述の細胞内カルシウムの結果から、細胞外 pH 低下時における新たな分泌経路は OGR1 を介した経路であるものと考えられる。OGR1 を過剰発現させた LβT2 細胞においても、ベクターを過剰発現させた LβT2 細胞においても、細胞外 pH を低下させた際の分泌量はアンチドの有無に関わらず低下した。細胞外 pH 低下時には OGR1 を介した経路以外の経路からの分泌は抑制されるようであるが、詳しいメカニズムは不明である。また今回の研究結果で示された細胞外 pH 低下時における OGR1 を介した LH の分泌が、実際にどのような生理学的、病態生理学的な役割を担っているかについても現段階では不明である。これらの点は今後の研究課題である。新たな生殖調節制御法の開発の視点から考察すると本研究の結果は、OGR1 の

アゴニストを開発することにより、GnRHと同様に人為的に生殖腺刺激ホルモンの分泌を制御することができる可能性を示唆している。本研究の結果のまとめを図12に示す。本研究により、S細胞やβ細胞からのホルモン分泌がpHの影響を受けるのと同様に、ゴナドトロフからのホルモン分泌もpHの影響を受けること、そのpHによるホルモン分泌にゴナドトロフに発現するOGR1が関与することが明らかとなった。pHの低下（プロトン濃度の上昇）は生体、細胞機能に多彩な影響を及ぼすことが知られている。そこでプロトン以外にOGR1の活性を制御するアゴニスト、アンタゴニスト、活性修飾化合物の探索が、OGR1を介した新たな生殖調節を目指すうえで必要となる。



4. 統合データベースの抽出情報に基づくアゴニスト、アンタゴニスト、活性化修飾剤による機能改善法の検討と確立を目指して

OGR1 は sphingosylphosphorylcholine (SPC)、lysophosphatidylcholine (LPC) といったリゾ脂質によって活性化される GPCR として最初にその報告がなされた。しかしながら現在 SPC や LPC が OGR1 のリガンドであるとの結果には否定的な意見が多い。

図13

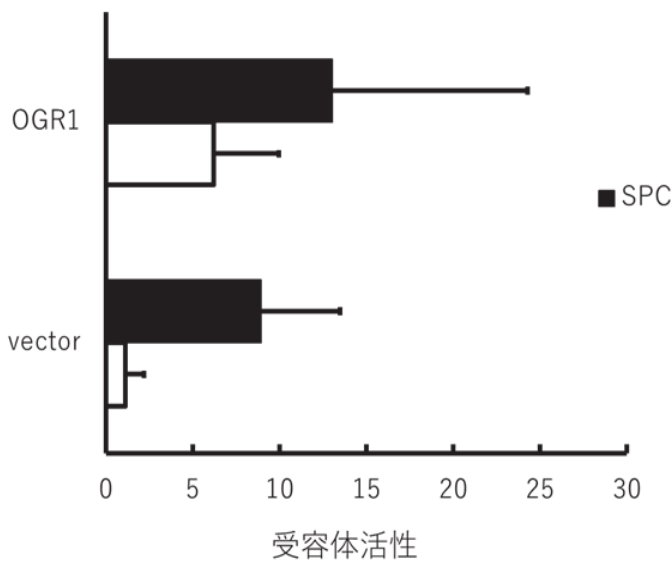
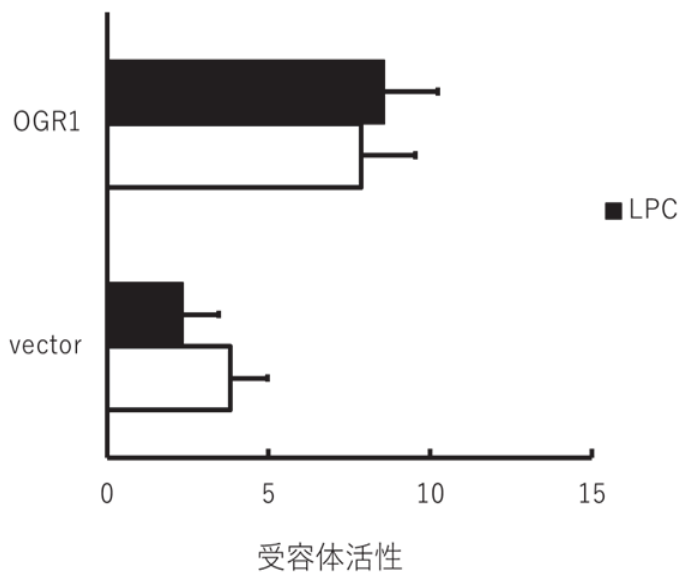
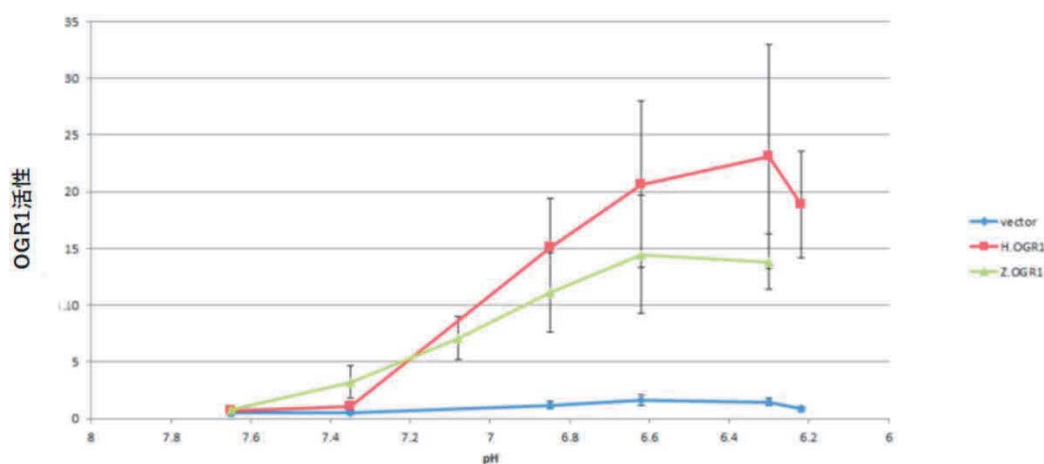


図 13 は実際にこれまで我々が解析した結果の一例である。OGR1 が SPC や LPC によって活性化されるという結果は得られていない。SPC は OGR1 を活性化しているように見えるが、vector のみを導入した OGR1 を発現していない細胞においても SPC による活性化が観察される。これは OGR1 ではなく、細胞に内在性に発現する S1P 受容体を介した活性化

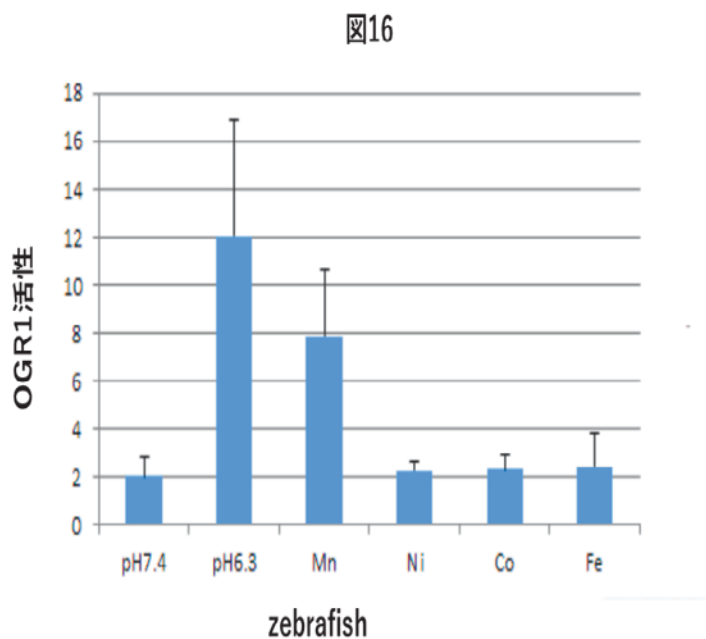
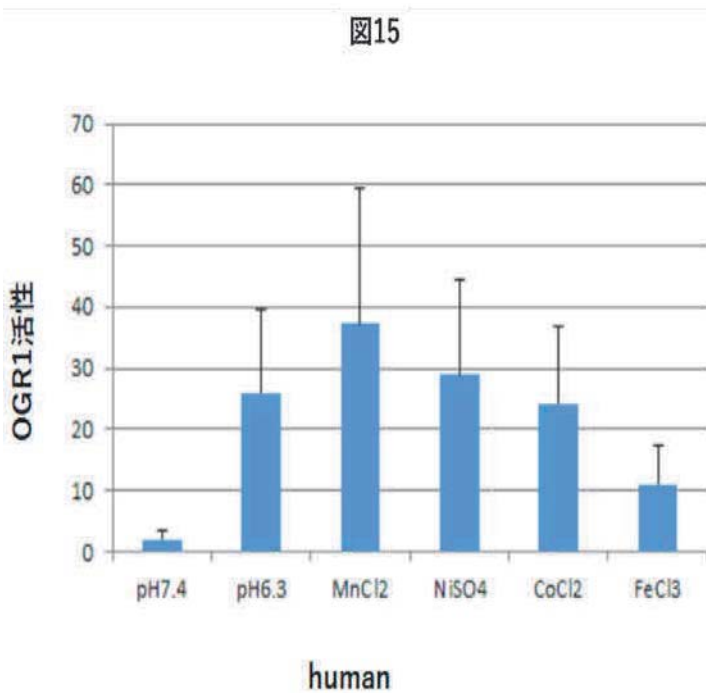
を検出しているものと考えられる。したがってこれらのリゾ脂質刺

激により OGR1 を介して細胞機能を調節できる可能性は低い。一方文献情報を含むデータベースにより、ヒト OGR1 はプロトンに加え、金属やロラゼパムにより活性化や活性の修飾がなされるとの情報得られた。ロラゼパムは抗不安薬として現在実際に使用されている薬物である。前述したようにプロトンは OGR1 を介してゴナドトロフからのホルモン分泌を調節している可能性がある。しかしながらプロトンは生体内のどこにでも存在すること、生体内で OGR1 以外に広範な標的を持ち、様々な作用を引き起こすことから、生殖調節剤として用いることは難しい。そこで OGR1 を標的とする新たな化合物の探索を、文献を含むデータベースを用いて行ったところ、ヒト、マウスの OGR1 はプロトンに加えて金属やロラゼパムによっても活性化することが明らかとなった。農学分野ではヒト、マウス以外の様々な動物の生殖、繁殖が対象となることから、金属やロラゼパムがこれらの動物の OGR1 に対してもアゴニスト活性や活性化修飾作用を示すのか、すなわちこれらのアゴニストや活性化修飾剤が新たな生殖調節剤として使用できる可能性があるかどうかに関して検討を加えた。

図14



まずヒト OGR1 とゼブラフィッシュ OGR1 のプロトンに対する活性応答を比較した。その結果、図 14 に示すようにゼブラフィッシュ OGR1 (zOGR1) もヒト OGR1 と同様に pH 低下に伴い活性化した。すなわちプロトンはヒトとゼブラフィッシュ OGR1 の共通のアゴニストであることが明らかとなった。

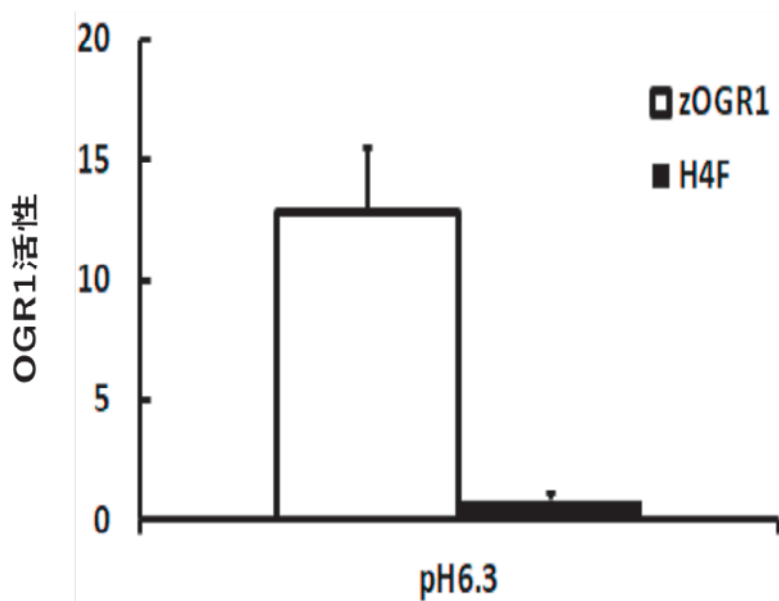


そこで次に、どの金属種が OGR1 の活性化を引き起こすのかを調べた。それぞれ 100 μ M の塩化コバルト(II)、塩化マンガン(II)、硫酸ニッケル(II)、塩化鉄(III)を、ヒト OGR1 (図 15) もしくはゼブラフィッシュ OGR1 (図 16) を過剰発現させた HEK293T 細胞に添加し、6 時間後の OGR1 活性を測定した。

その結果、ヒト OGR1 は試した金属種すべてによって活性化された。一方ゼブラフィッシュ OGR1 はマンガン刺激でのみ、その活性化が観察された。この結果はプロ

トンの結果とは異なっている。プロトンによる刺激では、ヒト OGR1 とゼブラフィッシュ OGR1 間でその活性化に差はなかった。しかしながら金属による刺激では、両者間でその活性化パターンに差が観察された。すなわち本研究の結果は、ヒト OGR1 の活性化に有効な金属種がゼブラフィッシュ OGR1 の活性化には必ずしも有効ではないことを示している。金属を OGR1 のアゴニストとして用いる場合には注意が必要であることが明らかとなった。

図17

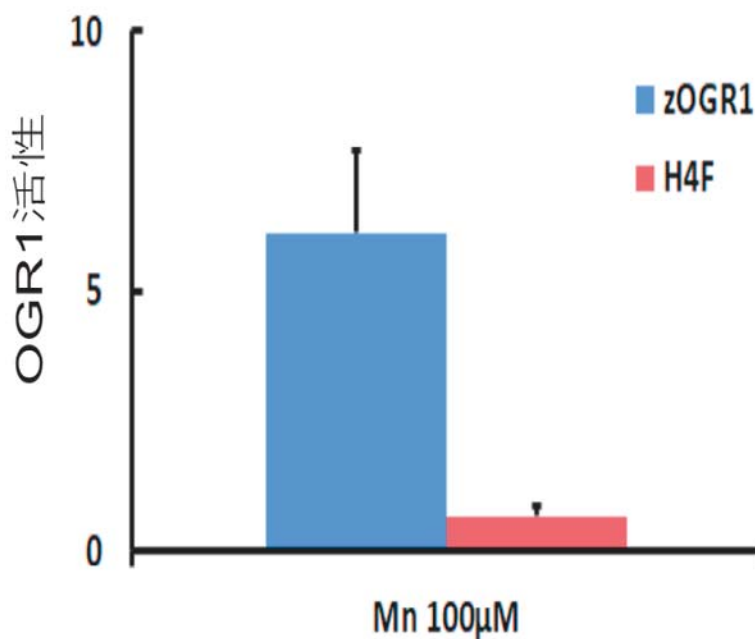


それではプロトンや金属による OGR1 の活性化のメカニズムは、どのようなものだろうか。その点について解析を行った。まず OGR1 はどのようにしてプロトンを感知して活性化するのかを調べた。ヒスチジンは

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のうち、唯一中性領域に pKa があり、生理的 pH の変化でその構造が変化する。図 14 に示すように OGR1 は中性付近の pH 変化で活性化することから、受容体中のヒスチジン残基がプロトン感知に関与しているものと考えられている。実際にヒト OGR1 の細胞外側に存在するヒスチジン残基をフェニルアラニン残基に変異させた受容体 (H5F) では、プロトンによる受容体の

活性化が消失する。この特性がゼブラフィッシュ OGR1 にも共通して存在するのかどうかを調べた。ヒト OGR1 と同様に、ゼブラフィッシュ OGR1 の細胞外ヒスチジン残基をフェニルアラニン残基に変化させた変異体 (H4F) は、プロトンによる受容体活性化が消失した (図 17)。すなわちヒト OGR1 とゼブラフィッシュ OGR1 は、プロトンに関して共通の感知機構を利用していることが明らかとなった。

図18



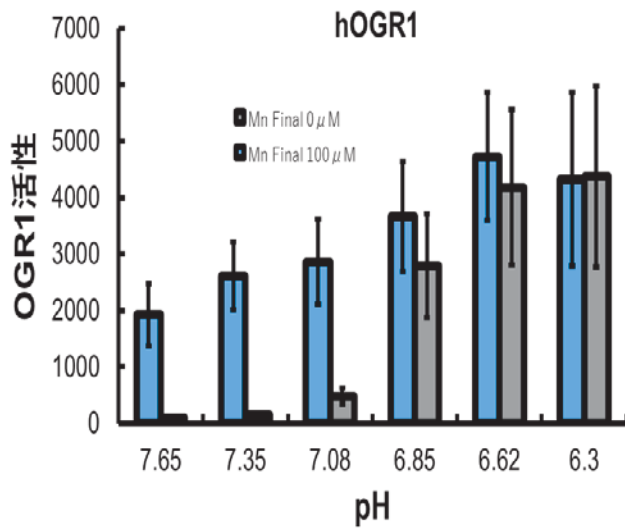
それでは金属によって OGR1 が活性化する場合に、OGR1 はプロトンと同様にヒスチジンを利用した活性化機構を使用しているのだろうか。そこでこのプロトンによる活性化能を失った H4F が、金属により活性化

するのかどうかを調べた。その結果、図 18 に示すように金属による活性化も H4F では完全に消失していることが明らかとなった。この結果は、金属による受容体活性化に対してもプロトンと同様のメカニズムが OGR1 では利用されていることを示している。

プロトンによる活性化と金属による活性化との間にはどのような関係が存在するのだろうか。図 19、20 はマンガンの影響を異なる pH 条件下で調べた結果である。なおマンガンは、ヒト OGR1 とゼブラフィ

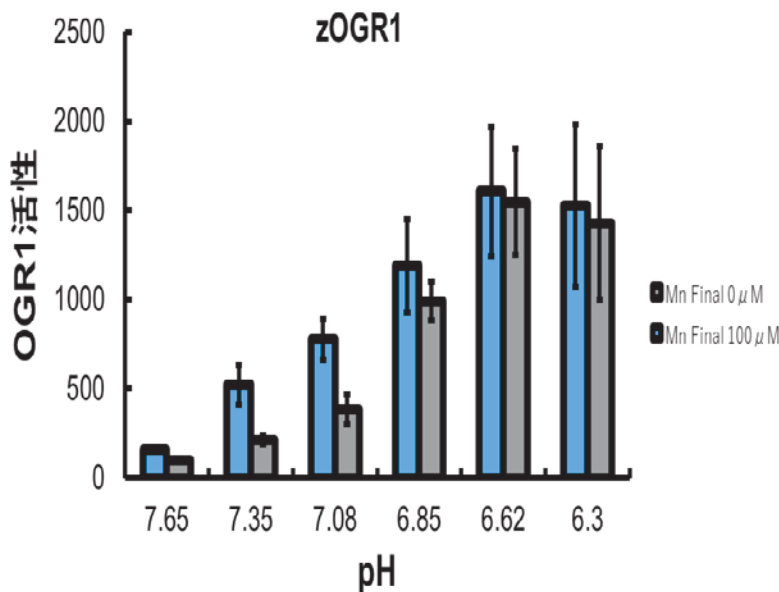
ツシュ OGR1 に共通して活性化応答を示す金属である (図 15、図 16)。

図19



プロトン濃度が低いアルカリ条件下では、マンガンによる活性化が観察される一方、酸性条件下ではプロトンによる OGR1 の活性化をマンガンがそれ以上に増強することはなかった。

図20



プロトンを感じているヒスチジンは金属イオンとも高い親和性を持っている。OGR1 の結晶構造はまだ明らかとなっていないが、アルカリ pH および中性 pH においては細胞外領域に複数存在するヒスチジン残基間の水素結合によっ

て受容体構造が不活性の状態にあるものと考えられている。プロトンおよび金属は OGR1 のヒスチジン残基と相互作用する結果、ヒスチジン残基間の水素結合が切断され、活性化型の受容体に構造が変化するものと考えられている。上記の結果はこの考え方に合致するものとなっている。すなわちマンガンはアルカリ pH および中性 pH において OGR1 の活性化を誘導するが、pH6.3 においてはさらに活性化を誘導することはない。pH6.3 という酸性 pH においてはアルカリ pH よりもプロトン濃度が高い。その高い濃度のプロトンが、OGR1 のヒスチジン残基間の水素結合を切断した結果、マンガンが切断できるヒスチジン残基間の水素結合の数が少なくなっているため、マンガンによるそれ以上の活性化が観察されないものと考えられる。

これまでの実験結果から、ヒト OGR1 とゼブラフィッシュ OGR1 はプロトンにより同じように活性化されるのに対して、金属による活性化は金属種により両者で異なっていることが明らかとなった。またプロトンと金属による活性化には、OGR1 中の共通のヒスチジン残基が使用されていることも明らかとなった。それではなぜヒト OGR1 とゼブラフィッシュ OGR1 を活性化する金属種が異なっているのだろうか。

ヒスチジン残基に加えて受容体中の他のアミノ酸残基が金属による活性化に関与していることが考えられる。そこで次に、OGR1 のどの領域が金属による活性化に重要な役割を担っているのかを調べた。そのためにヒト-ゼブラフィッシュキメラ受容体とゼブラフィッシュ-ヒトキメラ受容体の 2 種類のキメラ受容体を作製した。ヒト-ゼブラフィッシュキメラ受容体はゼブラフィッシュ OGR1 の細胞外領域をヒト OGR1 の細胞外領域に置換したキメラ受容体である。一方、ゼブラフィッシュ-ヒトキメラ受容体は、ヒト OGR1 の細胞外領域がゼブラフィッ

シュ OGR1 の細胞外領域に置換されたキメラ受容体である。実験の結果、ヒト-ゼブラフィッシュキメラ受容体はプロトンおよびマンガンに加えて、ニッケル、コバルト、鉄によっても活性化されるようになった(図21)。

図21

ヒト-ゼブラフィッシュキメラ

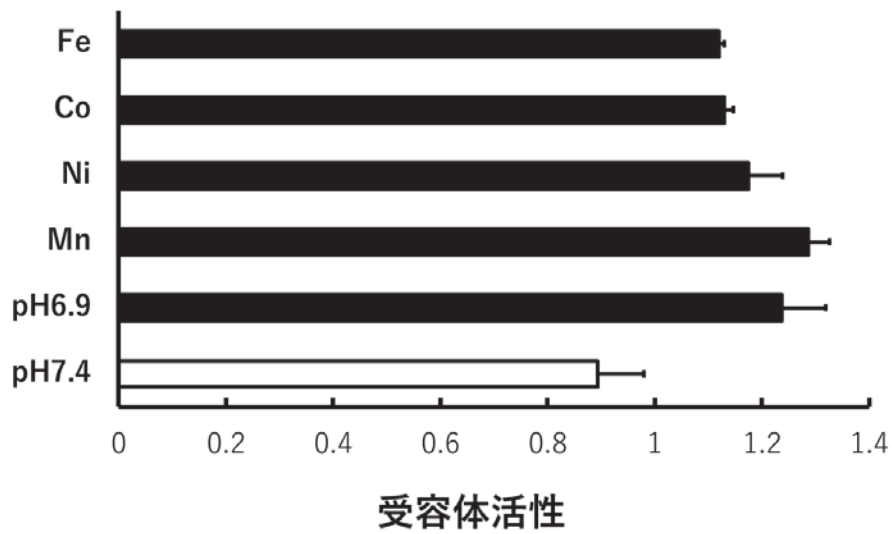
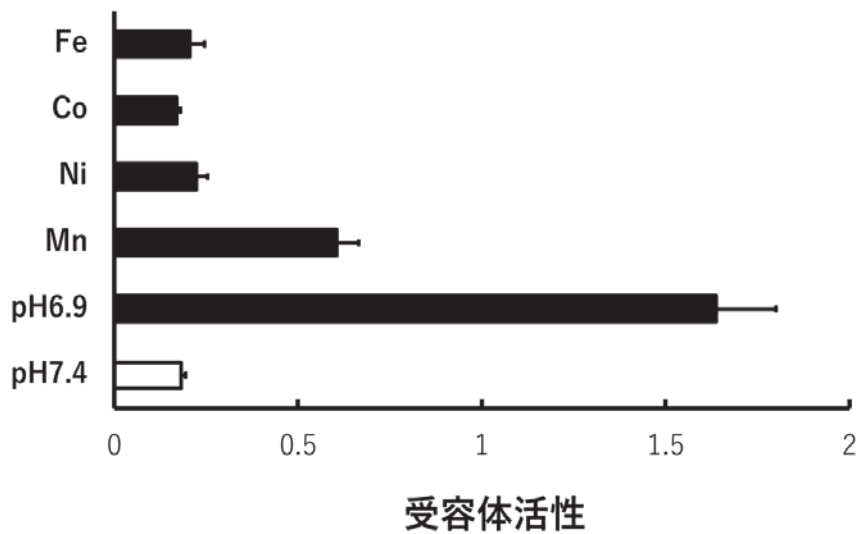


図22

ゼブラフィッシュ-ヒトキメラ



一方、ゼブラフィッシュヒトキメラ受容体はプロトンおよびマンガンによってのみ活性化され、他の金属によっては活性されなかった(図 22)。この結果は、細胞外領域をヒト型に変えたゼブラフィッシュ OGR1 はヒト OGR1 と同様にすべての金属種に応答するようになったのに対して、細胞外領域をゼブラフィッシュ型に変えたヒト OGR1 はプロトンとマンガンのみに応答するというゼブラフィッシュ OGR1 の特徴に変化したことを示している。すなわち金属による OGR1 の活性化には受容体のヒスチジン残基に加えて受容体の細胞外領域に存在するアミノ酸残基が重要な役割をはたすことが明らかとなった。

それでは他の動物種における OGR1 のプロトンや金属に対する応答性はどのようになっているのだろうか。この点に関して解析を行った。その結果、図 23 から図 26 に示すように大きく 4 種類のパターンに分けられることが明らかとなった。最初の群(図 23)に含まれる動物種はヒト OGR1 と同様に、すべての金属種に対して応答する OGR1 である。この群にはブタ、ラット、マウスなど哺乳類の OGR1 が含まれていた。

図23

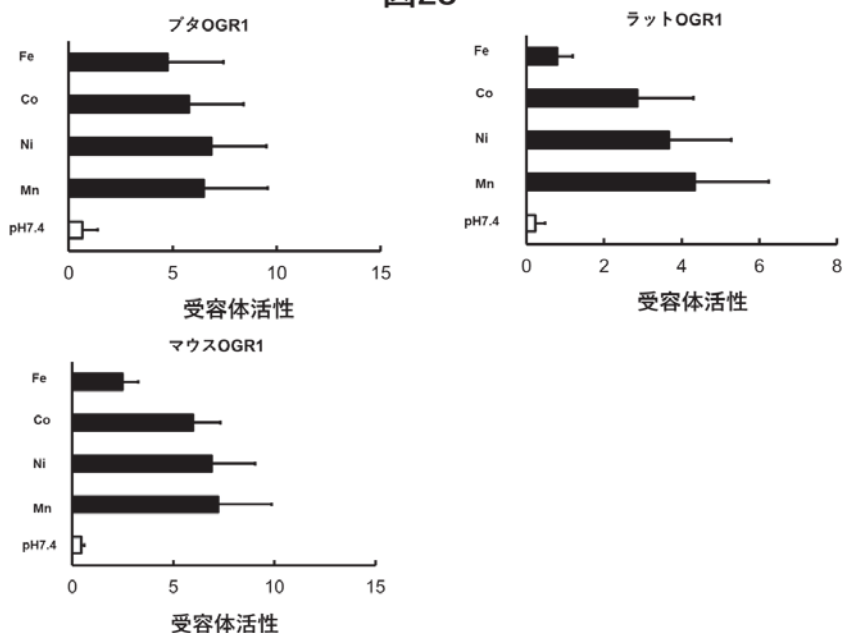
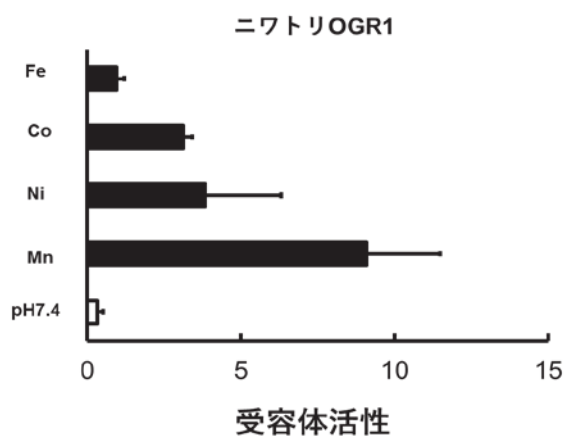


図24



これに対して図 24 は、ヒト OGR1 とゼブラフィッシュ OGR1 ととは異なる活性化様式を示す群である。この群の OGR1 はヒト OGR1 と同様に全ての金属種に対して活性化応答を示すが、ヒト OGR1 と比べて、その活性化の程度はマン

ガンを除いて減弱していた。この群には鳥類であるニワトリ OGR1 が含まれていた。

図25

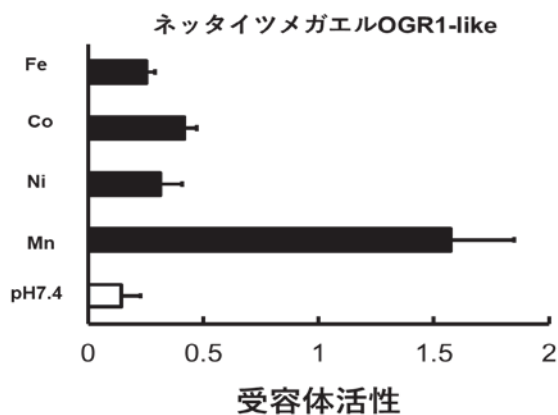


図 25 はゼブラフィッシュ OGR1 と同様の活性化パターンを示した群である。すなわちマンガンのみに活性化作用が観察される群である。この群には両生類であるネッタイツメガエル OGR1-like が含まれていた。

図26

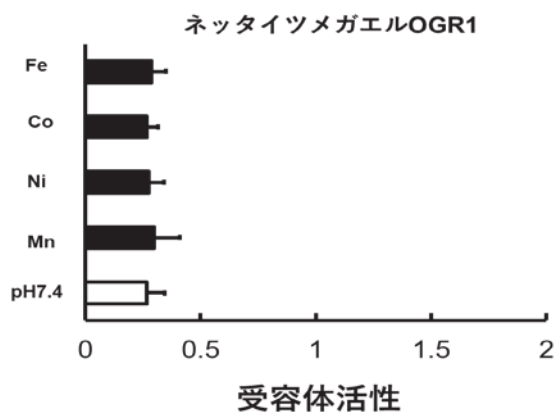
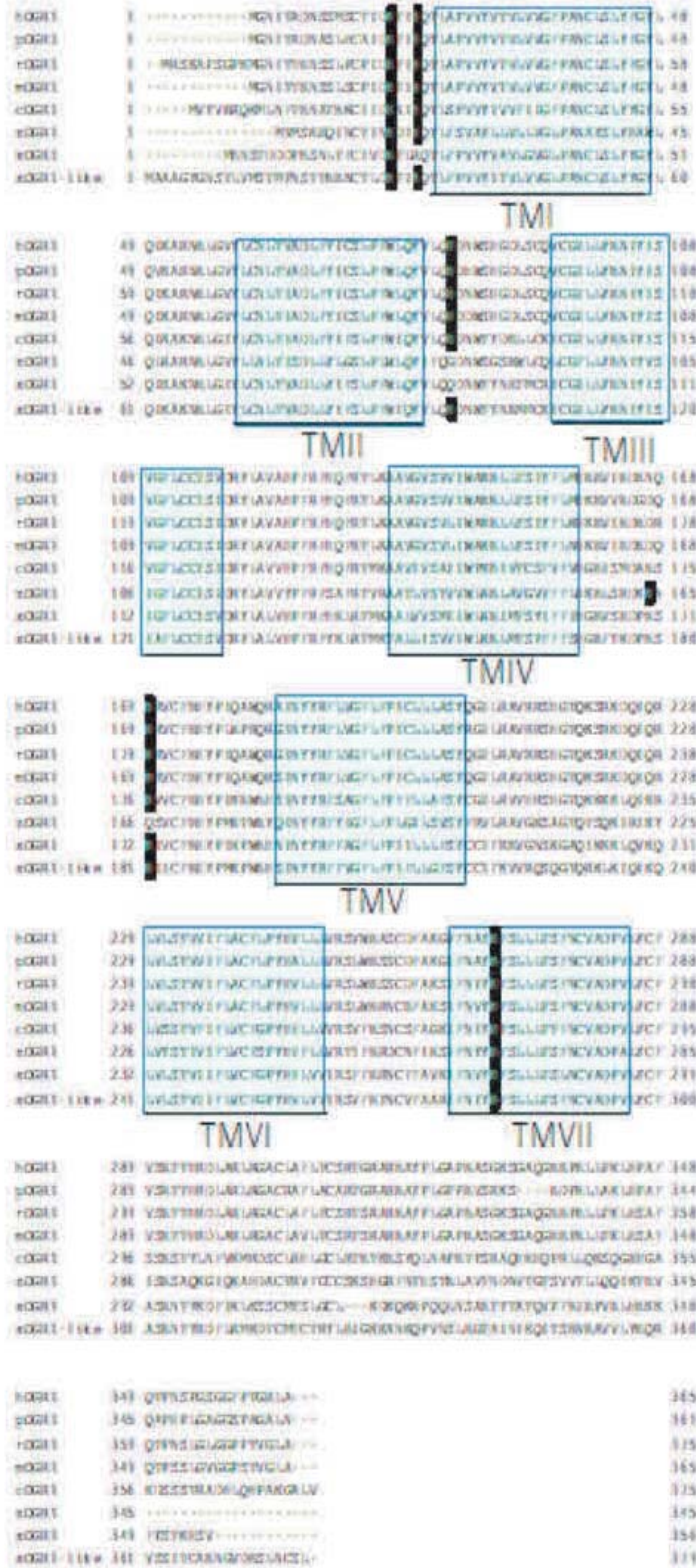


図 26 はすべての金属に対して活性化を示さない群である。この群に含まれているのはネッタイツメガエル OGR1 である。ネッタイツメガエルには2種類の OGR1 相同遺伝子が存在し、この OGR1 はそのうちの一つである。

図27



もうひとつは前述したネッタイツメガエル OGR1-like である (図 25)。

ちなみに今回調べた各動物種由来の OGR1 はすべて、プロトン刺激に対してはヒト OGR1 と同様の活性化応答を示した。またプロトン感知に重要なヒスチジン残基もこれらの動物種間で保存されていた (図 27)。

すなわち OGR1 は、進化の過程でプロトンを共通のリガンドとして利用してしてきたことが本研究により示唆された。

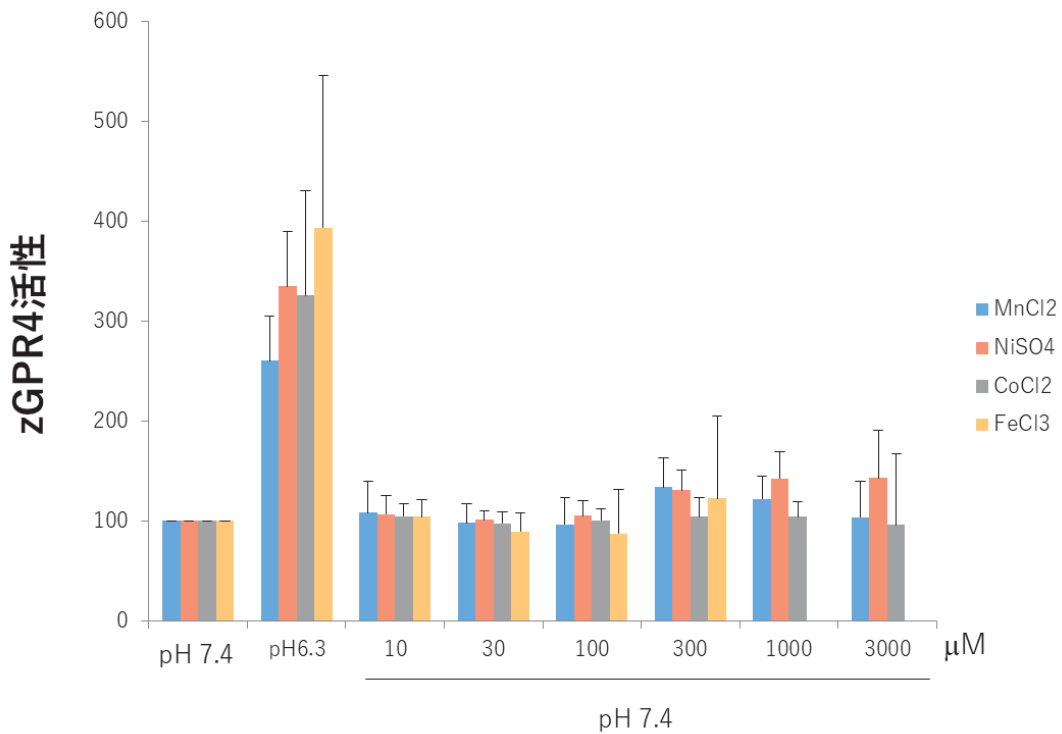
一方金属の刺激に対しては、OGR1

は動物種によって異なる応答を示すことが明らかとなった。この動物種による OGR1 の金属応答の違いは、異なる pH 条件下、すなわち異なるプロトン濃度下においても観察された。すなわちこれら金属種による応答性の違いは、まわりのプロトン濃度の影響の結果引き起こされているものではないことが示唆された。動物種間でなぜ OGR1 を活性化する金属種が異なるのかに関しては、その理由は現在不明である。哺乳類では調べた金属種のすべてで受容体の活性化が観察されたのに対して、鳥類ではいくつかの金属種での応答が減弱し、両生類、魚類ではさらに応答する金属種が少なくなる傾向が観察された。各生物種が生息する環境の違い、すなわち陸生と水生の環境の違いが金属に対する応答性の違いを生み出しているのかもしれない。本研究で用いた金属は微量元素、超微量元素として、生体の維持に必要不可欠のものとされている。この欠乏、過剰摂取は生体機能に様々な変化をもたらす。哺乳類は主に地上で生活し、必要なこれらの金属を主に土中からの植物の吸収を通して摂取しているためその摂取量には増減がある。そのため、それらの濃度の増減を感知する機構が必要である。一方魚類は水中で生活しており、周りの水に含まれる金属濃度が比較的一定のため、その感知機能があまり必要とされないせいなのかもしれない。両生類は水生と陸生の生活を併せ持つ種である。そのためこの種には、金属に対する応答性の違う 2 種類の OGR1、すなわちミネラルに応答しなくてもよい水生生活の OGR1 が残存する一方、陸生の生活に適応するための、すなわちミネラル応答性の OGR1 (OGR1-like) を新たに必要とした可能性がある。この可能性の検証にはまず、他の両生類の OGR1 を調べていく必要がある。

ヒトゼブラフィッシュ間の OGR1 キメラ受容体の解析結果 (図 21、

22) から、この動物種による金属特異性の違いに関与する部位は、受容体のヒスチジン残基以外の細胞外アミノ酸の配列中に存在するものと考えられる。この仮説は、以下の結果からも支持される。GPR4 は OGR1 と同様に、細胞外プロトン濃度の増加を感知して活性化するプロトン感知性 GPCR の一種である。この受容体も細胞外側に存在するヒスチジン残基を変異させると、プロトン感知能が消失する。図 28 は、ゼブラフィッシュ GPR4 (zGPR4) の金属に対する応答を調べた結果である。

図28

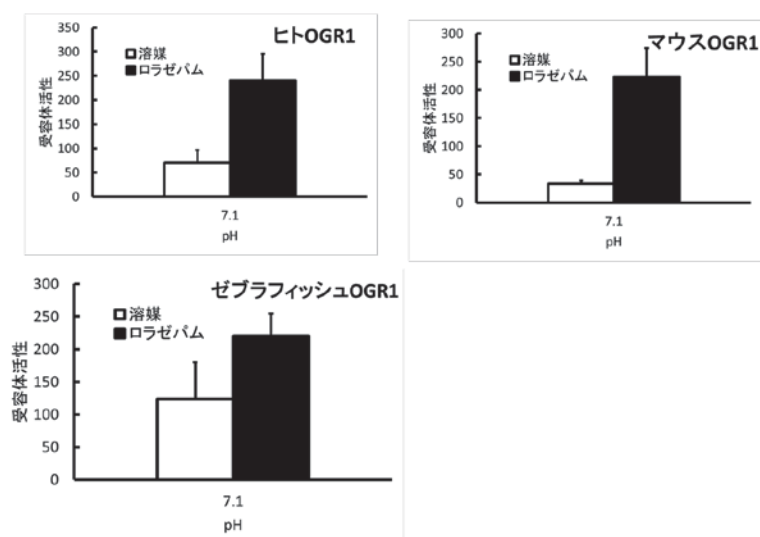


図に示すように、用いたどの金属種によっても調べた限りの金属では GPR4 が活性化する結果は得られなかった。すなわちヒスチジン残基以外のアミノ酸配列が金属による活性化応答に関わっているものと考えられた。しかしながら今回、細胞外領域のどのアミノ酸配列がその活性化に関与しているのかに関しては、明らかにすることはできなかった。

本結果は金属を OGR1 のアゴニストとして用いる場合、対象となる動物種によって、有効な金属種をまず選定することが重要であることを示している。しかしながら先にも述べたように、本研究で用いた金属は微量元素、超微量元素として、生体の維持に必要な不可欠のものである。この欠乏、過剰摂取は生体機能に様々な変化をもたらすことから、これら金属を生殖調節のためそのまま用いることは難しいものがある。そこで他に OGR1 の活性調節に関与する化合物情報を、各種データベースを利用して検索した。その結果、ロラゼパムが OGR1 の活性化を修飾するとの情報を得た。

ロラゼパムはベンゾジアゼピン系の抗不安薬として使用されている。その作用機構は、GABA_A 受容体のベンゾジアゼピン結合部位に結合後、GABA のよる Cl⁻透過性を増大させ、神経の興奮を抑制するものとされている。ところが GABA_A 受容体以外にロラゼパムが OGR1 のモジュレーターとしても作用し、マウスの不安行動の一部に関与しているとの報告がなされた。すなわち金属に加えてロラゼパムが OGR1 活性を制御する新たな修飾剤として使用可能であることが示された。そこで本研究ではこの薬物が種を超えて OGR1 の活性化を修飾できるのか調べた。予

図29



備的な結果を図 29 に示す。

図 29 よりロラゼパムは確かにヒト、マウス OGR1 のプロトンによる活性化を増強するという結果を得た。ゼブラフィ

ツシュ OGR1 に関してもヒトやマウス OGR1 と同様にその活性の増強傾向が観察されたが、その程度は弱いものであった。このゼブラフィッシュ OGR1 に対するロラゼパムの作用や他の生物種由来の OGR1 に対するロラゼパムの作用に関しては今後、実験を積み重ねていく必要がある。ロラゼパムが種を超えて OGR1 の活性を増強するのであれば、この薬物やその誘導体を新たな生殖調節剤として使用できる可能性がある。