

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	地球生命物質科学専攻
学生番号 Student No.	51428207
氏名 Name	顧 婷婷

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

ラットにおけるニューロメジン U の発現制御機構及び生理機能の解析

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

生物は地球の自転による約 24 時間の明暗周期に行動や生理機能を同調させている。概日リズムと呼ばれるこのリズムは、外部光環境情報が入力される視交叉上核が中枢時計として機能し、松果体からのメラトニン分泌等を介して各組織の末梢時計を同調させることで形成される。下垂体隆起部 (PT) は主要な内分泌腺である下垂体の一領域であり、正中隆起の脳底側を覆うように存在する薄い細胞層で構成されている。この PT はメラトニン受容体を高発現することから、古くから日周期的、季節的に変動する生理現象への関与に関する研究がなされてきた。その結果、ウズラのような季節繁殖動物では、長日条件になると PT からの甲状腺刺激ホルモンの分泌が亢進し、これが視床下部に作用して生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌を促進して生殖行動を引き起こすことが広く知られるようになった。

近年、マイクロアレイ解析により、ラットの PT でニューロメジン U (NMU) が高発現していることが見出された。さらに、成獣雄ラットの PT では *Nmu* mRNA 発現は明期に高く、暗期に低い日内変動を示し、メラトニン投与により発現が抑制されることが報告された。このことは、NMU がメラトニンの作用を仲介し、日周期的な生理機能の制御に関与する因子である可能性を示唆する。しかし、*Nmu* の発現制御のしくみには不明な点が多く残されている。また、ラットにおける NMU の生理機能についても脳室内投与実験結果に基づいた知見のみであり、内因性 NMU の働きは明らかになっていない。

本研究では、ラットの脳内で最も高発現する PT における NMU の発現制御のしくみをより詳細に理解するため、成獣雌ラットの PT における *Nmu* 発現の日内変動と雌性ホルモンの影響を検討すると共に、*Nmu* の発現制御のしくみを *in vitro* 系を用いて解析した。さらに、ゲノム編集により *Nmu* 遺伝子改変ラット (*Nmu*^{-/-}) を作出し、内因性 NMU の生理機能を検討した。

1. 成獣雌ラット PT における *Nmu* mRNA 発現の解析

F344 系統成獣雌ラットの PT における *Nmu* mRNA 発現の日内変動をリアルタイム RT-PCR (RT-qPCR) 解析と *in situ* hybridization (ISH) 解析により検討した。RT-qPCR 解析の結果、*Nmu* mRNA は明期の Zitgeber time (ZT) 6 で最高値を、暗期の ZT18 で最低値を示す時間依存的変化が観察された。ISH 解析においても同様の結果が得られ、染色性は ZT6 に高く、ZT18 で低かった。このことから成獣雌ラットにおいても、雄ラットと同様に明期に高く暗期に低い日内変動を示すことが明らかとなった。同様に、発情周期による発現量を調べたところ、RT-qPCR 解析と ISH 解析のいずれにおいても発情前期に低く、発情間期

に高かった。そこで PT における *Nmu* mRNA 発現に及ぼす雌性ホルモンの影響を解明するため、卵巣摘出 (OVX) を行ったところ RT-qPCR 解析と ISH 解析のいずれにおいても *Nmu* mRNA の発現亢進が観察され、さらに OVX を施したラットにエストラジオール-17 β (E₂) を投与すると発現が低下することがわかった。以上から、*Nmu* 発現は成獣雄ラットと同様な概日リズムを示す一方、その発現レベルは発情周期に伴って変化し、E₂ によって低下することがわかった。RT-PCR 解析の結果、PT ではエストロゲン受容体 *Er β* の発現が検出されたことから、エストロゲンは ER β を介して *Nmu* 発現を抑制することが示唆された。

2. PT における *Nmu* mRNA の発現制御メカニズムの解析

PT における *Nmu* 発現の概日リズム形成について、発現を抑制する因子としてメラトニンが同定されていたが、発現を促進する因子は不明であった。RT-PCR 解析の結果、PT ではアデノシン受容体 A2b が高発現していたことから、アデノシンの *Nmu* mRNA 発現に及ぼす影響を解析した。脳スライス培養系 (*ex vivo* 系) においてアデノシンアゴニストである NECA を投与したところ、PT における *Nmu* mRNA 発現が有意に上昇した。この NECA の効果は、A2b のアンタゴニスト PSB603 の同時投与により打ち消されたことから、アデノシンは A2b を介して *Nmu* mRNA 発現を促進することが示唆された。さらに、*Nmu* の 5' 上流域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組込んだレポータープラスミドを作製し、HEK293T 細胞を用いたプロモーター解析 (*in vitro*) を行ったところ、A2b を強制発現させ、NECA を投与することでプロモーター活性の劇的な上昇が観察された。この時、リン酸化 CREB が増加することが Western 解析によりわかった。しかし、*Nmu* 5' 上流域の-96 bp~-103 bp にある CRE 配列に変異を導入すると、上記のプロモーター活性上昇が抑えられた。これらの結果から、アデノシンは A2b を介して cAMP シグナル伝達経路を活性化し、*Nmu* の転写を促進することが示唆された。脳スライス培養系の実験結果と併せて、PT における *Nmu* 発現がアデノシンによって促進的に制御されている可能性が示唆された。

3. 遺伝子改変ラットを用いた NMU の生理機能解析

CRISPER/Cas9 システムと rGONAD (Rat Genome-editing via Oviductal Nucleic Acid Delivery) を適用して NMU 遺伝子欠損ラット (*Nmu*^{-/-} ラット) を作出し、得られた *Nmu*^{-/-} 雌ラットの表現型を *Nmu*^{+/+} ラットと比較検討した。その結果、外観に大きな違いは見られず、体重は測定した 4 週齢~24 週齢で有意差は見られなかった。また、摂食量についても、9 週齢~24 週齢まで調べたがどの週齢も有意差は見られなかった。これらの結果は、これまでの脳室内投与実験から提唱された NMU の生理機能、すなわち、摂食抑制作用やエネルギーホメオスタシスの働きを内因性 NMU が持たない可能性を示唆する。また雌ラットの生殖機能の解析として、発情周期や卵巣の形態、黄体数、掛け合わせから出産までにかかる日数、仔一匹の出産にかかる時間、産仔数に、*Nmu*^{-/-} ラットと *Nmu*^{+/+} ラットで違いが見られなかったが、出産の時間帯は *Nmu*^{+/+} ラットは ZT8~ZT12 時に集中するが、*Nmu*^{-/-} ラットではばらつきが大きくなり ZT4~ZT24 に出産する個体も散見された。また、出産に伴う母性行動 (巣作り、胎盤食、仔を舐める行動、仔を巣にまとめる行動など) については顕著な違いは観察されなかったが、*Nmu*^{-/-} 母ラットの仔は生存率が有意に低下していた。

申請者は本研究を通じ、ラットの PT における *Nmu* 発現がアデノシンによって制御されていることを示した。このことは、NMU が外部光環境シグナルのメラトニンと脳代謝シグナルのアデノシンの情報を統合して分泌される出力因子として機能し得ることを示唆する。さらに興味深いことに、この PT での *Nmu* 発現がエストロゲンによる抑制を受けることを初めて実証した。このことは、PT に発現する NMU が関わる生理現象に性差や発情周期特異性がみられる可能性を示唆する。NMU の生理機能については、*Nmu*^{-/-} ラットが多食や肥満を示さなかったことから、従来から提唱されてきた NMU の摂食制御に関する機能が薬理効果であった可能性が示唆された。代わりに、*Nmu*^{-/-} 母ラットでは出産の時間帯がばらつき、仔ラットの生存率が低くなるのが初めて明らかとなった。これらが *Nmu* 遺伝子欠損

の直接的な影響であるのか、間接的影響であるのかは不明であるが、NMU の生理機能の解明に重要な新知見を提供するものと考えられる。本研究の発展は、ヒトにおける乳児死亡の改善や理解、支援に繋がるものと期待される。