

博士論文

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

令和2年3月

51428207 顧 婷婷

岡山大学大学院

自然科学研究科

目次

I. 緒言	5
II. 第一章	8
II.1 序論	9
II.2 材料及び方法	11
II.2-1 雌ラット隆起部における <i>Nmu</i> 発現の日内変動と E ₂ の作用	11
実験動物	11
発情周期の観察	11
ラット脳のサンプリング	11
レーザーマイクロダイセクション (LMD) 用切片の作成	11
トルイジンブルー染色	12
LMD 法による隆起部の採取	12
LMD サンプルからの total RNA 抽出	12
逆転写反応による隆起部 cDNA サンプルの作製	12
卵巣除去 (OVX) 手術及び E ₂ 投与	13
脳スライス法による隆起部の回収	13
脳スライス隆起部サンプルからの total RNA 抽出及び逆転写	13
雌ラット隆起部における <i>Nmu</i> mRNA 発現の日内変動及び雌性ホルモンへの影響 (RT-qPCR 法)	14
統計的解析	14
ISH 用凍結切片の作成	15
雌ラット隆起部における <i>Nmu</i> mRNA 発現の日内変動及び雌性ホルモンへの影響 (ISH 法)	15
シグナル解析	16
II.2-2 雄ラット隆起部における <i>Nmu</i> 発現へのアデノシンの作用	16
雄ラット隆起部におけるアデノシン受容体発現の検討 (RT-PCR 及び RT-qPCR 法) ..	16
脳スライスの準備とスライス培養	16
コンストラクト作製	17
トランスフェクション及びルシフェラーゼレポーターアッセイ	17
ウエスタンブロット分析による pCREB レベルの測定	18
統計的解析	18
II.3 結果	19

II.3-1 雌ラット隆起部における <i>Nmu</i> 発現の日内変動と E ₂ の作用	19
雌ラット隆起部における <i>Nmu</i> mRNA 発現の日内変動	19
雌ラット隆起部における <i>Nmu</i> mRNA 発現と発情周期の関係	19
雌ラット隆起部における <i>Nmu</i> mRNA 発現への雌性ホルモンの影響	19
雌ラット隆起部における <i>Era</i> , <i>Erb</i> , <i>Pgr</i> mRNA の発現.....	20
雌ラット隆起部における <i>Nmu</i> mRNA 発現は E ₂ 処理による変化	20
II.3-2 雄ラット隆起部における <i>Nmu</i> 発現へのアデノシンの作用	20
ラット隆起部におけるアデノシン受容体の発現.....	20
ラット隆起部における <i>Nmu</i> 発現のアデノシンによる制御	20
アデノシンによる <i>Nmu</i> プロモーター活性への影響	21
アデノシンの cAMP 依存性シグナル伝達経路の活性化の検討	21
II.4 考察	22
III. 第二章.....	25
III.1 序論	26
III.2 材料と方法	28
動物	28
<i>Nmu</i> ⁺ ラットの作出	28
<i>Nmu</i> ⁺ F2 ラットの BigDye シークエンシング	28
<i>Nmu</i> ⁺ F2 ラットのジェノタイピング	29
雌ラットの体重と摂食量の測定	30
発情周期の観察	30
卵巣切片の作成	30
ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色)	30
卵巣黄体数の比較.....	31
繁殖行動の検討	31
出産に伴う母性行動の観察	31
巣作りの評価	31
仔ラットの生存率及び成長率の測定	32
統計的解析.....	32
III.3 結果	33
CRISPER-Cas9 システムと rGONAD 法による <i>Nmu</i> ⁺ ラットの作出.....	33
<i>Nmu</i> ⁺ ラットのジェノタイピングによる <i>Nmu</i> 遺伝子変異の確認	33
<i>Nmu</i> ⁺ 雌ラットの外観の比較及び体重と摂食量の測定	33

<i>Nmu</i> ^{-/-} 雌ラットの発情周期及び卵巢発達の検討	33
<i>Nmu</i> ^{-/-} 雌ラットの繁殖及び出産に伴う母性行動の検討	34
<i>Nmu</i> ^{-/-} 母ラットの養育行動の観察	35
III.4 考察	36
V. 総括	39
VI. 謝辞	42
VIII. 図	54

I. 緒言

動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、動物、植物、菌類、藻類など多くの生物に存在している。概日リズムは体内時計によって。哺乳類における時計中枢は視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在する。SCN を破壊された個体では、規則正しい睡眠・覚醒リズムが完全になくなってしまふ。SCN は日長の情報を網膜から受け取り、他の情報と統合し、松果体へ送信していると考えられている。松果体ではこの情報に応答してホルモンであるメラトニンを分泌する。メラトニン分泌は夜間に高く、昼間に低い。

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 にはメラトニン受容体が高密度に存在し、生物時計を作り出す時計遺伝子が日内リズムを持って発現している。これらの特徴から、PT はメラトニンや生物時計を作り出す日周期的、季節的メッセージを内分泌系に仲介する部位であると考えられてきている。しかしながら、PT の採取や摘除が難しい為に、ホルモン制御機構や生理的機能について研究が進んでいない。現在まで、PT におけるホルモン産生とメラトニンや時計遺伝子の関係は不明であり、PT の生理的意義の理解の為に、PT のホルモン制御メカニズムの解明が必要であると考えられる。

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。NMU はブタの脊髄から分離された神経ペプチドであり、強力な子宮筋収縮活性を持つことから命名された。NMU は広範な組織で機能する多機能な生理活性ペプチドである。さらに、先行研究により成獣雄ラットの 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。一方、いくつかの研究によって、性的成熟及び性腺機能の調節における NMU の潜在的な中枢神経系の役割も報告されている。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。さらに、生殖系の発達における NMU の機能は不明な点が多く、雌性ホルモンの制御について NMU の直接的な役割はほとんど研究されていない。特にラット PT における NMU の報告はない。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。

そこで本研究は、雌ラット PT の *Nmu* mRNA 発現が雌性ホルモンにより制御されるメカニズムを解明した。まず、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 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) 解析と *in situ* hybridization (ISH) 解析により検討した。また、同様に、発情周期による発現量を調べた。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) を施したラットにエストラジオール-17 β (E₂) を投与した。また、ラット PT における *Nmu* の発現にサーカディアンリズムが見られることを明らかにしたが、そのリズム形成のメカニズムや生理的意義は不目である。PT における *Nmu* mRNA の発現制御メカニズム特に発現を促進する因子の制御メカニズムを解明する為に、アデノシン (PT でアデノシン受容体が高発現を示し、日内変動を示す脳領域において細胞外のアデノシンの蓄積が観察された) がラット PT の *Nmu* mRNA 発現の調節に関与しているかを検討した。さらに、雌ラット NMU の生殖性機能は不明な点が多い。ラットにおける内因性の NMU の働きを知る為に、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。

II. 第一章

ラット下垂体隆起部における

NMU の発現制御機構

II.1 序論

動物の行動及び生理機能は外部光周期環境の変化に適応する。メラトニンは暗期に松果体から分泌され、メラトニン標的部位に光周期情報を提供する。隆起部 (PT) において高密度なメラトニン結合部位が観察されており(1,2), PT は季節的変換と概日リズムを持った生理機能へ重要な役割を果たすと考えられている(3-5)。これまでに、PT におけるメラトニンの役割を解明するために多くの研究が実施されている。その結果、PT における時計遺伝子の発現には概日リズムがあり、メラトニンによって制御されていることが示された(6,7)。また、PT における甲状腺刺激ホルモン (TSH) の発現量は光周期の変化に応じて調節されることも明らかとなった(8-10)。PT からの TSH 分泌は視床下部の甲状腺ホルモンレベルを調節し、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の分泌を調節して、季節性繁殖を制御することが報告されている(11,12)。

また、近年マイクロアレイ法を用いてラット PT の遺伝子発現を網羅的に検討し、PT で特徴的に発現する因子を同定した。その結果、ニューロメジン U (NMU) が PT で高発現していることが見出された(13)。NMU はラット(14,15)、カエル(16)、ニワトリ(17)、ヒト(18)などの脊椎動物で同定しているペプチドホルモンである。NMU は循環血液中から検出されないため、循環ホルモンではなく局所的な調節因子として作用することが示唆されている(19,20)。さらに、ラットやヒトでは、NMU は十二指腸で高発現し、小腸や胃、脂肪組織での発現も見られることから、NMU は広範な組織で機能する多機能な生理活性ペプチドであると考えられている(21)。

先行研究により雄ラット PT の *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示された(13)。さらに、いくつかの研究によって、性的成熟及び性腺機能の調節における NMU の役割も報告されている(22-25)。例えば、雌ラット視床下部における *Nmu* mRNA の発現は出生後から成年まで持続的存在し、幼児期に一番低い、その後徐々に増加し、発情周期がある思春期及び成年期に一番高いことが報告されている(22)。このことから、NMU は発情周期を形成する雌性ホルモンに関与することが示唆された。しかし、雌性ホルモンは NMU の直接的な制御機構はほとんど研究されていない。特に雌ラット PT の NMU に対する制御機構の報告はない。

そこで第一章では、はじめに雌ラット PT の *Nmu* mRNA 発現レベルの日内変動及び発情周期による変化を検討した。さらに雌性ホルモンの影響を検討するため、卵巣摘出 (OVX) ラット及びエストラジオール-17 β (E₂) を投与したラットにおける *Nmu* mRNA 発現の変化を検討し、PT の *Nmu* mRNA 発現が雌性ホルモンにより制御されるメカニズ

ムを解析した。

一方、先行研究によりラット PT の *Nmu* mRNA 発現はメラトニンにより抑制されることが分かっているため、今回は *Nmu* mRNA 発現を促進する因子の制御メカニズムを解析した。雌ラットには発情周期があり、雌性ホルモン等様々な影響があるため、解析が難しい。そのため、雄ラットを用いて、PT の *Nmu* mRNA 発現を促進的に制御する候補因子を検討した。PT におけるアデノシン受容体は高発現を示すことが報告されている(26,27)。また、日内変動を示す脳領域において細胞外のアデノシンの蓄積が観察された(28-30)。これらのことは、PT がアデノシンによって調節されることを示唆している。アデノシンは高エネルギーリン酸化合物であるアデノシン三リン酸 (ATP) の代謝過程で生じるプリンヌクレオシドで、中枢神経系において神経伝達や血流制御などの重要な機能を果たしている(31-34)。サイトゾール 5'-ヌクレオチダーゼは細胞内に豊富に存在する ATP/ADP/AMP を分解しアデノシンを産生する。産生された細胞内アデノシンはアデノシンキナーゼやアデノシンデアミナーゼによって AMP とイノシンに交換される。細胞外に放出された ATP や ADP は細胞表面に局在する膜結合型 CD39 と CD37 によって脱リン酸化され、細胞外アデノシンへと変換される。アデノシンは細胞内中間代謝体としての役割に加え、細胞表面の四つの細胞膜アデノシン受容体 (*Adora1*, *Adora2a*, *Adora2b*, *Adora3*) を介して細胞機能の調節をしている(35)。前脳基底部にアデノシンが蓄積することによって、睡眠促進及び覚醒抑制の役割を果たす可能性がある(36,37)。PT におけるアデノシンの作用メカニズムは未だ不明であるが、アデノシンのリズムの調節は PT において内部環境信号として機能する可能性があることを示唆している。

第一章では、また PT における *Nmu* mRNA の発現制御メカニズムを解明する為に、アデノシンがラット PT の *Nmu* mRNA 発現の調節に関与しているかを検討した。まず、ラット PT においてアデノシンの四つの受容体である *Adora1*, *Adora2a*, *Adora2b*, *Adora3* の発現の有無を検討した。その後、PT を含むラット脳スライスを培養し、アデノシンアゴニスト (NECA) 及びアデノシン受容体アンタゴニスト (PSB603) が *Nmu* mRNA 発現に与える影響を検討した。In vitro アッセイにより NECA は *Nmu* プロモーターの活性化、アデノシン受容体を介する制御、CRE 領域の活性化及びリン酸化 CREB (pCREB) に対する制御を検討した。

II.2 材料及び方法

II.2-1 雌ラット隆起部における *Nmu* 発現の日内変動と E_2 の作用

実験動物

本研究では、7週齢のF344系統雌ラット及び雄ラットを日本清水実験材料株式会社 (Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd, Kyoto, Japan) から購入した。室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で12時間/12時間の明暗サイクルの下で、水と餌 (オリエンタル酵母 MF 飼料, Oriental Yeast Co., Ltd. OYC, Tokyo, Japan) は自由に摂取させた。雌ラットは8~10週齢, 雄ラットは8~16週齢の範囲で使用した。すべての動物の世話と実験は, 岡山大学の動物実験委員会によって承認され, 岡山大学の動物実験のガイドラインに従って行った。

発情周期の観察

雌ラットにおいて8週齢から, Zeitgeber time (ZT) 3~ZT4に発情周期を判定するために膣スメア検査を行った。爪楊枝の先端に脱脂綿を巻き, 水で濡れた状態下で, ラットの膣は手前に固定し, 軽くまわして膣スメアを採取した。採取したスメアは直ちにフロストスライドガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd. Osaka, Japan) に塗抹し, 顕微鏡で観察した。発情周期は発情前期 (Proestrus: P期), 発情期 (Estrus: E期), 発情間期 (Diestrus: D期) に分けられる。発情期群には, 実験当日の発情周期がP期である雌を被験体として用い, 非発情期群にはD期であるものを用いた。膣スメア検査は発情周期2~3サイクル連続して行い, その後, D期及びP期を示す個体を実験に用いた。

ラット脳のサンプリング

脳のサンプリングは明期開始であるZT0より6時間間隔でZT24まで経時的に行った。二酸化炭素 (CO_2) で安楽死の後, 心拍の停止を確認して断頭した。暗期のサンプリング時には, 目に光による刺激を与えないようにした。脳を傷つけないように素早く取り出した後, PTを含む視床下部部分をTissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いて液体窒素で凍結包埋し -80°C で保存した。サンプリングは各実験時刻より5分以内に行った。

レーザーマイクロダイセクション (LMD) 用切片の作成

クライオスタットを用いて $20 \mu\text{m}$ 厚の凍結切片を作成し, MembraneSlides (No. 11505189; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) に貼付した。切片はスライドガラスから剥がれないように, クライオスタットで2時間程, 乾燥させて密封し, トルイジンブ

ルー染色まで-80°Cに保存した。

トルイジンブルー染色

切片を密封したまま、-80°Cから4°Cへ移動させ、30分以上静置した。その後アセトンで3分間固定し、75%、50%エタノールで1分ずつ脱水処理し、100%エタノールに溶解した0.2%トルイジンブルー (Sigma-Aldrich Co. LLC, Tokyo, Japan) で2分間染色をした。DEPC DW で洗浄後、50%、75%、100%エタノールにて脱水し、冷風ドライヤーを用いて切片を乾燥させた。操作はすべて4°C低温室で行った。

LMD 法による隆起部の採取

レーザーマイクロダイセクションシステム (ライカ LMD 6500/7000; Leica Microsystems) を用いて、PT を採取した。LMD 法によって切り出された切片はβ-mercaptoethanol を含む RLT buffer (RNeasy Micro Kit; QIAGEN, Hilden, Germany) 60 μl で満たした 0.5 mL チューブのキャップ部分に直接採取し、total RNA 抽出作業を行うまで-80°Cで保存した。

LMD サンプルからの total RNA 抽出

LMD サンプルから RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。カラム上で DNase 処理 (RNeasy Micro kit に付属) を行い、RNase-free water 16 μl で溶出した。

逆転写反応による隆起部 cDNA サンプルの作製

PrimeScriPT™ RT Reagent Kit (TaKaRa Bio Inc. Siga, Japan) を用いて逆転写反応を行った。得られた total RNA 11 μl (15~350 ng) は下記組成の逆転写反応液を 37°C で 15 分、85°C で 50 秒間反応させ、その後 4°C で急冷し cDNA を作成した。作成した cDNA は 20 倍希釈し、使用するまで-20°Cで保存した。

「逆転写反応 reaction mixture」

5×PrimeScriPT Buffer	3.38 μl
Oligo dT Primer (50 μm)	0.85 μl
Random 6 mers (100 μm)	0.85 μl
PrimeScriPT RT Enzyme Mix	0.85 μl
RNA	11 μl
Total	16.923 μl

卵巣除去 (OVX) 手術及び E₂ 投与

1) OVX 手術

8 週齢雌ラットを用いた。小動物用麻酔器 (TK-36, Biomachinery, Chiba, Japan) を用いてイソフルラン (FUJIFILM Diosynth Biotechnologies Texas. LLC, College Station, TX, United States) で麻酔をかけた後、背側後方の毛を刈り、正中線に沿って皮を約 5 mm 開いた。ピンセットを内部に入れ、子宮がある上部の筋肉をつまみ、剪刀で開いた。脂肪を目印に子宮を引き上げ、卵巣を摘出し、筋肉を縫合した。もう一方も同様に行い、最後に皮を縫合した。回復期間を 1 週間もうけ、その後実験を実施した。

2) エストラジオール (E₂) 投与

E₂ (1.5 µg, sigma-Aldrich) は少量の 100% エタノールで溶かし、ゴマ油で希釈した後、42°C のウォーターバスでエタノールを蒸発させた。ZT2~3 の間で、OVX 群はゴマ油 (0.1 mL) を、E₂ 群は E₂ (12 µg/150 g) を投与した。まず、ラットは右手で尻尾を持ち、飼育ゲージの蓋の上に足を乗せ、体勢を整える。次に、親指と人差し指で首の後ろから背中を掴み、最後に薬指と人差し指で左後肢と尻尾を抑えることで安定する。その後、腹部の正中線を外し、皮下に針を入れた後、注射筒を腹部に対して直角に近い角度で差し込み、腹部の筋肉を通過させて針を挿入して投入した。24 時間後、断頭して、脳スライス法で PT を含む脳組織を回収した。

脳スライス法による隆起部の回収

ラットを CO₂ で安楽死させた後、心拍停止を確認してから断頭した。脳を傷つけないように素早く取り出した後、マイクロスライサー (Neo-Linear Slicer; Dosaka EM, Kyoto, Japan) を使用して、氷冷した 1×PBS (-) で 1100 µm 厚の新鮮な脳スライスを作成した。その後、PT を含む部分 (PT 及び隣接した正中隆起を含む) を残してトリミングし、1.5 mL チューブに入れて、-80°C で保存した。

脳スライス隆起部サンプルからの total RNA 抽出及び逆転写

脳スライス PT サンプルを入れた 2 mL のチューブに 1 mL RNazol RT reagent (Molecular Research Center, Inc, USA) と 3~4 個のビーズ (Zirconia Beads, 3.0 mm, Tomy Seiko Co., Ltd, Tokyo, Japan) を加え、ビーズ破砕機 (BEADS CRUSHER µT-12, Taitec corporation, Saitama, Japan) を用いて high 2100 r/min で 30 秒間 2 回組織を破砕して、完全に懸濁した。

組織懸濁液に 700 µl のオートクレーブ DW を加え、約 20 秒間激しく振った後、室温

で15分間静置した。その後、4°C、16000×gで15分間遠心して、RNAを含む水層700 µl新しい1.5 mLチューブに回収した。回収した水層と同量のイソプロパノールを加えて転倒混和を行い、氷上で15分間静置した。その後、4°C、15000×gで20分間遠心した後、上清を捨て、RNAペレットを回収した。600 µlの75%エタノールを加えて、タッピングでRNAペレットを洗浄後、4°C、15000×gで1分間遠心して、上清のエタノールを除去した。RNAペレットの洗浄は2回行った。残ったRNAペレットを約5分間風乾した後、RNase-free Waterに溶解した。その後、分光光度計(NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)を用いてRNA濃度を測定した。その後、逆転写反応を行った。

雌ラット隆起部における *Nmu* mRNA 発現の日内変動及び雌性ホルモンへの影響 (RT-qPCR 法)

RT-qPCRの反応にはSYBR Green及びLight Cycler 96 クイックマニュアル(Nippon Genetics Co., Ltd, Tokyo, Japan)を用いて行った。下記のRT-qPCR反応混液を調製した後、サイクル反応を行った。サイクル反応の条件は95°C 30秒間の熱変性後、95°C 5秒間の熱変性と60°C 30秒間の伸長反応を45サイクル行い、最後に95°C 10秒、65°C 1分、97°C 1秒の解離反応を付加した。反応に用いたプライマーの塩基配列を表1に示す。内部標準として、*Actb*を用いた。

「RT-qPCR reaction mixture」

SYBR Premix Ex Taq (2×)	10 µl
Forward Primer (10 µm)	0.8 µl
Reverse Primer (10 µm)	0.8 µl
DW	4.4 µl
Template	4 µl
Total	20 µl

すべての反応は3回行った。スタンダードサンプルの希釈系列により得られた検量線を作成することで、各転写物を定量して測定した。PTにおける*Era*、*Erβ*、*Pgr*発現の検討はRT-qPCR産物を2%アガロースゲル電気泳動で泳動確認した。

統計的解析

雌ラットのRT-qPCR実験の最終データは3~7匹動物のデータを平均値±SEMとして表した。2つのグループ間の比較はStudent's t-検定により行った。3つ以上のグループまた条件間の比較はone-way ANOVAまたはtwo-way ANOVAを行い、その後に

post-hoc Dunnett 検定を実施した。すべての統計分析は GraphPad Prism 8 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA) を使用して実行した。P < 0.05 の時統計的に有意とした。

ISH 用凍結切片の作成

凍結切片はクライオスタットを用いて 10 μ m の厚さで作成し、シランコートスライドガラスに接着させた後、クライオスタット内で 2 時間程乾燥させて密封し、ISH まで -80°C で保存した。

雌ラット隆起部における *Nmu* mRNA 発現の日内変動及び雌性ホルモンへの影響 (ISH 法)

凍結切片を -80°C から取り出し、37°C で 1 時間インキュベートした後、4% PFA により固定し、PBS 洗浄、0.25% 無水酢酸/0.1M トリエタノールアミン (PH 8.0) で 10 分間処理した。その後、PBS で洗浄し、ハイブリダイゼーションバッファー (HB ; 10% Dextran Sulfate, 1×Denhardt's solution, 12.5 μ g/ml tRNA, 20×SSPE, DEPC DW) を 85°C に温め、プローブを溶解して 85°C で 5 分間熱変性し、氷冷を 5 分間行った。プローブ濃度は 1000 ng/ml とした。プローブ溶液を切片に滴下し、ハイブリダイゼーションカバー (Grace Bio-Labs HybriSlip™ hybridization covers, sigma Aldrich) で覆った後、60°C で一晩ハイブリダイズさせた。

20×SSC/50% ホルムアミド溶液で 60°C 30 分間洗浄し、2×SSC により 60°C で 20 分間、0.2×SSC により 20 分間、それぞれ 2 回ずつ洗浄した。切片は Buffer 1 (100 mM Tris-HCl · PH 7.5, 150 mM 塩化ナトリウム, 0.01% Tween 20) で 5 分間室温にて洗浄し、続いて非特異反応抑制のため、Buffer 1 で溶解した 1.5% Blocking Reagent (Roche Diagnostics K. K. Tokyo, Japan) により 37°C で 1 時間反応させた。Buffer 1 で洗浄後、Buffer 1 で 1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) により 4°C で一晩反応させた。

Buffer 1 による 20 分間の洗浄を 3 回行った後、Buffer 2 (1M Tris-HCl · PH 9.5, 5 M 塩化ナトリウム, 1M 塩化マグネシウム) で 5 分間反応させた。発色液 (50 mg/ml 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) と 50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) を Buffer 2 に溶解) を切片上に滴下し、室温で発色が確認できるまで反応させた。反応は DW で停止し、アクアテックス (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で封入後、光学顕微鏡 (BX53 ; Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、cellSens Standard で写真撮影を行った。

シグナル解析

光学顕微鏡撮影で得られたデジタル画像を Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, San Jose, USA) によりグレースケール処理した。処理された画像を用い、ImageJ 1.52K (Wayne Rasband National Institute of Health, USA) を使用して PT におけるグレーシグナルの単位ピクセルあたりの平均密度を求めた。算出された値をシグナル値として使用し、グラフを作成した。

II.2-2 雄ラット隆起部における *Nmu* 発現へのアデノシンの作用

雄ラット隆起部におけるアデノシン受容体発現の検討 (RT-PCR 及び RT-qPCR 法)

RT-PCRは雄ラットPTのサンプルを用いてTks Gflex™ (TaKaRa Bio) を使用して行った。0.2 mL PCRチューブに2×Gflex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus) 10 µL, Primer mix (3 µm each) 0.4 µL, Template DNA 1 µL, DW 8.6 µLを加え、94°Cで1分間処理した。熱変性は98°Cで10秒間、アニーリングは60°Cで15秒間、伸長反応は72°Cで30秒間、36 サイクル数の条件で行った。RT-qPCR反応は、雌ラットのRT-qPCR条件と同様にして行った。

脳スライスの準備とスライス培養

ラットは、PTにおける *Nmu* 発現が低レベルの ZT0~ZT2 の間で安楽死させた(13)。マイクロサイザーを使用して、氷冷した PBS (-) で 400 µm の厚さの新鮮な前頭脳スライスを作成した。脳スライスは PT に隣接する正中隆起を含んでトリミングし、右半分と左半分にそれぞれ切断した (それぞれ対照群と投与群)。脳断片は 5% CO₂ 環境下で 37°C 8 時間、低グルコース (5.56 mM) を含む無血清フェノールレッドなしの DMEM で培養した。アデノシンアナログ 5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン (NECA; Tocris Bioscience, Bristol, UK) 及びアデノシン受容体アンタゴニスト PSB 603 (Tocris Bioscience) をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、それぞれ最終濃度は 10 µM 及び 1 µM になるように調整した。vehicle コントロールとして、DMSO を最終濃度 0.1% (vol/vol) で培地に加えた。実験 PSB 603 では、脳の断片を NECA (10 µM) または NECA (10 µM) と PSB 603 (1 µM) で同時に 6 時間処理した。インキュベーション後、RNA 抽出のために ISOGEN II (Nippon Gene) に断片を回収した。

コンストラクト作製

ラットAdora2bの発現ベクターは、DNAライゲーションキット (TaKaRa Bio) を使用して、pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific) のKpnI/NotI部位にタンパク質コード領域の全長をコードするcDNAを挿入することによって作製された。

ラット*Nmu*プロモーターアッセイ用のルシフェラーゼレポーターベクターはF344ラットのゲノムDNAを用いてPCRによって作製された。ラット*Nmu*遺伝子の5'上流領域をコードするcDNAをpGL3 ルシフェラーゼレポーターベクターに挿入し作製した

(Promega, Madison, WI)。ラット*Nmu*遺伝子の転写開始部位 (TSS) はEnsemble Genome Browser (ENSRNOG00000002164) を参照して決定した。ラット*Nmu*遺伝子の-940 bpプロモーター領域はNheI部位を含む Forward プライマー (5'-TGA GCT AGC ACA CTG CAG ATA TGT CAT G-3', -940) とBgl2部位を含む Reverse プライマー (5'-TGC AGA TCT AGC AGC TCT GGA CTG GG-3', +100) でF344ラットゲノムDNAから増幅した。PCR産物はDNAライゲーションキット (TaKaRa Bio) を使用してpGL3 ベクターのNheI / Bgl2部位にクローニングし、pGL3_*Nmu*-940を得た。pGL3_*Nmu*-940ベクターをテンプレートとして、pGL3_*Nmu*-200, pGL3_*Nmu*-107, pGL3_*Nmu*-93ベクターを作製した。各ベクターを作製するために特異的なForwardプライマーを設計し、すべてのルシフェラーゼレポーターベクターにBgl2部位を含むReverseプライマー (5'-TGC AGA TCT AGC AGC TCT GGA CTG GG-3', +100) を使用した。pGL3_*Nmu*-200のクローニングにはNheI部位を含むForwardプライマー (5'-GCC GCT AGC TAA TTT CAT TCT CCA GCT C-3') を使用した。コンストラクトの作製に使用したプライマーを示す (Table. 1)

トランスフェクション及びルシフェラーゼレポーターアッセイ

Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) から入手したHEK293T細胞を推奨手順に従って増殖させた。トランスフェクションの24時間前に細胞をポリ-L-リジンでコーティングした24ウェルプレート (1.0×10^5 cells/well) に播種した。それぞれのレポーターベクター*Nmu*プロモーター (100 ng/well), Adora2b発現ベクター

(pcDNA3_Adora2b; 100 ng/well) をポリエチレンジアミン"Max" (PEI; Polysciences Inc., Warrington, PA) を使用して細胞にトランスフェクトした。24時間後、培地を1%インシュリン-トランスフェリン-セレン (ITS) を含むフェノール不含のDMEMに換えた。NECAまたはDMSOをそれぞれ最終濃度10 μ Mまたは0.1%で同時に添加して12時間インキュベートした。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を使用

してルシフェラーゼレポーター遺伝子の活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は各サンプルのウミシイタケルシフェラーゼ活性を用いて、補正した。

ウエスタンブロット分析による pCREB レベルの測定

トランスフェクションの24時間前に HEK293T 細胞をポリ-L-リジンでコーティングした6ウェルプレート (3.0×10^5 cells/well) に播種した。Adora2b 発現ベクター (pcDNA3_Adora2b; 100 ng/well) または空ベクター (pcDNA3; 100 ng/well) を PEI を使用して細胞にトランスフェクトした。24時間後、培地は1% ITS を含むフェノールを不含の DMEM に換え、NECA (10 μ M) または DMSO (最終: 0.1% vol/vol) を12時間インキュベートした。次に、細胞を回収して RIPA バッファーで溶解した。タンパク質濃度は BCA プロテインアッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して決定した。サンプルは 10% SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに移した。メンブレンは 0.1% Tween-20 を含む Tris 緩衝生理食塩水に溶解した 5% スキムミルクで1時間ブロックした。イムノブロッティングは一次抗体に対して pCREB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; sc-81486; 1:1000 dilution), CREB (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000 dilution), また ACTB (GeneTex Inc., Irvine, CA; 1:10,000 dilution) で行った。続いて適切なホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England; 1:10000 dilution) で反応させた。免疫複合体は LAS 4000mini (GE Healthcare) を使用した強化化学発光アッセイ (Thermo Fisher Scientific) によって検出した。

統計的解析

最終データは4~8匹動物のデータを平均値 \pm SEMとして表した。2つのグループ間の比較は Student's t 検定によって行った。3つのグループまたは条件間の比較は one-way ANOVA または two-way ANOVA を行い、その後 post-hoc Dunnett 検定を実施した。すべての統計分析は GraphPad Prism 6 ソフトウェア (GraphPad Software) を使用して実行した。P < 0.05 の時統計的に有意とした。

II.3 結果

II.3-1 雌ラット隆起部における *Nmu* 発現の日内変動と E_2 の作用

雌ラット隆起部における *Nmu* mRNA 発現の日内変動

雌ラット PT における *Nmu* mRNA の発現及び日内変動を検討するために、ISH 法及び RT-qPCR 法を用いた (Fig. 1A~B)。ISH 法により、PT における *Nmu* mRNA の発現が認められ (Fig. 1A, 矢印)、その染色性は明期 ZT6 (Fig. 1A 左) に高く、暗期 ZT18 (Fig. 1A 右) において低かった。LMD によって採取した PT サンプルを使用して RT-qPCR 法により解析した結果、*Nmu* mRNA 発現量は時間依存的に変化していた。明期である ZT0 で低く、その後 ZT6 では高値を示し、その後 ZT12~ZT18 において低かった (Fig. 1B)。この結果から、雌ラット PT の *Nmu* mRNA の発現は雄と同様に明期に高く、暗期に低い日内変動を持つことが示された。

雌ラット隆起部における *Nmu* mRNA 発現と発情周期の関係

雌ラット PT の *Nmu* mRNA の発現が発情周期により変化するかを検討する為に、ISH 法及び RT-qPCR 法を用いて、明期である ZT6 の雌ラット PT の *Nmu* mRNA の発現を検討した (Fig. 2A~C)。ISH 法による検討の結果、PT における *Nmu* mRNA シグナル染色性は P 期より D 期において強かった (Fig. 2A, 矢印)。シグナル強度の解析の結果、*Nmu* mRNA 発現レベルは P 期と比較して D 期において有意に高かった (Fig. 2B)。また、RT-qPCR でも同様に、D 期の *Nmu* mRNA 発現レベルは、P 期により有意に高かった (Fig. 2C)。この結果から、PT の *Nmu* mRNA の発現レベルは発情周期によって異なることが示された。

雌ラット隆起部における *Nmu* mRNA 発現への雌性ホルモンの影響

PT の *Nmu* mRNA 発現が雌性ホルモンに関与するかを検討する為に、OVX ラットを用いて、ISH 法及び RT-qPCR 法を行い、PT における *Nmu* mRNA の発現の変化を調べた (Fig. 3A~C)。ISH 法による検討の結果、OVX 群は D 期よりも染色性が強かった (Fig. 3A, 矢印)。シグナル強度を解析した結果、OVX 群は D 期よりも染色性が有意に高かった (Fig. 3B)。また、RT-qPCR 法による検討でも同様に、*Nmu* mRNA 発現レベルは OVX 群で高い傾向にあった (Fig. 3C)。この結果から、PT の *Nmu* mRNA の発現は卵巣性雌性ホルモンに関与し、抑制的な制御を受けていることが考えられた。

雌ラット隆起部における *Era*, *Erβ*, *Pgr* mRNA の発現

PT の *Nmu* mRNA 発現がエストロゲンとプロゲステロンのどちらの雌性ホルモンの影響を受けているかを検討する為に、RT-qPCR 法及び電気泳動法を用いて雌ラット PT におけるエストロゲン受容体 (*Era*, *Erβ*) とプロゲステロン受容体 (*Pgr*) mRNA の発現を調べた (Fig. 4A~B)。PT において *Era*, *Erβ*, *Pgr* mRNA の発現が見られたが、*Erβ* mRNA の発現は、*Era* と *Pgr* mRNA の発現と比較して高かった (Fig. 4A)。その後、RT-qPCR より得られた PCR 産物の電気泳動像 (Fig. 4B) で確認しても *Era*, *Erβ*, *Pgr* mRNA の発現が見られたが、*Erβ* mRNA の発現が一番高かった。この結果から、PT の *Nmu* mRNA 発現はエストロゲンの影響を受けることが示唆された。

雌ラット隆起部における *Nmu* mRNA 発現は E₂ 処理による変化

PT の *Nmu* mRNA の発現が E₂ に関与するか検討する為に、OVX した雌ラットに E₂ 投与を行い、脳スライス法によって PT サンプルを回収し、RT-qPCR 法で検討した (Fig. 5)。PT における *Nmu* mRNA の発現は E₂ 投与により減少する傾向があった。この結果から、E₂ は PT の *Nmu* mRNA を抑制することが示唆された。

II.3-2 雄ラット隆起部における *Nmu* 発現へのアデノシンの作用

ラット隆起部におけるアデノシン受容体の発現

PT におけるアデノシン受容体サブタイプ (*Adora2b*, *Adora1*, *Adora2a*, *Adora3*) の発現を確認するために、LMD によって採取した PT サンプルを使用して、各サブタイプ特異的なプライマーセットで RT-PCR 及び RT-qPCR を行った (Fig. 6A~B)。両者の解析において *Adora2b* mRNA のみが PT で検出された。

ラット隆起部における *Nmu* 発現のアデノシンによる制御

次に、アデノシンがラット PT の *Nmu* mRNA 発現に及ぼす影響を調べた。脳スライス培養でアデノシンアゴニスト NECA を用いて PT *Nmu* 発現に対する効果を調べた (Fig. 7A~B)。NECA 投与実験では、NECA は *Nmu* 発現を促進し、Vehicle コントロールと比較すると投与後 4~6 時間で発現が有意に増加した (Fig. 7A)。しかし、*Nmu* 発現は NECA とアデノシン受容体 A2b アンタゴニスト PSB 603 の同時投与によって増加しなかった (Fig. 7B)。この結果から、*Nmu* mRNA 発現はアデノシンによって *Adora2b* を介して促進されることが示唆された。

アデノシンによる *Nmu* プロモーター活性への影響

アデノシンによる *Nmu* 発現促進のメカニズムを解明するために、Adora2b 発現ベクター (293T_Adora2b cells) を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイによりラット *Nmu* プロモーター活性を分析した (Fig. 8A)。各ラット *Nmu* プロモーター領域 *Nmu*-940 bp, *Nmu*-200 bp 及び *Nmu*-93 bp を含むルシフェラーゼレポーター遺伝子を HEK 293T 細胞に強制発現させると、NECA を 12 時間投与した群では活性が顕著に上がる。NECA 投与群において、ルシフェラーゼ活性は、*Nmu*-93bp より *Nmu*-200bp の方が有意に高い。NECA が関わる主要な転写調節領域は-200bp~-93bp の *Nmu* プロモーター領域内に存在する可能性があることを示唆している。

Adora2b は、7 回膜貫通型の G タンパク質共役受容体 Gs を介して、アデニル酸シクラーゼと相互作用し、cAMP シグナル伝達経路を活性化する (Stehle et al., 1992)。ラット *Nmu* プロモーターには TSS の -96 bp から -103 bp の上流に CRE 相同配列 (5'-TGACGCCA-3') が含まれているため (Fig. 8B)、CRE 相同配列が *Nmu* 発現の調節に関与しているかを調べた (Fig. 8C)。293T_Adora2b 細胞への NECA 投与において、変異 CRE 相同配列 (変異 CRE 配列: 5'-CACTACCA-3') をもつ *Nmu*-107 bp プロモーターでは、ルシフェラーゼ活性が大幅に減少した。これらの結果は、アデノシンによる Adora2b を介した *Nmu* プロモーターの活性化には CRE が不可欠であることを示唆している。

アデノシンの cAMP 依存性シグナル伝達経路の活性化の検討

一方、アデノシンが cAMP 依存性シグナル伝達経路をさらに活性化するかを確認するために、NECA による CREB リン酸化の誘導をウエスタンブロット法で分析した (Fig. 9A~B)。NECA は 293T_Adora2b 細胞の pCREB のレベルを有意に増加させたが (Fig. 9A)、CREB レベルには影響を与えなかった (Fig. 9B)。これらの結果は、Adora2b が cAMP シグナル伝達経路を活性化し、CREB のリン酸化を促進することを示唆している。

II.4 考察

第一章の研究では、まず F344 系雌ラットの PT における *Nmu* mRNA 発現が日内変動を示していることを明らかにした。先行研究により、雄ラットの PT の *Nmu* mRNA は明期に高く、暗期に低くなる日内変動を持つことが示されている(13)。本研究により、雌ラットも雄ラットと同様の日内変動を示すことが明らかとなった。

また、雌性ホルモンが高発現する P 期の *Nmu* mRNA の発現は雌性ホルモンが低発現する D 期に比べ顕著に低くなることが示された。一方、OVX を行ったところ、*Nmu* mRNA の発現亢進が観察され、さらに、OVX を施したラットに E₂ を投与すると発現が低下することが分かった。NMU と雌性ホルモンの関係はいくつかの研究が報告されていた(22-25,38,39)。雌ラット視床下部の *Nmu* 発現は P 期により D 期に高かった。そして、OVX により減少傾向があった。さらに、E₂ とプロゲステロン (P₄) 投与により増加する(22)ことから、視床下部の NMU はエストロゲンとプロゲステロン依存性であることを示唆している。また、4 週齢と 6 週齢ラットより 8 週齢ラット下垂体の *Nmu* 発現は有意に低下し、下垂体細胞培養における E₂ 投与により有意に低かった(40)。これらの結果は、ラットが思春期から成熟期に発達するにつれて、雌ラット下垂体における *Nmu* mRNA の発現が減少することを示唆している。さらに、下垂体での *Nmu* 発現の減少は思春期に発生する血清 E₂ の増加に関連している可能性がある。一方、OVX によりラット子宮の NMU 受容体の発現は 60%減少し、E₂ 投与により大幅に増加した(41)から、NMU 受容体の発現もエストロゲン依存性であることを示唆している。本研究の PT の *Nmu* 発現は予想される P 期により D 期に高かったが、PT の *Nmu* 発現はエストロゲンと負の制御、特に PT では *Erβ* の発現が検出されたことから、PT の NMU は ERβ を介して負の制御をしている結果は視床下部の報告と矛盾になったが、下垂体の結果と一致とした。腺性下垂体は主部、中間部、そして PT から構成されている。視床下部にある視交叉上核 (SCN) において *Nmu* の発現がある。これらのことから、視床下部の NMU と雌性ホルモンの関係は特に SCN と思う。PT の NMU と雌性ホルモンの関係は下垂体の報告と一致の合理的な結果であった。

以上の発見から、PT の NMU は日内リズムの形成において重要な遺伝子と考えられ、エストロゲンによる PT の *Nmu* mRNA の制御は生殖系に関与することが強く示唆される。今後はより詳細な解析として、PT の *Nmu* mRNA 発現に対する *Erβ* を介した E₂ による制御機構をプロモーター解析などの *in vitro* 実験系によって検討する予定である。共に、LMD で採取する SCN の NMU とエストロゲンの関係を検討する予定である。

なお、ラット PT ではそれぞれメラトニン受容体 1A (MT1A) とアデノシン受容体

A2b (Adora2b) の遺伝子が高度に共発現する。両者の受容体の主要なシグナル伝達経路は cAMP シグナル伝達経路に関わっている。MT1A はアデニリルシクラーゼを阻害する Gi タンパク質共役受容体であり(42), Adora2b は細胞のアデニリルシクラーゼを促進する Gs タンパク質共役受容体である(43)。PT はメラトニンの主要な標的組織であることがよく知られており、光周期性応答の生理的調節に重要な役割を果たす。しかし、PT におけるアデノシンの役割は未だ不明な点が多い。PT の NMU 発現制御メカニズムを解明する為に、RT-PCR 解析と RT-qPCR 解析を組み合わせることにより、Adora2b がラット PT で発現するアデノシン受容体サブタイプであることを最初に実証した。また、アデノシンアゴニストである NECA が脳スライス培養において、*Nmu* 発現を促進することを発見した。さらに、NECA は CRE 相同性ドメインと cAMP シグナル伝達経路を介して *Nmu* プロモーター活性を促進した。これらの発見はアデノシンが Adora2b を介してラット PT の *Nmu* mRNA 発現を促進することを強く示唆している。

以前に、PT の *Nmu* mRNA 発現は MT1A を介して作用し、暗期の *Nmu* mRNA 発現が低下することが示唆された(13)。今回の結果では、PT での *Nmu* mRNA の発現がアデノシンによって Adora2b と cAMP シグナル伝達経路を介して促進されることを示した。まとめると、これらの発見は、ラット PT で観察される *Nmu* mRNA 発現が cAMP シグナル伝達経路の制御を介して、メラトニンとアデノシンによって、相互に制御されることを示唆している。

PT の MT1A と Adora2b の相互作用は以前にマウスで報告されている。マウス PT における時計遺伝子 *Period1* のリズム発現は MT1A を介して生じ、Adora2b の異種の増感 (heterologous sensitization) に依存していることが示された。また、PT において時計遺伝子の発現はメラトニンによって調節されることが知られている。例えば、*Period1* の概日発現は松果体切除によって失われ(44), *Mt1a*^{-/-} マウスでは *Period* の発現はない(45)。さらに、メラトニン投与によってラット PT での *Cry1* と *Period 1* の概日発現が直ちに誘導された(46)。したがって、メラトニンは cAMP シグナル伝達経路を不活性化するだけでなく、時計分子の発現を制御することにより PT の *Nmu* mRNA の発現を調節する可能性がある。この可能性は今後の研究で検討される。

以上の結果から想定される PT の *Nmu* mRNA 発現制御を示す (Fig. 10)。F344 系統の雌ラットでは、E₂ は ERβ を介して PT の *Nmu* mRNA 発現を抑制することが示唆された。そして、一方、先行研究により雄ラット PT の *Nmu* mRNA 発現は暗期に分泌されたメラトニンによって抑制される(13)ことから、*Nmu* mRNA は明期に高く、暗期に低くなる日内変動を示す。今回の雌ラット PT における *Nmu* mRNA も同様の日内変動を持つことが確認できた。そして、松果体から分泌されメラトニンは 7 回膜貫通型の Gi タイプ

の三量体 G タンパク質を介して、アデニル酸シクラーゼ (Ac) によって抑制され、それを介して cAMP 濃度が減少してプロテインキナーゼ A (PKA) の作用によってリン酸化され CREB と CRE が結合して *Nmu* mRNA の発現を促進することが考えられる。同じく、生体内細胞代謝・神経活性産物信号として作用するアデノシンは 7 回膜貫通型の Gs タイプの三量体 G タンパク質を介して、アデニル酸シクラーゼ (Ac) を促進し、cAMP 濃度が増加してプロテインキナーゼ A (PKA) の作用によってリン酸化され CREB と CRE が結合して *Nmu* mRNA の発現を促進することも分かった。

結論として、ラット PT での *Nmu* mRNA 発現はエストロゲンによって ER β を介して制御することを初めて実証した。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見られる可能性を示唆する。また、ラット PT での *Nmu* mRNA 発現はアデノシンによりアデノシン受容体 A2b を介して cAMP シグナル伝達経路を活性化することも初めて実証した。*Nmu* がメラトニンによって負に調節されているという事実と合わせて、PT は外部光周期的環境信号として作用するメラトニンと生体内細胞代謝産物信号として作用するアデノシンによって媒介されるシグナルの統合において重要な役割を果たすという仮説を提案する。PT での NMU の機能分析は、メラトニン、アデノシン及びエストロゲンによって季節や概日信号、生殖系などの生理学的機能を持つ。PT の重要な役割を明らかにするかもしれない。

III. 第二章

雌ラットにおける NMU の生理機能解析

III.1 序論

NMU 配列は、異なる種を通じて高く保存されており、このペプチドは古くから重要な生物学的役割を持つことを示唆している(21)。NMU は大抵 8-25 個のアミノ酸ペプチド鎖として異なる種に存在している。より長い前駆体タンパクから生成され、未知のタンパク分解酵素(47)によって切断される。ヒトやラットの前駆体タンパクは 174 個のアミノ酸から構成され、34 残基のアミノ酸シグナルペプチドを含む。そして、それかには分泌型であることを示唆している。NMU は食欲やエネルギーバランスの調節、筋肉の収縮や腫瘍進展などの多くの機能を持つことが示された。その機能は、NMU 受容体が関与する(21)。

NMU は NMU 受容体 1 型 (NMU1R) 及び NMU 受容体 2 型 (NMU2R) という 2 つの受容体を介して作用する。ラット NMU1R の発現は末梢組織で高発現している一方で、中枢神経系においては低発現を示す(48-50)。ラット NMU2R の発現は視床下部の第 3 脳室の上皮細胞層で高く発現し、傍室核 (PVN) と弓状核 (ARC) などの脳内の特定の領域及び海馬にも発現することが報告されている(48,51,52)。これらの受容体は、オーファンクラス AG タンパク共役型受容体 (GPCRs) から同定され、7 回膜貫通型ドメインを持つ。NMU と同様に NMU1R や NMU2R の C 末端領域は、種を超えて高く保存されており、生物学的活性を決定するようである(53)。

NMU 遺伝子欠損 (*Nmu*^{-/-}) マウスは過食で、肥満を示し、活動低下と代謝低下を伴うエネルギー消費の減少を示す報告がある(54)。一方、NMU を過剰発現する NMU トランスジェニック (NMU TG) マウスでは、食欲低下が見られ、酸素消費量が増加した(55)。これらの結果より、マウスでは NMU は摂食抑制作用やエネルギーホメオスタシスに関与していることが示唆されている。NMU TG はゼブラフィッシュでも作出されており、行動活性の促進や睡眠の抑制が観察されている(56)。一方で、ラットにおける NMU の生理機能解析はこれまで、NMU の脳室内投与により影響を調べられてきた。NMU の脳室内投与により体重、摂食量が減少し、運動活性、体温、熱産生、酸素消費量が増加することが報告されている(57-59)。さらに、*Nmu*^{-/-} 雌マウスでは繁殖力があるが、膈開口が早いという報告がある(60)。原因として、35 日齢の *Nmu*^{-/-} 雌マウスの視床下部における卵胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH) の発現が増加する一方で、GnRH の変化が見られないことが考えられた。この知見から、*Nmu*^{-/-} マウスは LH 及び FSH 合成の変化により性早熟になったことが示唆され、NMU は FSH 及び LH に対して負の制御を行うことが考えられる。また、雌ラットにおける NMU の生殖機能解析は、NMU の脳室内投与により ARC のドーパミンを介して血漿のプロラクチン (PRL) 濃度

は強く抑制されることが報告されている(39)。また、OVXの状態下ではLHを抑制することが分かっている(22)。しかし、雌ラットNMUの生理的機能はまだ不明であり、特に生殖性機能の解析は進んでいない。また、脳室内投与はNMUの本来の産生/分泌量や局在とは異なる可能性が高く、内因性NMUの生理的役割を反映していないかもしれない。そこで、ラットにおける内因性NMUの働きを解明する為に、第二章では、NMU遺伝子欠損ラット ($Nmu^{-/-}$ ラット) の作出を試み、 $Nmu^{-/-}$ 雌ラットを用いてその表現型の解析を行った。

第二章では、まず、摂食抑制ホルモンと考えられているNMUが $Nmu^{-/-}$ ラットと野生型 ($Nmu^{+/+}$) ラットの体重と摂食量の違いを検討した。また、第一章では、NMUは性的成熟及び性腺機能の調節における潜在的な中枢神経系の役割を報告し、PTにおいて Nmu mRNA 発現が日内変動を示し、そして、発情周期によって影響を受けた。さらに、エストロゲンに関与することを示した。第二章では、また雌特有の生殖機能について検討を行った。 $Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ 雌ラットの発情周期、繁殖行動（交配、妊娠、出産）及び出産に伴う母性行動（巣作り、胎盤食、仔舐める行動、仔を巣にまとめる行動、子育て等）の違いを検討した。

III.2 材料と方法

動物

本実験では、F344 の雌ラットを用いた。飼育は室内で行い、8:00 点灯、20:00 消灯の 12 時間明期、12 時間暗期の明暗周期下で飼育し、餌と水は自由摂取させた。すべての実験は、本学の動物実験ガイドラインに従って行われた。

Nmu^{-/-} ラットの作出

Nmu^{-/-} ラットは、重井医学研究所との共同研究により、CRISPR-Cas9 システムと rGONAD (rat Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) 法を用いて作製された(61)。初めに、妊娠した雌ラットに麻酔をかけ、ラットの卵管内にある着床前の受精卵に Cas9 タンパク質と gRNA、外来遺伝子をキャピラリーを用いてインジェクションを行い、エレクトロポレーションを行った。gRNA (5'-CGAGCAGCTAATCGCCGCCAG-3') は、rNMU のシグナル配列を標的に設計した。また、同時にストップコドンを含む外来遺伝子 (5'-TAGCTAGCTAGAATTCCTCCGG-3') のノックインも行い、*Nmu* 遺伝子改変ラットの作出を行った。生まれたラットをシーケンスにより解析したところ、*Nmu* シグナル配列にストップコドンを含んだ外来遺伝子を挿入することに成功した、*Nmu* 遺伝子改変ラットを得ることができた。その F0 を *Nmu*^{+/+} と掛け合わせ、得られた F1 のヘテロ個体を掛け合わせ、F2 の *Nmu*^{-/-} ラットを作出した。これを解析したところ、NMU のシグナル配列にストップコドンを含む 20 塩基の標的外来遺伝子が挿入されており、NMU が作れない配列となっていた (Fig. 11)。

Nmu^{-/-} F2 ラットの BigDye シークエンシング

Nmu^{-/-} ラットの耳片よりゲノム DNA を抽出した。1つの耳片当たり1つの 1.5 mL チューブに入れた。耳片入りの 1.5 mL チューブに 50 μ l の ProK と Lysis B (500 mM KCL, 100 mM Tris pH8.0, 0.5% NP40, 0.5% Tween20) のミックス (1:20) を入れた。優しくタッピングして、耳片が液に完全に浸かっているのを確認した。その後、チューブをラックに立てた状態でアルミホイルを巻き、50°C にした乾燥機に一晩置いた。次日、チューブを 10 秒ボールテックスして、ヒートブロックで 100°C 10 分を行い、耳の形が残っていないことを確認後、10 秒ボールテックスしてから 15000 rpm 2 分遠心した。この後、テンプレートとしてラット *Nmu* 遺伝子の一部を PCR により増幅し、pGEM-T Easy プラスミドに組み込みクローニングを行った。

DNA 断片は forward primer (5'-CAGCTTTAACACCCGCACAA-3') と、reverse primer

(5'-GCCCTGTGAGGTAGGATGATT-3')を用いて、Tks Gflex DNA polymerase (TaKaRa Bio)によるPCR反応によって調製した。このPCR産物をDNA Ligation Kit (TaKaRa Bio)を用いて、pGEM-T EasyをT4 DNA Ligaseで切断した部位に挿入した。これをDH5 α にトランスフォーメーションし、Ampicillinを添加したLBプレートで培養し、得られたポジティブクローンより、Nucleo Spin^R Plasmid Easy Pure (TaKaRa Bio)を用いてプラスミド抽出を行い、シーケンシングにより塩基配列を決定した。

シーケンスにはBigDye^R Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)を用いた。0.2 ml PCR チューブにBig Dye^R Terminator v3.1 5 \times Sequencing Buffer 3.5 μ l, BigDye^R Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 1.0 μ l, 0.8 μ M Primer (M13 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') 4.0 μ l, 適量の Template 二本鎖DNA (150~300 ng 程度)を加え、DWで20 μ lにメスアップした。このPCRチューブを96 $^{\circ}$ Cで1分間処理し、その後、熱変性(96 $^{\circ}$ C, 10分間), アニール反応(50 $^{\circ}$ C, 5秒間), 伸長反応(60 $^{\circ}$ C, 4分間)を25サイクル行った。反応産物をエタノール沈殿により回収し、70%エタノール70 μ lを加えて4 $^{\circ}$ C, 15000 rpmで5分間遠心することで洗浄した。5分間乾燥した後、Hi-Di ホルムアミド20 μ lを加え、ゆっくりと10回ピペッティングして沈殿を溶解させた。これを96 $^{\circ}$ Cで2分間処理して二本鎖を解離させ、氷上で急冷した後にシーケンサーにかけた。

Nmu^{-/-} F2 ラットのジェノタイピング

3週齢前後の仔ラットの耳を一部切り、Direct PCR (Tail) (VIAGEN BIOTECH Inc. Los Angeles) 190 μ lとProK 10 μ l加えて混合し、55 $^{\circ}$ Cで一晩振盪させた。その後、85 $^{\circ}$ Cで45分間ProKを失活させ、1200 gで30秒間遠心し、非溶解物を沈殿させ、-30 $^{\circ}$ Cに保存した。0.2 ml PCRチューブにEmeraldAmp^R Max PCR Master Mix (TaKaRa Bio) 10 μ l, *Nmu*^{+/+} forward primerと*Nmu*^{+/+} reverse primer (0.2 μ M) または、*Nmu*^{-/-} forward primerと*Nmu*^{-/-} reverse primer (0.2 μ M) (Table. 1) 0.4 μ l, H₂O 8.6 μ l, Template DNA 1 μ lを合計で20 μ l加えてピペッティングした。初めに、98 $^{\circ}$ Cで1分処理し、熱変性98 $^{\circ}$ Cで10秒, アニール61 $^{\circ}$ Cで30秒, 伸長反応72 $^{\circ}$ Cで40秒を40サイクル行った。Agar Powder (Nacalai Tesque Inc., Tokyo, Japan)とエチジウムブロマイドを1 \times TAEに溶かし、2%のアガロースゲルを作製した。PCR産物10 μ lをウェルにアプライした。1 \times TAE中に100Vで30分間電気泳動し、その後LED (Blue/Green LED Transilluminator, Nippon Genetics)照射下で撮影した。

雌ラットの体重と摂食量の測定

ラット4週齢で離乳させ、1ケージ2匹ずつで飼育し、体重測定は、4週齢から24週齢まで行った。摂食量を測り始める8週齢から1匹ずつ飼育した。体重と摂食は1週間に一度、測りで測定した。これらは明期のZT2~ZT8の間に測定した。摂食量は一週間測定したデータから1日の平均の数値を出した。

発情周期の観察

毎日のZT1~ZT2に8~11週齢の雌ラットを用いて、膣スメアによる発情段階の判定を20日間行った。発情周期の長さ(日数)を示すグラフを作り、比較した。

卵巣切片の作成

14週齢の雌ラットを用いた。卵巣を摘出し、ブアン固定液(ピクリン酸:ホルマリン:酢酸=15:5:1)に浸し、室温で24時間振盪させた。その後、70%エタノールで洗いを3回行った。各1時間エタノール(90%, 95%, 100%, 100%, 100%)に浸すことで脱水した。キシレンに2時間2回置換した。60°Cで保温したキシレン:パラフィン(1:1)に一晩浸した。60°Cで保温したパラフィンに2時間2回置換し、最後にパラフィン(Paraplast^R for tissue embedding, Sigma-Aldrich)で包埋した。パラフィン包埋された組織標本を回転式マイクローム(Yamato Kohki Industrial Co., Ltd. Saitama, Japan)により7µmの連続切片を作り、最初から最後まで平均4セクションの組織切片8枚ずつ、シランコートスライドガラス上に伸展接着させた。

ヘマトキシリン・エオシン染色(HE染色)

組織切片を接着させたスライドをHemo-De(Meiji Seika Pharma Co., Ltd. Tokyo, Japan)に15分間2回浸し、エタノール(100%, 100%, 95%, 90%, 70%)で各5分間処理して脱パラフィン・水和した。DWに数秒浸してスライドに残存するエタノールを除き、ヘマトキシリン(ヨウ素酸ナトリウム:Hematoxylin:クエン酸三ナトリウム二水和物:硫酸カリウムアルミニウム12水:抱水クロラール=1:5:5:250:250 in 150 mL DW)に3分間浸した。発色は水道水に30分間さらすことで行った。さらに、0.1%酢酸を含む1%エオシン(Eosin 1.5g in 150 mL 70%エタノール, 数滴酢酸)で30秒間染色し、エタノール(70%, 80%, 90%, 100%, 100%)で各1分間処理を行った。キシレンに1分間2回浸して透徹し、Permount(Thermo Fisher Scientific)で封入した。

卵巣黄体数の比較

HE 染色した切片は光学顕微鏡 (BX53; Olympus) で観察し, cellSens Standard で 1 個体あたり 4 切片の写真を撮影した。4 枚の写真の総黄体数を数えた。

繁殖行動の検討

1) $Nmu^{+/+}$ 雌ラット 2 匹 (9~20 週齢) と $Nmu^{+/+}$ 雄ラット 1 匹を同じケージに入れ掛け合わせた。 $Nmu^{+/+}$ 雌ラット 15 匹交配を行った ($Nmu^{+/+}$ -1 群, 仔は $Nmu^{+/+}$)。2) $Nmu^{+/-}$ 雌ラット 2 匹 (9~20 週齢) と $Nmu^{+/+}$ 雄ラット 1 匹を同じケージに入れ掛け合わせた。 $Nmu^{+/-}$ 雌ラット 25 匹交配を行った ($Nmu^{+/-}$ 群, 仔は $Nmu^{+/-}$)。3) $Nmu^{+/-}$ 雌ラット 2 匹 (9~20 週齢) と $Nmu^{+/-}$ 雄ラット 1 匹を同じケージに入れ掛け合わせた。 $Nmu^{+/+}$ 雌ラット 8 匹交配を行った ($Nmu^{+/+}$ -2 群, 仔は $Nmu^{+/-}$) (Fig. 14)。

掛け合わせて 2 週間後, 妊娠兆候の見られた雌ラットは 1 匹ずつ飼育し, 出産が近づくと, 毎日 ZT0~ZT20 まで 2 時間おきに分娩の有無を確認した。その後, 掛け合わせてから出産までにかかる日を計算し, グラフを作成した。今回の繁殖実験では, すべて未経産雌ラットを用いた。

出産に伴う母性行動の観察

ストレスを与えないように, ケージに触らないように注意し, 出産初めから最後の仔を出産して, 仔を巣にまとめる行動の完了まで観察した。主に母ラットの胎盤食, 仔を舐める行動, 仔を巣にはこぶ行動及び仔をまとめる行動の評価 (すべての生存している仔たちが巣の中で互いに接している状態か) を観察した。そして, 1 匹の仔の平均出産時間, 出産時間帯, 出産完了から仔をまとめるまでの時間を記録した。前述の観察が終了したら, 全ての仔ラットをケージから取り出し, 産仔数, 仔ラット全身の異常の有無 (食殺, 噛傷, 死亡, 残存した胎盤, 胎仔組織に付着した巣材) を確認した。

巣作りの評価

ケージの外から巣を観察し, 巣の評価は Hess SE たちの論文を参考にして(62), 以下の 5 段階の点数をつけた。

- 0 点: 巣が作られていない, あるいは巣材が無秩序に散乱し, 巣がどこか特定できない
- 1 点: 平坦でまとまりは悪いが, 巣がどこかはわかる
- 2 点: 底の浅いスープ皿状の巣
- 3 点: 連続した土手状構造をもち, 内側はくぼ地になった巣 (不完全ドーム・半球状)
- 4 点: 完全ドームの巣, 紙片を噛み砕いてふわふわにし, これを用いて巣の周囲・上下

とも完全に囲，外からは仔は全く見えない

以上の点数を基準として， $Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ 母ラットの巣作りの評価を行い，平均値を示した。

仔ラットの生存率及び成長率の測定

仔ラットが出生する日を0日齢として，21日齢まで飼育した。0日齢から12日齢までの毎日，仔ラットの生存個体数を数えた。そして2日に1度体重を14日齢まで測定した。母ラット1匹あたりの仔ラットの生存率を12日齢まで示した。また，母ラット1匹あたりの仔ラット1匹の平均体重を示した。

統計的解析

最終のデータは3~25匹動物のデータを平均値±SEMとして示されている。2つのグループ間の比較はStudent's t検定によって行った。3つのグループまたは条件間の比較はone-way ANOVA または two-way ANOVA を行い，その後に post-hoc Dunnett 検定を実施した。すべての統計分析は GraphPad Prism 8 ソフトウェア (GraphPad Software) を使用して実行した。P < 0.05 の時統計的に有意とした。

III.3 結果

CRISPER-Cas9 システムと rGONAD 法による $Nmu^{-/-}$ ラットの作出

F0 の Nmu 遺伝子構造をゲノム PCR とシーケンシングで解析したところ、予想された位置にストップコドンが挿入され、プロ NMU が翻訳されない Nmu 遺伝子改変ラットであることがわかった。そこでこの F0 を野生型ラットと掛合わせ、さらに F1 ヘテロ個体同士を掛合わせて、F2 の $Nmu^{-/-}$ ラットを得た。この個体の Nmu 遺伝子構造をゲノム PCR とシーケンシングで解析した結果、NMU のシグナル配列にストップコドンを含む 20 塩基の標的外来遺伝子が挿入されていた (Fig. 11A)。

$Nmu^{-/-}$ ラットのジェノタイピングによる Nmu 遺伝子変異の確認

3週齢前後のラットの耳から抽出した DNA を鋳型とし、 $Nmu^{+/+}$ 遺伝子特異的プライマー (wt primer set) と $Nmu^{-/-}$ 遺伝子特異的プライマー (ko primer set) を用いたゲノム PCR によりジェノタイピングを行った (Fig. 11B)。 $Nmu^{+/+}$ では wt primer set で単一のバンドが見られ、ko primer set ではバンドは見られなかった。一方、 $Nmu^{-/-}$ では wt primer set でのバンドは見られず、ko primer set では単一バンドが見られた。これらを、シーケンス解析すると、 $Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ の判別が正しいことが確認できた。このことより、 $Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ の遺伝型をゲノム PCR により識別することができた。

$Nmu^{-/-}$ 雌ラットの外観の比較及び体重と摂食量の測定

$Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ の外観、体重及び摂食量を比較した。 $Nmu^{-/-}$ 雌ラットの外観には顕著な異常がなかった (Fig. 12A)。

体重は離乳時の4週齢から24週齢までの各群の平均値を比較したが、どの週齢においても有意な差は見られなかった (Fig. 12B)。

摂食量は9週齢から24週齢までの各群の平均値を比較したが、その結果、どの週齢においても有意差は見られなかった (Fig. 12C)。

こちらの結果から、ラットにおいては内因性の NMU は摂食抑制作用やエネルギーホメオスタシスに関与していないことが示唆された。

$Nmu^{-/-}$ 雌ラットの発情周期及び卵巣発達の検討

8 週から 12 週齢の雌ラットの発情周期を 20 日間に連続で観察した (Fig. 13A)。その結果、 $Nmu^{+/+}$ 雌ラットの発情周期は P 期 1 日、E 期 1 日、D 期 3 日の 5 日間の規則的なサイクルが観察された。 $Nmu^{-/-}$ 雌ラットも同様に規律的な 5 日の発情周期が観察された。また、両方とも不規則的な発情周期 ($Nmu^{+/+}$ 67%, $Nmu^{-/-}$ 67%) も観察された。な

お、発情周期の長さ（日数）を比較したところ、 $Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ に違いは見られなかった（Fig. 13B）。

また、未経産の 14 週齢の雌ラットの卵巣形態及び黄体数を検討した（Fig. 13C~D）。 $Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ 雌ラットにおける両方とも卵胞及び黄体が見られた（Fig. 13C, 矢印は黄体, 矢頭は卵胞）。そして、黄体数を比較したところ、違いは見られなかった（Fig. 13D）。

これらの結果から、 $Nmu^{-/-}$ 雌ラットの卵巣の発達異常がないことが示唆された。

$Nmu^{-/-}$ 雌ラットの繁殖及び出産に伴う母性行動の検討

$Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ 雌ラットの繁殖及び出産に伴う母性行動を検討する為に、Fig. 14 の繁殖フローチャートのように雄ラットと交配した。

1) $Nmu^{-/-}$ 雌ラットの妊娠異常の観察： $Nmu^{+/+}$ -1, $Nmu^{-/-}$, $Nmu^{+/+}$ -2 雌ラットは雄ラットと掛け合わせてから出産まで日数の違いが認められなかった（Fig. 15A）。この結果から $Nmu^{-/-}$ 雌ラットの妊娠機能に問題はないことが考えられる。さらに、 $Nmu^{-/-}$ 雄ラットも性機能の問題がないことが示唆された。

2) 出産の異常の有無の観察：仔ラットの遺伝子型影響を遠慮して、 $Nmu^{+/+}$ 雌ラットは $Nmu^{-/-}$ 雄ラットと交配し（ $Nmu^{+/+}$ -2 群, 仔ラット $Nmu^{+/-}$ ）, $Nmu^{-/-}$ 雌ラットは $Nmu^{-/-}$ 雄ラットと交配（仔ラット $Nmu^{+/-}$ ）して検討した。まず、明期の 12 時間（ZT0~ZT12）, 2 時間おきにラットの出産時間を確認した（Fig. 15B）。結果は、 $Nmu^{+/+}$ -2 母ラットは 5 匹の中に 3 匹は ZT8-10 の時間帯で出産開始し、2 匹は ZT10~12 の時間帯で出産開始した。5 匹の $Nmu^{+/+}$ -2 母ラットは ZT8~ZT12 の時間帯に出産開始することが分かった。 $Nmu^{-/-}$ 母ラットは 6 匹の中に 2 匹は ZT4~ZT6 の時間帯に出産開始、1 匹は ZT6~8 の時間帯に出産開始、2 匹は ZT10~12 の時間帯に出産開始、また 1 匹は ZT12~ZT0 の暗期の時間帯に出産開始した。6 匹の $Nmu^{-/-}$ 母ラットは ZT4~ZT0 のばらつきの出産時間帯に出産開始することが分かった。この結果から、 $Nmu^{-/-}$ 母ラットの出産リズムが乱れる可能性があることが示唆された。また、1 匹の仔ラットにおいて平均の出産にかかる時間の違いを検討した（Fig. 15C）が、 $Nmu^{+/+}$ -2 母ラットと $Nmu^{-/-}$ 母ラットに差は見られず、 $Nmu^{-/-}$ 母ラットが正常に分娩できることが確認された。また、産仔数にも $Nmu^{-/-}$ 母ラットは異常がなかった（Fig. 15D）から、 $Nmu^{-/-}$ 雌ラットは排卵の異常がないことが示唆された。

3) 出産に伴う母性行動の観察：出産が完了した後、仔ラットをまとめるまでにかかる

時間を検討した (Fig. 16A)。結果は、 $Nmu^{+/+}$ -2 母ラットの仔をまとめる時間は 12 分ぐらいにあった (4 匹の平均値)。 $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔をまとめる時間は 21 分ぐらいにあった (4 匹の平均値)。 $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔をまとめる時間が $Nmu^{+/+}$ -2 母ラットの仔をまとめる時間により 1.75 倍ぐらい遅い傾向にあった。また、巣の形成の段階の点数で評価したが、 $Nmu^{+/+}$ -2 と $Nmu^{-/-}$ に差は見られなかったため、 $Nmu^{-/-}$ 母ラットの巣作りの異常が認められなかった (Fig. 16B)。以上の結果から、 $Nmu^{-/-}$ 母ラットは仔をまとめる時間がかかったが、仔ラットの周りに巣材を集めることに異常が認められなかった。

4) 仔ラットの観察: 前述の観察が終了した後、全ての仔ラットをケージから取り出し、仔ラットの異常、生死、羊膜や羊水や臍帯が仔ラットの体表面に残っていないかどうか、噛まれた傷がないかなどを記録した (Fig. 16C)。結果は、まず、 $Nmu^{+/+}$ -2 母ラットと $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔ラットの外部形態の異常が認められなかった。また、仔ラットの生死と噛傷が認められなかったが、 $Nmu^{+/+}$ -2 母ラットと $Nmu^{-/-}$ 母ラットは両方とも胎盤、胎仔に付着した巣材が見られ、両方とも胎盤完食と全身綺麗な仔ラットも認められた。この結果から、 $Nmu^{-/-}$ 母ラットは胎盤食や身体の掃除や噛傷の異常は認められなかった。

$Nmu^{-/-}$ 母ラットの養育行動の観察

1) 仔ラットの生存率の観察: 仔ラットが 21 日齢になるまで母ラットに飼育させ、12 日齢まで生存及び死亡した仔ラットの数を数え、生存率を示した (Fig. 17A)。仔ラットの遺伝子型に関係なく、 $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔ラットは生存率が有意に低かった。また、生存が一番低い 2 日齢の仔ラットの生存率は 1 匹ずつ母ラットの仔ラットの生存率として詳細なグラフを示した (Fig. 17B)。2 日齢の仔ラットの生存率の結果は、 $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔ラット ($Nmu^{+/+}$) の生存率は 0% になったのが多かった。 $Nmu^{+/+}$ -1 と $Nmu^{+/+}$ -2 の母ラットの仔ラットの生存率は 0% になったのがいなかった。そして、2 日齢の $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔ラット ($Nmu^{+/+}$) の生存率は $Nmu^{+/+}$ -1 母ラット (仔は $Nmu^{+/+}$) により有意な 34% 低く、 $Nmu^{+/+}$ -2 母ラット (仔は $Nmu^{+/+}$) により 43% 低くなることが分かった。以上の結果から、 $Nmu^{-/-}$ 母ラットにおける死亡した仔が多かったことが示唆された。特に 2 日齢に仔ラットの生存率が一番低かった、その後安定した。 $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔ラットの生存率は母親に依存して低下することが示唆された。

2) 生存している仔ラットの成長(体重)の観察結果として違いは認められなかった (Fig. 17C) から、仔ラットの成長の異常が認められなかった。

III.4 考察

重井医学研究所との共同研究により CRISPER-Cas9 システムと rGONAD 法を用いて、*Nmu*^{-/-} ラットを作出することに成功した。このラットでは、*Nmu* のシグナルペプチド領域に翻訳終止コドンを導入しており、成熟型 NMU や NURP (NMU 前駆体関連ペプチド) (63) の産生がされていないと考えられる。

この *Nmu*^{-/-} 雌ラットを用いて、体重と摂食量を *Nmu*^{+/+} と比較したところ、両者に有意な違いが見られなかった。この結果は、これまでに報告されている NMU の摂食抑制作用とは異なり、驚くべきものだった。*Nmu*^{-/-} マウスの報告では、4 週齢から過食で肥満を呈し、32 週齢では *Nmu*^{+/+} に対して約 35% の体重増加が報告されている(54)。また、*Nmu*^{-/-} マウスでは、食欲抑制ホルモンとして知られる ARC における *Pomc* と PVN の *Crh* の mRNA 発現は減少したことが報告されている(54)。これらの報告より、マウスの NMU が脳内の摂食抑制制御機構に関わり体重や摂食に深く関与することが示唆されている。ラットにおいても NMU の脳室内投与により摂食が減少するという報告があり(57-59)、この時、PVN における *Crh* mRNA 発現が増加し、NMU と共局在を示すが、一方で、ARC における *Pomc* mRNA 発現には変化が見られないので、NMU と CRH が摂食抑制作用に深くかかわっていると考えられる(54)。しかし、本研究において *Nmu*^{-/-} ラットでは *Nmu*^{-/-} マウスとは異なり、摂食増加及び肥満は観察されなかった。この原因の1つとして、ラットとマウスの *Nmu* 発現部位の違いが考えられる。ラットの脳内では、*Nmu* 発現は PT に最も高く発現しており、視床下部の背内側核 (DMH)、ARC では低発現を示す。一方、マウスでは、視床下部の DMH、ARC、腹内側核 (VMH) で高発現を示すが(64)、PT には NMU の発現が認められない。このことから、ラットとマウスでは NMU が脳内の摂食制御機構に違いの可能性を示唆する。2 つ目の原因として、これまでに報告されているラットにおける NMU の脳室内投与実験での摂食量の増加は、薬理的な効果であり、内因性の NMU は摂食制御に関わっていないのかもしれない。3 つ目は、ラットの摂食制御には NMU の日内リズムが重要であり、*Nmu*^{-/-} ラットでは NMU の日内リズムが消滅してしまったことで、摂食への影響がなかったのかもしれない。この仮説は、ラットへの NMU の慢性投与が、食物摂食に影響を及ぼさないという報告と符合する(65)。

また、*Nmu*^{-/-} 雌ラットを用いて発情周期及び卵巣の発達を検討した結果は、*Nmu*^{-/-} 雌ラットの発情周期の異常が見られなくて、卵巣の卵胞及び黄体が見られ、そして、黄体数の異常も認められなかった。現在まで、卵巣における NMU の制御機構及び NMU は卵巣発達に関連する雌性ホルモンの研究がいくつかがある。例えば、ラット卵巣の卵胞

膜と間質細胞及び顆粒膜細胞における *Nmu* の発現が検出され、卵胞膜と間質細胞に発現する NMU2R を介してプロゲステロンを促進することが報告されている(38)。卵巢の卵胞成長と成熟は種々の因子により調節されている。FSH と LH は 2 次卵胞の時期に現れて、卵胞の成長及び黄体の発達維持には必須である(66)。さらに、以前に報告されたように、NMU の脳室内投与は性腺及び光周期の影響によって GnRH 軸の異なる機能を実行し、特に LH 分泌の抑制を明確であった(22)。一方、*Nmu*^{-/-} マウスは可育性があるが、膻開口は早く発生し、LH/FSH 比は高くなることも報告されている(23)ことから、NMU は LH と FSH を介して発情周期及び卵巢の発達に関与することが示唆されている。本研究では、*Nmu*^{-/-} 雌ラットの発情周期及び卵胞の発達には異常は見られなかったもので、内因性 NMU は性成熟には関与しないと考えられる。

さらに、*Nmu*^{-/-} 雌ラットの繁殖行動、出産前後の母性行動及び出産後の養育行動を検討した結果により、*Nmu*^{-/-} 雌ラットの出産時間帯及び仔をまとめる行動に違いが見られた。*Nmu*^{-/-} 雌ラットの出産時間帯は *Nmu*^{+/+} 雌ラットに比べばらつきが見られと仔をまとめる行動の遅い傾向が見られた。光周期及び摂食リズムがラットの出産時間に影響を与えることはよく知られている(67-69)。げっ歯類では、妊娠後期及び出産初期に母体の視床下部 SCN の概日時計のタイミングを明暗周期に合わせ、胎児が出生前及び出生後の両方の期間における母性行動の必要な要素であることを示している(70-72)。さらに、マウスにおいて概日リズムの破壊 (Circadian Disruption) により母マウスは出産初期段階の巣作り行動の欠陥及び仔をまとめる行動が遅延することが報告されている(73,74)。さらに、ウサギの授乳行動は概日リズムの破壊及び時計遺伝子のリズムの乱れにより問題が引き起こされる(75)。これらの報告より、出産時間と母性行動が概日リズムに深く関与することが示唆されている。ラットにおいて *Nmu* mRNA 発現に概日リズムがあることから、NMU はリズムをもった生理機能の制御に関与していることが示唆されている。*Nmu*^{-/-} 雌ラットで出産時間帯のばらつきと仔をまとめる行動の遅延が観察されたことから、内因性 NMU はラットにおいてこれら生理機能の概日リズム形成に関与するのかもしれない。

同じく、*Nmu*^{-/-} 母ラットの仔ラットの生存率を検討した結果は、母親に依存して顕著な低下を示した。特に、出産初期の 1 日齢から 2 日齢にかけて大幅に仔ラットの死亡率が上昇した。この原因の 1 つとして母性行動の問題が考えられる。哺乳動物は仔の生存のために、分娩後に経験的なものやホルモンや出産に伴う母性行動など様々な要素がある(76)。出産直後の仔ラットは体温調節機能が未発達であり、母親から身体を清潔に保たれたり保温されたりして、さまざまな親からの養育行動を必要とする。素早くの仔をまとめる行動が大事であることを示唆される。*Nmu*^{-/-} 母ラットは出産時間と仔をまとめ

の概日リズムが乱れ、不規則的な活動であることが考えられるため、仔ラットをまとめる時間が遅く、仔ラットは生存に大事な時期である出生1日齢から2日齢に素早く保温されなかったため、仔ラットの死亡率が高いことが考えられた。2つ目は、乳汁分泌の問題が考えられる。分娩直前から乳汁分泌の開始は始まる。乳汁分泌の開始・維持に最も大切なホルモンはPRLであることがよく知られており、泌乳の開始にPRL受容体(*Prlr*)遺伝子が高発現し、受容体数が増加する(77,78)。また、*Prlr*^{-/-}マウスの乳腺は*Prlr*^{+/+}マウスの乳腺により発達レベルは低下し、乳管の分岐が大幅に減少した(78,79)ことから、PRLが乳腺の発達に必要であることを示している。さらに、ラットのNMU脳室内投与により血漿のPRL濃度が有意に減少することが報告されている(39)。ラットNURP脳室内投与により血漿のPRL濃度が有意に増加することも報告されている(63)。これらの報告より、NMUはPRLを介して乳腺の発達に関与することが考えられる。本研究で用いた*Nmu*^{-/-}ラットではPRLレベルに影響が見られる可能性が高い。*Nmu*^{-/-}雌ラットの乳腺の発達に異常が生じ、それによって初期に母乳の出が遅い、出にくい、量が足りないといった可能性が考えるかもしれない。それ故、仔ラットは素早く母乳を取れずに、1日齢目と2日齢目に死亡率が高かったかもしれない。この可能性は今後の研究で乳腺の発達や、血中PRL濃度への影響を検討することで明らかにしたい。3つ目はストレスとの関連が考えられる。NMUがストレス応答に関与することはよく報告されており、ラットのNMU脳室内投与は、ACTHとコルチコステロンを増加する(39,80,81)。そのため本研究で使用した*Nmu*^{-/-}母ラットは、出産直後にストレスと不安を感じにくい可能性が考えられる。仔ラットの身を守る緊張感が低くなり、母性行動が遅延し、仔ラットの生存率が低くなったのかもしれない。この可能性については、今後の研究でPVNにおける*Crh*の発現及び血中コルチコステロンの濃度を検討し明らかにしていきたい。

以上の結果より、本研究では*Nmu*^{-/-}ラットを世界で初めて作成した。また、ラットにおいては内因性のNMUは摂食抑制作用やエネルギーホメオスタシスに関与していないことが示唆された。さらに、*Nmu*^{-/-}母ラットでは出産の時間帯が乱れ、また仔ラットの生存率が低くなるのが初めて明らかとなり、NMUは概日リズムと養育行動に関与することが示唆された。今後は雌ラットを用いてNMUの出産や養育行動における機能を解明することで、将来的に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。

V. 総括

本研究では、PT の *Nmu* mRNA 発現の制御メカニズム及び内因性の NMU の働きの解明を目的に一連の研究を行った。PT は季節的変換と概日リズムを持った生理機能へ重要な役割を果たすと考えられている(3-5)。PT における時計遺伝子の発現には日内リズムがあり、メラトニンによって制御されていることが示唆された(6,7)。近年、NMU が PT で高発現していることが見出された(13)。しかし、PT が非常に微小で薄い細胞層として存在する為に、採取や隣接する部位に影響を与えずに摘除することが困難なことから研究対象として扱いにくく、今までその生理的役割には不明な点が多く残されている。特に生殖系の発達における NMU の機能は不明な点が多く、卵巣機能及び雌性ホルモンの制御における NMU の直接的な役割はほとんど研究されていない。

今回の検討で、成獣雌ラット PT における *Nmu* mRNA 発現の解析を明らかになった。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。また、その発現レベルは発情周期に伴って変化し、 E_2 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 $ER\beta$ が検出されたことから、 E_2 は $ER\beta$ を介して *Nmu* 発現を抑制することが示唆された。このことは、PT の NMU は日内リズムの形成において重要な遺伝子と考えられ、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。

一方で、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。今回の PT の *Nmu* mRNA 発現を促進する因子の制御メカニズムの検討では、脳スライス培養系においてアデノシンは *Adora2b* を介して *Nmu* mRNA 発現を促進することが示唆された。さらに、*in vitro* を行ったところ、アデノシンは *Adora2b* 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。

さらに、ラットにおける内因性の NMU の働きを知る為に、*Nmu*^{-/-} ラットの作出を試みて、*Nmu*^{-/-} 雌ラットを用いて NMU の生理機能を検討では、*Nmu*^{-/-} ラットは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、*Nmu*^{-/-} 母ラットの仔は生存率が有意に低下していた。*Nmu*^{-/-} 母ラットでの出産の時間帯のばらつきや、仔ラットの生存率の低下が *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今後の課題として残された。

以上のように、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こと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。

VI. 謝辭

本論文作成にあたり、始終御高配と懇篤なる御指導を賜りました岡山大学大学院 自然科学研究科 竹内 栄教授、相澤 清香助教、高橋 純夫栄誉教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究の機会を与えていただきました川崎医科大学 自然科学教室 小島 史也助教、重井医学研究所 分子遺伝部門 松山 誠室長に厚く御礼申し上げます。さらに本論文作成に関してお世話になりました岡山大学 自然科学研究科 分子内分泌研究室の諸氏に深厚なる謝意を表す。

VII. 引用

1. Williams, L. M., and Morgan, P. J. (1988) Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *The Journal of endocrinology* **119**, R1-3
2. Carlson, L. L., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. (1989) Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology* **125**, 2670-2676
3. Bartness, T. J., Powers, J. B., Hastings, M. H., Bittman, E. L., and Goldman, B. D. (1993) The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *Journal of pineal research* **15**, 161-190
4. Lincoln, G. A., and Clarke, I. J. (1994) Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *Journal of neuroendocrinology* **6**, 251-260
5. Morgan, P. J. (2000) The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? *Journal of neuroendocrinology* **12**, 287-295
6. Ross, A. W., and Morgan, P. J. (2002) The pars tuberalis as a target of the central clock. *Cell and tissue research* **309**, 163-171
7. Wagner, G. C., Johnston, J. D., Tournier, B. B., Ebling, F. J., and Hazlerigg, D. G. (2007) Melatonin induces gene-specific effects on rhythmic mRNA expression in the pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *The European journal of neuroscience* **25**, 485-490
8. Aizawa, S., Hoshino, S., Sakata, I., Adachi, A., Yashima, S., Hattori, A., and Sakai, T. (2007) Diurnal change of thyroid-stimulating hormone mRNA expression in the rat pars tuberalis. *Journal of neuroendocrinology* **19**, 839-846
9. Masumoto, K. H., Ukai-Tadenuma, M., Kasukawa, T., Nagano, M., Uno, K. D., Tsujino, K., Horikawa, K., Shigeyoshi, Y., and Ueda, H. R. (2010) Acute induction of *Eya3* by late-night light stimulation triggers TSHbeta expression in photoperiodism. *Current biology : CB* **20**, 2199-2206
10. Dardente, H., Wyse, C. A., Birnie, M. J., Dupre, S. M., Loudon, A. S., Lincoln, G. A., and Hazlerigg, D. G. (2010) A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Current biology : CB* **20**, 2193-2198
11. Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P. J., Iwasawa, A.,

- Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., Ebihara, S., Ueda, H. R., and Yoshimura, T. (2008) Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* **452**, 317-322
12. Ono, H., Hoshino, Y., Yasuo, S., Watanabe, M., Nakane, Y., Murai, A., Ebihara, S., Korf, H. W., and Yoshimura, T. (2008) Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18238-18242
 13. Aizawa, S., Sakata, I., Nagasaka, M., Higaki, Y., and Sakai, T. (2013) Negative regulation of neuromedin U mRNA expression in the rat pars tuberalis by melatonin. *PloS one* **8**, e67118
 14. Conlon, J. M., Domin, J., Thim, L., DiMarzo, V., Morris, H. R., and Bloom, S. R. (1988) Primary structure of neuromedin U from the rat. *Journal of neurochemistry* **51**, 988-991
 15. Minamino, N., Kangawa, K., Honzawa, M., and Matsuo, H. (1988) Isolation and structural determination of rat neuromedin U. *Biochemical and biophysical research communications* **156**, 355-360
 16. Domin, J., Yiangou, Y. G., Spokes, R. A., Aitken, A., Parmar, K. B., Chrysanthou, B. J., and Bloom, S. R. (1989) The distribution, purification, and pharmacological action of an amphibian neuromedin U. *The Journal of biological chemistry* **264**, 20881-20885
 17. O'Harte, F., Bockman, C. S., Zeng, W., Abel, P. W., Harvey, S., and Conlon, J. M. (1991) Primary structure and pharmacological activity of a nonapeptide related to neuromedin U isolated from chicken intestine. *Peptides* **12**, 809-812
 18. Austin, C., Lo, G., Nandha, K. A., Meleagros, L., and Bloom, S. R. (1995) Cloning and characterization of the cDNA encoding the human neuromedin U (NmU) precursor: NmU expression in the human gastrointestinal tract. *Journal of molecular endocrinology* **14**, 157-169
 19. Domin, J., Ghatei, M. A., Chohan, P., and Bloom, S. R. (1987) Neuromedin U--a study of its distribution in the rat. *Peptides* **8**, 779-784
 20. Mitchell, J. D., Maguire, J. J., Kuc, R. E., and Davenport, A. P. (2009) Expression and vasoconstrictor function of anorexigenic peptides neuromedin U-25 and S in the human cardiovascular system. *Cardiovascular research* **81**, 353-361
 21. Martinez, V. G., and O'Driscoll, L. (2015) Neuromedin U: a multifunctional

- neuropeptide with pleiotropic roles. *Clinical chemistry* **61**, 471-482
22. Vigo, E., Roa, J., Pineda, R., Castellano, J. M., Navarro, V. M., Aguilar, E., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2007) Novel role of the anorexigenic peptide neuromedin U in the control of LH secretion and its regulation by gonadal hormones and photoperiod. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**, E1265-1273
 23. Fukue, Y., Sato, T., Teranishi, H., Hanada, R., Takahashi, T., Nakashima, Y., and Kojima, M. (2006) Regulation of gonadotropin secretion and puberty onset by neuromedin U. *FEBS letters* **580**, 3485-3488
 24. Quan, H., Funabashi, T., Furuta, M., and Kimura, F. (2003) Effects of neuromedin U on the pulsatile LH secretion in ovariectomized rats in association with feeding conditions. *Biochemical and biophysical research communications* **311**, 721-727
 25. Quan, H., Funabashi, T., and Kimura, F. (2004) Intracerebroventricular injection of corticotropin-releasing hormone receptor antagonist blocks the suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion induced by neuromedin U in ovariectomized rats after 48 hours of fasting. *Neuroscience letters* **369**, 33-38
 26. Stehle, J. H., Rivkees, S. A., Lee, J. J., Weaver, D. R., Deeds, J. D., and Reppert, S. M. (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Molecular endocrinology* **6**, 384-393
 27. von Gall, C., Garabette, M. L., Kell, C. A., Frenzel, S., Dehghani, F., Schumm-Draeger, P. M., Weaver, D. R., Korf, H. W., Hastings, M. H., and Stehle, J. H. (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nature neuroscience* **5**, 234-238
 28. Chabannes, B., Sarda, N., Cronenberger, L., and Pacheco, H. (1984) Diurnal variations of S-adenosyl-L-methionine and adenosine content in the rat pineal gland. *Life sciences* **35**, 589-596
 29. Chagoya de Sanchez, V. (1995) Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms? *Canadian journal of physiology and pharmacology* **73**, 339-355
 30. Chagoya de Sanchez, V., Hernandez Munoz, R., Suarez, J., Vidrio, S., Yanez, L., and Diaz Munoz, M. (1993) Day-night variations of adenosine and its metabolizing enzymes in the brain cortex of the rat--possible physiological significance for the energetic homeostasis and the sleep-wake cycle. *Brain research* **612**, 115-121

31. Zimmermann, H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **362**, 299-309
32. White, T. D. (1977) Direct detection of depolarisation-induced release of ATP from a synaptosomal preparation. *Nature* **267**, 67-68
33. Fredholm, B. B., Chen, J. F., Cunha, R. A., Svenningsson, P., and Vaugeois, J. M. (2005) Adenosine and brain function. *International review of neurobiology* **63**, 191-270
34. Cunha, R. A. (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry international* **38**, 107-125
35. Junger, W. G. (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature reviews. Immunology* **11**, 201-212
36. Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., Thakkar, M., Bjorkum, A. A., Greene, R. W., and McCarley, R. W. (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* **276**, 1265-1268
37. Strecker, R. E., Morairty, S., Thakkar, M. M., Porkka-Heiskanen, T., Basheer, R., Dauphin, L. J., Rainnie, D. G., Portas, C. M., Greene, R. W., and McCarley, R. W. (2000) Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behavioural brain research* **115**, 183-204
38. Lin, T. Y., Wu, F. J., Lee, W. Y., Hsiao, C. L., and Luo, C. W. (2013) Ovarian regulation of neuromedin U and its local actions in the ovary, mediated through neuromedin U receptor 2. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **304**, E800-809
39. Nakahara, K., Maruyama, K., Ensho, T., Mori, K., Miyazato, M., Kangawa, K., Uemura, R., Sakoda, H., Nakazato, M., and Murakami, N. (2020) Neuromedin U suppresses prolactin secretion via dopamine neurons of the arcuate nucleus. *Biochemical and biophysical research communications* **521**, 521-526
40. Shimizu, F., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Minakuchi, M., Kuwahara, A., Yasui, T., and Irahara, M. (2008) Estradiol suppresses NMU mRNA expression during sexual maturation in the female rat pituitary. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **26**, 381-384

41. Nandha, K. A., Benito-Orfila, M. A., Jamal, H., Akinsanya, K. O., Bloom, S. R., and Smith, D. M. (1999) Effect of steroids and the estrous cycle on uterine neuromedin U receptor expression. *Peptides* **20**, 1203-1209
42. McNulty, S., Ross, A. W., Barrett, P., Hastings, M. H., and Morgan, P. J. (1994) Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *Journal of neuroendocrinology* **6**, 523-532
43. Rivkees, S. A., and Reppert, S. M. (1992) RFL9 encodes an A2b-adenosine receptor. *Molecular endocrinology* **6**, 1598-1604
44. Messenger, S., Garabette, M. L., Hastings, M. H., and Hazlerigg, D. G. (2001) Tissue-specific abolition of Per1 expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport* **12**, 579-582
45. von Gall, C., Weaver, D. R., Moek, J., Jilg, A., Stehle, J. H., and Korf, H. W. (2005) Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1040**, 508-511
46. Dardente, H., Menet, J. S., Poirel, V. J., Streicher, D., Gauer, F., Vivien-Roels, B., Klosen, P., Pevet, P., and Masson-Pevet, M. (2003) Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain research. Molecular brain research* **114**, 101-106
47. Lo, G., Legon, S., Austin, C., Wallis, S., Wang, Z., and Bloom, S. R. (1992) Characterization of complementary DNA encoding the rat neuromedin U precursor. *Molecular endocrinology* **6**, 1538-1544
48. Howard, A. D., Wang, R., Pong, S. S., Mellin, T. N., Strack, A., Guan, X. M., Zeng, Z., Williams, D. L., Jr., Feighner, S. D., Nunes, C. N., Murphy, B., Stair, J. N., Yu, H., Jiang, Q., Clements, M. K., Tan, C. P., McKee, K. K., Hreniuk, D. L., McDonald, T. P., Lynch, K. R., Evans, J. F., Austin, C. P., Caskey, C. T., Van der Ploeg, L. H., and Liu, Q. (2000) Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature* **406**, 70-74
49. Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Habata, Y., Hinuma, S., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2000) Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3. *The Journal of biological chemistry* **275**, 21068-21074
50. Szekeres, P. G., Muir, A. I., Spinage, L. D., Miller, J. E., Butler, S. I., Smith, A.,

- Rennie, G. I., Murdock, P. R., Fitzgerald, L. R., Wu, H., McMillan, L. J., Guerrero, S., Vawter, L., Elshourbagy, N. A., Mooney, J. L., Bergsma, D. J., Wilson, S., and Chambers, J. K. (2000) Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3. *The Journal of biological chemistry* **275**, 20247-20250
51. Raddatz, R., Wilson, A. E., Artymyshyn, R., Bonini, J. A., Borowsky, B., Boteju, L. W., Zhou, S., Kouranova, E. V., Nagorny, R., Guevarra, M. S., Dai, M., Lerman, G. S., Vaysse, P. J., Branchek, T. A., Gerald, C., Forray, C., and Adham, N. (2000) Identification and characterization of two neuromedin U receptors differentially expressed in peripheral tissues and the central nervous system. *The Journal of biological chemistry* **275**, 32452-32459
52. Shan, L., Qiao, X., Crona, J. H., Behan, J., Wang, S., Laz, T., Bayne, M., Gustafson, E. L., Monsma, F. J., Jr., and Hedrick, J. A. (2000) Identification of a novel neuromedin U receptor subtype expressed in the central nervous system. *The Journal of biological chemistry* **275**, 39482-39486
53. Brighton, P. J., Szekeres, P. G., Wise, A., and Willars, G. B. (2004) Signaling and ligand binding by recombinant neuromedin U receptors: evidence for dual coupling to Galphaq/11 and Galphai and an irreversible ligand-receptor interaction. *Molecular pharmacology* **66**, 1544-1556
54. Hanada, R., Teranishi, H., Pearson, J. T., Kurokawa, M., Hosoda, H., Fukushima, N., Fukue, Y., Serino, R., Fujihara, H., Ueta, Y., Ikawa, M., Okabe, M., Murakami, N., Shirai, M., Yoshimatsu, H., Kangawa, K., and Kojima, M. (2004) Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nature medicine* **10**, 1067-1073
55. Kowalski, T. J., Spar, B. D., Markowitz, L., Maguire, M., Golovko, A., Yang, S., Farley, C., Cook, J. A., Tetzloff, G., Hoos, L., Del Vecchio, R. A., Kazdoba, T. M., McCool, M. F., Hwa, J. J., Hyde, L. A., Davis, H., Vassileva, G., Hedrick, J. A., and Gustafson, E. L. (2005) Transgenic overexpression of neuromedin U promotes leanness and hypophagia in mice. *The Journal of endocrinology* **185**, 151-164
56. Chiu, C. N., Rihel, J., Lee, D. A., Singh, C., Mosser, E. A., Chen, S., Sapin, V., Pham, U., Engle, J., Niles, B. J., Montz, C. J., Chakravarthy, S., Zimmerman, S., Salehi-Ashtiani, K., Vidal, M., Schier, A. F., and Prober, D. A. (2016) A Zebrafish Genetic Screen Identifies Neuromedin U as a Regulator of Sleep/Wake States.

Neuron **89**, 842-856

57. Nakazato, M., Hanada, R., Murakami, N., Date, Y., Mondal, M. S., Kojima, M., Yoshimatsu, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2000) Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications* **277**, 191-194
58. Novak, C. M., Zhang, M., and Levine, J. A. (2006) Neuromedin U in the paraventricular and arcuate hypothalamic nuclei increases non-exercise activity thermogenesis. *Journal of neuroendocrinology* **18**, 594-601
59. Wren, A. M., Small, C. J., Abbott, C. R., Jethwa, P. H., Kennedy, A. R., Murphy, K. G., Stanley, S. A., Zollner, A. N., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2002) Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinology* **143**, 4227-4234
60. Sharief, A. H., Gasim Khalil, E. A., Theander, T. G., Kharazmi, A., Omer, S. A., and Ibrahim, M. E. (2006) *Leishmania donovani*: an in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. *Experimental parasitology* **114**, 247-252
61. Kobayashi, T., Namba, M., Koyano, T., Fukushima, M., Sato, M., Ohtsuka, M., and Matsuyama, M. (2018) Successful production of genome-edited rats by the rGONAD method. *BMC biotechnology* **18**, 19
62. Hess, S. E., Rohr, S., Dufour, B. D., Gaskill, B. N., Pajor, E. A., and Garner, J. P. (2008) Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **47**, 25-31
63. Mori, K., Ida, T., Fudetani, M., Mori, M., Kaiya, H., Hino, J., Nakahara, K., Murakami, N., Miyazato, M., and Kangawa, K. (2017) Identification of neuromedin U precursor-related peptide and its possible role in the regulation of prolactin release. *Scientific reports* **7**, 10468
64. Graham, E. S., Turnbull, Y., Fotheringham, P., Nilaweera, K., Mercer, J. G., Morgan, P. J., and Barrett, P. (2003) Neuromedin U and Neuromedin U receptor-2 expression in the mouse and rat hypothalamus: effects of nutritional status. *Journal of neurochemistry* **87**, 1165-1173
65. Thompson, E. L., Murphy, K. G., Todd, J. F., Martin, N. M., Small, C. J., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2004) Chronic administration of NMU into the paraventricular nucleus stimulates the HPA axis but does not influence food intake or body weight. *Biochemical and biophysical research communications* **323**, 65-71

66. Hillier, S. G., Whitelaw, P. F., and Smyth, C. D. (1994) Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Molecular and cellular endocrinology* **100**, 51-54
67. Bosc, M. J., and Nicolle, A. (1985) Influence of photoperiod on the time of birth in the rat. IV. Effects of an imposed feeding rhythm. *Reproduction, nutrition, developpement* **25**, 39-48
68. Krieger, D. T., Hauser, H., and Krey, L. C. (1977) Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* **197**, 398-399
69. Krieger, D. T. (1974) Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology* **95**, 1195-1201
70. Reppert, S. M., and Schwartz, W. J. (1986) Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **6**, 2724-2729
71. Reppert, S. M., Weaver, D. R., and Rivkees, S. A. (1988) Maternal communication of circadian phase to the developing mammal. *Psychoneuroendocrinology* **13**, 63-78
72. Olejnikova, L., Polidarova, L., Behuliak, M., Sladek, M., and Sumova, A. (2018) Circadian alignment in a foster mother improves the offspring's pathological phenotype. *The Journal of physiology* **596**, 5757-5775
73. Smarr, B. L., Grant, A. D., Perez, L., Zucker, I., and Kriegsfeld, L. J. (2017) Maternal and Early-Life Circadian Disruption Have Long-Lasting Negative Consequences on Offspring Development and Adult Behavior in Mice. *Scientific reports* **7**, 3326
74. Antle, M. C., and Silver, R. (2016) Circadian Insights into Motivated Behavior. *Current topics in behavioral neurosciences* **27**, 137-169
75. Caba, M., Gonzalez-Mariscal, G., and Meza, E. (2018) Circadian Rhythms and Clock Genes in Reproduction: Insights From Behavior and the Female Rabbit's Brain. *Frontiers in endocrinology* **9**, 106
76. Brown, J. R., Ye, H., Bronson, R. T., Dikkes, P., and Greenberg, M. E. (1996) A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell* **86**, 297-309
77. Imagawa, W., Bandyopadhyay, G. K., and Nandi, S. (1990) Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats. *Endocr Rev* **11**, 494-523
78. Ormandy, C. J., Binart, N., and Kelly, P. A. (1997) Mammary gland development in

- prolactin receptor knockout mice. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **2**, 355-364
79. Brisken, C., Kaur, S., Chavarria, T. E., Binart, N., Sutherland, R. L., Weinberg, R. A., Kelly, P. A., and Ormandy, C. J. (1999) Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Developmental biology* **210**, 96-106
80. Hanada, R., Nakazato, M., Murakami, N., Sakihara, S., Yoshimatsu, H., Toshinai, K., Hanada, T., Suda, T., Kangawa, K., Matsukura, S., and Sakata, T. (2001) A role for neuromedin U in stress response. *Biochemical and biophysical research communications* **289**, 225-228
81. Ozaki, Y., Onaka, T., Nakazato, M., Saito, J., Kanemoto, K., Matsumoto, T., and Ueta, Y. (2002) Centrally administered neuromedin U activates neurosecretion and induction of c-fos messenger ribonucleic acid in the paraventricular and supraoptic nuclei of rat. *Endocrinology* **143**, 4320-4329

VIII. ㊦

Table. 1 プライマー配列

Gene	Name	Forward primer	Reverse primer
<i>Actβ</i>	rat_ActB_qPCR	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	CAGTGAGCCAGGATAGAGC
<i>Nmu</i>	rat_NMU_qPCR	CGTTCCTCAACTGCATGAGA	CCATTGCGTGGCCTAAATAA
<i>Era</i>	rat_ESR1_qPCR	TGCTGGCTACGTCAAGTCG	TTGGCCATCAAGTGGATCAAAG
<i>Erβ</i>	rat_ESR2_qPCR	TATCTCTCCAGCAGCAGT	ACTGTCCTCTGTTGAGCTGC
<i>Pgr</i>	rat_Pgr_qPCR	TTACTGTGGGAGCTGCAAG	CGAGGGCTCTCATAACTCGG
<i>Adora1</i>	rat_AdorA1_qPCR	CAACATTGGGCCACAGACCTA	TCAGGTGTTCCAGCCAAAC
<i>Adora2a</i>	rat_AdorA2a_qPCR	CGCTACATCGCCATCCGAA	GTCTCGAACAGACAGGTCAC
<i>Adora2b</i>	rat_AdorA2b_qPCR	TGCTCACACAGAGCTCCATC	AGTCAGTCCAATGCCAAAGG
<i>Adora3</i>	rat_AdorA3_qPCR	TGTTGGGGTGTGTCATAC	GGGTCAGTCCCACCAGAAAG
pGL3_ <i>Nmu</i> -940	rNMU-940_NheI	TGAGCTAGCACACTGCAGATATGTCATG	TGCAGATCTAGCAGCTCTGGACTGGG
pGL3_ <i>Nmu</i> -200	rNU-200_NheI	GCCGCTAGCTAATTTTCATCTCCAGCTC	TGCAGATCTAGCAGCTCTGGACTGGG
pGL3_ <i>Nmu</i> -107	rNMU-107_NheI	CAGGCTAGCCGGGTGACGCCAGGGAGC	TGCAGATCTAGCAGCTCTGGACTGGG
pGL3_ <i>Nmu</i> -93	rNMU-93_NheI	GACGCTAGCGAGCCAGGGCGCGAGG	TGCAGATCTAGCAGCTCTGGACTGGG
pGL3_CRE mutation_ <i>Nmu</i> -107	mut- rNMU-107_NheI	CAGGCTAGCCGGGACTACCAGGGAGCCAG	TGCAGATCTAGCAGCTCTGGACTGGG
<i>Nmu</i> ^{+/+}	NMU_gentyp_WT	ATGTCGCGAGCAGCTAATCG	GAGGTCCTCTGTGTCATCGG
<i>Nmu</i> ^{-/-}	NMU_gentyp_KO	GACTAGCTAGAATTCCTCCGG	GAGGTCCTCTGTGTCATCGG

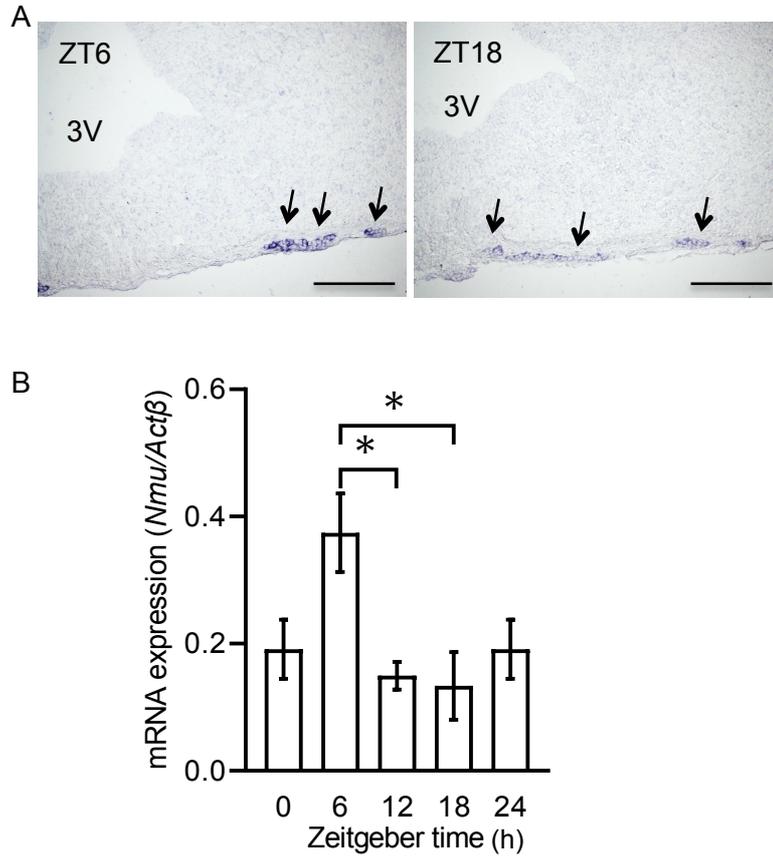


Fig. 1 雌ラットPTにおける*Nmu* mRNA発現の日内変動

ZT0より6時間間隔でZT24まで経時的に発情間期（D期）の*Nmu* mRNAの発現を確認した。（A）ISH法による明期（ZT6）及び暗期（ZT18）における染色像。3V：Third ventricle（第三脳室），矢印：PTの染色像を示す。スケールバー：100 μ m。（B）RT-qPCR法による各時間における*Nmu* mRNAの発現。データの有意差はone-way ANOVAとpost-hoc Dunnett検定により行った（* $P < 0.05$ ）。データは平均値 \pm SEM（各群n=3~4）を示す。

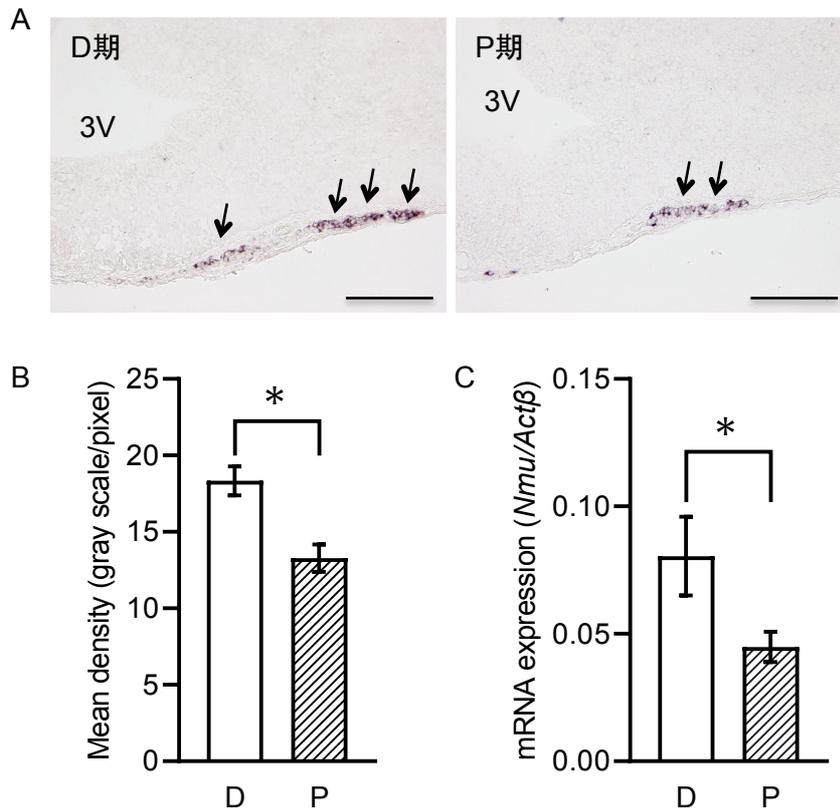


Fig. 2 雌ラットPTにおける*Nmu* mRNA発現と発情周期の関係

明期ZT6のD期と発情前期（P期）の雌ラットPTにおける*Nmu* mRNAの発現。（A）ISH法によるD期とP期のPTにおける*Nmu* mRNAの染色像。矢印：PTの染色性像を示す。スケールバー：100 μ m。（B）ISHの染色性をImage Jを用いて数値化したグラフ。データの有意差はStudent's t-検定により行った（* $P < 0.05$ ）。データは平均値 \pm SEM（各群n=3）を示す。（C）LMDで採取したPTサンプルのRT-qPCR法による*Nmu* mRNAの発現。データの有意差はStudent's t-検定により行った（* $P < 0.05$ ）。データは平均値 \pm SEM（各群n=6~7）を示す。

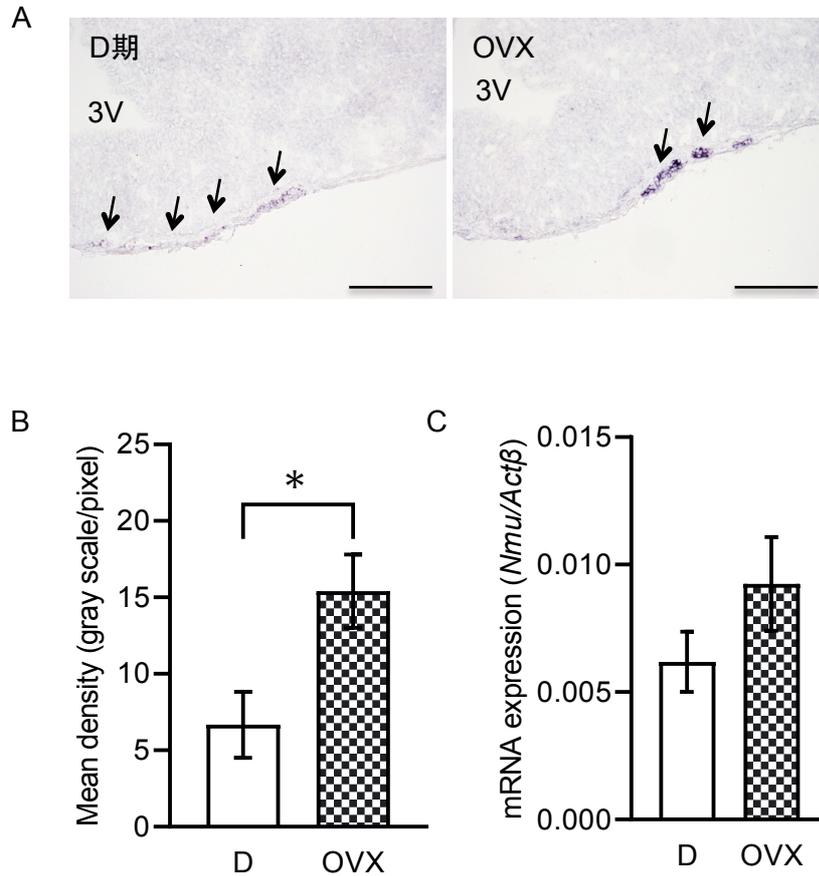


Fig. 3 雌ラットPTにおける*Nmu* mRNA発現への雌性ホルモンの影響

ISH法及びRT-qPCR法を用いて、雌ラットPT (ZT6) における*Nmu* mRNA発現への雌性ホルモンの影響。
 (A) D期と卵巣摘出 (OVX) ラットのPTにおける*Nmu* mRNA発現のISH法による染色像。矢印：PTの染色像を示す。スケールバー：100 μ m。 (B) ISHの染色性をImage Jを用いて数値化したグラフ。データの有意差はStudent's t-検定により行った (* $P < 0.05$)。データは平均値 \pm SEM (各群 $n = 3$) を示す。 (C) 脳スライス法によって回収したPTサンプルを用いて、RT-qPCR法で*Nmu* mRNA発現を解析した。データは平均値 \pm SEM (各群 $n = 6 \sim 7$) を示す。

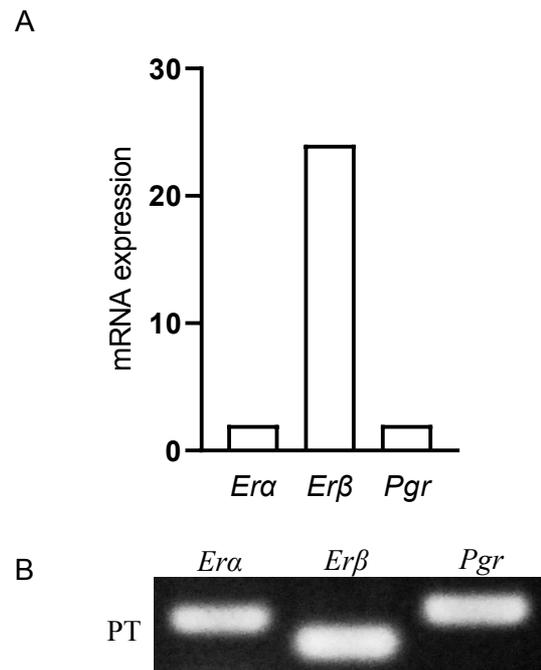


Fig. 4 雌ラットPTにおける*Era*, *Erbβ*, *Pgr* mRNAの発現

雌ラットPT (ZT6) におけるエストロゲン受容体 (*Era*, *Erbβ*) とプロゲステロン受容体 (*Pgr*) mRNA の発現。(A) LMDによって採取されたPTサンプルを用いたRT-qPCR法による*Era*, *Erbβ*, *Pgr* mRNAの発現 (各群n=1)。(B) RT-qPCRより得られたPCR産物の電気泳動像。

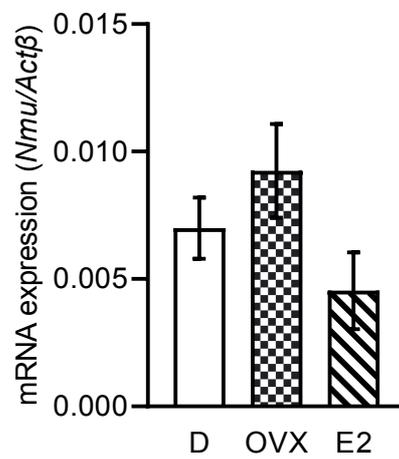


Fig. 5 雌ラットPTにおける*Nmu* mRNA発現はE₂処理による変化

D期, OVX群, E₂投与群における雌ラットPTの*Nmu* mRNA発現。脳スライス法によって回収した雌ラットPTを用いてRT-qPCR法により検討した (各群 n=3)。

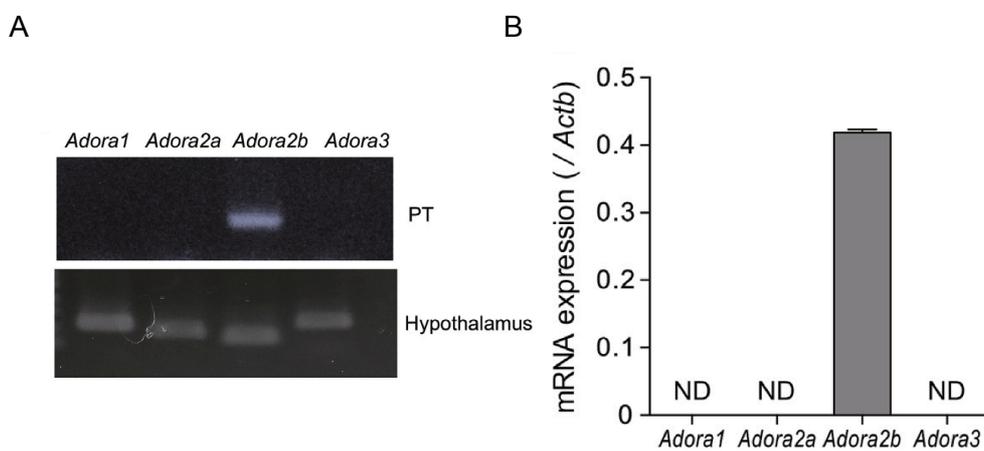


Fig. 6 ラットPTにおけるアデノシン受容体の発現

LMDによって採取された雄ラットPT (ZT0~2) サンプルを使用して、4つのアデノシン受容体サブタイプA1 (*Adora1*)、A2a (*Adora2a*)、A2b (*Adora2b*) 及びA3 (*Adora3*) mRNA発現を確認した。

(A) PT (上) 及び視床下部 (下) サンプルにおけるRT-PCR反応の電気泳動像。*Adora1*、*Adora2a*、*Adora2b*及び*Adora3*特定のプライマーを使用した。PCR反応は36サイクルで行った。(B) RT-qPCRで測定したアデノシン受容体mRNAの相対発現レベル。NDは検出不可 (各群n = 4)。

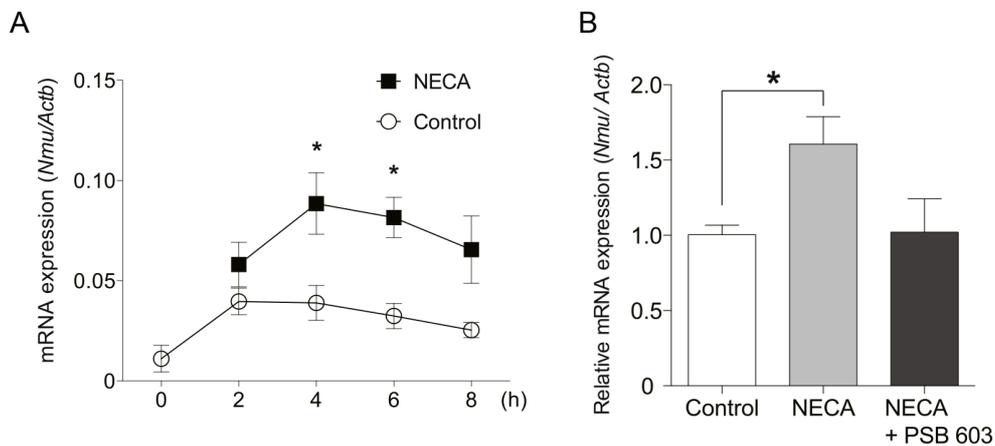


Fig. 7 ラットPTにおける*Nmu*発現のアデノシンによる制御

脳スライス培養におけるアデノシンアゴニストNECAが*Nmu*発現に及ぼす影響を検討した。(A) RT-qPCRで測定したNECAが*Nmu* mRNA発現レベルに及ぼす影響。脳スライスでPTを含む部分にトリミングした。PTスライスサンプルを対照群とNECA群に分け、10 μ M NECAを0, 2, 4, 6及び8時間インキュベートした。データの有意差はone-way ANOVAとpost-hoc Dunnett検定により行った (* $P < 0.05$ vs コントロール)。データは平均値 \pm SEM (各群n=4~8)を示す。(B) RT-qPCRで測定したNECAとアデノシン受容体アンタゴニストPSB603の共投与による*Nmu*発現レベルの変化。PTスライスサンプルを6時間処理した。データの有意差はone-way ANOVAとpost-hoc Dunnett検定により行った (* $P < 0.05$)。データは平均値 \pm SEM (各群n=3~4)を示す。

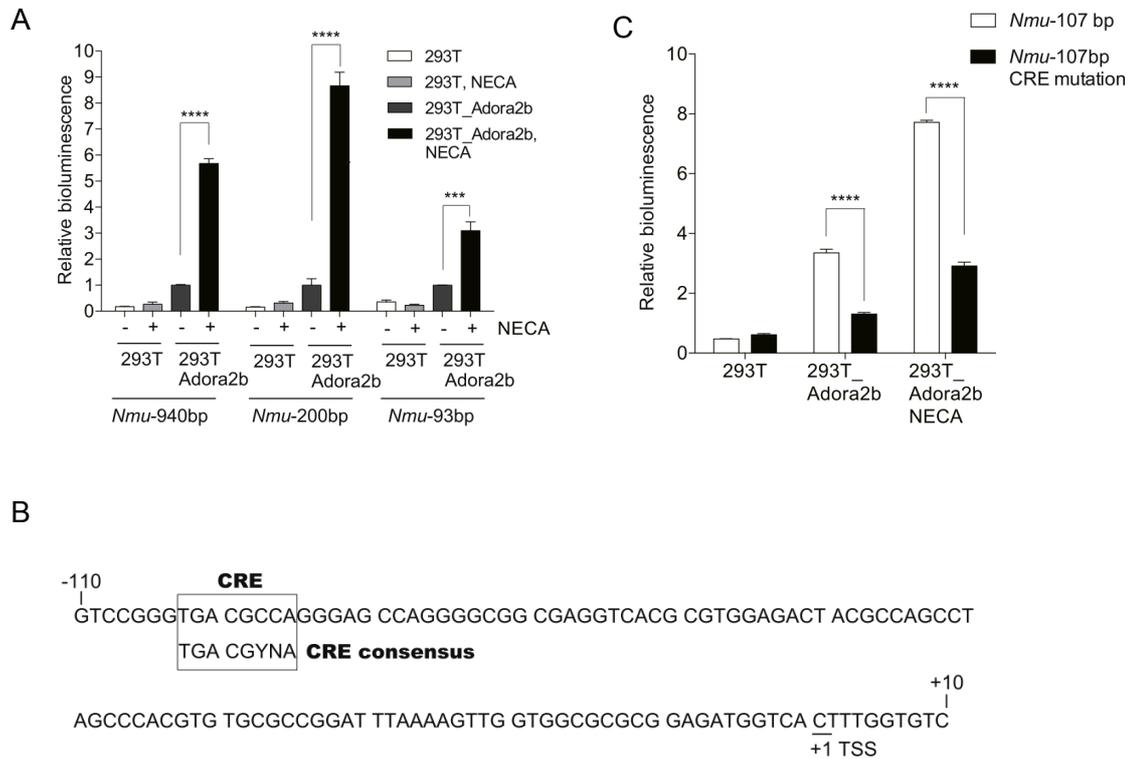


Fig. 8 アデノシンによる*Nmu*プロモーター活性への影響

in vitroでHEK293T細胞（293T細胞）を用いてNECAまたNECAとAdora2b同時に投与した時のラット*Nmu*プロモーター活性に対する影響を検討した。また、CRE相同配列が*Nmu*発現の調節に関与しているかを調べた。（A）ラット*Nmu*プロモーター領域は*Nmu*-940 bp、*Nmu*-200 bp及び*Nmu*-93 bpで測定した。トランスフェクションした細胞を12時間、10 μ M NECAあり（+）またはなし（-）でインキュベート後、ルシフェラーゼアッセイを行った。データの有意差はone-way ANOVAとpost-hoc Dunnett検定により行った（*** $P < 0.005$, **** $P < 0.001$, NECA (-) vs NECA (+)）。データは平均値 \pm SEM（各群n=4）を示す。

（B）TSSから上流のラット*Nmu*の5'変異領域の配列。TSSの上流-96 bp~-103 bpにCRE相同性ドメイン（5'-TGACGCCA-3'）が示される。また、CRE変異配列（5'-TGACGYNA-3'）を示している。CRE：cAMP応答要素，TSS：転写開始サイト。（C）*Nmu*-107 bpプロモーターまたはCRE変異*Nmu*-107 bpプロモーター活性におけるルシフェラーゼの変化。NECA（10 μ M）は293T_ Adora2b細胞に12時間内投与した。データの有意差はone-way ANOVAとpost-hoc Dunnett検定により行った（**** $P < 0.001$, NECA (-) vs NECA (+)）。データは平均値 \pm SEM（各群n=4）を示す。

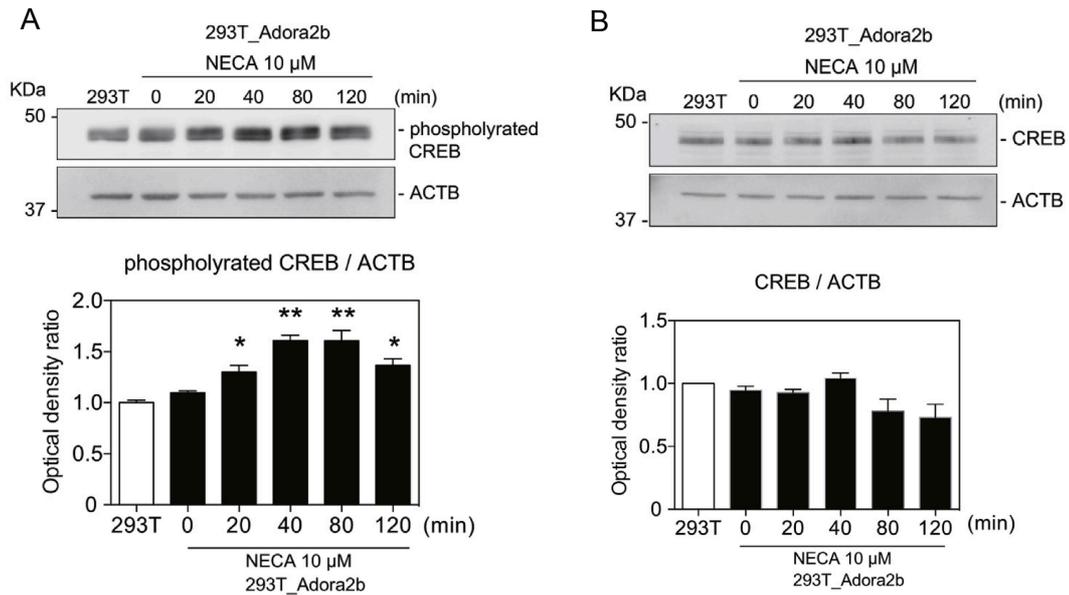


Fig. 9 アデノシンのcAMP依存性シグナル伝達経路の活性化の検討

NECAは293T及び293T_Adora2bを介してCREBリン酸化の誘導を検討した。10 μ M NECAまたは0.1%DMSOとともに0, 20, 40, 60, 80及び120分間インキュベートした後、抗リン酸化CREB, 抗CREB及び抗ACTB抗体を用いてウェスタンブロットを行った。(A) NECAは293T及び293T_Adora2bを介してリン酸化CREB及びACTBを検出することを示すウェスタンブロットの結果像。下のグラフはImage Jソフトウェアを使用して定量化し、ACTBによって補正されたリン酸化CREBの相対量を示している。データの有意差はone-way ANOVAとpost-hoc Dunnett検定により行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0時間)。データは平均値 \pm SEM (各群n=3)を示す。(B) NECAは293T及び293T_Adora2bを介してCREB及びACTBを検出するウェスタンブロットの結果像。下のグラフはImage Jソフトウェアを使用して定量化し、ACTBによって補正されたCREBの相対量を示している。データは平均値 \pm SEM (各群n=3)を示す。

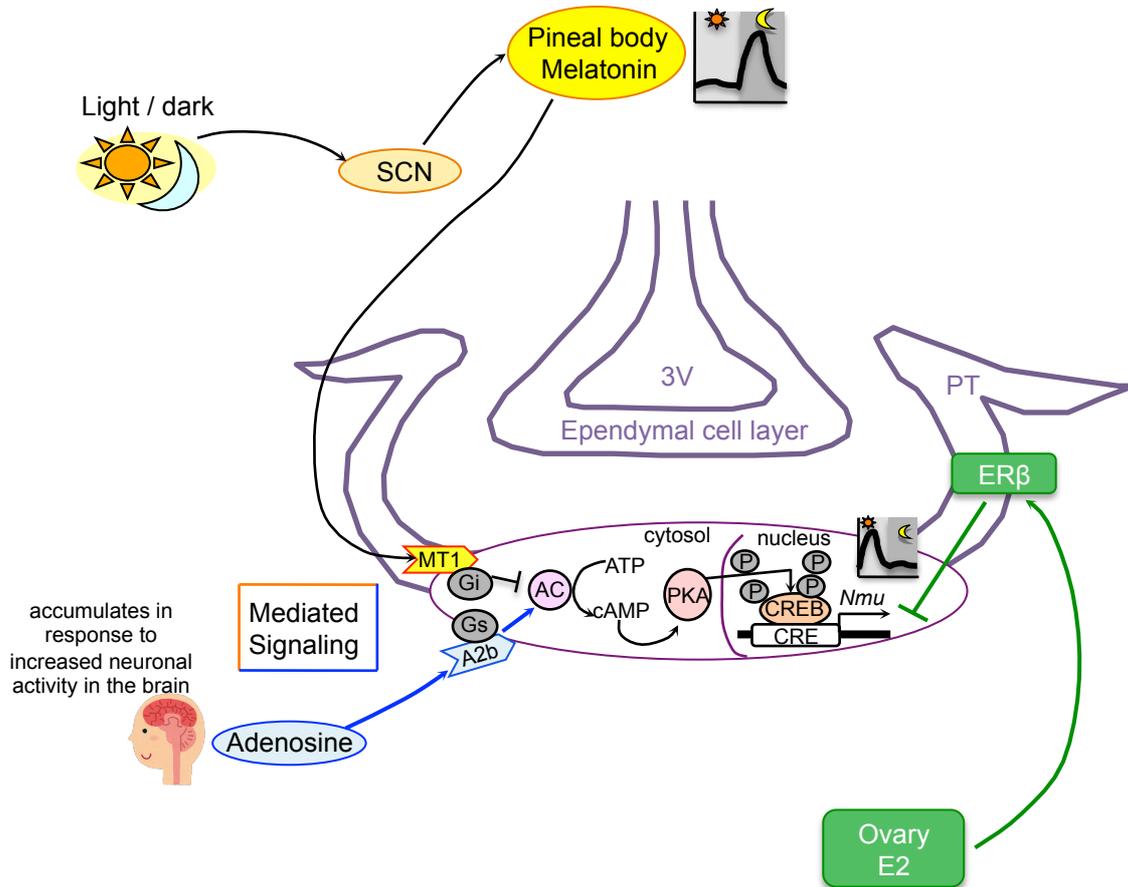


Fig. 10 想定される隆起部Nmuの発現制御

F344系統の雌ラットでは、 E_2 はERβを介してPTの*Nmu* mRNA発現を抑制する。隆起部における*Nmu* mRNAは明期に高く、暗期に低くなる日内変動を持つ。暗期には松果体からメラトニンが分泌され、PTのメラトニン受容体に作用し、Giタンパク質を介して、アデニル酸シクラーゼ (Ac) の活性を抑制し、cAMP濃度が減少してリン酸化CREBが減少し、*Nmu* mRNAの発現が減少することが考えられる。一方、生体内細胞代謝産物であるアデノシンは、7回膜貫通型のGsタンパク質を介して、Acを促進し、cAMP濃度が増加してプロテインキナーゼA (PKA) の作用によってリン酸化CREBが増加し、CREに作用して*Nmu* mRNA発現が促進すると考えられる。

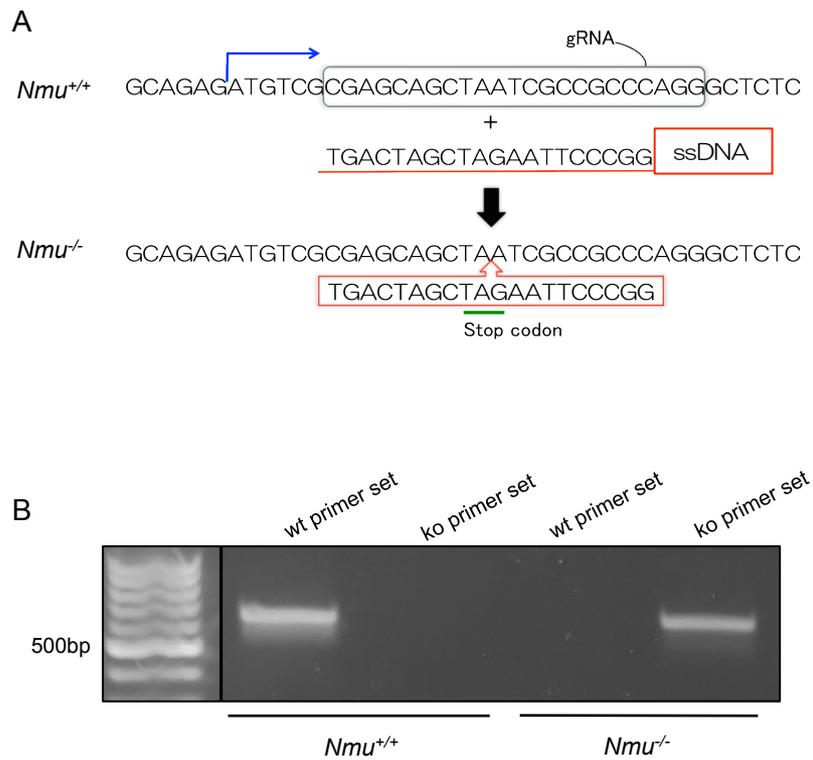


Fig. 11 *Nmu*^{-/-} F2ラットのゲノム編集領域及びゲノムPCRによる遺伝子型決定

(A) *Nmu*^{+/+}と*Nmu*^{-/-}ラットのNMU翻訳開始点(ATG)付近の塩基配列の比較図。NMUシグナル配列をコードする領域にgRNAを設計し、stopコドンを含む外来遺伝子(ssDNA) 20塩基が挿入され、NMUが作れない配列となっていた。(B) ゲノムPCRによる電気泳動像。3週齢前後の仔ラットの耳組織片から抽出したゲノムDNAを鋳型に用いたPCRは*Nmu*^{+/+}の配列のみを増幅するプライマー(wt primer set)、*Nmu*^{-/-}の配列のみを増幅するプライマー(ko primer set)を使用した。

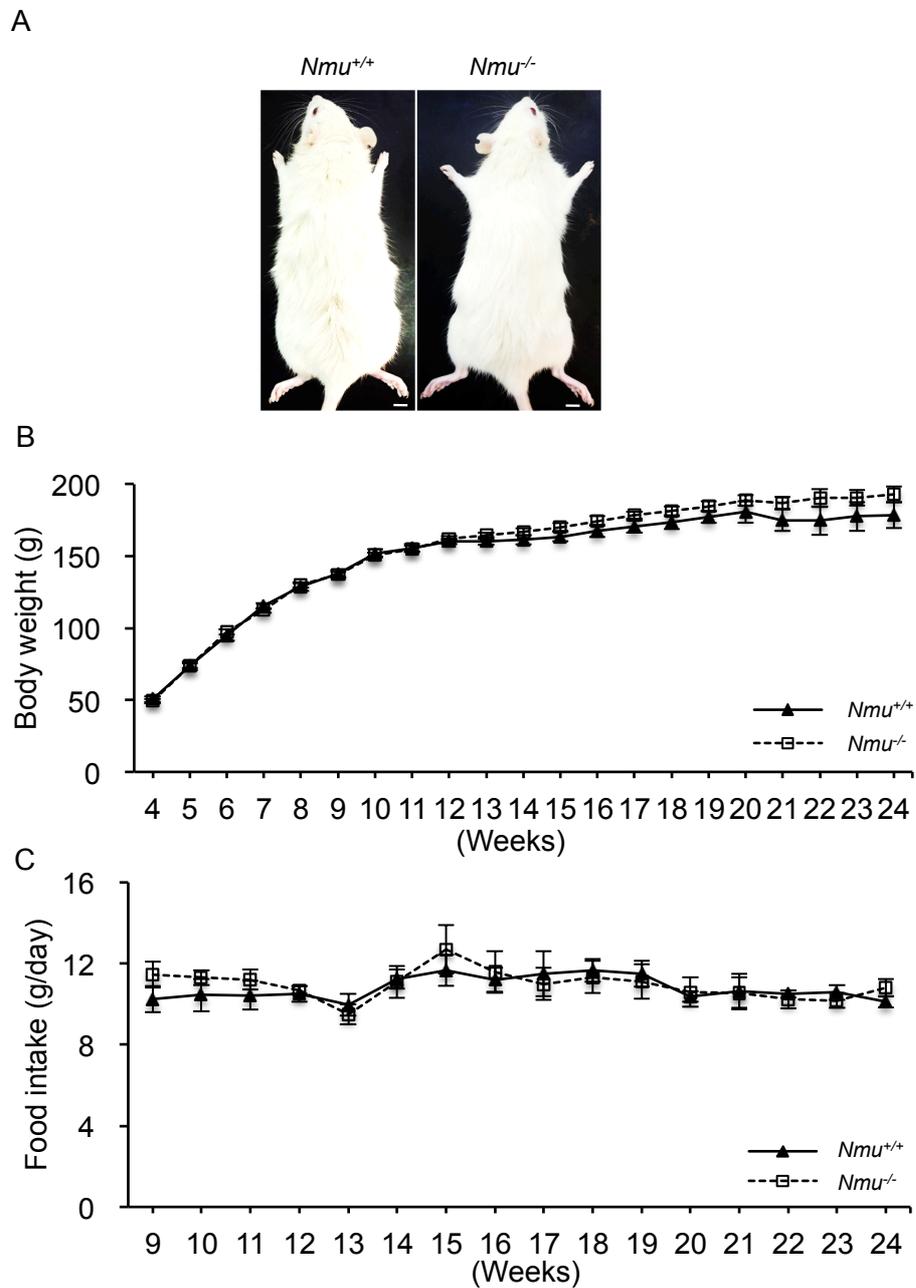


Fig. 12 *Nmu^{+/+}* と *Nmu^{-/-}* 雌ラット外観の比較及び成長に伴う体重と摂食量の変化

(A) 27週齢の *Nmu^{+/+}* と *Nmu^{-/-}* 雌ラットの写真。スケールバー：1 cm。(B) 4週齢から24週齢までの体重の測定値。全てのデータは平均値±SEM (各群：*Nmu^{+/+}* n=14, *Nmu^{-/-}* n=18) を示す。(C) 9週齢から24週齢までの摂食量 (1日当たり)。全てのデータは平均値±SEM (各群：*Nmu^{+/+}* n=10, *Nmu^{-/-}* n=11) を示す。

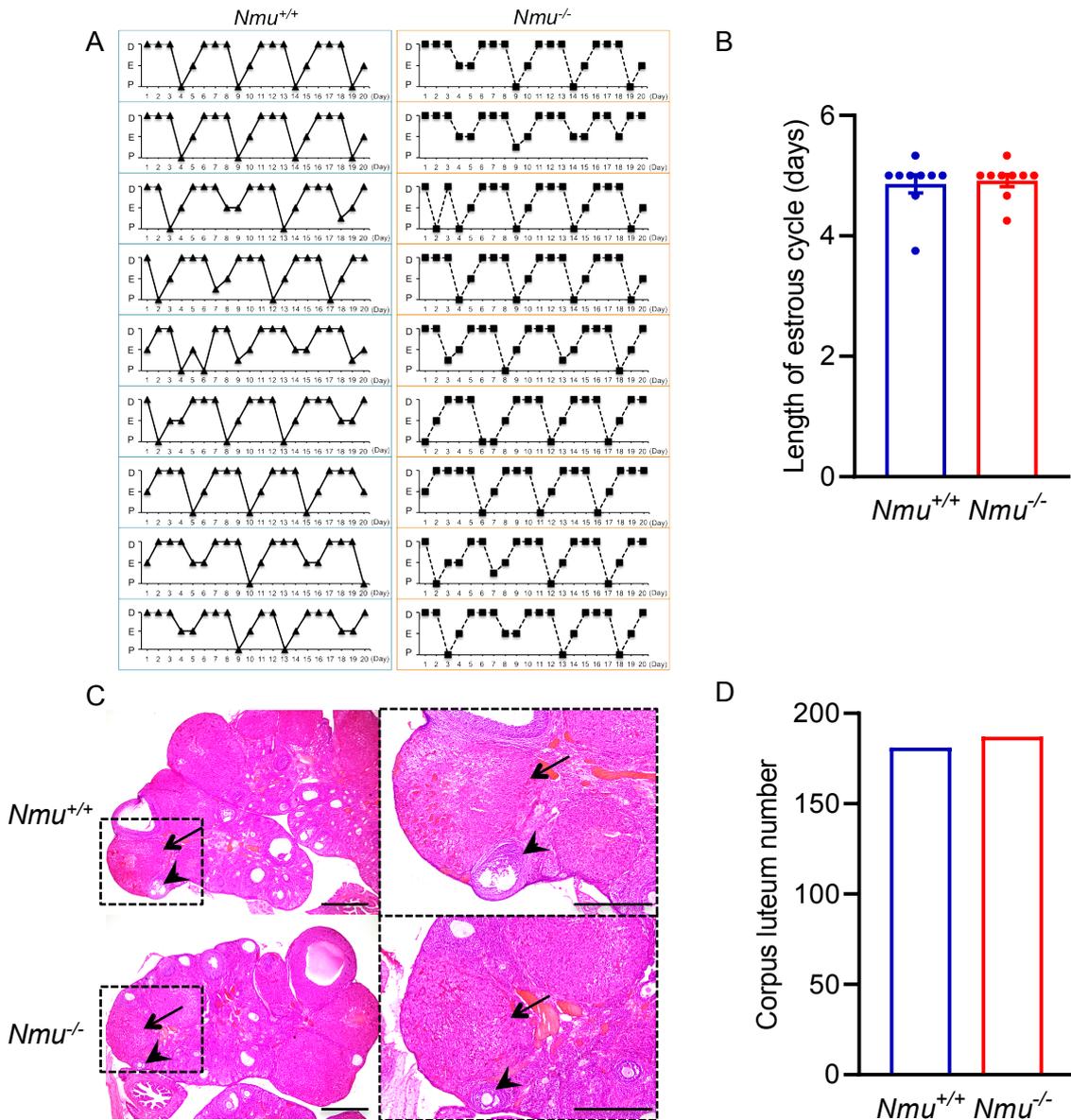


Fig. 13 *Nmu*^{-/-} 雌ラットの発情周期及び卵巣発達の検討

(A) *Nmu*^{+/+} と *Nmu*^{-/-} 雌ラット (8-11週齢) の20日間の発情周期のグラフ。縦軸は発情周期のサイクルを示す、P: 発情前期, E: 発情期, D: 発情間期である。横軸は日数を示す (各群n=9)。(B) *Nmu*^{+/+} と *Nmu*^{-/-} 雌ラットの発情周期の1サイクルの長さ (日数)。全てのデータは平均値±SEM (各群n=9)を示す。(C) *Nmu*^{+/+} と *Nmu*^{-/-} 未経産の雌ラット (14週齢) 卵巣切片のHE染色図 (左)。左図の四角部分の拡大図 (右)。矢印: 黄体, 矢頭: 卵胞を示す。スケールバー: 100 μm。(D) *Nmu*^{+/+} と *Nmu*^{-/-} 雌ラットの卵巣切片における黄体数。卵巣全体の連続切片における平均4箇所を選択し黄体数を数えた。各群 n=1を示す。

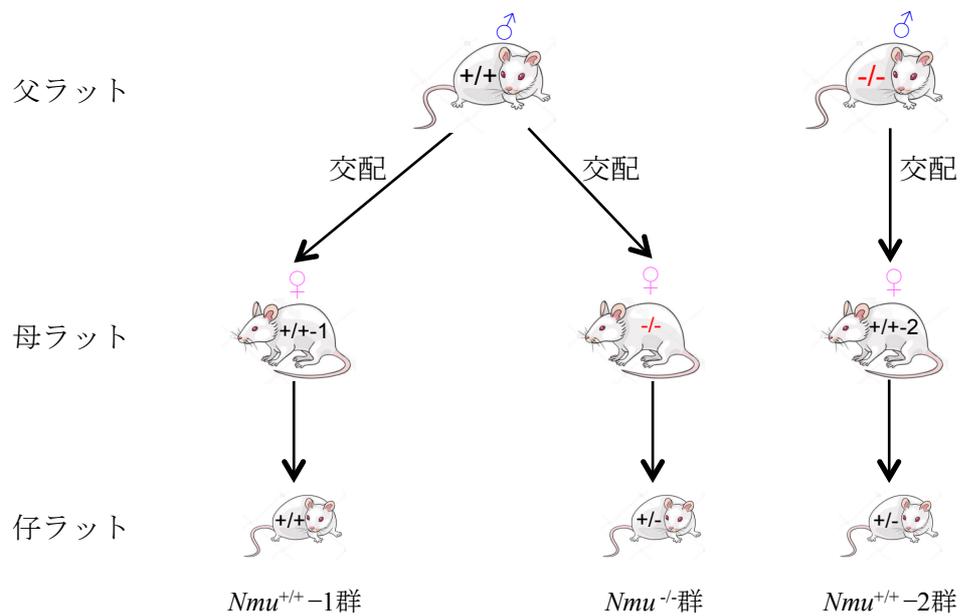


Fig. 14 $Nmu^{+/+}$ と $Nmu^{-/-}$ 雌ラットの繁殖能力の検討のためのフローチャート

$Nmu^{+/+}$ 雌ラット (15匹) を $Nmu^{+/+}$ 雄ラットと交配させる群 ($Nmu^{+/+}$ -1群, 仔は $Nmu^{+/+}$) と, $Nmu^{-/-}$ 雌ラット (25匹) と $Nmu^{+/+}$ 雄ラットと交配させる群 ($Nmu^{-/-}$ 群, 仔は $Nmu^{+/-}$), 及び, $Nmu^{+/+}$ 雌ラット (8匹) と $Nmu^{-/-}$ 雄ラットと交配させる群 ($Nmu^{+/+}$ -2群, 仔は $Nmu^{+/-}$) を用意した。分娩の確認, 出産の時間帯, 出産にかかる時間, 出産完了から仔まとめるのにかかる時間, 巣作りの評価, 出産に伴う母性行動, 出産1時間後の仔ラットの状態及び21日まで仔ラットの生存と成長 (体重) を観察した。

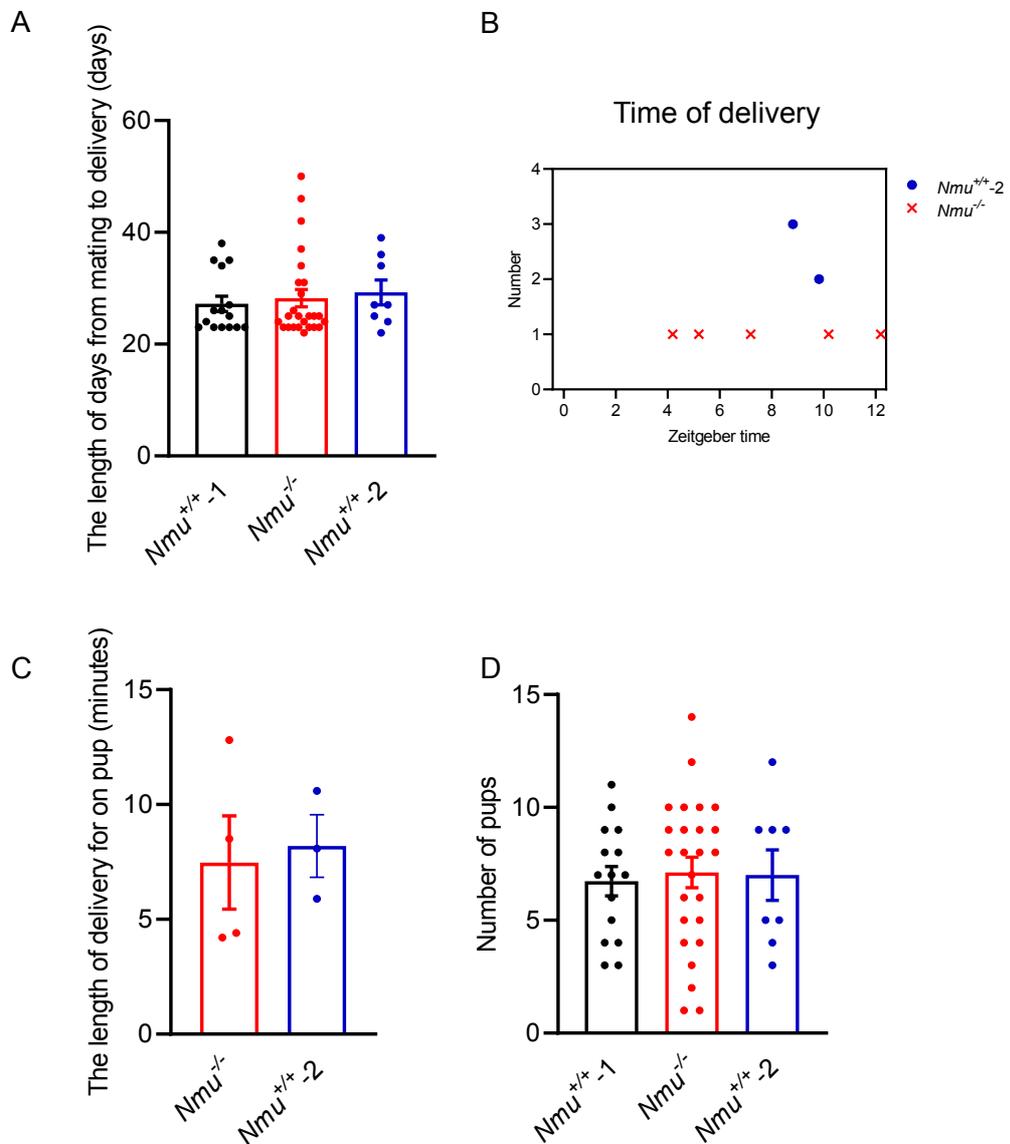


Fig. 15 $Nmu^{-/-}$ 雌ラットの妊娠及び出産異常の観察

(A) $Nmu^{+/+ -1}$, $Nmu^{-/-}$ と $Nmu^{+/+ -2}$ 雌ラットの雄ラットと同一ケージに入れてから出産まで日数。データは平均値±SEM (各群: $Nmu^{+/+ -1}$ n=15, $Nmu^{-/-}$ n=25, $Nmu^{+/+ -2}$ n=8) を示す。(B) $Nmu^{+/+ -2}$ と $Nmu^{-/-}$ 母ラットの出産時間帯。明期の12時間に2時間ずつラットの出産時間を確認した。暗期の出産は次の日の朝 ZT0 に確認した (各群: $Nmu^{+/+ -2}$ n=5, $Nmu^{-/-}$ n=6)。横軸: ZT, 縦軸: 匹数。(C) $Nmu^{+/+ -2}$ と $Nmu^{-/-}$ 母ラットの1匹の仔ラットの出産にかかる時間。全仔の出産開始から完了までの時間を産仔数で割り算出した。データは平均値±SEM (各群: $Nmu^{-/-}$ n=4, $Nmu^{+/+ -2}$ n=3) を示す。(D) $Nmu^{+/+ -1}$, $Nmu^{-/-}$ と $Nmu^{+/+ -2}$ 母ラットの出産数。データは平均値±SEM (各群: $Nmu^{+/+ -1}$ n=15, $Nmu^{-/-}$ n=25, $Nmu^{+/+ -2}$ n=8) を示す。

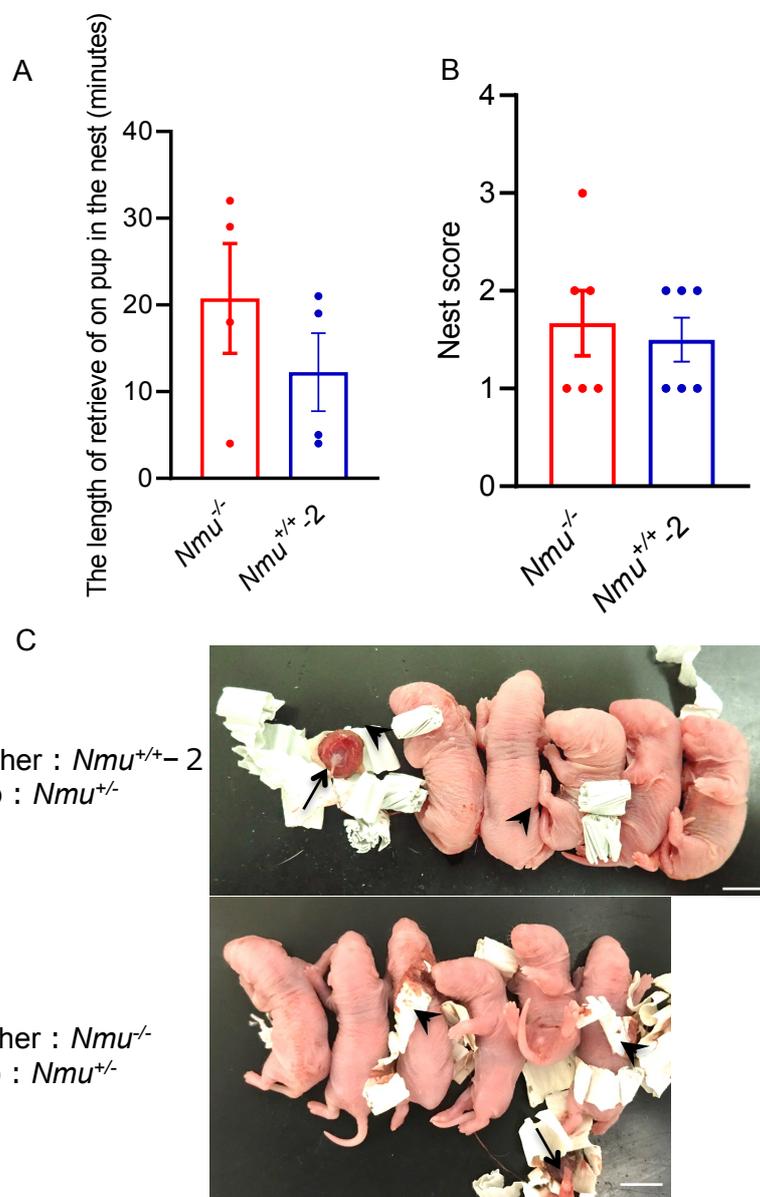


Fig. 16 $Nmu^{-/-}$ 母ラットの出産に伴う母性行動の観察および仔ラットの観察

(A) $Nmu^{+/+}-2$ と $Nmu^{-/-}$ 母ラットの出産完了から仔ラットを1カ所にまとめるのにかかる時間。データは平均値±SEM (各群 : $Nmu^{-/-}$ n=4, $Nmu^{+/+}-2$ n=4) を示す。(B) 出産に伴う巣作りの評価。ケージの外から巣を観察し、5段階の点数で評価した。データ平均値±SEM (各群 : $Nmu^{-/-}$ n=6, $Nmu^{+/+}-2$ n=6) を示す。

(C) $Nmu^{+/+}-2$ と $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔ラットの出産1時間後の写真。上の写真は $Nmu^{+/+}-2$ 母ラットの仔 ($Nmu^{+/+}$) , 下の写真は $Nmu^{-/-}$ 母ラットの仔 ($Nmu^{+/+}$) 。矢印 : 胎盤, 矢頭 : 胎仔に付着した巣材を示す。

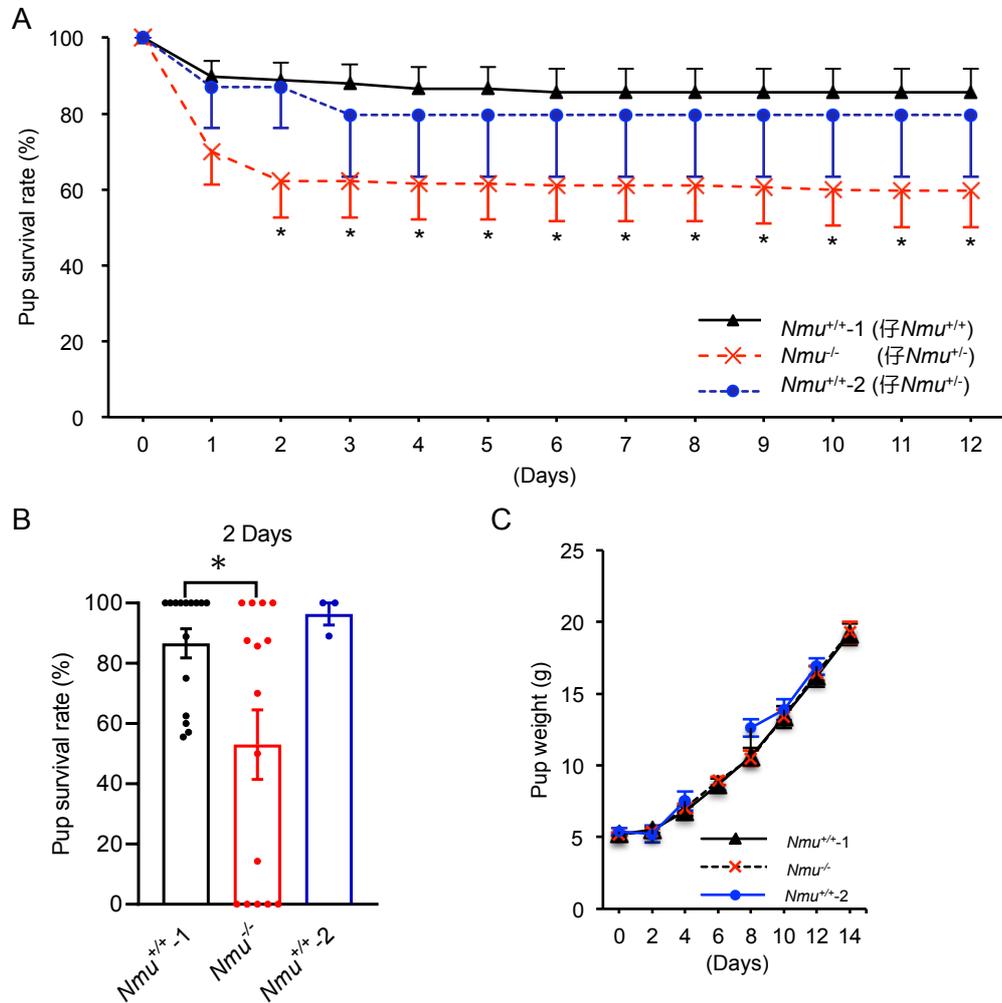


Fig. 17 仔ラットの生存率及び成長の観察

(A) 0日齢から12日齢までの仔ラットの生存率。仔ラットは0日齢から12日齢まで生存数を数え、1匹の母ラットにおける仔ラットの生存率を算出した。データの有意差はone-way ANOVAとpost-hoc Dunnett検定により行った (* $P < 0.05$)。データは平均値 \pm SEM (各群: $Nmu^{+/+}-1$ $n=14$, $Nmu^{-/-}$ $n=20$, $Nmu^{+/+}-2$ $n=6$)を示す。(B) 2日齢の仔ラットの生存率。有意差はone-way ANOVAとpost-hoc Dunnett検定により行った (* $P < 0.05$)。データは平均値 \pm SEM (各群: $Nmu^{+/+}-1$ $n=14$, $Nmu^{-/-}$ $n=20$, $Nmu^{+/+}-2$ $n=6$)を示す。

(C) $Nmu^{+/+}-1$, $Nmu^{-/-}$, $Nmu^{+/+}-2$ 母ラットの仔ラットは成長に伴う体重測定値。データは平均値 \pm SEM (各群: $Nmu^{+/+}-1$ $n=15$, $Nmu^{-/-}$ $n=19$, $Nmu^{+/+}-2$ $n=4$)を示す。