

Studies on Circadian Oscillators in Rat Ovarian Follicular Cells during Development and their Physiological Functions

陳, 華涛

<https://hdl.handle.net/2324/1398426>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏名・(本籍・国籍)	チェン ファタオ 陳 華 涛 (中 国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	生資環博甲第723号
学位授与の日付	平成25年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 資源生物科学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Circadian Oscillators in Rat Ovarian Follicular Cells during Development and their Physiological Functions (ラット卵胞発達に伴う細胞時計の振動とその生理学的機能に関する研究)
論 文 調 査 委 員	(主 査) 教 授 服 部 眞 彰 (副 査) 教 授 松 山 倫 也 教 授 下 東 康 幸 准教授 山 内 伸 彦

論 文 内 容 の 要 旨

地球上に生息するほぼ全ての動物はあらゆる臓器・組織の中に生体時計の機能を持っている。その臓器・組織では、視床下部の視交叉上核に存在する中枢時計を頂点とする階層関係を取りながら、それぞれ固有の生理機能に最も適するように時間位相が変化するということが、最近の研究から得られた一般的な考え方である。末梢時計の時間位相を変化させる最大の要因が食事で、その影響を最も受けるのが肝臓である。これに対して、ホルモンなど内分泌因子の影響を強く受ける細胞時計が卵巣や子宮などの生殖組織に存在している。卵巣や子宮は性周期や妊娠に伴う周期的なリモデリングが起こるが、その全体の流れを統御するメカニズムについては全く未解明である。

本研究では、雌の生殖細胞である卵母細胞(卵子)を取り囲む顆粒膜細胞における時計機構の発達、ならびにその生理学的な機能について解明を試みた。解析精度を上げるために、マウスの時計遺伝子 *Per2* のプロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを knock-in した遺伝子組換えラットを用いた。均質な顆粒膜細胞で解析するために、目的に応じて合成エストロジェンあるいはウマ胎盤性ゴナドトロピン (eCG) を未成熟ラットに投与して得た細胞を用いた。

まず、顆粒膜細胞の時計が発達するメカニズムについて解析を試みた。顆粒膜細胞を成熟させる FSH と、細胞の成熟に伴って発達するギャップジャンクションタンパク質である connexin(Cx43) に着目した。未成熟な顆粒膜細胞を FSH で処理して成熟した細胞の時計を同期化すると、*Bmal1*, *Per2*, *Rev-erba* などの時計遺伝子の発現が概日的な変化を示した。また、FSH で処理した細胞では *Cx43* 遺伝子の発現が増加し、*Cx43* タンパク質が eCG 処理したラットの卵巣の顆粒膜細胞に強く発現することが認められた。さらに *Cx43* タンパク質の阻害剤 (Lindane, CBX) で処理した培養細胞では細胞時計の振動が減弱した。これらの結果から、FSH による顆粒膜細胞における時計の発達のためのシグナルは、*Cx43* タンパク質を通して細胞層全体に拡散していることが示唆された。

次いで、核内受容体でもある時計遺伝子 *Rev-erba* の機能を解析した。*Rev-erba* タンパク質は転写/翻訳ループを制御する重要なコンポーネントである。ヘムが *Rev-erba* タンパク質の天然のリガンドであるが、*Rev-erba* タンパク質の合成アゴニスト (GSK4112) を用いて成熟した顆粒膜における *Rev-erba* の機能を解析した。GSK4112 で細胞を処理すると、予想されたように *Bmal1* の発現が抑制された。しかし、興味あることに、ミトコンドリアでのコレステロール担体である *Star* の発現が有意に増加した。以上のことから、核内受容体 *Rev-erba* がステロイドホルモン合成に機能し、しかも細胞時計と細胞内代謝が密接にリンクしていることが示唆された。

最後に、成熟した顆粒膜細胞での細胞時計の生理学的機能について解明を試みた。概日リズムは、入力系 (内分泌因子や栄養素など)、ペースメーカー (時計遺伝子)、および出力系 (時計タンパク

質制御遺伝子)の3素成分に分けられる。このうち出力系について *Bmal1* の mRNA をターゲットにした RNA 干渉 (siRNA) により細胞時計の振動を減弱させて、ステロイドホルモン合成関連タンパク質 (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp19a1* など), プロスタグランジン合成酵素 (*Ptgs2/Cox2*), および細胞周期チェックポイントタンパク質 (*p53*) などをコードする遺伝子の発現変化を解析した。培養顆粒膜細胞に siRNA を導入すると, *Clock* を除く全てのコア時計遺伝子 (*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Rev-erba*, *Dbp*) の振動的な発現の減少が認められた。時計タンパク質制御遺伝子の候補として発現を解析した遺伝子のうち, ステロイドホルモン合成関連タンパク質およびプロスタグランジン合成酵素をコードする遺伝子の発現が, *Bmal1* の knock-down 細胞で減少した。さらに培地中のプロジェステロンおよびプロスタグランジン E₂ のレベルも有意に減少することが認められた。以上の結果から, 成熟した顆粒膜細胞において, LH はペースメーカー機構を駆動して酵素タンパク質を最大レベルに保つことによって, 効率的にステロイドホルモンおよびプロスタグランジンを生成することが示唆された。

以上をまとめると, FSH が Cx43 タンパク質を介して顆粒膜細胞の時計を発達させ, 排卵前の LH サージは発達した時計機構を駆動してステロイドホルモンやプロスタグランジンを効率的に生成するという, 卵巣細胞時計の生理学的な機能に関して本研究は新たな時間生理学の概念を提供している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞における細胞時計の発達およびその生理学的な機能の解明を目的に、ラット卵巣をモデルにプロジェステロン (P₄) やプロスタグランジン E₂ (PGE₂) の合成調節について細胞生物学的に解析したものである。

地球上に生息する動物はほとんどの臓器・組織の中に生体時計を持っている。その臓器・組織では脳の視交叉上核に位置する中枢時計を頂点とした階層関係を取りながら、それぞれ固有の生理機能に最も適するように時間位相が変化する。末梢時計の時間位相を変化させる最大の要因が食餌で、その影響を強く受けるのが肝臓の時計である。これに対して卵巣の時計はホルモンなど内分泌因子の影響を強く受けるが、卵胞発育に伴う細胞時計の発達のメカニズムとその生理的機能は未解明である。

本論文では、まず cAMP や Ca²⁺ など低分子物質の細胞間移動を担うギャップジャンクションタンパク質 (Cx43) の発現に注目し、顆粒膜細胞層における時計の発達のメカニズムについて解析した。ウマ性腺刺激ホルモンを投与した未成熟ラットの卵巣から分離した顆粒膜細胞を卵胞刺激ホルモン (FSH) で刺激すると、時計遺伝子 (*Bmal1*, *Per2*, *Nr1d1*) の振動的発現に加えて、Cx43 遺伝子およびそのタンパク質の発現が増加した。さらに、阻害剤 (Lindane, CBX) で Cx43 の機能をブロックすると時計遺伝子の振動的発現が低下し時間位相が変化したことから、FSH 刺激で発生したシグナルが Cx43 を介して細胞層全体に拡散し、細胞時計が発達するものと結論した。

次いで、時計遺伝子 *Nr1d1* がコードする核受容体 Rev-erba による *Star* 遺伝子の発現調節について解析した。Rev-erba とヘムが結合すると転写因子として、時計制御遺伝子 (CCGs) のプロモーター領域に存在するエレメント (RORE) に結合して転写活性を調節する。Rev-erba の合成アゴニスト GSK4112 を顆粒膜細胞の培養系に添加すると、RORE を持つ *Star* 遺伝子の発現が増加した。一方、Rev-erba は転写・翻訳のフィードバックループにより *Bmal1* 遺伝子の転写を抑制するために、*Bmal1* の発現は合成アゴニストの添加によって減少した。このことから顆粒膜細胞でのステロイドホルモン合成には Rev-erba が密接に関与することが示唆された。

さらに、成熟した顆粒膜細胞において時計による P₄ や PGE₂ の合成に関連する酵素類の発現調節について解析した。黄体形成ホルモン (LH) 刺激により P₄ 合成に関連する遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*)

は同じ時間位相で発現したが、*Bmal1* 発現を siRNA でダウンレギュレートすると時計遺伝子 (*Per2*、*Nr1d1*、*Dbp*、*Per1*) の振動的発現が低下し、それに伴って P_4 合成関連遺伝子の発現の時間位相が消失した。また、エストロジェン (*Cyp19a1*) および PGE_2 の合成関連遺伝子 (*Cyp19a1*、*Ptgs2*) の発現も低下するだけでなく、時間位相も前後にシフトした。これら遺伝子の発現変化に伴って、 P_4 および PGE_2 の生成量も減少した。このことから LH が成熟した顆粒膜細胞に作用すると細胞時計が同期化され、細胞は新たに時を刻み始めて CCGs が発現し、ホルモンが効率的に生成されるものと結論した。

以上要するに、本論文はラット卵巢をモデルにして卵胞発育に伴う顆粒膜細胞層の時計の発達のメカニズムを解明し、その時計の振動によって顆粒膜細胞でのステロイドホルモンやプロスタグランジンが効率的に生成されるという新たな知見を提供したものであり、繁殖生理学、特に時間生殖生理学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有するものと認める。