

学 位 論 文 要 旨

氏名 ファイディバン・オクトフィアヌス・ルドルフ

題 目 :

Rapid non-genomic control by membrane estradiol receptor, GPR30, for luteinizing hormone secretion from bovine anterior pituitary

(膜型エストロジェン受容体 GPR30 による迅速でノンゲノミックなウシ下垂体前葉からの LH 分泌の調節機構)

論文要旨 :

Estradiol secreted from the ovaries is the most important feedback regulator for both the hypothalamus and anterior pituitary (AP) in controlling the secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) in animals. Therefore, abnormalities of estradiol feedback induce various reproductive diseases. However, details of feedback mechanisms are remained to be clarified. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) is an estradiol receptor located on the plasma membrane, and it initiates several rapid, non-genomic signaling events. GPR30 has recently been identified in rat AP; however, little is known about the role of GPR30 in controlling LH secretion from gonadotropes in animals. To fill this research gap, we hypothesized that GPR30 is expressed in bovine AP and mediates estradiol inhibition of GnRH-induced LH release.

We confirmed the expressions of GPR30 mRNA and protein by RT-PCR, western blotting, and immunohistochemistry. In next, we cultured bovine AP cells (n=8) for 3 days in steroid-free conditions and then treated them with increasing concentrations (0.001nM, 0.01nM, 0.1nM, 1nM, and 10nM) of estradiol or a GPR30-specific agonist, G1, for 5min before GnRH stimulation. As expected, estradiol at 0.001-0.1nM inhibited the GnRH-stimulated LH secretion. However, we found also that G1 at 0.001nM was able to inhibit this secretion ($P<0.05$). In contrast, both estradiol and G1 at higher doses were less efficient in suppressing the GnRH-stimulated LH secretion. Neither estradiol nor G1 suppressed GnRH-stimulated follicle-stimulating hormone secretion.

In separate experiments, fluorescent immunohistochemistry and immunocytochemistry revealed that approximately 50% of GPR30-positive cells express LH, and about 30% of LH-positive cells express GPR30. Therefore, GPR30 is expressed in bovine gonadotropes and may contribute to rapid negative estradiol feedback of GnRH-induced LH secretion.

However, bovine gonadotropes may have another undefined plasma membrane receptor that mediates. STX is an agonist for a recently characterized membrane estrogen receptor whose structure has not been identified. We evaluated whether STX suppresses

GnRH-induced LH release from bovine AP cells. We cultured AP cells (n=12) for 3 days in steroid-free conditions, followed by increasing concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 nM) of estradiol or STX for 5 min before GnRH stimulation until the end of the experiment. Estradiol (0.001 to 0.1 nM) significantly suppressed GnRH-stimulated LH secretion, whereas STX did not affect GnRH-stimulated LH secretion at any of the tested concentrations. Therefore, STX, unlike estradiol and G1, possesses no suppressive effect on GnRH-induced LH release from bovine AP cells.

The GPR30 is the only clearly identified membrane estradiol receptor in bovine AP cells. In order to verify whether GPR30 is the receptor mediating such effect, we conducted to evaluate effect of GPR30-specific antagonist, G36, on the estradiol rapid suppression of GnRH-induced LH secretion. Pre-treatment for 5min with G36 inhibited the estradiol suppression of LH secretion from cultured AP cells. Therefore, GPR30 is the main important receptor for rapid estradiol suppression.

In order to verify the effect of short time treatment with estradiol is mediated by non-genomic mechanism, we evaluated the effect of estradiol on the gene expressions of LH α , LH β , or FSH β subunits. The AP cells (n = 5) were cultured for 3 days in steroid-free conditions and then treated them with 0.01 nM estradiol for 5 min before GnRH stimulation. Realtime realtime PCR analyses revealed that pre-treatment with estradiol (P<0.05) did not decrease the gene expressions of the LH α , LH β , or FSH β subunits in the AP cells. Therefore, the estradiol suppression is non-genomic manner.

Further studies were conducted to clarify the cytoplasmic pathway in the downstream of GPR30 in bovine AP cells using inhibitors. Pre-treatment with ERK1/2/5 inhibitor and PKA inhibitor inhibited the estradiol or G1 suppression of LH secretion from cultured AP cells. Therefore, both ERK1/2/5 pathway and PKA pathway are important pathways in the downstream of GPR30 to suppress LH secretion in the non-genomic mechanism.

Cyclic AMP is the key molecule in the cytoplasmic pathway to increase LH secretion from ovine gonadotrope cells. In order to clarify whether cAMP pathway is the cytoplasmic pathway in the downstream of GPR30 in bovine AP cells, another study was conducted utilizing cAMP measurement. cAMP measurements analyses revealed that pre-treatment with small amounts of estradiol (P<0.05) decreased cAMP in the AP cells rapidly. Therefore, cAMP is the central molecule in the cytoplasmic mechanism in the downstream of GPR30 to inhibit LH secretion non-genomically.

In the dissertation studies, we found that AP of heifers with quiescent ovary and or cystic follicle show abnormal responses to the rapid effect of estradiol. Thus, the GPR30 on the cell surface and the cytoplasmic pathways may be the reason to induce the ovarian diseases.

In conclusion, estradiol binds to GPR30 on the surface of gonadotrope, decreased cAMP, activates PKA and ERK1/2/5 pathways to decrease LH secretion in a rapid, non-genomic mechanism.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Faidiban Oktofianus Rudolf
審査委員	主査：山口大学・准教授 角川博哉
	副査：山口大学・教授 田浦保穂
	副査：鹿児島大学・教授 窪田力
	副査：山口大学・教授 木曾康郎
	副査：山口大学・教授 中市統三
題目	Rapid non-genomic control by membrane estradiol receptor, GPR30, for luteinizing hormone secretion from bovine anterior pituitary (膜型エストロゲン受容体 GPR30 による迅速でノンゲノミックなウシ下垂体前葉からの LH 分泌の調節機構)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>卵巣から分泌されるエストラジオールによる下垂体前葉からの LH の分泌調節、すなわち、ネガティブ・フィードバックは、生殖機能の調節機構の中で最も重要なものである。最近になって、下垂体前葉細胞の細胞膜には、エストラジオールが結合する何らかの受容体が存在し、遺伝子発現を介さない、すなわち、ノンゲノミックな機構により LH 分泌を抑制することがヒツジで明らかになってきた。最近発見された細胞膜型のエストラジオール受容体である G タンパク質共役受容体 30(以下、GPR30)は、癌細胞においては、エストラジオールの結合後に、細胞質内のシグナル伝達機構が影響を受け、ノンゲノミックな反応を短時間で誘起する。そこで本研究において、ウシ下垂体前葉内に存在して LH 分泌をする細胞であるゴナドトロフ細胞は GPR30 を発現しているか、またエストラジオールや GPR30 特異的なアゴニストである G1 は、短時間にウシ下垂体前葉細胞からの LH 分泌を抑制するかについて調べた。本研究では最初に、RT-PCR 法とウエスタンブロット法を用いて、ウシ下垂体前葉における GPR30 の mRNA やタンパクの発現を確認した。次に蛍光免疫染色法等により、GPR30 陽性細胞の約 50% は LH 陽性であり、LH 陽性細胞の約 30% は GPR30 陽性であることも確認した。また 5 分間の低濃度の G1 による前処理は、5 分間の低濃度のエストラジオールによる前処理と同様に、培養下のウシ下垂体前葉細胞からの LH 分泌を有意に抑制することも明らかにした。したがって、ウシのゴナドトロフ細胞の細胞膜表面には、新規なエストラジオール受容体である GPR30 が発現し、エストラジオールが短時間結合すると LH 分泌が抑制されることが発見された。この抑制機構は、遺伝子発現の変化を介さない、ノンゲノミックな機構と考えられた。</p> <p>下垂体前葉内のゴナドトロフ細胞には、他の細胞膜型受容体も存在する可能性が考えられ</p>	

た。STX 受容体は、細胞膜型のエストラジオール受容体である可能性が考えられるようになってきた受容体である。しかしそのアミノ酸配列等の構造は未解明であり、特異的抗体も未開発である。現在の科学では、アゴニストと考えられる STX を用いてのみ STX 受容体の作用が確認できる。そこで本研究により、STX が培養下のウシ下垂体前葉細胞からの LH 分泌を抑制するか調べた。5 分間の低濃度のエストラジオールによる前処理は、培養下のウシ下垂体前葉細胞からの LH 分泌を抑制した。しかし 5 分間の STX による前処理は、低濃度、中濃度、高濃度のいずれの場合にも LH 分泌を抑制しなかった。したがって、STX 受容体がウシ下垂体前葉細胞に存在するかどうかについては今後の研究が必要であるが、STX 受容体がノンゲノミックな機構による LH 分泌抑制における重要な受容体であるとは考えられなかった。

以上の結果から、GPR30 がゴナドトロフ細胞における膜型エストロジェン受容体である可能性が強くなった。さらにこの事を確定するために、GPR30 に対するアンタゴニストである G36 を用いて検討した。その結果、G36 による前処置はエストラジオールによる LH 分泌抑制を阻害することが明らかになり、GPR30 がゴナドトロフ細胞における膜型エストロジェン受容体であると結論できた。

次にエストラジオールが結合した GPR30 による LH 分泌抑制は、LH α サブユニットや LH β サブユニットの mRNA 発現に影響せず起きる、ノンゲノミックな機構であるか明確にするため、遺伝子発現解析を行った。リアルタイム PCR 法を用いた解析の結果、エストラジオールによる迅速な LH 分泌抑制が起きている際に、mRNA の発現量は低下しないことが明らかになった。したがって、ノンゲノミックな機構であると結論できた。

本学位論文では、さらに、GPR30 が LH 分泌抑制を起こす細胞内シグナル伝達機構についても調べた。インヒビターを用いた結果、ERK1/2/5 パスウェイと PKA パスウェイが GPR30 が LH 分泌抑制を起こすシグナル伝達機構であることが明らかになった。また細胞内 cAMP 量の測定の結果、cAMP もシグナル伝達機構であることが明らかになった。

本学位論文では、卵巢静止や卵胞嚢腫といった繁殖障害に、解明された GPR30 や下流に位置する細胞内伝達機構が関与することも明らかになった。

以上の結果より、ウシ下垂体前葉のゴナドトロフ細胞には膜型エストロジェン受容体である GPR30 が発現しており、エストロジェンが結合すると迅速でノンゲノミックな機構により LH 分泌を抑制することが明らかになった。またウシで頻発する繁殖障害に関わることも明らかになり、獣医学に大いに貢献する研究成果である。

以上により、審査員一同は、本論文は博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。