

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 Kiran Pandey

題 目 :

Global gene expression analyses and discovery of new receptors in bovine anterior pituitary  
(ウシ下垂体前葉における網羅的発現遺伝子解析と新規受容体の発見)

論文要旨 :

The anterior pituitary (AP) receives signals from both the hypothalamus and various peripheral tissues, and secretes the important hormones that control various important functions in multiple organs. The AP is expected to express a large number of genes for various purposes, including paracrine, autocrine, and endocrine roles by the heterogeneous secretory cells (corticotrophs, gonadotrophs, lactotrophs, somatotrophs, and thyrotrophs) and the non-endocrine cells, e.g. stromal cells, and also the paracrine cells, e.g., folliculostellate (FS) cells. However, little is known regarding global gene expression in the AP of animals. Deep sequencing of the transcriptome (RNA-seq) via next-generation sequencing (NGS) technology is the most recent and high-throughput type of genetic analysis tool that can be used to determine global gene expression.

I aimed to determine gene expression patterns in the AP of heifers before and after ovulation via RNA-seq to identify new genes and clarify important pathways. Heifers were slaughtered on the estrus day (pre-ovulation;  $n = 5$ ) or 3 days after ovulation (post-ovulation;  $n = 5$ ) for AP collection. I randomly selected 4 pre-ovulation and 4 post-ovulation APs, and the ribosomal RNA-depleted poly (A)+RNA were prepared to assemble NGS libraries. The bovine APs expressed 12,769 annotated genes at pre- or post-ovulation. The sum of the reads per kilobase of exon model per million mapped reads (RPKM) values of all transcriptomes were  $599,676 \pm 38,913$  and  $668,209 \pm 23,690$ , and  $32.2 \pm 2.6\%$  and  $44.0 \pm 4.4\%$  of these corresponded to the AP hormones in the APs of pre- and post-ovulation heifers, respectively. The bovine AP showed differential expression of 396 genes ( $P < 0.05$ ) in the pre- and post-ovulation APs. The 396 genes included two G-protein-coupled receptor (GPCR) genes (GPR61, and GPR153) and those encoding 13 binding proteins. The AP also expressed 259 receptors including GPR101 and GPR173, and other 364 binding proteins. Moreover, ingenuity pathway analysis for the 396 genes revealed ( $P = 2.4 \times 10^{-3}$ ) a canonical pathway linking GPCR to cytoskeleton reorganization, actin polymerization, microtubule growth, and gene expression. Thus, the study clarified the novel genes found to be differentially expressed before and after ovulation and clarified an important pathway in the AP.



Gonadotropin-releasing hormone receptors (GnRHRs) colocalize with insulin and glucocorticoid receptors in lipid rafts of the gonadotroph plasma membrane, where they facilitate downstream signaling. I found that orphan GPR61 and GPR153 are expressed in the AP of heifers, leading us to speculate that the GPRs colocalize with GnRHR in the plasma membrane of gonadotrophs and are expressed at specific times of the reproductive cycle. To test this hypothesis, I examined the coexpression of GnRHR, GPR61 or GPR153, and either luteinizing hormone (LH)  $\beta$  subunit or follicle-stimulating hormone (FSH)  $\beta$  subunit in AP tissue and cultured AP cells by immunofluorescence microscopy. The GPRs were detected in gonadotrophs, with a majority of them being colocalized with GnRHR and the remainder present at other parts of the cell surface or in the cytoplasm. I obtained a strong positive overlap coefficient between the GPRs and GnRHR on the cell-surface of cultured GnRHR-positive AP cells ( $0.71 \pm 0.01$  between GPR61 and GnRHR, and  $0.75 \pm 0.02$  between GPR153 and GnRHR). Real-time PCR and western blot analyses found that expression of GPRs was lower ( $P < 0.05$ ) in AP tissues during early luteal phase as compared to other phases. Additionally, the 5'-flanking region of the GPR genes contained several sites with response elements similar to those of estrogen or progesterone. These data suggested that both GPR61 and GPR153 colocalize with GnRHR in the plasma membrane of gonadotrophs, and their expression changes stage-dependently in the bovine AP.

Gonadotrophs in the AP are important cells; however, the AP has a heterogeneous cell population, and gonadotrophs constitute only 10 to 15% of all cells in the AP and are scattered among other cell types. No methods are currently available for rapidly isolating gonadotrophs from the AP in any species. I developed a method for preparing pure bovine gonadotrophs from a heterogeneous AP cell mixture by magnetic separation and our original antibody against the N terminus of bovine GnRHR. I evaluated the expression of GPR61 and GPR153 in the purified gonadotrophs by western blotting. The purified gonadotrophs express both GPR61 and GPR153, and there was no difference in band size when compared to AP tissues. Non-gonadotrophs cells showed weak or no band.

I evaluated the effect of possible ligand candidate for GPR101 and GPR173 on GnRH induced LH secretion. However, their reported ligand candidates had no effect on LH secretion from the cultured AP cells.

In conclusion, these studies clarified the global gene expression in bovine AP before and after ovulation, and also these studies discovered the new important receptors GPR61 and 153 expressed in gonadotrophs in stage-dependent manner.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Kiran Pandey
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 高木光博
	副査：山口大学・准教授 日下部健
題目	Global gene expression analyses and discovery of new receptors in bovine anterior pituitary (ウシ下垂体前葉における網羅的発現遺伝子解析と新規受容体の発見)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>下垂体前葉は様々な重要な役割を担っていることはよく知られている。しかし、下垂体前葉で発現している遺伝子の全貌については、全ての動物種において明らかになっていない。本学位論文の研究では、発情期と排卵後期におけるウシ下垂体前葉における発現遺伝子を網羅的手法である、次世代シーケンサーを用いた RNAseq 法により解析し、新しい遺伝子やパスウェイを明らかにすることを最初の目的とした。</p> <p>発情期、または排卵後期の未経産牛から下垂体前葉を採取し、ポリ A RNA を精製し、次世代シーケンサー用のライブラリーを作成した。ウシ下垂体前葉では、12,769 遺伝子が発現していた。遺伝子の発現量の指標である RPKM 値 (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) の合計は、発情期では 599,676 ± 38,913、排卵後期では 668,209 ± 23,690 であった。そのうち、約 32.2%、ないし、約 44.04% は、下垂体前葉ホルモンが占めていた。発情期と排卵後期の間で比較すると、有意 (<math>P &lt; 0.05</math>) に発現量の異なる 396 遺伝子が見つかった。396 遺伝子の中には、GPCR 型受容体の GPR61 と GPR153 という新規の受容体、ならびに、13 のバインディングプロテインが含まれていた。ウシ下垂体前葉では、259 の受容体と 364 のバインディングプロテインが発現することも解明された。発情期と排卵後期の間で有意差のあった 396 遺伝子を用いて、Ingenuity Pathway Analysis 法で重要なパスウェイを調べたところ、GPCR と cytoskeleton reorganization, actin polymerization, microtubule growth、そして遺伝子発現を結びつけるパスウェイが見つかった。したがって本研究によって、発情期と排卵後期のウシ下垂体前葉の間で発現量の異なる重要な遺伝子や、重要なパスウェイが発見された。</p> <p>動物の生殖機能は、下垂体前葉の中であって、LH や FSH という重要なホルモンを分泌するであるゴナドトロフ細胞によってコントロールされている。しかしゴナドトロフ細胞における LH</p>	

(別紙様式第 10 号)

や FSH の分泌調節機構には未解明な点が多い。次世代シーケンサーを用いて、発情期と黄体初期の正常牛の下垂体前葉間で発現量に差がある遺伝子として 396 遺伝子を発見したが、その中には GPCR 型受容体である新規受容体、GPR61 や GPR153 も含まれていた。そこで GPR61 や GPR153 の細胞外領域に対する抗体を用いて、下垂体前葉の組織や細胞に対する免疫染色を実施し、リアルタイム PCR で性周期の間にどのように発現量に変化するかも調べた。その結果、下垂体前葉細胞の中にあつて、GPR61 や GPR153 を発現する主要な細胞は、ゴナドトロフ細胞であることが明らかになり、特に LH 分泌が活発になる黄体初期のゴナドトロフ細胞では発現量が低いことも明らかになった。また GnRH 受容体を含む脂質イカダに乗る受容体であることも明らかになった。さらに GPR61 や GPR153 の遺伝子のプロモーター領域を解析したところ、エストロゲン受容体やプロジェステロン受容体の結合領域が存在することも明らかになった。

ゴナドトロフ細胞は、下垂体前葉の中の細胞のわずか 10~15% しか存在せず、またゴナドトロフ細胞のみを精製する手法はこれまでには無かった。Kiran Pandey らは、ウシ下垂体前葉からゴナドトロフ細胞を精製する方法としては、フローサイトメトリを用いることで既に開発に成功していた。この方法は、全ての動物種で世界初の成功であった。しかしフローサイトメトリを用いた手法には、速度が遅く同時には一つの材料しか処理できないという問題が残されていた。そこで、本学位論文では、磁気ビーズ等を用いて、迅速に、複数サンプルを同時に処理して、ウシのゴナドトロフ細胞を精製する新しい方法の開発を試み成功した。次にこの新手法を用い、精製ゴナドトロフ細胞や非ゴナドトロフ細胞から抽出したタンパクを材料として、抗 GPR61 抗体や抗 GPR153 抗体を用いてウエスタンブロットを実施した。その結果、GPR61 や GPR153 を発現する細胞はゴナドトロフ細胞であることが確認された。

以上のとおり、本学位論文の研究により、下垂体前葉で発現している遺伝子の全貌が解明し、特に発情期と排卵後期のウシ下垂体前葉の間で発現量の異なる重要な遺伝子や、重要なパスウェイが発見された。さらに GPR61 や GPR153 という新規の受容体がゴナドトロフ細胞の細胞膜で発現していることも発見された。

以上の内容により、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。