

# $\delta$ GABA<sub>A</sub> 受容体特異的作動薬 DS1による ゴナドトロピンサブユニット発現

折出 亜希, 金崎 春彦, ミジドルジ ツェルメグ, スクバツタル ウヌルジャルガル, 京 哲  
島根大学医学部産婦人科

## はじめに

下垂体ゴナドトロピンである黄体化ホルモン (luteinizing hormone: LH) と卵巣刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone: FSH) は, 卵巣において卵巣発育や, 卵の成熟, 性ステロイドホルモンの合成など女性の生殖機能に重要な役割を果たしている [1]. LH と FSH は視床下部からパルス状に分泌されるゴナドトロピン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone: GnRH) によって主に制御されている [2]. さらにゴナドトロピンは卵巣から産生されるインヒビン, アクチビン, フォリスタチン [3] や, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: PACAP) によっても調節を受けていることが知られている [4, 5].

GnRH は視床下部—下垂体—性腺軸 (hypothalamic-pituitary gonadal axis: HPG axis) の最も重要な活性化因子であることは周知であるが, 最近の報告では視床下部に存在するキスペプチンニューロンが HPG axis の最上位の調節因子であり, GnRH 分泌はキスペプチンにより制御されていることが明らかとなってきた [6, 7]. 一方,  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) ニューロンもまたその受容体を介して GnRH ニューロンに直接作用していることを示唆する報告がある [8, 9]. 視床下部に存在する GnRH ニューロンは GABA ニューロンから多くのシナプス入力を受けている [10]. 齧歯類, ヒツジにおいては GABA antagonist がゴナドトロピン分泌を増加させることが報告されており [11, 12], GABA は GnRH ニューロンに対して抑制的制御を行っていることが推測されている. 一方, GABA は GnRH ニューロンに対し即時的に興奮性作用をし, LH 分泌を促進するという報告もある [13–15].

GABA は中枢神経系において重要な神経伝達物質であり, 3つの構造的および薬理作用的に異なった受容体で

ある GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, GABA<sub>C</sub> 受容体を介して作用を発揮している. GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub> 受容体は Cl<sup>-</sup>チャンネル結合型であり, リガンド依存性イオンチャンネルのファミリーに属する. 一方 GABA<sub>B</sub> 受容体は GTP 結合タンパク質と共役する 7 回膜貫通型受容体ファミリーに属する [16]. これらの 3 種類の GABA 受容体は中枢神経系だけではなく下垂体にも発現していることが明らかになっている [17, 18]. *in vitro* で GABA 阻害剤はプロラクチン分泌を抑制したとする報告がある一方 [19, 20], 下垂体細胞では副腎皮質刺激ホルモンや甲状腺刺激ホルモン, LH の分泌に促進的に作用するという報告もある [21, 22].

ほ乳類の GABA<sub>A</sub> 受容体にはクローニングされ, 構造が同定されている少なくとも  $\alpha 1-6$ ,  $\beta 1-3$ ,  $\gamma 1-3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  の 16 個のサブユニットの存在が知られている [23]. それらの脳内では GABA<sub>A</sub> 受容体はヘテロ 5 量体で機能しており, muscimol は GABA<sub>A</sub> 受容体の特異的な作動薬である. 脳内の GABA<sub>A</sub> 受容体は  $\alpha 2\beta 2\gamma 1$  受容体が大多数を占めるが,  $\delta$  サブユニットを含む GABA<sub>A</sub> 受容体も少ないながらも存在していることが明らかとなっている. 興味深いことに,  $\delta$  サブユニットを含む GABA<sub>A</sub> 受容体 ( $\delta$ -GABA<sub>A</sub> 受容体) は, マウス海馬のニューロンでの発現が発情周期で変化し [24], その発現は性ステロイドホルモンによって影響を受けることが報告されている [25].  $\delta$ -GABA<sub>A</sub> 受容体はシナプス外あるいはシナプス周囲に存在し, GABA によって活性化される [26]. また  $\delta$ -GABA<sub>A</sub> 受容体はベンゾジアゼピン系薬物に反応しないので, 新規薬剤開発のターゲットとして注目されている [27]. また  $\delta$ -GABA<sub>A</sub> 受容体は下垂体に発現していることも明らかにされている [28].

4-Chloro-N-[6,8-dibromo-2-(2-thienyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-yl] (DS1) は  $\delta$  サブユニットを含む GABA<sub>A</sub> 受容体である  $\alpha 4\beta 3\delta$  受容体の特異的かつ強力な作動薬である. 今回私たちは, 下垂体ゴナドトロピン細胞株における DS1 のゴナドトロピンサブユニット発現に対する作用を明らかにするために研究を行った.

連絡先: 折出亜希, 島根大学医学部産婦人科  
〒693-8501 島根県出雲市塩治町89-1  
TEL: 0853-20-2268  
FAX: 0853-20-2264  
E-mail: oride@med.shimane-u.ac.jp

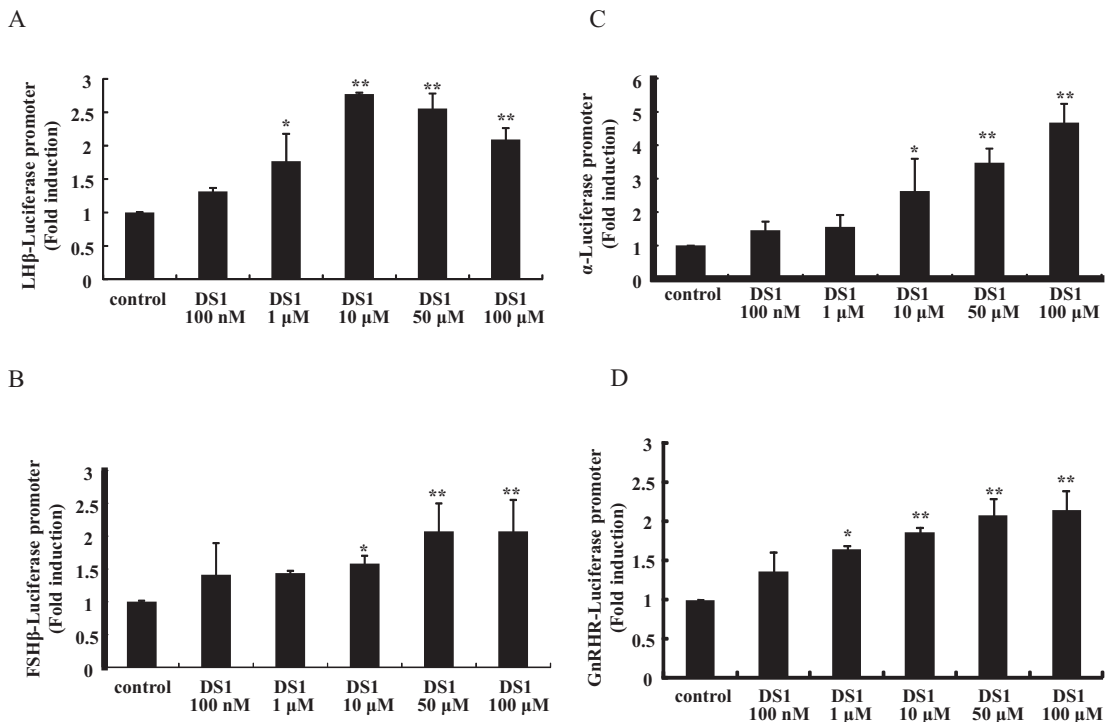


図1 ギナドトロピンサブユニットプロモーター活性に対するDS1の作用  
*LβT2*細胞に2.0μg LHβ-Luc (A), FSHβ-Luc (B), α-Luc (C), GnRH-Luc (D) ベクターをpRL-TK (0.1μg) プラスミドとともにトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後にDS1で6時間刺激を行った。LHβ (A), FSHβ (B), α (C) サブユニットおよびGnRH受容体 (D) プロモーター活性をLuciferase assayで評価した。結果は独立した3回の実験の平均値±SEMとし、コントロールに対するfold stimulationで表した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control.

## ゴナドトロピンサブユニットプロモーター活性に対するDS1の効果

今回の研究では、下垂体ゴナドトロピン産生細胞のモデル細胞としてトランスジェニックマウス由来の細胞株である*LβT2*細胞を使用した。まず研究をするのに先立ち、*LβT2*細胞およびラット下垂体前葉初代培養細胞にδ-GABA<sub>A</sub>受容体の発現があることをPCR法にて確認している(データ未掲載)。

まず*LβT2*細胞におけるゴナドトロピンサブユニット発現に対するDS1の作用について検討した。*LβT2*細胞を100nM, 1μM, 10μM, 50μM, 100μMのDS1でそれぞれ刺激し、ゴナドトロピンLHβ, FSHβ, αサブユニットのプロモーター活性をdual luciferase assayで測定した。DS1はすべてのゴナドトロピンサブユニットのプロモーター活性を増加させた。LHβサブユニットプロモーター活性は、DS1濃度1μM以上で有意に増加し、10μMではコントロールと比べ2.77±0.02倍となり最大の増加を認めた(図1A)。FSHβサブユニット, αサブユニット発現も同様にDS1刺激で増加し、FSHβサブユニットはDS1濃度50μMで最大(2.07±0.42倍), αサブユニットはDS1濃度100μMで最大(4.66±0.57倍)となった

(図1B, C)。また*LβT2*細胞におけるDS1によるGnRH受容体プロモーター活性に対する作用についても同様に検討を行ったところ、GnRH受容体プロモーター活性もDS1の濃度依存的に増加することが分かった(図1D)。

## GnRHの作用に対するDS1の影響

DS1は単独で3つすべてのゴナドトロピンサブユニットプロモーター活性を増加させたが、その効果はGnRH刺激によるゴナドトロピンサブユニット発現に比べると限定的であった。GnRHはLHβプロモーター活性を8.76±0.77倍増加させたが、DS1の存在下ではLHβプロモーター活性は12.62±1.21倍となり、GnRH単独刺激に比し有意な増加を認めた(図2A)。同様に、GnRH刺激で8.07±1.60倍に増加したFSHβサブユニットプロモーター活性は、DS1の存在下で13.5±1.79倍とGnRH単独刺激に比し有意に増加した。αサブユニット発現に関してもDS1存在下でGnRH単独刺激に比べて有意な増加を認めた(図2B, C)。このことからDS1は単独でゴナドトロピンを発現させ、かつGnRHとの同時投与でGnRHの作用を増強することが明らかとなった。

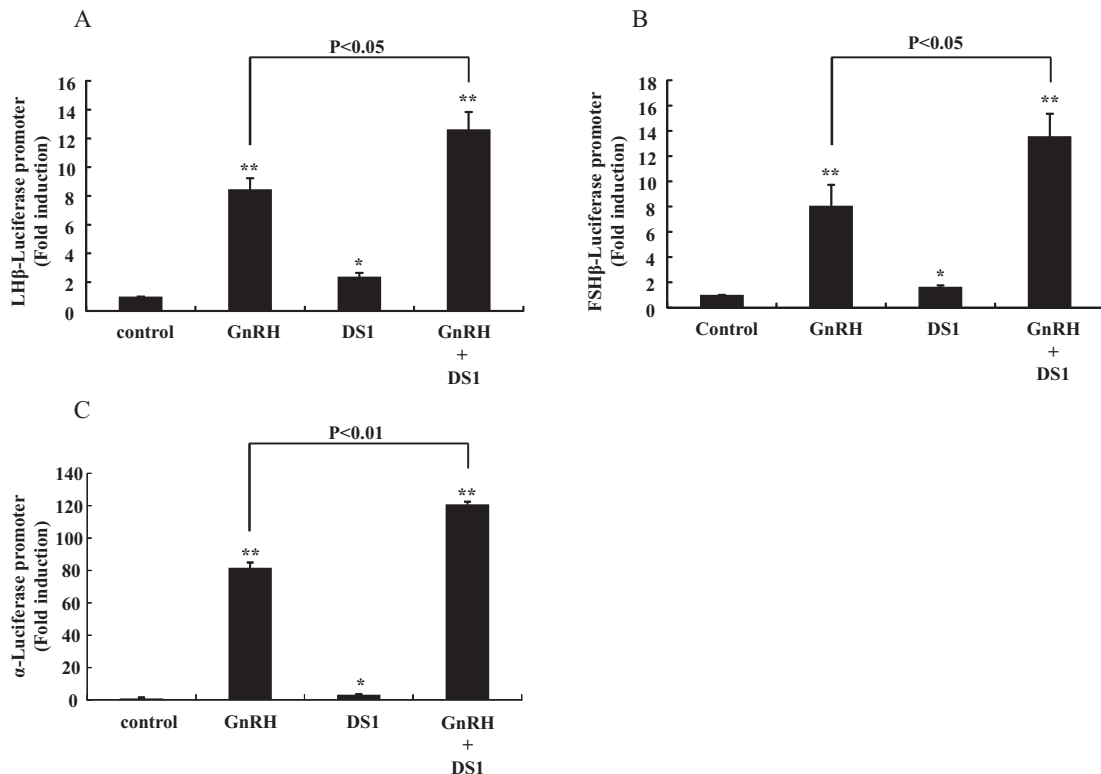


図2 GnRHによるゴナドトロピンサブユニットプロモーター活性反応に対するDS1の効果  
Lβ T2細胞に2.0μg LHβ-Luc (A), FSHβ-Luci (B), α-Luci (C) ベクターをpRL-TK (0.1μg) プラスミドとともにトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後にGnRH 10nM, DS1 50μMでそれぞれ6時間刺激を行った。LHβ (A), FSHβ (B), α(C) サブユニットプロモーター活性をLuciferase assayで評価した。結果は独立した3回の実験の平均値±SEMとし、コントロールに対するfold stimulationで表した。\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. control. LHβ, FSHβ, αサブユニットプロモーター活性においてGnRH単独刺激とGnRH, DS1併用刺激間に有意差を認めた。

### ゴナドトロピンサブユニットプロモーター活性に対する muscimol および一般的 GABA 化合物の効果

DS1はその5量体にδサブユニットを含むGABA<sub>A</sub>受容体特異的な作動薬である。DS1によるゴナドトロピン発現促進作用がδサブユニットに特異的なものかどうか検討するために、他のGABA受容体作動薬でも同様の作用がみられるのか検討を行った。一般的にGABA<sub>A</sub>受容体(α2β2γ1)作動薬として使用されるmuscimolを用いて、ゴナドトロピン発現を検討したが、muscimolはLHβ, FSHβプロモーター活性どちらも増加させず、またGnRHによるゴナドトロピン発現に対しても何ら影響を与えなかった(図3A, B)。一方、一般的なGABA化合物はLHβ, FSHβサブユニットプロモーターの基礎活性を増加させなかったが(図3C), GnRHによるFSHβプロモーター活性を有意に増強した(図3D)。

### SRE, CRE プロモーター活性に対するDS1の作用

続いてDS1による細胞内情報伝達系について検討を

行った。SREはERKにより調節を受ける転写因子が結合するDNAプロモーター領域であり、CREはcAMP/protein kinase A (PKA) 経路のターゲットとなるプロモーター領域として知られている。GnRHはSREとCREのプロモーター活性をそれぞれ20.78±0.87倍, 13.74±2.46倍に増加させた。一方、DS1によってSREプロモーター活性は2.08±0.19倍, CREプロモーター活性は2.25±0.29倍に増加した。SRE, CREプロモーター活性に対するDS1の作用は有意なものであったが、GnRHの効果に比べると限定的であった。ゴナドトロピンプロモーターと同様に、GnRHによるSRE, CREプロモーター活性はDS1の存在下でより増強された(図4A, B)。このことより、DS1はSRE活性, CRE活性をともに単独で増加させ、GnRHによる刺激効果を増加させることが分かった。

### DS-1によるゴナドトロピンプロモーター活性に対するERK阻害剤, PKA阻害剤の効果

DS1によるゴナドトロピンサブユニット発現に至る情

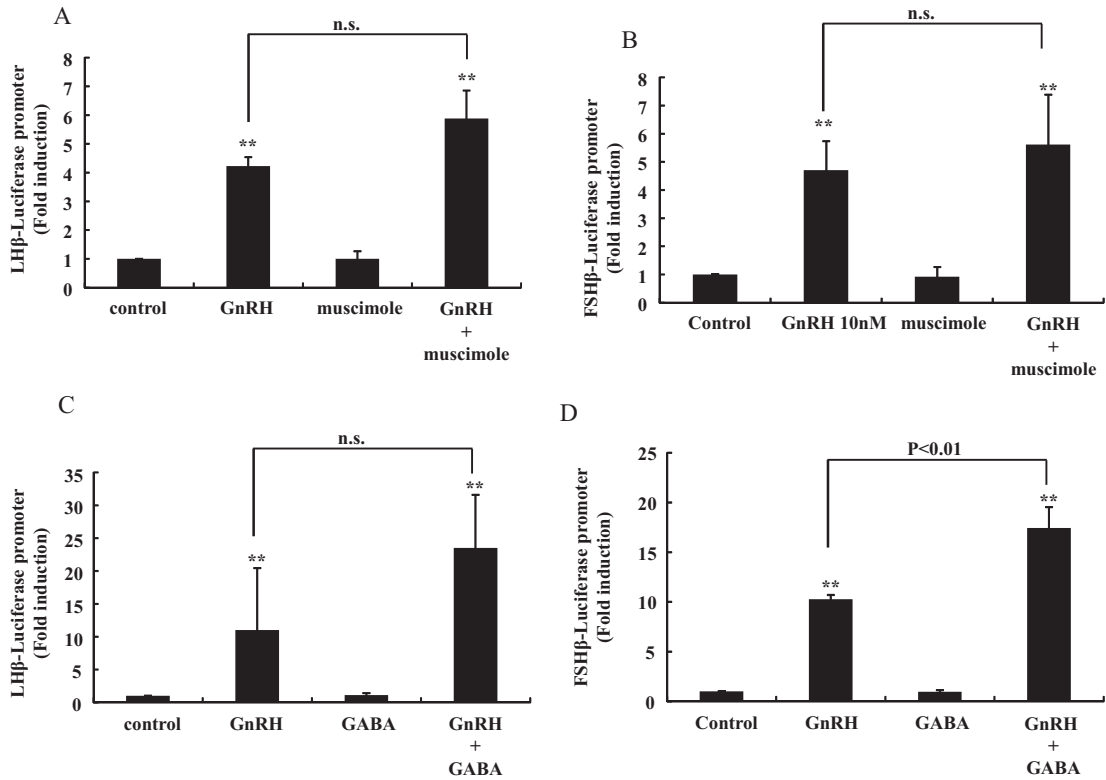


図3 ゴナドトロピンサブユニットプロモーター活性に対する muscimol および一般的 GABA 化合物の効果  
 Lβ T2細胞に2.0μg LHβ-Luc (A, C), FSHβ-Luci (B, D) ベクターを pRL-TK (0.1μg) プラスミドとともにトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後に GnRH 10nM, muscimol 50μM, GABA 50μM でそれぞれ6時間刺激を行った。LHβ (A, C), FSHβ (B, D) サブユニットプロモーター活性を Luciferase assay で評価した。結果は独立した3回の実験の平均値±SEM とし、コントロールに対する fold stimulation で表した。\*\*P<0.01 vs. control. GnRH と GnRH + muscimol には LHβ, FSHβ サブユニットプロモーター活性において有意差を認めなかった。GnRH と GnRH + GABA には LHβ サブユニットプロモーター活性において有意差を認めなかったが、FSHβ サブユニットプロモーター活性において有意差を認めた (P<0.01)。

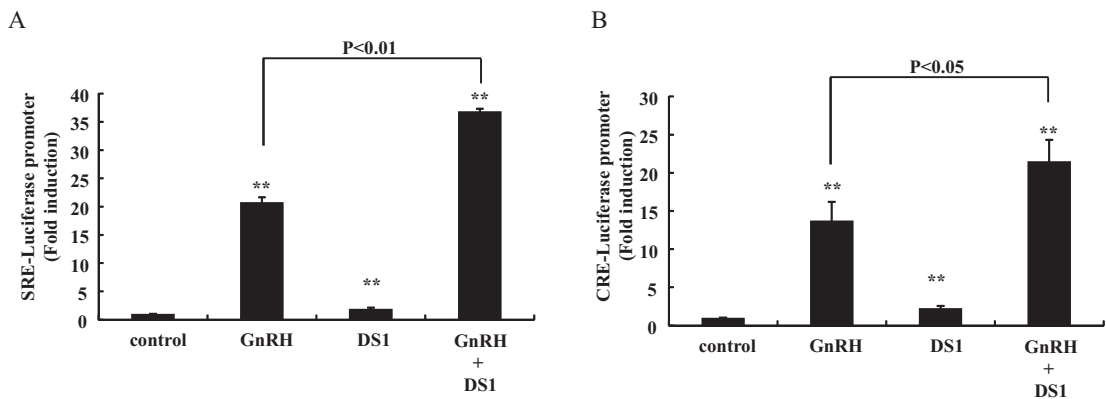


図4 SRE, CRE プロモーター活性における DS1 の作用  
 Lβ T2細胞に2.0μg SRE-Luc (A), CRE-Luci (B) ベクターを pRL-TK (0.1μg) プラスミドとともにトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後に GnRH 10nM, DS1 50μM でそれぞれ6時間刺激を行った。LHβ (A), FSHβ (B) プロモーター活性は Luciferase assay で測定した。結果は独立した3回の実験の平均値±SEM とし、コントロールに対する fold stimulation で表した。\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. control. GnRH と GnRH + DS1 には LHβ, FSHβ サブユニットプロモーター活性共に有意差を認めた (P<0.01, P<0.05)。

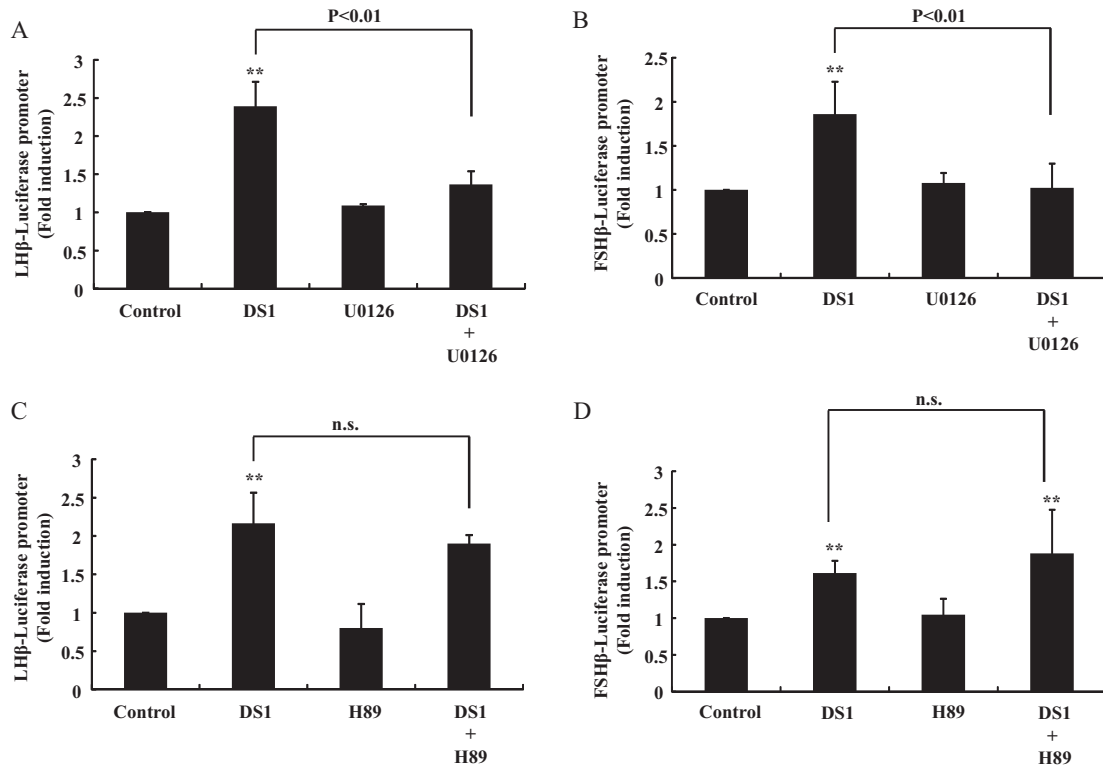


図5 DS-1によるゴナドトロピンプロモーター活性に対するERK阻害剤、PKA阻害剤の効果  
ERKの特異的阻害剤としてU0126、PKA阻害剤としてH89を用いた。LβT2細胞に2.0μg SRE-Luc (A, C), CRE-Luc (B, D) ベクターをpRL-TK (0.1μg) プラスミドとともにトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後にDS1 50μMおよびU0126 10μM (A, B), H89 10μM (C, D) でそれぞれ6時間刺激を行った。LHβ (A, C), FSHβ (B, D) プロモーター活性はLuciferase assayで測定した。結果は独立した3回の実験の平均値±SEMとし、コントロールに対するfold stimulationで表した。\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. control. LHβ, FSHβサブユニットプロモーター活性においてDS1とDS1+U0126間で有意差を認めた (P<0.01)。一方DS1とDS1+H89間には有意差を認めなかった。

報伝達系路を明らかにするため、ERKおよびcAMP/PKA経路の特異的阻害剤を用いて検討を行った。

ERK特異的阻害剤であるU0126はDS1によるゴナドトロピン発現を完全に抑制した(図5A, B)。一方PKA阻害剤であるH89はDS1によるゴナドトロピン発現に影響を与えなかった(図5C, D)。このことよりDS1のゴナドトロピン発現作用は、PKA/cAMPよりもむしろERK活性化が関与している可能性が考えられた。

## おわりに

今回の研究ではα4β3δGABA<sub>A</sub>受容体アゴニストであるDS1によるゴナドトロピンサブユニット発現について検討を行った。DS1は下垂体ゴナドトロピン産生細胞株であるLβT2細胞において、単独でα、LHβ、FSHβの全てのゴナドトロピンサブユニット発現を増加させ、またGnRHによるゴナドトロピン発現を増強した。このゴナドトロピンサブユニット発現はmuscimolや一般的GABA化合物では認められなかったことより、GABA<sub>A</sub>

受容体δサブユニット特異的な効果であると考えられた。またDS1によるゴナドトロピン発現にはERK活性化が関与していると考えられた。

DS1のこれらの作用が果たしてGABA<sub>A</sub>受容体δサブユニットを介した特異的な効果なのかどうかさらに検討を進め、GABAおよびその受容体の生殖内分泌への関与について解明を行う必要があると考えられた。

## 引用文献

- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11, 177-199.
- Crowley WF Jr, Filicori M, Spratt DI, Santoro NF (1985) The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent Prog Horm Res* 41, 473-531.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*

- 164, 567-574.
4. Ying SY (1988) Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 9, 267-293.
  5. Kovacs K, Kantor O, Molnar J, Heinzlmann A, Szabo E, Szabo F, Nemeskeri A, Horvath J, Arimura A (2003) The role of PACAP in gonadotropic hormone secretion at hypothalamic and pituitary levels. *J Mol Neurosci* 20, 141-152.
  6. Bianco SD, Kaiser UB (2013) Molecular biology of the kisspeptin receptor: signaling, function, and mutations. *Adv Exp Med Biol* 784, 133-158.
  7. Seminara SB (2007) Kisspeptin in reproduction. *Semin Reprod Med* 25, 337-343.
  8. Han SK, Todman MG, Herbison AE (2004) Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 145, 495-499.
  9. Moenter SM, DeFazio RA (2005) Endogenous gamma-aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 146, 5374-5379.
  10. Leranath C, MacLusky NJ, Sakamoto H, Shanabrough M, Naftolin F (1985) Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 40, 536-539.
  11. Lamberts R, Vijayan E, Graf M, Mansky T, Wuttke W (1983) Involvement of preoptic-anterior hypothalamic GABA neurons in the regulation of pituitary LH and prolactin release. *Exp Brain Res* 52, 356-362.
  12. Ferreira SA, Hileman SM, Kuehl DE, Jackson GL (1998) Effects of dialyzing gamma-aminobutyric acid receptor antagonists into the medial preoptic and arcuate ventromedial region on luteinizing hormone release in male sheep. *Biol Reprod* 58, 1038-1046.
  13. Han SK, Abraham IM, Herbison AE (2002) Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology* 143, 1459-1466.
  14. DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM (2002) Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 16, 2872-2891.
  15. Bilger M, Heger S, Brann DW, Paredes A, Ojeda SR (2001) A conditional tetracycline-regulated increase in Gamma amino butyric acid production near luteinizing hormone-releasing hormone nerve terminals disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 142, 2102-2114.
  16. Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3, 715-727.
  17. Anderson RA, Mitchell R (1986) Distribution of GABA binding site subtypes in rat pituitary gland. *Brain Res* 365, 78-84.
  18. Boue-Grabot E, Taupignon A, Tramu G, Garret M (2000) Molecular and electrophysiological evidence for a GABA<sub>A</sub> receptor in thyrotropin-secreting cells. *Endocrinology* 141, 1627-1632.
  19. Schally AV, Redding TW, Arimura A, Dupont A, Linthicum GL (1977) Isolation of gamma-amino butyric acid from pig hypothalamus and demonstration of its prolactin release-inhibiting (PIF) activity in vivo and in vitro. *Endocrinology* 100, 681-691.
  20. Grandison L, Guidotti A (1979) gamma-Aminobutyric acid receptor function in rat anterior pituitary: evidence for control of prolactin release. *Endocrinology* 105, 754-759.
  21. Anderson RA, Mitchell R (1986) Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists on the secretion of growth hormone, luteinizing hormone, adrenocorticotrophic hormone and thyroid-stimulating hormone from the rat pituitary gland in vitro. *J Endocrinol* 108, 1-8.
  22. Virmani MA, Stojilkovic SS, Catt KJ (1990) Stimulation of luteinizing hormone release by gamma-aminobutyric acid (GABA) agonists: mediation by GABA<sub>A</sub>-type receptors and activation of chloride and voltage-sensitive calcium channels. *Endocrinology* 126, 2499-2505.
  23. Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2, 795-816.
  24. Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I (2005) Ovarian cycle-linked changes in GABA<sub>A</sub> receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8, 797-804.
  25. Maguire J, Mody I (2007) Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA<sub>A</sub> receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J Neurosci* 27, 2155-2162.
  26. Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Nat Rev Neurosci* 6, 215-229.
  27. Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA (2002) Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha (4) beta (3) delta GABA<sub>A</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 136, 965-974.
  28. Zemkova HW, Bjelobaba I, Tomic M, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Molecular, pharmacological and functional properties of GABA<sub>A</sub> receptors in anterior pituitary cells. *J Physiol* 586, 3097-3111.