

平成30年6月4日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14842

研究課題名(和文)コンディショナルノックアウト技術を活用したヤギの排卵制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism of ovulation in goats via establishment of conditional knockout animal model

研究代表者

大蔵 聡 (Ohkura, Satoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20263163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エストロゲン受容体(ER)の発現をコンディショナルにノックアウトできる遺伝子改変ヤギの作出に向けた基盤的知見を集積することを目的とし、RACE法によりヤギERをコードする遺伝子(ESR1)のmRNA塩基配列および推定アミノ酸配列の同定を行った。また、去勢オスヤギの視索前野にエストロゲン結晶を微量留置したところ、黄体形成ホルモン(LH)サージ様の濃度上昇が誘起された。このことから、エストロゲンは視索前野に作用してサージ様のLH分泌を誘起することが示唆されたとともに、視索前野への微量投与法を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, as the first step in establishing conditional estrogen receptor (ER) gene (ESR1) knockout goats, we first revealed the base sequence of goat ESR1 mRNA and deduced amino acid sequence of goat ER. This information can be used for further determination of the goat ESR1 genomic structure and establishment of conditional knockout model. Second, we demonstrated that estrogen microimplants into the medial preoptic area (MPOA) induced surge-like luteinizing hormone (LH) release in gonadectomized male goat. These results suggest that the MPOA would be the brain mechanism controlling LH surge and plays a role in positive feedback actions on LH secretion in goats.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：応用動物 神経科学 獣医学 畜産学 性腺刺激ホルモン放出ホルモン ヤギ エストロゲン 卵胞
嚢腫

1. 研究開始当初の背景

卵胞嚢腫に罹患したウシの卵巢では、異常な大きさの卵胞が排卵することなく存在する。これは排卵を調節する脳機能の異常が原因と考えられる。排卵は、第一義的には、エストロジェンの正のフィードバック作用による性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) および黄体形成ホルモン (LH) のサージ状分泌が引き金となるため、GnRH/LH サージの欠如が卵胞嚢腫の発生要因であると想定できる。これまでに研究代表者らは、視床下部に存在する神経ペプチド、キスペプチンが GnRH/LH 分泌制御に中心的な役割をもつことを示してきた (Peptides 30:49-56, 2009)。そこで、われわれは「GnRH/LH サージ制御中枢におけるキスペプチン神経系の機能不全が卵胞嚢腫の原因」とする仮説を提唱するに至った。卵胞嚢腫を発症した一部の動物では、エストロジェンの正のフィードバック作用を仲介するキスペプチンニューロン群の活性が低下した状態、あるいは、先天的な機能不全が発症のメカニズムとなることが想定された。

そこでわれわれは、ヤギに高濃度エストロジェンを投与したときに誘起される GnRH/LH サージについて、キスペプチン神経系に着目して解析したところ、視床下部前方に存在するキスペプチンニューロン群がエストロジェンを受容して GnRH/LH サージを引き起こすことが明らかとなった (Journal of Neuroendocrinology 27:57-65, 2015)。一方、ヒツジにおけるこれまでの先行研究では、高濃度エストロジェンを受容する領域は視床下部後方に存在しており (Endocrinology 139:1752-1760, 1998)、ヤギにおける知見と一致しない。ウシの繁殖性低下の大きな要因のひとつである卵胞嚢腫の予防や治療技術を確立するためには、ウシの好適なモデルであるシバヤギを用い、サージ中枢の神経メカニズムを完全に解明することが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、新規ゲノム編集技術とアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを活用する新たなアプローチにより、エストロジェン受容体 (ER) の発現をコンディショナルにノックアウトする遺伝子改変ヤギを作出し、反芻家畜の排卵を制御する神経機構の局在を同定することを当初の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、ゲノム編集技術 (TALEN 法または CRISPR/Cas9 システム) を用いて、ヤギ ER 遺伝子 (*ESR1*) 座に loxP 配列を導入した遺伝子改変ヤギ (*ESR1*-floxed ヤギ) を作出することを最終的な目的とした。本研究では、以下の二つの実験を実施した。

(1) *ESR1*-floxed ヤギを作出するためには、ヤギ *ESR1* プロモーター領域および *ESR1* 転写

調節因子を探索して、ヤギ *ESR1* のゲノム構造を明らかにする必要がある。本実験ではその端緒として、RACE 法によりヤギ *ESR1* mRNA の塩基配列および推定アミノ酸配列を同定することを試みた。成熟雌シバヤギの視床下部弓状核から抽出した total RNA をテンプレートに用いて 3' -RACE 法と 5' -RACE 法を行い、ヤギ *ESR1* mRNA の両末端を含んだ cDNA ライブラリを調製した。これを鋳型として、TOPO TA Cloning Kit を用いて TA クローニングを行い、得られたプラスミドからシーケンス解析によりヤギ *ESR1* mRNA 配列を決定した。

(2) ヤギにおいて、エストロジェンを直接受容して GnRH/LH サージを誘起する脳領域を同定することを目的とし、ヤギ内側視索前野 (MPOA) へのエストロジオール (E2) の局所投与が LH サージを誘起するか検証した。実験には去勢雄シバヤギ 12 頭を用いた。去勢雄シバヤギでは、高濃度エストロジェンにตอบสนองして GnRH/LH サージを発生させる機構が卵巣除去雌ヤギと同様に機能することが報告されている。脳定位固定手術により、ヤギの両側の MPOA を標的としたガイドカニューレの留置を行った。動物の回復後に、結晶 E2 を先端に充填した投与用ステンレスチューブを、ガイドカニューレを通じて 48 時間留置する局所投与を行った。E2 投与開始 4 時間前から 48 時間後まで 2 時間おきに経時的に採血し、E2 投与が血漿中 LH 濃度におよぼす影響を検討した。局所投与チューブ先端の留置部位は、灌流固定した視床下部組織を採取し、組織学的に検証した。MPOA 近傍に局所投与チューブの先端があったヤギをグループ 1、それ以外のヤギをグループ 2 とした。

4. 研究成果

(1) RACE 法によりヤギ *ESR1* mRNA の塩基配列および推定アミノ酸配列の同定を行った。その結果、ヤギ *ESR1* mRNA には少なくとも 2 つのバリエーション (3,836 および 4,353 塩基) が存在することが明らかとなった。得られた *ESR1* mRNA 配列から推定されたヤギ ER のアミノ酸配列は、ウシ、ヒト、マウスの ER と高い相同性を示した (表 1)。特に DNA 結合ドメインおよびリガンド結合ドメインにおいて 95% 以上の相同性を示したことから、エストロジェンを受容するメカニズムは多くの哺乳類で共通である可能性が考えられた。また、ER のリガンドであるエストロジェン、および ER が結合する DNA 配列が多くの動物種で類似している可能性が示唆された。

表 1. ヤギ ER アミノ酸配列の他動物種との相同性

	Size	Accession No.	Homology with goat ERα		
			Full length	DNA-binding domain	Ligand-binding domain
Cattle	596	AAS46251.1	98%	100%	98%
Human	595	NP_001116214.1	91%	100%	95%
Mouse	599	BAJ65337.1	89%	100%	95%

(2)局所投与を行った12頭のうち、4頭(~)をMPOA近傍に局所投与が行われたグループ1に、それ以外の8頭(~)をグループ2に分類した(図1)。グループ1において、MPOA近傍へのE2局所投与によりサージ様のLH濃度上昇が誘起されたことから(図2)、MPOAがGnRH/LHサージを誘起するエストロジェンの作用部位であることが示唆された。これまでの報告と考え合わせ、MPOA近傍に投与されたE2は、MPOAのキスペプチンニューロンによって受容され、キスペプチンによるGnRH分泌刺激を介して血漿中LH濃度の上昇を誘起したと考えられた。一方、誘起されたLH濃度上昇のピーク値がE2の末梢投与によるLHサージのピーク値(Journal of Neuroendocrinology 27:57-65, 2015)に比べ小さかったことから、MPOAに加えてMPOA以外の神経核がエストロジェンを受容し、正のフィードバック作用を仲介してGnRH/LHサージの誘起に関わる可能性が考えられた。

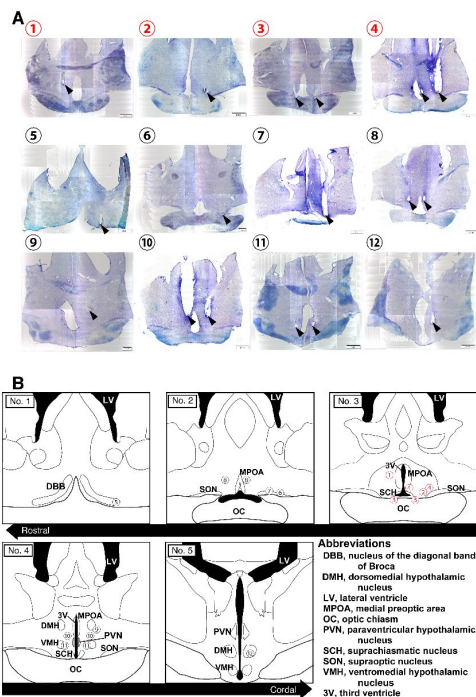


図1 .E2局所投与チューブ留置箇所を示したニッスル染色像(A)および模式図(B)

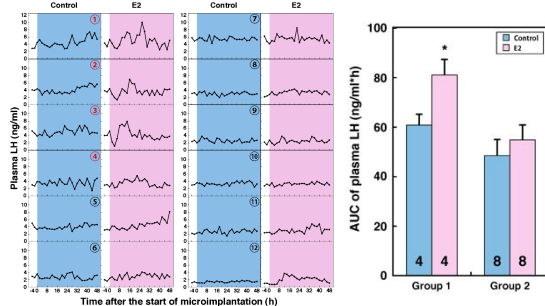


図2 .E2局所投与によるLH濃度への影響 (A)各個体における投与前後のLH濃度の推移.各投与期間を色付の領域で示した。(B)投与開始8~24時間後のLH分泌曲線下面積。

(3)研究期間全体を通じ、*ESR1*-floxedヤギの作出には至らなかったが、その基盤的技術としてヤギ脳内局所にAAV-Creを投与するための手法の開発を行った。脳定位固定装置とX線撮影による脳室造影画像を用いて、ERが発現する内側視索前野、視床下部腹内側核、視床下部弓状核などをターゲットとして、微量投与用のガイドカニューレを留置する条件検討を行った。内側視索前野への局所投与技術は、実験(2)において活用した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計11件)

Fabre-Nys, C., Cognié, J., Dufourny, L., Ghenim, M., Martinet, S., Lassere, O., Lomet, D., Millar, R.P., Ohkura, S. and Suetomi, Y. (2017). The two populations of kisspeptin neurons are involved in the ram-induced LH pulsatile secretion and LH surge in anestrus ewes. *Endocrinology* 158, 3914-3928. 査読有 DOI:10.1210/en.2017-00429

Nakamura, S., Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Ohkura, S. and Matsuyama, S. (2017). A Neurokinin 3 receptor-selective agonist accelerates pulsatile luteinizing hormone secretion in lactating cattle. *Biology of Reproduction* 97, 81-90. 査読有 DOI:10.1093/biolre/iox068

Kanai, N., Endo, N., Ohkura, S., Wakabayashi, Y., Matsui, H., Matsumoto, H., Ishikawa, K., Tanaka, A., Watanabe, T., Okamura, H. and Tanaka, T. (2017). An administration of TAK-683 at a minimally effective dose for luteinizing hormone stimulation under the absence of the ovary induces luteinizing hormone surge in ovary-intact goats. *Journal of Reproduction and Development* 63, 305-310. 査読有 DOI:10.1262/jrd.2016-184

Hassaneen, A.S.A., Naniwa, Y., Suetomi, Y., Matsuyama, S., Kimura, K., Ieda, N., Inoue, N., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-I., Matsuda, F. and Ohkura, S. (2016). Immunohistochemical characterization of the arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) and pre-optic kisspeptin neuronal populations in the hypothalamus during the estrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Development* 62, 471-477. 査読有 DOI:10.1262/jrd.2016-075

Matsuda, F., Nakatsukasa, K., Suetomi, Y., Naniwa, Y., Ito, D., Inoue, N.,

Wakabayashi, Y., Okamura, H., Maeda, K.-I., Uenoyama, Y., Tsukamura, H. and Ohkura, S. (2015). The luteinising hormone surge-generating system is functional in male goats as in females: involvement of kisspeptin neurones in the medial preoptic area. *Journal of Neuroendocrinology* 27, 57-65. 査読有 DOI:10.1111/jne.12235

〔学会発表〕(計10件)

Watanabe, M. Microimplants of estradiol in the medial preoptic area induce a surge-like secretion of luteinizing hormone in male Shiba goats. The 4th World Congress on Reproductive Biology, 2017年9月, Ginowan, Japan.

Tatebayashi, R. Modification of KISS1 gene in goat embryonic fibroblasts using TALEN. International Symposium on Pituitary Gland and Its Related Systems, 2016年9月, Honolulu, USA.

松田二子. 排卵中枢キスペプチンニューロンの性分化には種差がある. 第13回GPCR研究会, 2016年5月, 東京都江東区. 末富祐太. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いたヤギ視床下部神経細胞への遺伝子導入法の検討. 第108回日本繁殖生物学会大会, 2015年9月, 宮崎県宮崎市.

舘林亮輝. TALENを用いたシバヤギ体細胞のKISS1遺伝子改変. 第108回日本繁殖生物学会大会. 第108回日本繁殖生物学会大会, 2015年9月, 宮崎県宮崎市.

〔図書〕(計1件)

Goodman, R.L., Ohkura, S., Okamura, H., Coolen, L.M., Lehman, M.N. (2018). KNDy hypothesis for generation of GnRH pulses: evidence from sheep and goats. In *The GnRH Neuron and its Control* (Wiley-INF Masterclass in Neuroendocrinology Series), in press. Eds. A.E. Herbison and T.M. Plant. Wiley-Blackwell, Hoboken, USA.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~laps/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大蔵 聡 (OHKURA, Satoshi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 20263163

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

松田 二子 (MATSUDA, Fuko)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

(現: 東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授)

研究者番号: 10608855

平尾 雄二 (HIRAO, Yuji)

農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・上席研究員

研究者番号: 10355349

赤木 悟史 (AKAGI, Satoshi)

農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・主任研究員

研究者番号: 70414696

(4) 研究協力者

渡辺 みなみ (WATANABE, Minami)

舘林 亮輝 (TATEBAYASHI, Ryoki)

末富 祐太 (SUETOMI, Yuta)