

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06742

研究課題名(和文) エストロジェンによる発情行動発現の分子制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the brain mechanisms responsible for the estrogen-dependent female sexual behavior

研究代表者

渡辺 雄貴 (Watanabe, Youki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：50781788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エストロジェンによる発情行動発現の分子制御メカニズムを解明することを目的とし、視床下部腹内側核(VMH)のエストロジェン-ERシグナリングに着目して研究を行った。VMHにおける発情行動発現時特異的にERと結合する遺伝子配列を、抗ER抗体を用いたクロマチン免疫沈降sequence (ChIP-seq)により網羅的に調べた。ChIP-seqの結果、VMH内でERと結合する発情行動誘起に関連する可能性のある候補遺伝子を得ることができた。今後、この候補遺伝子の発情行動へ及ぼす影響について明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to investigate the brain mechanism mediating the estrogen-dependent female sexual behavior. Previous studies suggested that estrogen control the female-sexual behavior via estrogen-receptor alpha (ER $\alpha$ ) in the hypothalamic ventromedial nucleus (VMH). Thus, we focused on the ER $\alpha$  signaling in the VMH in the female rats. We successfully got the gene lists of the ER $\alpha$  binding genes in VMH by genome-wide chromatin Immunoprecipitation sequencing analysis (ChIP-seq). We will clarify the function of these genes in terms of sexual behavior.

研究分野：動物生産科学

キーワード：エストロジェン ロードシス ChIP-seq

### 1. 研究開始当初の背景

家畜の受胎率は、年々低下の一途をたどっている。その原因のひとつに、家畜の発情行動の微弱化があげられる。畜産現場では、排卵誘起と発情行動が同時に起こることを利用し、ウシの発情行動を指標に人工授精を行うタイミングをはかっている。発情行動が明確であれば、適切なタイミングで人工授精を行うことができる。しかし、高泌乳化に伴って人工授精開始時期の発情行動が微弱化するウシが頻発しており、適切なタイミングでの人工授精が困難となっている(平子ら、2011)。発情の微弱化の根本的解決には、発情行動のカギを握る脳内の制御メカニズムの詳細な解析が求められる。しかし、これまでは、当時の技術的な制約から神経核全体の刺激・破壊、あるいは薬物投与による発情行動への影響をみたものであり、神経細胞の特定には至っていない。

これまでの数多くの報告から、発情行動のカギを握る特定の神経細胞は、視床下部腹内側核 (VMH) 内の ER $\alpha$  を発現する細胞である可能性が高い。なぜなら、VMH へのエストロジェンの留置はラットの発情行動を誘起し (Barfield and Chen, 1977)、VMH の電気破壊はラットやヒツジでメスの発情行動を消失させる (Pfaff and Sakuma, 1979, W. F. GANONG et al., 1958)。また、全身性の ER $\alpha$  のノックアウト (KO) は、メスの発情行動を示さない (Ogawa et al., 1998)。発情行動に関連している VMH の細胞と中脳中心灰白質 (PAG) とは神経連絡があり、VMH の ER $\alpha$  発現細胞群にエストロジェンが結合すると、発情行動を誘起するシグナルが PAG に送られ、発情行動が誘起されると考えられている。そこで、本研究では、VMH のエストロジェン-ER $\alpha$  シグナリングに着目して研究を行った。

### 2. 研究の目的

哺乳類のメスのエストロジェン-エストロジェン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) シグナリングに着目し、エストロジェンによる発情行動発現の分子制御メカニズムの解明を目的とする。具体的には、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-seq 法により、ER $\alpha$  と結合する遺伝子群を明らかにし、発情行動関連候補遺伝子リストを作成し、その候補遺伝子の発情行動に及ぼす影響を明らかにしようとした。

### 3. 研究の方法

①ER $\alpha$  は、神経細胞とグリア細胞に発現することが知られている。そこで、本研究では、まず VMH に発現する ER $\alpha$  が、神経細胞であるか否かを明らかにするために、ニューロンマーカーである NeuN、アストログリア細胞マーカーである GFAP、さらにミクログ

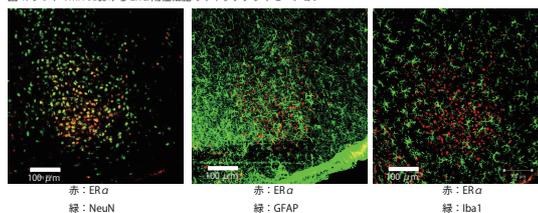
リアマーカーである Iba1 と抗 ER $\alpha$  抗体を用い、それぞれ共染色を行った。使用したサンプルは、卵巣除去後エストロジェンを充填したチューブを皮下に植え込んだ成熟メスラットの脳を用いた。

②実験には、先行研究により発情行動を惹起することが確認されているモデル、卵巣除去後 1 週間エストロジェンを留置した Wistar-Imamichi 系統のメスラットを用いた (n=20)。このラットの視床下部 VMH を発情行動が観察される 17:00-19:00 の間に採取した。採取した VMH から ER $\alpha$  特異抗体 (sc-543) を用いて、クロマチン免疫沈降 (ChIP 法) により、ER $\alpha$  と結合するクロマチンを集めた。ChIP 後産物の Quality check 後に、illumina NextSeq 500 を用いて、網羅的解析を行った。

### 4. 研究成果

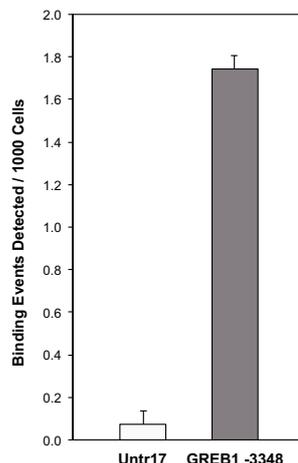
①染色の結果、VMH に発現する ER $\alpha$  は NeuN と共発現しており、GFAP、Iba1 との共局在は認められなかった。そのため、VMH に発現する ER $\alpha$  は神経細胞である可能性が示唆された (図 1)。

図 1. ラット VMH における ER $\alpha$  陽性細胞のキャラクタライゼーション

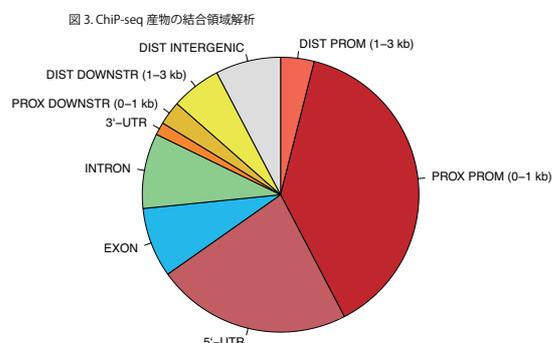


②ChIP 後の DNA 配列は、estrogen receptor regulatory factor の一つの GREB-3348 とネガティブコントロールとして Untr17 のプライマーセットを用いてそれぞれ qPCR を行った結果、GREB-3348 が Untr17 に比べて、およそ 24 倍であった (図 2)。したがって、回収した DNA は ER $\alpha$  と結合する遺伝子であることが明らかとなった。この ChIP 後 DNA を、次世代シーケンサー (Illumina NextSeq 500) により網羅的に解析した結果、ER $\alpha$  と結合する遺伝子として約 1800 遺伝子が候補として

図 2. qPCR による ER $\alpha$  特異性の検証



挙げられた。また、遺伝子の多くは、プロモーター領域と結合していることが明らかとなった (図3)。今後は、この候補遺伝子のうち、促進系の因子に着目し、発情行動における機能解析を進めていく予定である。



## 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 4 件)

①Uenoyama Y, Tomikawa J, Inoue N, Goto T, Minabe S, Ieda N, Nakamura S, Watanabe Y, Ikegami K, Matsuda F, Ohkura S, Maeda KI, Tsukamura H. Molecular and Epigenetic Mechanism Regulating Hypothalamic Kiss1 Gene Expression in Mammals. *Neuroendocrinology*, 10.1159/000445207.

②Minabe S, Ieda N, Watanabe Y, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H. Long-Term Neonatal Estrogen Exposure Causes Irreversible Inhibition of LH Pulses by Suppressing Arcuate Kisspeptin Expression via Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in Female Rodents. *Endocrinology*, 10.1210/en.2016-1144.

③Watanabe Y, Ikegami K, Ishigaki R, Ieda N, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H and Inoue N. Enhancement of the LH surge by male olfactory signals is associated with AVPV Kiss1 cell activation in female rats. *Journal of neuroendocrinology*, 10.1111/jne.12505.

④Bun C, Watanabe Y, Uenoyama Y, Inoue N, Ieda N, Matsuda F, Tsukamura H, Kuwahara M, Maeda KI, Ohkura S, Pheng V. Evaluation of heat stress response in crossbred dairy cows under tropical climate by analysis of heart rate variability. *J Vet Med Sci.*, 10.1292/jvms.17-0368.

[学会発表] (計 10 件)

①Watanabe Y, Ishigaki R, Ikegami K, Ieda N, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H, Inoue N., Augmentation of the LH surge by male olfactory signals is associated with AVPV Kiss1

cell activation in female rats., Kisspeptin 2017, Orland, USA

②Watanabe Y, Ishigaki R, Ikegami K, Ieda N, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H, Inoue N., Augmentation of the LH surge by male olfactory signals is associated with AVPV Kiss1 cell activation in female rats., ENDO2017, Orland, USA

③渡辺雄貴, 井上直子, 池上花奈, 上野山賀久, 東村博子, オスラット由来の嗅覚刺激によるメスラット前腹側室周囲核 (AVPV) キスペプチンニューロンの活性化および LH 分泌の増強作用, 日本繁殖生物学会, 麻布大学 (神奈川県相模原市)

④Nahoko Ieda, Shiori Minabe, Kana Ikegami, Youki Watanabe, Alisa Sugimoto, Naoko Inoue, Yoshihisa Uenoyama, Kei-ichiro Maeda and Hiroko Tsukamura, Expression of Gpr101, receptor gene for GnRH metabolite, in KNDy neurons in female rats, 4th World Congress of Reproductive Biology 2017

⑤Marimo Sato, Shiori Minabe, Youki Watanabe, Fuko Matsuda and Kei-ichiro Maeda, Involvement of the ependymal cells in the brain glucose-sensing mechanism to regulate the glucoprivic responses., 4th World Congress of Reproductive Biology 2017, Okinawa

⑥Chan Bun, Youki Watanabe, Satoshi Ohkura, Yoshihisa Uenoyama, Naoko Inoue, Nahoko Ieda, Fuko Matsuda, Hiroko Tsukamura, Masayoshi Kuwahara, Kei-ichiro Maeda, and Vutha Pheng, Evaluation of heat stress responses by analysis of heart rate variability in crossbred dairy cows under the tropical climate, 4th World Congress of Reproductive Biology 2017, Okinawa

⑦ Takahiro Sakono, Shiori Minabe, Youki Watanabe, Fuko Matsuda, Takafumi Ishida and Kei-ichiro Maeda, Amino acid sequences of neuropeptides and their receptors regulating reproduction of sika deer (*Cervus nippon*), 4th World Congress of Reproductive Biology 2017, Okinawa

⑧渡辺雄貴, 池上花奈, 石垣蓮, 家田菜穂子, 上野山賀久, 前多敬一郎, 東村博子, 井上直子, 雄由来嗅覚刺激は雌ラット前腹側室周囲核キスペプチンニューロンを活性化し LH 分泌を増強する, 内分泌代謝サマーセミナー, 群馬

⑨佐藤 真梨萌、美辺 詩、織、渡辺 雄貴、松田 二子、前多 敬一郎、後脳上衣細胞のグルコースセンサー細胞としての可能性, 生殖内分泌学会

⑩Marimo Sato, Shiori Minabe, Youki Watanabe,  
Fuko Matsuda and Kei-ichiro Maeda, Possible  
Involvement of the Ependymal Cells in the  
Hindbrain glucose-sensing Mechanism  
Mediating the Glucoprivic Responses in Male  
Rats, ENDO2018

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

なし

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.nms.ac.jp/nms/kaibou2/watanabey.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

渡辺 雄貴 (WATANABE YOUKI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：50781788

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし