

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06396

研究課題名(和文)ウシ子宮に発現するクロモグラニン Aの生理的役割の解明と低受胎診断への適用

研究課題名(英文) Study of Chromogranin A in the cow; Physiological roles and practical application

研究代表者

高橋 透 (Takahashi, Toru)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20355738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウシのクロモグラニン Aの発現動態と生理的役割について研究を実施した。ウシのクロモグラニン Aの血中濃度測定系を構築し、妊娠初期の血中動態を検討したところ、受胎例では大きな変動がなく低値で推移したが、不受胎例では不規則な変動を示すものがあった。ウシの子宮灌流液中のクロモグラニン Aの発現をイムノブロット法で検討し、灌流液採取の直後の周期の受胎成績との関連を検討したところ、不受胎例では発現の亢進が認められた。ウシ子宮内膜上皮細胞にクロモグラニン Aを添加して遺伝子発現の変化を検討したところ、クロモグラニン Aは子宮内膜のケモカインの発現を促進することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳牛の受胎率は過去数十年にわたって低下の一途を辿っており、その改善が急務になっている。本研究では乳牛の受胎性に関与する可能性のある因子としてクロモグラニン Aというタンパク質に注目して、その発現動態と生理的役割について検討した。クロモグラニン Aの発現は受胎例と不受胎例で異なった血中動態を示し、子宮内におけるタンパク質発現量にも違いが認められた。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted on the expression dynamics and physiological role of bovine chromogranin A. We constructed a system for measuring the blood concentration of bovine chromogranin A and examined the blood dynamics in the early stages of pregnancy. In the conception cases, there were no major fluctuations and the values remained low, but in the non-conception cases, there were some that showed irregular fluctuations. The expression of chromogranin A in bovine uterine perfusate was examined by immunoblotting, and the relationship with the conception performance in the cycle immediately after collection of the perfusate was examined. As a result, increased expression was observed in non-conceived cases. When chromogranin A was added to bovine endometrial epithelial cells and changes in gene expression were examined, it was shown that chromogranin A promotes the expression of chemokines in the endometrium.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ クロモグラニン A 子宮

## 1. 研究開始当初の背景

クロモグラニン A (CHGA)は、副腎髄質のクロム親和性細胞に発現する酸性糖タンパク質である。研究代表者らは、マイクロアレイ解析を用いた研究によって CHGA がウシ子宮内膜でも発現し、低受胎牛ではその発現が低下している事を明らかにしてきた。CHGA の発現はプロジェステロンによって促進的に制御されていることから、CHGA が着床や妊娠維持に重要な役割を担っていると推察されるが、その機構は明らかでなかった。近年の研究によって、CHGA は翻訳後にタンパク質分解酵素によるプロセッシングを受けて多様なペプチドが派生し、それぞれが多様な生物活性を有する事が報告された。しかし、ウシ子宮内の CHGA およびその派生ペプチドの発現動態とその生理活性は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、「ウシ子宮で発現する CHGA が酵素切断を受けて派生する多様なペプチドは、血管の新生や作動性を調節する制御因子の集団である」との仮説を提唱し、ウシ子宮内膜に発現する CHGA およびその派生ペプチドの生理的意義を解明して、繁殖障害との関連性を明らかにする事を目的とした。

### 研究のポイント

- (1) ウシの子宮で発現する完全長 CHGA の生物活性と妊娠に及ぼす生理的意義の解明
- (2) CHGA の酵素切断の可能性の探索と切断部位の同定
- (3) 正常牛と低受胎牛における CHGA またはその派生ペプチド産生動態の比較

## 3. 研究の方法

### 2019 年度の研究計画

#### 小課題(1). ウシ子宮に発現する完全長 CHGA の生物活性と妊娠に及ぼす生理的意義の解明

小課題 1. では、完全長型の CHGA の生物活性の探索と生理的意義を解明する。研究に必要な CHGA タンパク質はウシ CHGA の cDNA をクローニングしてこれを原核生物ホストであるブレヴィバチルスに組み込んで発現させる。組換えタンパク質の作製は、N 末端に His タグを付加した融合タンパク質として発現させ、ブレヴィバチルスの発現プロモーターを選択することで効率的に培養液に分泌させる発現系を用いる。研究代表者はこれまでに哺乳類細胞や大腸菌をホストにした様々な組換え発現を成功させて研究用の組換えタンパク質を得てきた経緯があり、実施にあたっての問題点はない。また、組換え発現実験は遺伝子組換え実験 (P1) に該当するが、既に実験計画を提出して承認されている。

組換え発現によって得られた精製タンパク質を用いて生理活性の探索を行う。生理活性の探索は、血管新生、子宮内膜上皮細胞の遊走および子宮内膜の組織リモデリングに及ぼす影響を検討する。血管内皮細胞への作用は、ウシ大脳毛細血管内皮細胞 (BBMC) の培養系に組換えタンパク質を添加してその増殖への影響を検討する。子宮内膜細胞の遊走能への影響は、マトリゲルチャンパーに子宮内膜上皮細胞を培養して遊走能を評価する。組織リモデリングへの影響は、組換えタンパク質を添加して培養した細胞の培養上清中のマトリックスメタロプロティナーゼ (MMP) 活性を、ゼイモグラフィ法で評価する。

### 2020 年度の研究計画

#### 小課題(2). CHGA の酵素切断の可能性の探索と切断部位の同定

小課題 2. では、完全長の CHGA タンパク質が子宮や胎盤由来の酵素によって分解を受けるか否かを検討する。組換え CHGA は N 末端側に His タグを持つので、抗 His タグ抗体と抗 CHGA ペプチド抗体を用いたウェスタンブロットを相互に比較することによって、切断産物の概要の推測が可能である。

次いで、組換え CHGA タンパク質を黄体期の牛子宮内に注入し、6 時間後に還流液を回収して抗 His タグ抗体および抗 CHGA 抗体を用いたウェスタンブロットを行い、in vivo の酵素切断によるペプチド生成を確認する。

### 2021 年度の研究計画

#### 小課題(3). 正常牛と低受胎牛における CHGA およびその派生ペプチド産生動態の比較

正常牛と低受胎牛の子宮還流液のウェスタンブロット解析によって、完全長 CHGA またはその派生ペプチドの存在を確認し、還流液中の血中濃度を評価する。正常牛と低受胎牛の間で完全長 CHGA とその派生ペプチドの存在比率について検討して、CHGA またはその派生ペプチドが受胎性に及ぼす影響について検討する。

## 4. 研究成果

#### 小課題(1). ウシ子宮に発現する完全長 CHGA の生物活性と妊娠に及ぼす生理的意義の解明

本小課題ではウシの CHGA の血中濃度推移を測定する手法を開発して妊娠初期の血中動態を検索した。その結果、受胎例の血中 CHGA 濃度は比較的低値で一定に推移したが、不受胎例では不規則な変動が認められた。

完全長 CHGA の組み換えタンパク質をプレバチルスの発現系で発現させたところ、完全長に相当する組換えタンパク質と、C 末端を欠損した短鎖の組み換えタンパク質の 2 種類の産物が得られた。短鎖の組み換えタンパク質はその C 末端がカテスタチンのプロセッシング部位と近く、この付近に翻訳後修飾の段階で切断を受けやすい部位が存在することが示唆された。カテスタチンのプロセッシング部位までのポリペプチド鎖を組み換え発現させたタンパク質は、完全長タンパク質発現で生じた短鎖タンパク質とほぼ同等の分子量であった。上記の実験で発現させた組み換えタンパク質をウシの血管内皮細胞の培養系に添加すると、カテスタチンのプロセッシング部位までを組み換え発現させたタンパク質は、血管内皮細胞の増殖を促進した。一方、完全長 CHGA の組み換え発現で得られた完全長タンパク質と短鎖タンパク質の混合物も血管内皮細胞の増殖を促進した。また、ザイモグラフィによる実験によって、組み換え CHGA を添加して培養された血管内皮細胞は、コラゲナーゼやゼラチナーゼの産生が亢進することが示された。

また、子宮内膜上皮から樹立した初代培養細胞を用いて完全長 CHGA タンパク質が子宮内膜上皮細胞の遺伝子発現動態に及ぼす影響をリアルタイム PCR で検討したところ、完全長 CHGA タンパク質は炎症における好中球の機能を亢進させるケモカインの一つである CXCL5 の発現を促進することが明らかになった。

#### 小課題(2). CHGA の酵素切断の可能性の探索と切断部位の同定

完全長の組換え CHGA タンパク質を食肉処理場から入手したウシ子宮に注入して 6 時間インキュベートした後に子宮内溶液を回収してウェスタンブロット解析を行なったところ、子宮内に注入された組み換えタンパク質はインキュベーションによって複数のポリペプチド断片に切断されることが明らかになった。本実験に使用した抗体は、抗 His タグ抗体と、完全長 CHGA の中央部付近を認識する抗体で、同一サンプルを 2 種類の抗体を用いてウェスタンブロットを行うことによって、CHGA の派生ペプチドのマッピングが可能であった。

#### 小課題(3). 正常牛と低受胎牛における CHGA およびその派生ペプチド産生動態の比較

酪農場の搾乳牛を対象として、子宮灌流液を採取して灌流液中の CHGA とその派生ペプチドをウェスタンブロットで探索した。灌流液に回収された CHGA タンパク質の量は個体ごとに一定しないために実験の標準化が困難であったが、子宮灌流液中の完全長 CHGA タンパク質とその派生ペプチドの比率を指標として正常牛と低受胎牛の比較を行なったところ、低受胎牛では正常牛に比較して完全長 CHGA タンパク質に対する派生ペプチドの量が少なかった。これは逆の見方をすれば、低受胎牛では完全長 CHGA タンパク質の発現が亢進していたとも考えられた。

実験 1 の成績から、完全長 CHGA タンパク質は CXCL5 の発現亢進を介して炎症反応の成立に関わっており、カテスタチンのプロセッシング部位かその近傍でポリペプチド鎖が切断された派生ペプチドは、血管内皮細胞の増殖を促進することが示された。実験 3 の結果から、低受胎牛では派生ペプチドの産生が低下して、子宮内膜組織の血管新生が停滞している、CHGA 完全長タンパク質の発現亢進によって子宮内に炎症反応が惹起されている、あるいは と の両方の変化が起きている、という 3 つの可能性が示された。

#### まとめ

本研究では、ウシの CHGA の血中動態を検出する手法を開発して妊娠初期の血中動態を明らかにした。また、CHGA の組換えタンパク質を作製してその機能を評価し、完全長 CHGA は炎症の誘発に関わっていることが示唆され、完全長 CHGA が切断されて派生するペプチドのあるものは血管内皮細胞の増殖を促進することが示された。これまでの文献による報告では、マイクロアレイ法を用いた研究では低受胎牛に CHGA の発現が低く、プロテーム解析を用いた研究では低受胎牛に CHGA の発現が高いという一見矛盾した成績が得られている。本研究の成績から CHGA の低発現は血管新生作用のある派生ペプチドの産生低下につながり、受胎性に負のインパクトを与えることが想像された。その一方で、CHGA タンパク質の高発現は過剰な炎症反応に繋がることを示唆され、これも受胎性に負のインパクトを与えることが想像される。よって、一見矛盾するよう見えるマイクロアレイとプロテーム解析の結論は、実は大きな齟齬のない研究成果であると思われた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito C, Ido-Matsumoto H, Kumazaki H, Kubo T, Kanazawa T, Takahashi T.	4. 巻 92
2. 論文標題 Development of enzyme immunoassay for chromogranin A (CgA) and profiling of plasma CgA concentrations in the cow	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anim Sci J.	6. 最初と最後の頁 e13542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13542.PMID: 33723871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aizu M, Ido-Matsumoto H, Wada N, Kumazaki H, Kubo T, Kanazawa T, Izaike Y, Takahashi T.	4. 巻 91
2. 論文標題 Development of the Timed Re-Insemination (TRI-synch) program re-inseminating 24 days after the initial service in dairy cows	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anim Sci J.	6. 最初と最後の頁 e13477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13477.PMID: 33372383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Awad M, Kizaki K, Ishiguro-Oonuma T, Takahashi T, Hashizume K.	4. 巻 56
2. 論文標題 Secreted protein of Ly6 domain 1 enhanced bovine trophoblastic cell migration activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vitro Cell Dev Biol Anim.	6. 最初と最後の頁 827-831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11626-020-00521-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kikuchi M, Kizaki K, Shigeno S, Toji N, Ishiguro-Oonuma T, Koshi K, Takahashi T, Hashizume K.	4. 巻 68
2. 論文標題 Newly identified interferon tau-responsive Hes family BHLH transcription factor 4 and cytidine/uridine monophosphate kinase 2 genes in peripheral blood granulocytes during early pregnancy in cows.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Domest Anim Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 64-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.domaniend.2019.01.006.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎紗也加、水田晴也、栗原雅子、児島珠由、高橋 透
2. 発表標題 人工授精後5日から19日までのプロゲステロン徐放財の腔内留置が乳牛の受胎性に及ぼす効果
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本繁殖生物学会（編）分担共著	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 351
3. 書名 繁殖生物学 改訂版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------