

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32669
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：19K15966
研究課題名（和文）発情行動発現の新たな制御機構の解明：新規エストロゲン応答ペプチドに着目して

研究課題名（英文）Elucidation of a new regulatory mechanism for the regulation of female sexual behavior: Focusing on novel estrogen-responsive peptides

研究代表者

渡辺 雄貴 (Watanabe, Youki)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：50781788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではメスの発情行動を制御する神経メカニズムを解明するため、発情行動制御に極めて重要な神経核である視床下部腹内側核において、エストロゲン受容体（ER）と共役する遺伝子の網羅的解析から発情行動を制御する候補因子を絞った。それら候補因子の遺伝子発現に及ぼすエストロゲンの影響を定量型PCR法を用いて解析し、ニューロペプチドB（NPB）をコードする遺伝子を最有力候補とした。NPBの受容体遺伝子であるNPBWR1遺伝子のノックアウトラット作出を試みた。5腹のラットに対し、GONAD法を実施し、7匹においてNpbwr1ノックアウト候補ラット（F0）を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ニューロペプチドB（NPB）の脳室内投与は、発情行動制御に関連のあるホルモン、黄体形成ホルモンやプロラクチン分泌の分泌を亢進することが明らかとなった。この結果は、生殖機能の中核制御機構の全容解明への一助となりうる。また、本実験では、発情行動発現を制御する因子の同定にまでは至らなかったが、本研究で作出したNpbwr1遺伝子欠損ラットは、今後、NPB-NPBWR1シグナリングが発情行動に及ぼす影響を明らかにするために用いるだけでなく、摂食機能や生殖機能などの生理機能におけるNPB/NPW-Npbwr1の役割を詳細に解明するために有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to unravel the neural mechanism governing estrous behavior in female rats. To achieve this, I focused on identifying potential factors responsible for regulating estrous behavior by conducting an analysis of genes associated with estrogen receptor (ER) in the ventromedial hypothalamus, a crucial nucleus involved in the control of estrous behavior. Among the various candidates, the gene encoding neuropeptide B (NPB) emerged as the most candidate. Utilizing the GONAD technique, we successfully obtained neuropeptide B receptor 1 (Npbwr1) knockout candidate rats (F0) from five pregnant rats, then seven rats exhibiting the desired genetic modification.

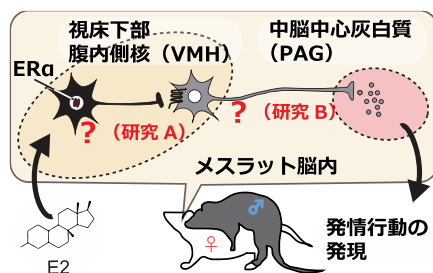
研究分野：神経内分泌

キーワード：ロードシス エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

ウシの受胎率低下は我が国の畜産において早急に解決されるべき喫緊の課題である。家畜受胎率低下要因の一つに、微弱発情や無発情などの発情行動異常が挙げられ、発情行動を発現する脳内機構の解明が強く求められている。発情行動は、発情期に特徴的に観察される行動であり、主に発情期に高まるエストロゲン (E₂) により制御される行動である。

現在までに発情行動の制御メカニズムとして、視床下部腹内側核 (VMH) と中脳中心灰白質 (PAG) を結ぶ神経回路が重要な役割を担っていることが明らかとなっている。VMH を破壊されたラットやネコ、ヒツジでは、発情行動が消失するため、この機構は哺乳類に共通している可能性が高い。発情行動の制御メカニズムに関する研究は、これまで VMH や PAG の神経核刺激や破壊による研究が主流であり、発情行動を担う責任脳領域を「神経核」単位ではなく、「ニューロン種」単位にまで言及した研究はない。つまり、哺乳類に共通した発情行動発現の鍵を担う責任細胞の特定という最も重要な課題が解明されていない。また、先行研究により、①VMH 内のエストロゲン受容体 α (ERα) が発情行動には必須であること、②VMH から PAG に投射する細胞には ERα は発現していないことが報告されている。こうした背景のもと、発情行動を発現するメカニズムとして、図 1 の A と B の 2 種類のニューロンによる神経制御機構が推定される。しかし、その局所回路は未だ不明であった。



2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類メスに共通する発情行動の発現を担う神経内分泌メカニズムを明らかにすることである。具体的には、A: 視床下部 VMH において ERα を有する発情行動の発現を担うニューロン種の同定、および B: VMH 内で A の細胞と神経連絡し、PAG に軸索を延ばすニューロン種の同定により、VMH を介した発情行動を担う神経ネットワークの解明を目指した。

3. 研究の方法

(実験 1)

VMH に局在する ERα と共役する遺伝子を同定するために、ERα 抗体を用いた ChiP-seq をおこなった。そのうち、候補因子として 7 個の遺伝子について発現解析をおこなった。発情行動を確実に誘起するモデルである、卵巣除去 (OVX) 後に高濃度 E₂ チューブを 1 週間皮下に留置したラットと、対象群として OVX のみをおこなった個体を用意した。それぞれのラットの VMH 領域を切り出し、RNA 抽出後、cDNA 合成をおこなった。得られた cDNA をテンプレートにし、7 つの候補遺伝子について qPCR をおこなった。

(実験 2)

ニューロペプチド B (NPB) の脳室内投与をおこない、発情行動制御との関連のある二つのホルモン、黄体形成ホルモン (LH) とプロラクチン (PRL) 分泌に及ぼす NPB の影響を明らかにしようとした。実験には、OVX と、OVX 後に発情休止期レベルの E₂ を投与したラットを用意した。

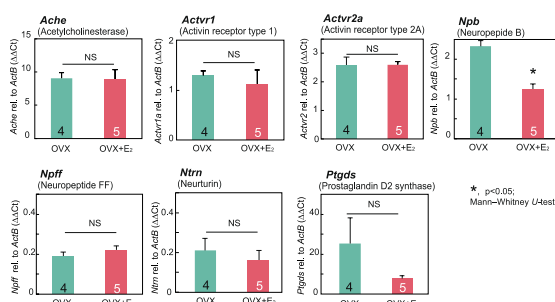
(実験 3)

NPB の受容体遺伝子である NPBR1 のノックアウトラット作出をおこなった。ノックアウトラットの作出には、Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (GONAD) 法を用いた。ラット Npbwr1 のエクソン 1 領域にガイド RNA を設計し、TracrRNA、Cas9 タンパク質とともに受精卵が存在する卵管膨大部に注入した。その後、エレクトロポレーションをかけ、受精卵に CRISPR/Cas9 を導入した。

4. 研究成果

(実験 1)

VMH 周辺の cDNA サンプルを用いて、7 つの候補因子について qPCR をおこなったところ、ニューロペプチド B をコードする遺伝子 (Npb) が、OVX 後に高濃度 E₂ 処置を一週間おこなった個体において OVX 個体よりも有意に遺伝子発現が抑えられたことから、NPB を最有力候補



とした。

(実験 2)

実験 1 の結果から、最有力候補因子となった NPB の中枢投与による影響を明らかにしようとした。脳室内に NPB を投与した結果、発情行動との関連がある LH と PRL 分泌の一過性の亢進がみられた。以上の結果より、NPB は脳内において、LH と PRL 分泌を亢進する働きがあることが示唆された。

(実験 3)

NPB の発情行動への影響や、生理的役割を明らかにするために、NPB の受容体遺伝子 *Npbwr1* のノックアウトラット作出を試みた。5 腹のラットに対し、GONAD 法を実施し、合計 30 匹の産子が得られた。得られたすべての産子の DNA 中の *Npbwr1* 配列を増幅し、DNA シーケンシングにより変異レベルを確認した。その結果、7 匹において単一の 20 数塩基の欠損がみられ、両アレルでのノックアウト候補ラットが得られた。これら 7 匹のうち 3 系統に絞り、それぞれ野生型との交配により F1 を作出した。現在は、F1 同士の掛け合わせにより F2 世代を作出している。F2 世代で得られる予定の *Npbwr1* ホモノックアウトラットを用い、発情行動への影響を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Marimo, Minabe Shiori, Sakono Takahiro, Magata Fumie, Nakamura Sho, Watanabe Youki, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko, Matsuda Fuko	4. 巻 162
2. 論文標題 Morphological Analysis of the Hindbrain Glucose Sensor-Hypothalamic Neural Pathway Activated by Hindbrain Glucoprivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqab125	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 WATANABE Youki, IKEGAMI Kana, NAKAMURA Sho, UENOYAMA Yoshihisa, OZAWA Hitoshi, MAEDA Kei-ichiro, TSUKAMURA Hiroko, INOUE Naoko	4. 巻 66
2. 論文標題 Mating-induced increase in <i>Kiss1</i> mRNA expression in the anteroventral periventricular nucleus prior to an increase in LH and testosterone release in male rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 579 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-067	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 Goto Teppei, Hirabayashi Masumi, Watanabe Youki, Sanbo Makoto, Tomita Koichi, Inoue Naoko, Tsukamura Hiroko, Uenoyama Yoshihisa	4. 巻 161
2. 論文標題 Testosterone Supplementation Rescues Spermatogenesis and In Vitro Fertilizing Ability of Sperm in <i>Kiss1</i> Knockout Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqaa092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqaa092	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 Ieda Nahoko, Assadullah, Minabe Shiori, Ikegami Kana, Watanabe Youki, Sugimoto Yusuke, Sugimoto Arisa, Kawai Narumi, Ishii Hirotaka, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko	4. 巻 67
2. 論文標題 GnRH(1-5), a metabolite of gonadotropin-releasing hormone, enhances luteinizing hormone release <i>via</i> activation of kisspeptin neurons in female rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 409 ~ 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0444	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 IKEGAMI Kana, GOTO Teppei, NAKAMURA Sho, WATANABE Youki, SUGIMOTO Arisa, MAJARUNE Sutisa, HORIHATA Kei, NAGAE Mayuko, TOMIKAWA Junko, IMAMURA Takuya, SANBO Makoto, HIRABAYASHI Masumi, INOUE Naoko, MAEDA Kei-ichiro, TSUKAMURA Hiroko, UENOYAMA Yoshihisa	4. 巻 66
2. 論文標題 Conditional kisspeptin neuron-specific <i>Kiss1</i> knockout with newly generated <i>Kiss1</i> -floxed and <i>Kiss1</i> -Cre mice replicates a hypogonadal phenotype of global <i>Kiss1</i> knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 359 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-026	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 Minabe Shiori, Sato Marimo, Inoue Naoko, Watanabe Youki, Magata Fumie, Matsuda Fuko, Uenoyama Yoshihisa, Ozawa Hitoshi, Tsukamura Hiroko	4. 巻 160
2. 論文標題 Neonatal Estrogen Causes Irreversible Male Infertility via Specific Suppressive Action on Hypothalamic Kiss1 Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1223 ~ 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2018-00732	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 Ieda Nahoko, Assadullah, Minabe Shiori, Ikegami Kana, Watanabe Youki, Sugimoto Yusuke, Sugimoto Arisa, Kawai Narumi, Ishii Hirotaka, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko	4. 巻 -
2. 論文標題 GnRH(1-5), a metabolite of gonadotropin-releasing hormone, enhances luteinizing hormone release <i>via</i> activation of kisspeptin neurons in female rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 EJ19-0444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0444	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 Kana Ikegami, Teppei Goto, Sho Nakamura, Youki Watanabe, Arisa Sugimoto, Sutisa Majorune, Kei Horihata, Mayuko Nagae, Junko Tomikawa, Takuya Imamura, Makoto Sanbo, Masumi Hirabayashi, Naoko Inoue, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura, Yoshihisa Uenoyama	4. 巻 -
2. 論文標題 Conditional Kisspeptin Neuron-Specific Kiss1 Knockout With Newly Generated Kiss1-floxed and Kiss1-Cre Mice Replicates a Hypogonadal Phenotype of Global Kiss1 Knockout Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of reproduction and development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺雄貴、岩田衣世、小澤一史
2. 発表標題 Neuropeptide Bの脳室内投与による黄体形成ホルモンの分泌増加作用
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺雄貴、美辺詩織、岩田衣世、小澤一史
2. 発表標題 ニューロペプチドBがメスラットのプロラクチン分泌に及ぼす影響
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺雄貴、美辺詩織、岩田衣世、小澤一史
2. 発表標題 メスラットのプロラクチン分泌に及ぼす エストロゲン非依存的なニューロペプチドBの効果
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 総監修者 鈴木浩悦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 学窓社	5. 総ページ数 906
3. 書名 原書13版 デュークス獣医生理学	

〔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
---------	---------