

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15650

研究課題名（和文）Tac1ニューロンによる哺乳類の発情行動制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）The study on the central neural mechanism of female estrous behavior controlled by Tac1 neurons

研究代表者

中村 翔（Nakamura, Sho）

名古屋大学・アジアサテライトキャンパス学院(農)・特任准教授

研究者番号：50829223

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）：本研究は、雌の発情行動の神経メカニズムを解明することを目的にTac1ニューロンに着目して実施した。交尾の際に雌ラットの脳内で活性化される領域を検索したところ、腹内側核、扁桃核、乳頭体前核、分界条床核におけるTac1ニューロンが交尾刺激により活性化された。ゲノム編集によりTac1 KOラットを作製し、交尾行動の表現系解析を行ったが、KOラットにおいて発情行動に変化は認められなかった。以上により、Tac1ニューロンは雌の発情行動に関与し、なんらかの役割を担うことが示唆された。今後は、コンディショナルKOモデルを作出することによりTac1の機能について検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、発情行動を発現する際に様々な神経核においてTac1ニューロンが活性化することが示唆された。哺乳類の繁殖が成立するには、動物の生理状態に応じて生殖内分泌系と発情行動が協調的に制御されることが重要である。家畜の生産現場では、人工授精時の初回受胎率の低下が深刻な問題となっている。牛の場合、人工授精のタイミングは発情行動の発見をもって決定されるため、微弱な発情行動や排卵していても発情行動を示さないサイレントヒートなどの繁殖障害は人工授精の適期を逃す要因となり問題となっている。発情行動を制御する神経メカニズムが明らかになれば、発情行動の異常に起因する繁殖障害の解決が可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focused on Tac1 neurons with the aim of elucidating the neural mechanisms of female estrous behavior. We searched for regions in the female rat brain that are activated during mating, and found that Tac1 neurons in the VMHvl, MePD, PMv, and BNSTpm were activated by mating stimuli. Phenotypic analysis of estrous behavior in Tac1 KO female rats generated by genome editing with CRISPR-Cas9 showed no change in mating behavior in the KO rats. These results suggest that Tac1 neurons play some role in female estrous behavior. In the future, it would be necessary to investigate the function of Tac1 by generating a conditional Tac1 KO model.

研究分野：神経内分泌がく

キーワード：発情行動 ロードシス Tac1 交尾刺激

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の妊娠が成立するには、個体の生理状態に応じて内分泌機能と発情行動が協調的に働くことが重要である。雌では発情期に成熟卵胞から大量のエストロジェンが分泌されることで、視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の一過性の大量放出 (サージ) と、それに伴う下垂体からの黄体形成ホルモンサージが誘起され、排卵が起こる。このとき、雌は雄を受け入れる発情行動を示し、妊娠可能となる。牛の畜産現場では人工授精のタイミングは発情行動の発見をもって決定される。そのため、微弱な発情行動や排卵していても発情行動を示さないサイレントヒートなどの繁殖障害は人工授精の適期を逃す要因となり問題となっている。発情行動を制御する神経メカニズムを明らかにすれば、発情行動の異常に起因する繁殖障害の根本的な解決が可能になると期待される。

本研究では、発情行動の詳細が研究されてきたラットをモデル動物として用いる。発情した雌ラットは雄のマウンティング刺激に対して脊柱を湾曲させるロードシスという特徴的な発情行動を示す。ロードシスの発現に重要な脳領域として視索前野、分界条床核、腹内側核、扁桃体、乳頭体、中脳中心灰白質等が知られているが、それらの領域のどのようなニューロンがどのような経路で発情行動を調節しているのかは未だ不明なままである。そこで申請者は、ラットが発情行動を示した際に興奮するニューロンを神経細胞の活性化マーカーである c-Fos を指標に探索し、それらの脳領域において発現する神経伝達物質と c-Fos の共染色を行うことにより、発情行動制御に関与するニューロンを同定しようと試みた。Tac1 遺伝子は選択的スプライシングにより神経ペプチドであるサブスタンス P (SP) あるいはニューロキニン A (NKA) を産生する。Tac1 遺伝子は複数の脳領域に発現しており、行動、内分泌、情動、疼痛などその機能は多岐にわたる。これまでに SP の中枢投与はラットのロードシスを促進させる (Dornan *et al.*, 1986) ことが報告されてきたが、どの領域の Tac1 ニューロンが発情行動において重要かは明らかにされていなかった。Tac1 ニューロンの分泌する神経ペプチドは情動行動・内分泌調節に機能することが知られるが、発情行動との関係は明らかでない。効率的な家畜繁殖のためには、家畜の発情を正確に把握し、交配や人工授精を行うことが重要である。発情行動は、種を越えて存在する共通の生理現象であることから、本研究成果は、家畜の発情行動・繁殖障害の理解に、Tac1 ニューロンを介した神経調節という新たな観点を提供することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Tac1 ニューロンの神経ネットワークに着目し、雌における発情行動の神経メカニズムを解明することである。これまで動物の発情行動について多くの研究が行われてきたが、その詳細は依然として不明である。本研究は、発情行動を制御する新規の因子として、前腹側室周囲核、分界条床核、腹内側核、扁桃体、乳頭体前核の Tac1 ニューロンに着目し、各領域の Tac1 ニューロンの発情行動における機能を解明し発情行動を制御する新たな神経メカニズムを明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

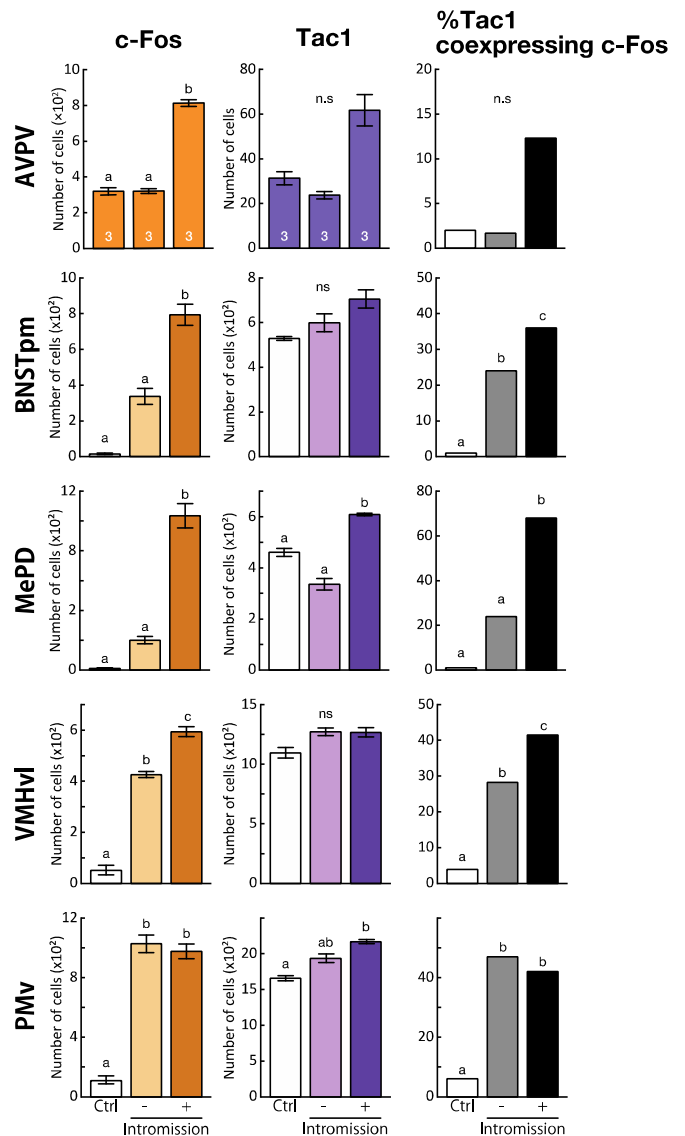
本研究では、発情行動の神経メカニズムを解明することを目的に、卵巣摘出後に高濃度のエストロジェンを負荷した発情前期モデル雌ラットを用いた。17時から1時間雄ラットと同居させ、雌の発情行動を記録した。その後、4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定し脳を摘出した。凍結切片を作成し、ニューロンの活性化マーカーである c-Fos タンパク質の免疫組織化学およ

び Substance P をコードする *Tac1* 遺伝子の *in situ* hybridization による二重染色を実施し、前腹側室周囲核 (AVPV)、分界条床核 (BNSTpm)、扁桃体背内側核 (MePD)、腹内側核腹外側野 (VMHvl)、腹側前乳頭核 (PMv) における c-Fos 陽性細胞数、*Tac1* 陽性細胞数を計測した。雄と同居させない対照群、雄と同居させるが陰茎の挿入を伴わない群、雄と同居させ通常の交尾をさせる群の 3 群を用意した。さらに、発情行動における *Tac1* ニューロンの機能を解析するために rGONAD 法を利用したゲノム編集に *Tac1* KO ラットを作製し、発情行動を解析した。

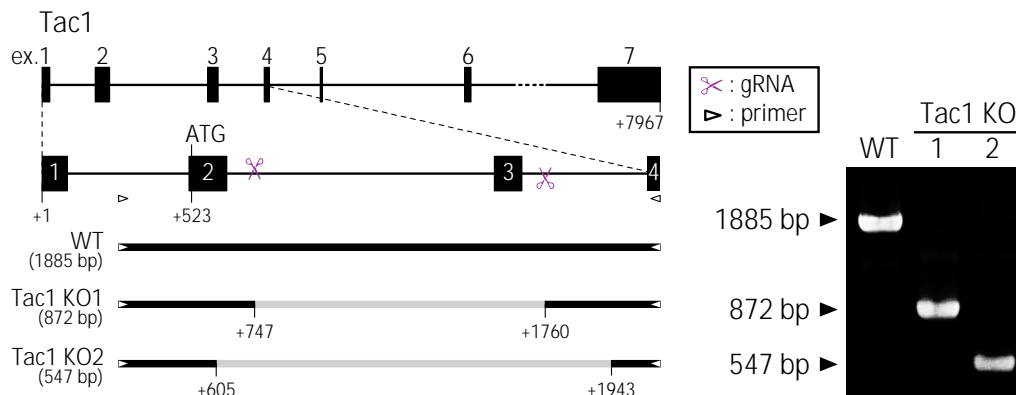
#### 4. 研究成果

発情に関連する脳領域である前腹側室周囲核 (AVPV)、分界条床核 (BNSTpm)、扁桃体背内側核 (MePD)、腹内側核腹外側野 (VMHvl)、腹側前乳頭核 (PMv) において *Tac1* 陽性細胞数、c-Fos 陽性細胞数をカウントし、c-Fos 陽性の *Tac1* ニューロンの割合を算出した。BNSTpm、MePD において雄ラットの陰茎挿入によって有意に c-Fos 陽性細胞数が増加することが明らかになった。MePD においては陰茎の挿入によって c-Fos 陽性の *Tac1* ニューロンの割合が有意に増加したことから、陰茎挿入のシグナルを MePD *Tac1* ニューロンが仲介していると考えられる。また、VMHvl 及び PMv においては陰茎の挿入によらず c-Fos 陽性細胞数が対照群と比較して有意に増加していた。また、同領域の *Tac1* ニューロンも同様に陰茎の挿入によらず対照群と比較して有意に活性化した割合が増加していたことから、これらの領域の *Tac1* ニューロンは発情行動を示す過程で何らかの機能を有すると考えられる。また、AVPV については陰茎挿入によってのみ c-Fos 陽性細胞数が増加したが、*Tac1* ニューロンとの共存はほとんど認められず、異なるニューロンが陰茎による刺激によって活性化したと考えられる。以上の結果より、VMHvl 及び PMv の *Tac1* ニューロンはオスのマウンティングに対して反射的に起こるロードシスを示す過程で何らかの役割を有することが示唆された。また、BNSTpm 及び MePD の *Tac1* ニューロンは雄の陰茎による刺激によるシグナルを仲介することが示唆された。

次に、*Tac1* ニューロンの発情行動における役割を明らかにするため、*Tac1* 遺伝子を欠損させた *Tac1* KO ラットを作製し、表現型解析を行った。卵管に直接 Cas9 及び gRNA を注入し絵レクトロポレーションによって受精卵にゲノム編集を誘導する rGONAD 法を用いて、*Tac1* KO ラットを作出した。遺伝子型解析の結果、エクソン 3 を含む 1013 bp を欠損した *Tac1* K01 エクソン 2 の一部とエクソン 3 を含む 1338 bp を欠損した *Tac1* K02 の 2 系統を得た。これらの *Tac1* KO ラットにおいて SP に対する免疫組織科学を実施したが免疫陽性細胞は認められなかった。また、成長曲線及び膣開口を指標とした性成熟のタイミングに野生型との違いは認められず、性周期



も回帰していた。10-12 週齢において卵巢を摘出し、高濃度のエストロジェンを負荷して雄と同居させたところ、野生型と同様にオスのマウンティングに対し明瞭なロードシスを示し、ロードシス商に有意な差は認められなかった。



本研究により、*Tac1* ニューロンが発情行動に関わる多くの神経核において活性化していたことから、*Tac1* ニューロンは哺乳類の交尾の過程で何らかの役割を担っている可能性が高いと考えられる。様々な脳領域における *Tac1* ニューロンが発情行動の発現そのものに関与する場合に加え、オスの陰茎による刺激に対して反応することが明らかになった。これらの脳領域ごとの *Tac1* ニューロンの機能を明らかにするためには、神経核限定的に *Tac1* 遺伝子を KO する方法や、光遺伝学や薬理遺伝学を用いた機能解析が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uenoyama Yoshihisa, Inoue Naoko, Nakamura Sho, Tsukamura Hiroko	4. 巻 22
2. 論文標題 Kisspeptin Neurons and Estrogen-Estrogen Receptor Signaling: Unraveling the Mystery of Steroid Feedback System Regulating Mammalian Reproduction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9229 ~ 9229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22179229	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 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 bqab125
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 Nakamura Sho, Watanabe Youki, Goto Teppei, Ikegami Kana, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko	4. 巻 64
2. 論文標題 Kisspeptin neurons as a key player bridging the endocrine system and sexual behavior in mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 100952 ~ 100952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yfrne.2021.100952	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, Watanabe Youki, Nakamura Sho, Goto Teppei, Inoue Naoko, Uenoyama Yoshihisa, Tsukamura Hiroko	4. 巻 64
2. 論文標題 Cellular and molecular mechanisms regulating the KNDy neuronal activities to generate and modulate GnRH pulse in mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 100968 ~ 100968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yfrne.2021.100968	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 -

1. 著者名 井上直子、中村翔、上野山賀久、束村博子	4. 巻 52
2. 論文標題 キスペプチン受容体・GnRH受容体: キスペプチン - キスペプチン受容体シグナリングによるGnRH分泌制御メカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科 (内分泌・糖尿病・代謝内科)	6. 最初と最後の頁 476-480
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 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 -

1. 著者名 MINABE Shiori, NAKAMURA Sho, FUKUSHIMA Eri, SATO Marimo, IKEGAMI Kana, GOTO Teppei, SANBO Makoto, HIRABAYASHI Masumi, TOMIKAWA Junko, IMAMURA Takuya, INOUE Naoko, UENOYAMA Yoshihisa, TSUKAMURA Hiroko, MAEDA Kei-Ichiro, MATSUDA Fuko	4. 巻 66
2. 論文標題 Inducible <i>Kiss1</i> knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 369 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-164	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura S., Miwa M., Morita Y., Ohkura S., Yamamura T., Wakabayashi Y., Matsuyama S.	4. 巻 74
2. 論文標題 Neurokinin 3 receptor-selective agonist, senktide, decreases core temperature in Japanese Black cattle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Domestic Animal Endocrinology	6. 最初と最後の頁 106522 ~ 106522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.domaniend.2020.106522	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tatebayashi Ryoki, Nakamura Sho, Minabe Shiori, Furusawa Tadashi, Abe Ryoya, Kajisa Miki, Morita Yasuhiro, Ohkura Satoshi, Kimura Koji, Matsuyama Shuichi	4. 巻 104
2. 論文標題 Gene-expression profile and postpartum transition of bovine endometrial side population cells†	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 850 ~ 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioab004	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 Nagae Mayuko, Uenoyama Yoshihisa, Okamoto Saki, Tsuchida Hitomi, Ikegami Kana, Goto Teppei, Majarune Sutisa, Nakamura Sho, Sanbo Makoto, Hirabayashi Masumi, Kobayashi Kenta, Inoue Naoko, Tsukamura Hiroko	4. 巻 118
2. 論文標題 Direct evidence that KNDy neurons maintain gonadotropin pulses and folliculogenesis as the GnRH pulse generator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2009156118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2009156118	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 館林 亮輝, 中村 翔, 北川 悠梨, 加治佐 実希, 市川 怜, 森田 康広, 大蔵 聡, 木村 康二, 松山 秀一
2. 発表標題 ポピドンヨード子宮内投与後のウシ子宮内膜における遺伝子発現変化およびside population細胞の変遷
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村翔
2. 発表標題 雌ラットの発情行動発現時に活性化するニューロンの同定
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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