

機関番号：82112

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21780259

研究課題名 (和文) ウシ妊娠黄体に特異的な生理活性物質の探索とその機能の解明

研究課題名 (英文) Studies on pregnant-specific substances in the bovine corpus luteum

研究代表者

作本 亮介 (SAKUMOTO RYOSUKE)

独立行政法人農業生物資源研究所 生殖機構研究ユニット 主任研究員

研究者番号：20343999

研究成果の概要 (和文)：本研究では、哺乳動物の受胎率の向上に向けた新規技術開発に資する基礎的知見を提供することを目的として、ウシの妊娠黄体ならびに非妊娠黄体間における遺伝子発現の違いを網羅的に解析することで、妊娠黄体に特異的な発現動態を示す生理活性物質の存在を検討するとともに、非妊娠期の黄体や子宮内膜における種々の生理活性物質の機能解明を実施した。これらの結果から、妊娠することで特異的に発現の変化する生理活性物質の存在が示され、ウシにおける非妊娠黄体と妊娠黄体の機能的な違いの一端が明らかになるとともに、腫瘍壊死因子などのサイトカインやプロジェステロンなどのステロイドホルモンが黄体や子宮の機能調節において、妊娠期・非妊娠期を問わず重要な機能を持つことが示された。

研究成果の概要 (英文) : To determine whether pregnant-specific substances are produced in the bovine corpus luteum (CL), this study evaluated the differences of gene and protein expressions between in the pregnant and in nonpregnant CL. Physiological roles of cytokines and steroids in the bovine CL and endometrial functions are also investigated. As a result, gene expressions of several substances such as prostaglandin receptors or tumor necrosis factor (TNF) are more abundant in the pregnant CL. Moreover, cellular localization of TNF and progesterone receptors in the bovine CL and endometrium are clarified in the present study. Thus, the present study provides a new concept in regulating CL and endometrial function in cows.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

家畜を含む多くの哺乳動物では、排卵後の卵胞に形成される黄体が妊娠の成立・維持に必須の内分泌器官として知られている。妊娠が成立しない場合には黄体は速やかに退行（消失）し、次の卵胞発育が回帰することによ

て周期的な生殖周期が営まれる。しかし、妊娠が成立すると黄体は存続し、妊娠維持に必須なステロイドホルモンであるプロジェステロンを分泌し続ける。現在、畜産の生産現場ではウシではほぼ 100%人工授精が行われているが、その受胎率は 40%程度であり、体細

胞クローンに至っては受胎率で十数%、産子として生まれてくるものはわずか数%にすぎない。この受胎率低下の現象について、種々の要因が考えられ研究が進んでいるにもかかわらず、いまだ明確な解決策は見出されていない。このような背景から、受胎率向上に向けた様々な視点からの基礎的研究ならびにそれらの知見を活用した新規技術の開発は必須かつ急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ウシの妊娠黄体ならびに非妊娠黄体間における遺伝子発現の違いを網羅的に解析し、妊娠黄体に特異的な発現動態を示す生理活性物質の存在を検討するとともに、非妊娠期の黄体や子宮内膜における種々の生理活性物質の機能解明を実施することで、哺乳動物の受胎率の向上に向けた新規技術開発に資する基礎的知見を提供することを目的とした。

## 3. 研究の方法

正常な発情周期を示すウシに人工授精した後、妊娠初期 I (人工授精後 20~30 日)、妊娠初期 II (40~50 日)、妊娠後期 (220 日) にて倫理規定に従って屠殺し、妊娠黄体を採取した。同時に、対照として発情周期初期 (排卵後 2~4 日)、中期 (8~11 日)、後期 (14~16 日)、退行期 (19~21 日) の非妊娠黄体 (周期性黄体) ならびに子宮を採取した。採取した黄体および子宮は遺伝子発現解析用、タンパク質発現解析用として定法により処理した。遺伝子発現の比較解析はリアルタイム PCR 法ならびに In situ ハイブリダイゼーション法を用いて行い、タンパク質発現は免疫組織化学染色法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

1) 妊娠黄体と非妊娠黄体での遺伝子発現の違いを比較検討した結果、アポトーシス (プログラムされた細胞死) を誘起することが知られる主要壊死因子 (TNF) や Fas の発現が妊娠黄体では非妊娠黄体と比較して有意に高いことが明らかとなった。一方、TNF 受容体 (TNF-RI、TNF-RII) ならびにアポトーシス抑制因子である cFLIP の発現には、妊娠黄体と非妊娠黄体間で有意な差は見られなかった。

2) 妊娠黄体では、プロスタグランジン (PG) F2 $\alpha$  受容体、PGE 合成酵素の発現が非妊娠黄体と比較して有意に高いことが明らかとなった。さらに、プロゲステロン受容体 (PR)、黄体形成ホルモン受容体、PGE 受容体 (EP1、EP2) 発現には妊娠黄体と非妊娠黄体で発現差が見られないこと、他の動物種や組織と異なりウシ黄体では PGE 受容体 (EP3、EP4) および PG 代謝酵素 (9K-PGR) が存在しない可能性

が示された。

3) 哺乳動物の黄体で生産され、子宮ならびに胎仔発育に影響を与えるプロゲステロンが、黄体自身の機能におよぼす影響を明らかにするため、その特異的受容体の発現について検討した結果、黄体期初期で PR 発現が有意に高いことが明らかとなった (図 1)。

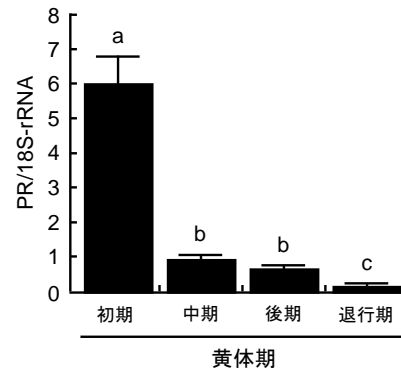


図 1 : ウシ周期性黄体におけるプロゲステロン受容体 (PR) 遺伝子発現の変化。異なるアルファベット間で有意差あり (P<0.01)。

さらに、PR タンパクが大型黄体細胞や小型黄体細胞、血管内皮細胞にも存在することを明らかにした。

4) ウシ黄体における TNF および TNF-RII 遺伝子発現は黄体退行期において、他の周期と比較して有意に高いことが示された。一方、TNF-RI 遺伝子発現に周期による差は認められなかった (図 2)。さらに、TNF、TNF-RI、TNF-RII の黄体における局在が明らかとなり、免疫細胞だけでなく黄体細胞にも TNF とその受容体の存在することが示された。

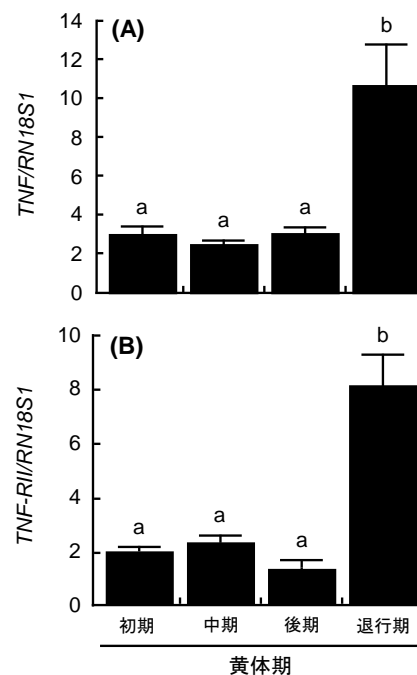


図2：ウシ周期性黄体における(A)腫瘍壊死因子(TNF)、(B)TNF受容体 type II (TNF-RII)遺伝子発現の変化。異なるアルファベット間で有意差あり(P<0.01)。

5) ウシ子宮内膜における TNF、TNF-RI、TNF-RII の遺伝子発現について発情周期に伴う明確な増減は認められなかった。また、TNF の遺伝子ならびにタンパク発現は上皮細胞、腺上皮細胞に認められたが、TNF-RI、TNF-RII 発現は上皮細胞だけでなく、間質細胞でも認められたことから(図3)、上皮細胞で産生された TNF が自己分泌もしくは傍分泌によって子宮内膜の機能を調節していることが示唆された。

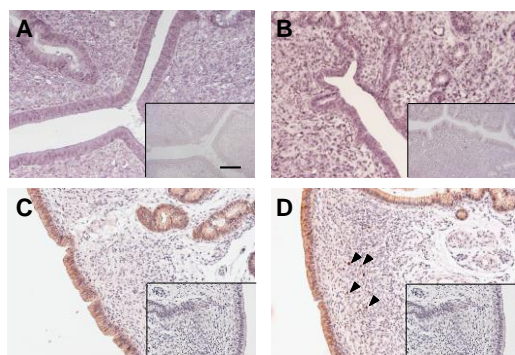


図3：ウシ子宮内膜における遺伝子(A)TNF-RI、(B)TNF-RII、およびタンパク(C)TNF-RI、(D)TNF-RIIの局在。TNF-RIとTNF-RIIの遺伝子並びにタンパクは上皮細胞、間質

#### 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)

1. Sakumoto R, Vermehren M, Kenngott R, Okuda K, Sinowatz F. Changes in the levels of progesterone receptor mRNA and protein in the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Journal of Reproduction and Development* 2010, 56(2), 219-222.
2. Sakumoto R, Ito S, Komatsu T. Possible actions of corticotropin-releasing hormone in regulating porcine corpus luteum function. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2010, 72(9), 1173-1177.
3. Okuda K, Sakumoto R, Okamoto N, Acosta

TJ, Al-z'abi OM, Okada H, Sinowatz F, Skarzynski DJ. Cellular localization of genes and proteins for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), TNF receptor types I and II in bovine endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010, 330, 41-48.

4. Sakumoto R, Vermehren M, Kenngott R, Okuda K, Sinowatz F. Localization of gene and protein expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), TNF receptor types I and II in the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Journal of Animal Science* 2011, in press.

[学会発表] (計3件)

1. Sakumoto R, Okamoto N, Al-z'abi O, Okada H, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Sinowatz F, Okuda K. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is produced by endometrial epithelial cells and affects stromal cell function as a paracrine regulator in cattle. 42<sup>nd</sup> Society for the Study of Reproduction; July, 2009.
2. 作本亮介, Vermehren M, Kenngott RA, 奥田潔, Sinowatz F ウシ周期性黄体における腫瘍壊死因子とその受容体の局在に関する研究 第102回日本繁殖生物学会(近畿大学) 2009年9月
3. 作本亮介, Vermehren M, Kenngott R, 奥田潔, Sinowatz F ウシ周期性黄体におけるプロジェステロン受容体の局在と発現量の変化 第111回日本畜産学会(琉球大学) 2009年9月

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

作本亮介 (SAKUMOTO RYOSUKE)  
(独) 農業生物資源研究所 生殖機構研究  
ユニット・主任研究員  
研究者番号：20343999

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：