

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450372

研究課題名(和文) 乳牛の免疫機能および繁殖性と核・ミトコンドリアのゲノム特性との関連性の検証

研究課題名(英文) Involvement of nuclear and mitochondrial genome on immune function and reproductive performance in dairy cow

研究代表者

清水 隆 (SHIMIZU, TAKASHI)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90375113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Toll様受容体4 (TLR4) およびTLR2は、グラム陰性細菌から放出される内毒素であるリポポリサッカライド(LPS)の受容体である。分娩後の乳牛において、グラム陰性菌である大腸菌の感染により子宮炎や乳房炎などを発症した乳牛では繁殖性が低下することが知られている。本研究では、TLR4の一塩基多型(SNP)と免疫細胞機能および繁殖性との関連を調べ、TLR4の多型が免疫細胞の遊走性、アポトーシスおよびサイトカイン産生能に影響していること、また繁殖性を左右する卵巣機能に影響していることが示された。さらに、TLR2の多型が卵胞構成細胞機能と関係することが示された。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptor 4 (TLR4) and TLR2 are receptor for LPS that is released from gram-negative bacteria. In postpartum dairy cows, inflammation diseases such as metritis and mastitis suppress reproductive performance. The present study is to examine the relationships among SNPs for TLR4 and TLR2 and reproductive performance and immune functions. TLR4 SNP affect the production of cytokine, apoptosis and migration of immune cells. In addition, TLR4 SNP affect ovarian function such as ovulation. Moreover, TLR2 SNP influence follicular cell function (steroid production). These data suggest that SNPs for TLR4 and TLR2 are associated with reproductive performance and immune function.

研究分野：生殖科学

キーワード：繁殖性 免疫機能 一塩基多型 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

現代の乳牛は、乳量を主とした育種選抜によって高泌乳化に成功し、年間 9,500Kg の乳生産を行うようになった。しかし、これとは対照的に、乳牛の受胎率や空胎期間など繁殖性が著しく低下している。事実、乳牛の受胎率は平成 5 年に 62%であったのに対し、平成 22 年には 45%と顕著に低下している。このことは、子牛生産の減少に繋がり、酪農経営に影響を及ぼす要因となる。乳牛の受胎率や空胎期間に影響を及ぼす分娩後の卵巣機能の特徴についてみると、泌乳前期の乳生産量が同じであるにも関わらず、分娩後 3 週以内に優勢卵胞が排卵した乳牛では、その後の卵巣機能の回復が早く繁殖性が良好であること、また分娩後に周産期疾病を発症した乳牛では分娩後 3 週以内に排卵が起きにくく卵巣機能の回復の遅いことが報告されている。これらのことは、分娩後の乳牛の免疫機能や卵巣機能の良・不良が受胎率や空胎期間に影響することを示唆しており、疾病に抵抗性をもつ免疫機能や早期に卵巣機能を回復する乳牛を選定することが、繁殖性改善に向けたこれからの乳牛の遺伝的改良に貢献すると考えられる。したがって、乳牛の免疫機能および繁殖性に関係する遺伝的特性に着目し、乳牛の遺伝情報から健康で繁殖性に優れた乳牛の選抜手法を確立する必要がある。そのためには、生理現象に影響を及ぼす遺伝的特性である一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) に着目し、SNP と繁殖性や免疫機能などの生理現象との関連性を調べることは重要である。本研究では、分娩後の細菌感染によって発症する子宮内膜炎や乳房炎など免疫機能に強く関連する Toll-like Receptor-4 (TLR4) と TLR2 の SNP 多型を取り上げ、これらの SNP 多型と乳牛の疾病罹患および白血球における免疫細胞の機能 (免疫機能) との関連性を検証することに加え、空胎期間や早期卵巣機能回復などの繁殖性との関連性も検証すること、また繁殖性に影響する卵胞構成細胞のステロイドホルモンの分泌動態と TLR-4 および TLR2 の SNP 多型との関連性を細胞レベルで解析することにより、乳牛の繁殖性改善に向けた遺伝的改良における核ゲノムおよびミトコンドリアゲノムの SNP 多型の複合的活用を着想した。

2. 研究の目的

近年、乳牛の高泌乳化が進んだが、対照的に繁殖性の低下や疾病罹患率の増加が問題となっている。酪農経営では、乳牛の泌乳能力が向上しても繁殖性が低下すれば、生産性の改善効果が低くなる。したがって、これからは乳量を維持し、健康で繁殖性の高い乳牛が求められることから、乳牛の免疫機能および繁殖性に関連する遺伝的特性に着目し、乳牛の遺伝

情報から健康で繁殖性に優れた乳牛の選抜手法を確立する必要がある。そこで、本研究では免疫機能関連因子の遺伝的多型と疾病罹患や繁殖性との関連性を明らかにするとともに、免疫細胞および卵胞構成細胞の機能との関連性も検証することで、次世代高泌乳牛の遺伝的特性の方向性を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、本学フィールド科学センターで飼育されている分娩後の乳牛 (100 頭, 305 日乳量が 9,000Kg) を利用し、尾静脈から採血を行う。白血球から DNA を抽出し、TLR-4 の SNP 解析には PCR-制限酵素切断断片長多型法 (RFLP) を用い、各個体の TLR-4 の SNP 多型を同定した。繁殖性については、分娩日を 0 日とし、分娩 3 週および 4 週目に尾静脈から採血を行い、早期初回排卵の有無の指標として排卵後の黄体から分泌されるプロゲステロン (P4) を酵素免疫化学法 (EIA) により測定した。分娩後 3 週あるいは 4 週目で血中 P4 濃度が 1 ng/ml を超えた乳牛を「早期初回排卵あり」とし、超えなかった乳牛を「早期初回排卵なし」と定義した。さらに、初回人工授精日、人工授精回数および空胎期間などを算出し、TLR-4 の SNP 多型との関連性を解析した。

(2) 免疫細胞の機能として白血球の遊走性、アポトーシスおよびサイトカイン産生能と TLR-4 の SNP 多型との関連性を解析するため、乳牛の生理状態が比較的安定している泌乳後期の乳牛を用い、免疫細胞の状態が恒常的であるときの機能を SNP 多型間で比較検討する。TLR-4 の SNP 多型の違いにより細胞内へのシグナル伝達の強度の違いを明確化するため、TLR-4 のリガンドである LPS を添加し、白血球の遊走能、アポトーシスおよびサイトカイン産生能と TLR-4 の SNP 多型との関連を解析した。

(3) TLR-4 の SNP 多型と細胞機能を詳細に解析するためには、使用した細胞の SNP 多型が明確になっていなければならない。そこで、1 つの卵巣に存在する大卵胞から卵胞膜細胞を採取し、ゲノム解析に耐え得る少量の細胞を用いて TLR-4 の SNP 多型を迅速に決定し、残りの細胞を培養する方法を確立した。この方法を用いて、TLR-4 の SNP 多型と卵胞膜細胞の機能との関連を解析した。

4. 研究成果

(1) TLR4 の SNP 解析において、TLR4 のイントロン領域とエキソン 3 領域に存在する SNP をそれぞれ同定した。繁殖性の指標でもあり卵巣機能回復の指標である分娩後の初回排卵の有無において、TLR4 のイントロン領域の SNP およびエキソン 3 領域の SNP のいずれの SNP 多型は初回排卵の有無と関

連性は認められなかった (Table 1)。空胎日数および人工授精回数についてみると、TLR 4 のエキソン 3 領域の SNP に関連性が認められた (Table 2)。

Table 1 Association of the TLR4 polymorphisms with resumption of ovulation in cows postpartum

| Factor | Genotypes | No. of ovulatory cows | No. of anovulatory cows | Ovulatory ratio (%) | P-value |
|-------------|-----------|-----------------------|-------------------------|---------------------|---------|
| TLR4 intron | A/A | 50 | 61 | 45.0 | P=0.79 |
| | A/G | 30 | 45 | 40.0 | |
| | G/G | 7 | 9 | 43.8 | |
| TLR4 exon3 | T/C | 21 | 36 | 36.8 | P=0.27 |
| | C/C | 61 | 73 | 45.5 | |

Table 2 Association of the TLR4 polymorphisms with the number of artificial insemination (AI) and days open

| Factor | Genotypes | No. of AI ¹ | P-value | Days open (days) | P-value |
|-------------|-----------|-------------------------------|---------|---------------------------------|---------|
| TLR4 intron | A/A | 2.2 ± 0.2 (n=72) | P=0.32 | 136.0 ± 9.3 (n=72) | P=0.36 |
| | A/G | 1.8 ± 0.2 (n=33) | | 115.3 ± 10.6 (n=33) | |
| | G/G | 1.9 ± 0.4 (n=11) | | 119.5 ± 15.6 (n=11) | |
| TLR4 exon3 | T/C | 1.6 ± 0.2 (n=26) ^a | P=0.048 | 100.7 ± 6.9 (n=26) ^a | P=0.029 |
| | C/C | 2.2 ± 0.2 (n=79) ^b | | 136.5 ± 9.0 (n=79) ^b | |

(2) 免疫細胞機能については、繁殖性に関連性の認められた TLR4 のエキソン 3 領域の SNP に関して検討した。アポトーシスについて、C/C 型は T/C 型に比べアポトーシスの出現率が高かった (図 1)。

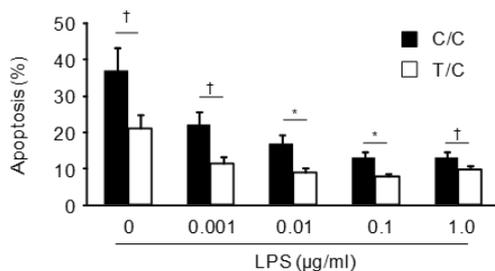


図 1 TLR4 の SNP 多型と免疫細胞のアポトーシス出現率

遊走性に関しては、免疫細胞の遊走因子であるインターロイキン 8 を添加した培地を用いて遊走性を惹起し、TLR4 のエキソン 3 領域の SNP との関連を調べた。その結果、C/C 型に比べ T/C 型で遊走性が高い傾向のあることが分かった (図 2)。

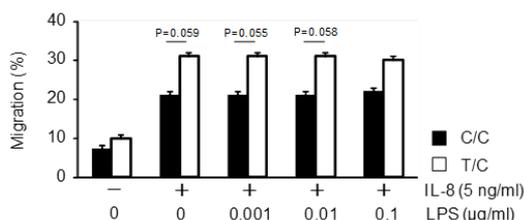


図 2 TLR4 の SNP 多型と免疫細胞の遊走性能力

免疫細胞のサイトカイン産生能を検討するため、インターロイキン 1 (IL-1) の遺伝子発現およびタンパク産生量を調べた。免疫細胞における IL-1 の遺伝子発現は、TLR4 のエキソン 3 領域の SNP 間で有意な差は認められなかった。しかしながら、IL-1 の産生量を見てみると、C/C 型に比べ T/C 型で産生量が高い傾向が認められた (図 3)。

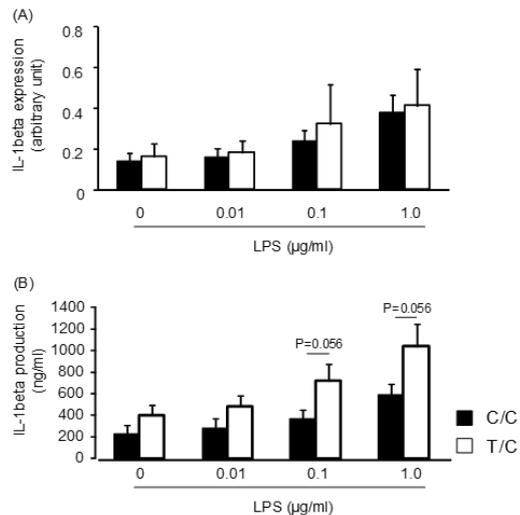


図 3 TLR4 の SNP 多型と免疫細胞の IL-1β の遺伝子発現 (A) および産生量 (B)

以上の結果から、T/C 型の乳牛が C/C 型に比べ免疫機能が高く、疾病に対する抵抗性を有している可能性が考えられた。

(3) TLR-4 および TLR-2 の SNP 多型と細胞機能を詳細に解析するため、1 つの卵巣に存在する大卵胞から卵胞膜細胞を採取し、ゲノム解析に耐え得る少量の細胞を用いて TLR-4 および TLR-2 の SNP 多型を迅速に決定し、TLR-4 および TLR-2 の SNP 多型と卵胞膜細胞の機能との関連を解析した。卵胞膜細胞の機能であるステロイド産生能力を見やすくするため、LPS 処理を行った。その結果、LPS 処理した卵胞膜細胞のプロジェステロン産生は、TLR-4 の CC 型に比べ CT 型で減少する傾向が認められた (P=0.07)。しかしながら、TLR-2 の SNP 型である TT 型、GT 型および GG 型においては、プロジェステロン産生に有意な差は認められなかった。さらに、TLR2 の野生型である TT 型を基準にして TLR4 の CC 型と CT 型を比較すると、TLR4 の CC 型-TLR2 の GT 型の組み合わせが TLR4 の CC 型-TLR2 の TT 型の組み合わせと比較して、プロジェステロン産生量が有意に低かった。このことは、単一因子の SNP の遺伝子型による細胞機能を判断推定するよりも、複数因子による SNP の遺伝子型の組み合わせによる判断推定のほうが優れていることを示唆している。以上の結果から、本研究で用いた TLR4 の SNP の位置が共役受容体結合部位であることから、C が T に変異することにより共役受容体との結合に異常が生じ、LPS によるシグナル伝達の強度

が、プロゲステロン産生に影響したと考えられる。

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5件)

Shimizu T, Kawasaki Y, Aoki Y, Magata F, Kawashima C, Miyamoto A. Effect of Single Nucleotide Polymorphisms of Toll-Like Receptor 4 (TLR 4) on Reproductive Performance and Immune Function in Dairy Cows. **Biochem. Genet.** 2017 Jun;55(3): 212-222. 査読有
doi: 10.1007/s10528-017-9790-0.

Shimizu, T., Echizenya, R., Miyamoto, A. Effect of lipopolysaccharide during luteinization of granulosa and theca cells in vitro culture **J. Mol. Cell. Toxicol.** 2016 30(4), 206-211. 査読有
doi: 10.1002/jbt.21783.

Magata F, Horiuchi M, Miyamoto A, Shimizu T. Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. **J. Reprod. Dev.** 2014;60(4): 280-287. 査読有

Kawasaki Y, Aoki Y, Magata F, Miyamoto A, Kawashima C, Hojo T, Okuda K, Shirasuna K, Shimizu T. The effect of single nucleotide polymorphisms in the tumor necrosis factor- gene on reproductive performance and immune function in dairy cattle. **J. Reprod. Dev.** 2014;60(3):173-178. 査読有

Magata F, Horiuchi M, Echizenya R, Miura R, Chiba S, Matsui M, Miyamoto A, Kobayashi Y, Shimizu T.

Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. **Anim Reprod Sci.** 2014 Jan 10;144(1-2): 6-13. 査読有
doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.11.005

[学会発表](計1件)

Shimizu T, Horiuchi M, Miyauchi K, Echizenya R, Magata F, Miyamoto A. Effect of endotoxin on ovarian follicle function in domestic animals. International Conference on Biology and Pathology of Reproduction in Domestic Animals (招待講演)(国際学会) 2015年9月26日~30日 Gdansk, Poland

[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

清水 隆 (SHIMIZU Takashi)
帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90375113

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()