

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380154

研究課題名(和文) オプトジェネティクス技術を活用したヤギ卵胞発育制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on a regulatory mechanism of follicular growth in goats by applying optogenetic technology

研究代表者

大蔵 聡 (Ohkura, Satoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20263163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、反芻家畜の卵胞発育を制御する視床下部神経機構の解明を目的とした。まず、ヤギニューロキニンB遺伝子(TAC3)のゲノム構造を解析し、TAC3のプロモーター領域を同定した。ニューロキニンBを含有する視床下部弓状核のKNDyニューロン活性をオプトジェネティクス技術により制御できるヤギを作出するため、アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子導入法とCre-loxPシステムを組み合わせ、KNDyニューロン特異的な光感受性イオンチャネル発現を可能にする技術開発を行った。また、KNDyニューロンがウシ視床下部に存在することを確認し、KNDyニューロンはGnRH分泌を促進的に制御することを示した。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to elucidate the hypothalamic mechanism controlling the follicular growth in ruminants. First, the genome structure of the goat neurokinin B gene (TAC3) and a transcriptional regulatory domain of TAC3 were identified. Second, to generate genetically modified goats which could control the activity of KNDy neurons (neurons contain neurokinin B) in the hypothalamic arcuate nucleus by using an optogenetic technology, we applied the gene introduction method by the adeno-associated virus vector and Cre-loxP system in goats to establish a KNDy neuron-specific expression of light-responsive ion channels. Third, we demonstrated the localization of KNDy neurons in the hypothalamic arcuate nucleus in cows by immunohistochemistry and suggested that KNDy neurons have a key role to stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion, and then follicular growth in ruminants.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：応用動物 神経科学 獣医学 畜産学 GnRH ヤギ キスペプチン ニューロキニンB

## 1. 研究開始当初の背景

(1)畜産分野では、ウシの人工授精後の受胎率低下が国内外を問わず問題となっている。その原因となっている家畜の繁殖障害の治療には、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 製剤や絨毛性性腺刺激ホルモン製剤が長年にわたって使われてきた。これらの薬剤はくり返して投与することで治療効果が低減することが知られている。受胎成績の飛躍的向上のためには、これらの古典的な繁殖用製剤に代わり、卵胞発育から発情・排卵にいたる生理現象のメカニズムの知見に基づく新規な繁殖制御技術や繁殖障害の治療薬剤の開発が必要とされている。

(2)哺乳動物の視床下部弓状核には、神経ペプチドであるキスペプチン (K)/ニューロキニン B (N)/ダイノルフィン (Dy) をすべて含有するニューロン群が存在する。これらは「KNDy ニューロン」と呼ばれ、動物の卵胞発育を制御する重要なニューロン群として注目されている (引用文献)。KNDy ニューロンはパルス状の GnRH 分泌を介して卵胞発育を調節すると考えられるが、その詳細はわかっていない。われわれはニューロキニン B 受容体作動薬の持続投与が、パルス状の黄体形成ホルモン (LH) 分泌を持続的に促進することを明らかにしてきた。このことは、ニューロキニン B がパルス状の GnRH 分泌促進を通じて強力な卵胞発育刺激作用をもつことを示唆している。本研究では、ニューロキニン B またはその作動薬が家畜の繁殖効率化の特効薬となる可能性を秘めていることに着目し、ニューロキニン B による卵胞発育制御メカニズムを解明することを目的とした。

(3)パルス状の GnRH 放出を調節する卵胞発育制御中枢は「GnRH パルスジェネレーター」と呼ばれている。GnRH パルスジェネレーターは家畜の繁殖機能を制御する最上位中枢であるが、その詳細はわかっていない。反芻家畜のモデル動物であるシバヤギでは、視床下部に留置した電極を通じて神経活動を記録することにより、GnRH パルスジェネレーター活動をリアルタイムにモニタリングすることが可能である。われわれは、視床下部弓状核の KNDy ニューロン近傍から周期的な神経活動の上昇が記録でき、それらが LH パルスと同期すること (引用文献) また、ニューロキニン B が GnRH パルスジェネレーター活動を強力に刺激すること (引用文献) を見いだした。これらの成果から、弓状核の KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターであるとの仮説を考えるに至った。

## 2. 研究の目的

(1)上記の背景およびこれまでの研究成果に基づき、本研究では視床下部 KNDy ニューロ

ンによるパルス状 GnRH/LH 分泌刺激作用メカニズムを解明し、ニューロキニン B を利用した新しい繁殖制御剤開発や臨床応用に展開するための基盤的知見を集積することをめざした。具体的には、ニューロキニン B 製剤による卵胞発育刺激効果を解明し、効果的な投与方法を確立すること、また、神経細胞の興奮または抑制を光学的に任意のタイミングで制御できるオプトジェネティクス技術 (引用文献) をヤギに適用し、光感受性イオンチャンネルタンパク質を弓状核の KNDy ニューロン特異的に発現する遺伝子改変ヤギを作成して、KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーター本体であることを直接的に証明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)ヤギ TAC3 ゲノム構造の解析および転写調節メカニズムの解明:

光感受性イオンチャンネルを効果的に発現する DNA コンストラクト設計のため、ニューロキニン B をコードする遺伝子 (TAC3) のヤギにおけるゲノム構造を明らかにした。ヤギ血液から採取したゲノム DNA サンプルを用いて、ゲノムウォーキング法によるゲノム構造の解析を実施した。さらに、神経由来不死化細胞株を用い、ルシフェラーゼアッセイによりヤギ TAC3 プロモーター領域および TAC3 遺伝子転写調節メカニズムを解析した。

(2)KNDy ニューロン特異的に光感受性イオンチャンネルを発現するヤギの作出:

ヤギ TAC3 プロモーター領域の下流に、Cre リコンビナーゼ遺伝子 (Cre) を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、および、光感受性イオンチャンネル (チャンネルロドプシン 2 (ChR2) またはアーキロドプシン (ArchT)) をコードする遺伝子を loxP 配列ではさんだ AAV ベクターを、脳定位固定装置を用いて視床下部弓状核に直接投与し、Cre-loxP システムを利用して KNDy ニューロン特異的に ChR2 および ArchT を発現するヤギを作成することを試みた。

光感受性イオンチャンネル (ChR2 または ArchT) をコードする遺伝子を loxP 配列ではさんだ AAV ベクターを、KNDy ニューロン特異的に Cre リコンビナーゼを発現するヤギ視床下部弓状核に局所投与し、KNDy ニューロン特異的に光感受性イオンチャンネルを発現するヤギを作成することを試みた。そのため、キスペプチン遺伝子 (KISS1) 下流に Cre を組み込んだ KISS1-Cre ノックインヤギの作出をめざし、ゲノム編集技術である TALEN を用いて、Cre がノックインされたヤギ胎子繊維芽細胞の樹立を行った。

(3)光照射ユニットを組み込んだヤギ視床下部神経活動記録法の開発:

光感受性イオンチャンネルを発現させた KNDy ニューロンにおける神経活動を記録し

ながら、任意のタイミングでレーザー光照射を行う手法の開発を行った。シバヤギ視床下部における神経活動記録法は研究代表者らが既に確立している方法(引用文献)を用いた。雌シバヤギを用い、脳定位固定装置を使用して、レーザー光照射用の光ファイバーを組み込んだ神経活動記録用電極を通じて、視床下部弓状核 KNDy ニューロン近傍からの神経活動の記録をめざした。

#### (4)ニューロキニン B 受容体アゴニスト投与による卵巣発育刺激効果の解明:

ウシを用いて、ウシ視床下部弓状核に KNDy ニューロンが存在することを示すために、卵巣期および黄体期にあるウシ視床下部組織を用いて免疫組織化学法によりキスペプチン、ニューロキニン B およびダイノルフィンの局在を検討した。また、ニューロキニン B 受容体アゴニスト (senktide) の末梢投与による LH 分泌および卵巣における卵巣発育におよぼす効果を検証した。

#### 4. 研究成果

##### ヤギ TAC3 ゲノム構造の解析および転写調節メカニズムの解明:

ヤギ血液から採取したゲノム DNA サンプルを用いて、ゲノムウォーキング法によりヤギ TAC3 上流域を解析し、推定翻訳開始点の約 3.4 kb 上流までの塩基配列を取得した。この領域には、エストロジェン受容体、Sp-1、AP-1 など繁殖機能に関与する転写因子の結合部位が多数存在していた。さらに、マウス視床下部由来不死化細胞株、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株、および当研究室で樹立したヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイにより、ヤギ TAC3 の -197~+166 の領域にコアプロモーターが存在することを確認した(図 1)。これらの情

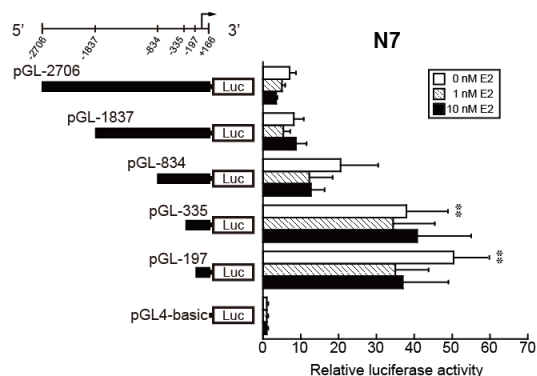


図 1. マウス視床下部由来不死化細胞株 (N7) を用いたルシフェラーゼアッセイによるヤギ TAC3 プロモーター活性の評価。エストロジェン添加の有無にかかわらず、ヤギ TAC3 の -197~+166 の領域による遺伝子発現活性が最も高く、この領域にヤギ TAC3 のコアプロモーターが存在することを示す。報は、KNDy ニューロン特異的な遺伝子改変ヤギの作出に活用することができる。また、ヤギ TAC3 発現の転写調節因子の探索には至

らなかったが、今後それらの同定を引き続き行う。

#### (2) KNDy ニューロン特異的に光感受性イオンチャンネルを発現するヤギの作出:

ヤギ TAC3 プロモーター領域の下流に Cre を組み込んだ AAV ベクターと、ChR2 および ArchT 遺伝子が loxP 配列にはさまれて逆向きに組み込まれた AAV ベクターを視床下部弓状核に直接感染させることにより、弓状核の KNDy ニューロン特異的に ChR2 および ArchT を発現するヤギの作出をめざした。まず、AAV ベクターを用いた遺伝子改変技術を適用するため、ヤギ視床下部への感染に適した AAV 血清型を検討した。4 つの血清型の AAV (AAV-1、2、5、DJ; 生理学研究所・小林憲太博士により作製) をヤギ視床下部に注入したところ、赤色蛍光タンパク質レポーター遺伝子の発現強度から、AAV-1 および AAV-DJ による遺伝子導入効率が高いことを特定した。さらに、ヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株に AAV を感染させたところ、レポーター遺伝子の発現強度から、AAV-2、AAV-5 および AAV-DJ で導入効率が高いことを確認した。以上より、ヤギ KNDy ニューロンへの遺伝子導入には AAV-DJ が最も適していることが確認できた。今後は AAV-DJ を用いて、TAC3 プロモーターの下流に Cre を組み込んだ AAV ベクターおよび ChR2 および ArchT 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターの設計を急ぎ、KNDy ニューロン特異的に ChR2 および ArchT を発現するヤギの作出を行っていく。

KNDy ニューロン特異的に光感受性イオンチャンネルを発現するヤギを作出するため、KISS1 下流に Cre を組み込んだ KISS1-Cre ノックインヤギの作出をめざした。まず、ヤギ KISS1 の終止コドン近傍を切断する TALEN 発現ベクターを設計し、それらをヤギ胎子繊維芽細胞へ導入してゲノムに導入された変異を検出した。その結果、設計した TALEN 発現ベクターによりヤギ KISS1 遺伝子座に欠損が生じており、変異が導入できることが確認できた。次に、ヤギ KISS1 遺伝子座に Cre をノックインするためのターゲティングベクターと、上記の TALEN 発現ベクターを同時にヤギ胎子繊維芽細胞へ導入した。その結果、ヤギ KISS1 遺伝子座へ Cre がノックインされたことを示唆する結果を得た。現在、Cre リコンビナーゼノックイン細胞の単離を進めている。Cre リコンビナーゼノックイン細胞が単離された後、体細胞核移植技術により KISS1-Cre ノックインヤギの作出を行う。

#### (3) 光照射ユニットを組み込んだヤギ視床下部神経活動記録法の開発:

KNDy ニューロン特異的に光感受性イオンチャンネルを発現するヤギ視床下部において、神経活動を記録している領域に限定して

レーザー光を照射するために、光ファイバーを組み込んだ記録用電極の設計を完了した。試作品の完成には至らなかったが、目的のヤギが作出された後にただちに記録実験ができるように、記録用電極の準備を今後早急に行う予定である。

#### (4)ニューロキニン B 受容体アゴニスト投与による卵胞発育刺激効果の解明：

まず、卵胞期および黄体期にあるウシの視床下部組織を採取し、キスペプチンとニューロキニン B、および、キスペプチンとダイノルフィンの二重免疫組織化学を行った。その結果、卵胞期および黄体期にかかわらず、ウシ視床下部弓状核にキスペプチンとニューロキニン B、および、キスペプチンとダイノルフィンを含むニューロン群が存在しており、KNDy ニューロンがウシ視床下部に存在することが確認できた（図 2）。ウシ

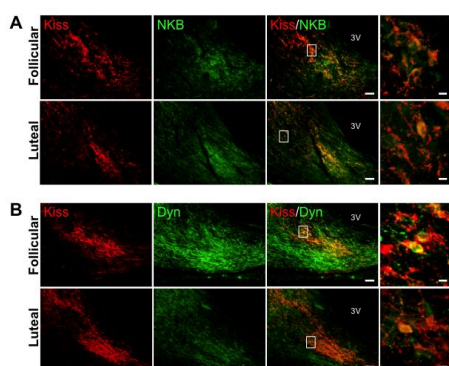


図 2. 卵胞期および黄体期ウシ視床下部弓状核におけるキスペプチン、ニューロキニン B およびダイノルフィンの免疫組織化学。(A) キスペプチン（赤）およびニューロキニン B（緑）の二重免疫染色の代表例。(B) キスペプチン（赤）およびダイノルフィン（緑）の二重免疫染色の代表例。

KNDy ニューロンは、他の動物種と同様にパルス状の GnRH 分泌制御に関与することが考えられた。また、ニューロキニン B 受容体アゴニスト（senktide）の末梢持続投与（4 時間）は、投与開始から 8 時間程度の持続的な LH 分泌促進効果および卵巣における卵胞発育刺激効果を示した。これらの結果から、ウシ生体内において、KNDy ニューロンは GnRH 分泌を促進的に制御しており、その結果、卵胞発育が刺激されることが示唆された。

#### <引用文献>

Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151, 2010, 3479-3489.  
Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda K-I,

Okamura H. Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J. Neuroendocrinol.*, 21, 2009, 813-821.

Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Steiner RA, Okamura H. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci.*, 30, 2010, 3124-3132.

Buchen L. Neuroscience: Illuminating the brain. *Nature*, 465, 2010, 26-28.

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 19 件)

Hassaneen ASA, Naniwa Y, Suetomi Y, Matsuyama S, Kimura K, Idea N, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Matsuda F, Ohkura S. Immunohistochemical characterization of the arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) and preoptic kisspeptin neuronal populations in the hypothalamus during the estrous cycle in heifers. *J. Reprod. Dev.*, 62, 2016, in press. 査読有

Matsuda F, Nakatsukasa K, Suetomi Y, Naniwa Y, Ito D, Inoue N, Wakabayashi Y, Okamura H, Maeda K-I, Uenoyama Y, Tsukamura H, Ohkura S. The luteinising hormone surge-generating system is functional in male goats as in females: involvement of kisspeptin neurones in the medial preoptic area. *J. Neuroendocrinol.*, 27, 2015, 57-65. 査読有

DOI: 10.1111/jne.12235

Yamamura T, Wakabayashi Y, Ohkura S, Navarro VM, Okamura H. Effects of intravenous administration of neurokinin receptor subtype-selective agonists on gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and luteinizing hormone secretion in goats. *J. Reprod. Dev.*, 61, 2015, 20-29. 査読有

DOI: 10.1262/jrd.2014-109

Suetomi Y, Matsuda F, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H, Ohkura S. Molecular cloning and identification of the transcriptional regulatory domain of the goat neurokinin B gene *TAC3*. *J. Reprod. Dev.*, 59, 2013, 463-469. 査読有

DOI: 10.1262/jrd.2013-037

##### 〔学会発表〕(計 4 4 件)

末富祐太・奥田雄大・小林憲太・大蔵 聡・松田二子. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いたヤギ視床下部神経細胞への遺伝子導入法の検討. 第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月 17 日～20 日、宮崎大学 (宮崎県・宮崎市)

舘林亮輝・佐久間哲史・山本 卓・大蔵 聡・松田二子. TALEN を用いたシバヤギ体細胞の *KISS1* 遺伝子改変. 第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月 17 日～20 日、宮崎大学 (宮崎県・宮崎市)

Suetomi Y, Matsuda F, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Ohkura S. Molecular cloning and identification of the transcriptional regulatory domain of the goat neurokinin B gene *TAC3*. International Conference on Biology and Pathology of Reproduction in Domestic Animals, 2015 年 9 月 28 日～30 日, Gdansk (Poland)

加藤雅大・末富祐太・伊藤太祐・佐々木拓弥・難波陽介・三須良介・大石真也・藤井信孝・松田二子・大蔵 聡. ニューロキニン B 作動薬の末梢投与は黒毛和種雌ウシの黄体形成ホルモン分泌および卵胞発育を促進する. 第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 21 日～24 日、帯広畜産大学 (北海道・帯広市)

奥田雄大・松田二子・末富祐太・小林憲太・大蔵 聡. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いたシバヤギ視床下部への遺伝子導入法の検討. 第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 21 日～24 日、帯広畜産大学 (北海道・帯広市)

Suetomi Y, Matsuda F, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Ohkura S. Cloning of full-length mRNA and 5' -upstream DNA sequences of goat *TAC3* and the analysis of its transcriptional regulatory mechanisms. The 46th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2013 年 7 月 22 日～26 日, Montreal (Canada)

〔図書〕(計 2 件)

Okamura H, Tsukamura H, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Maeda K-I. Springer, Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology, 2013, 514 (297-324)

大蔵 聡、インターズー、繁殖生物学、2013、328 (66-83)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 家畜視床下部繁殖中枢由来不死化神経細胞株

発明者: 松田二子、大蔵 聡

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-243719

出願年月日: 平成 27 年 12 月 15 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大蔵 聡 (OHKURA, Satoshi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号: 20263163

(2) 研究分担者

松田 二子 (MATSUDA, Fuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 10608855

(3) 連携研究者

古澤 軌 (FURUSAWA, Tadashi)

農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員

研究者番号: 00343997

大越 勝広 (OHKOSHI, Katsuhiko)

農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員

研究者番号: 00414889

(4) 研究協力者

小林 憲太 (KOBAYASHI, Kenta)

末富 祐太 (SUETOMI, Yuta)

舘林 亮輝 (TATEBAYASHI, Ryoki)

奥田 雄大 (OKUDA, Kazuhiro)

加藤 雅大 (KATO, Masahiro)

ハサニーン アーメド・サド・アーメド (HASSANEEN, Ahmed Saad Ahmed)