

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780276

研究課題名(和文) 妊娠の成立を左右するウシ黄体機能及び構造変化の網羅的解析

研究課題名(英文) Difference in global gene expression profiles in the bovine corpus luteum of the estrous cycle and pregnancy

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・動物生産生理機能研究ユニット・主任研究員

研究者番号：20343999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳動物の受胎率向上や生殖周期制御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、ウシの妊娠成立と維持に必須な内分泌器官である黄体での妊娠に伴う遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。その結果、妊娠することで特異的にウシ黄体で発現が変化する生理活性物質(ケモカインや成長因子、細胞外マトリックス等)を明らかにし、これらの知見をもとにしてケモカイン等の発現をコントロールすることにより、ウシの妊娠成立・維持を人為的に制御する技術開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Functional differences between the corpus luteum (CL) of pregnancy and CL of the cycle in cows were examined. Microarray analysis using a custom-made, 15 K bovine oligo DNA microarray detected 138, 265 and 455 differentially expressed genes in the bovine CL of day 20 to 25, 40 to 45, and 150 to 160 of pregnancy compared with day 10 to 12 (mid-luteal) of the estrous cycle (>2-fold change relative to mid-luteal stage). These up- and down-regulated genes in the CL of pregnancy involved chemokines, growth factor-related proteins, cluster of differentiation molecules, or collagens. The expression of eotaxin, lymphotactin and ENA-78, and their receptors were observed in the CL of pregnancy. Moreover, mRNAs of collagen and fibronectin expression in the pregnant CL were significantly lower than that in the CL of the estrous cycle. Thus, the different gene expression profiles may contribute to functional differences between the CL of pregnancy and the CL of the estrous cycle in cows.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：ウシ 妊娠 黄体 受胎率 繁殖

### 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っ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として知られるプロゲ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%が人工授精によるものであるが、その受胎率は40%前後であり、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に数%に過ぎない。この受胎率低下の現象について、様々な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。一方、ウシの分娩間隔は平成22年で13.3ヶ月（約400日）となっており、平成32年度までに12.5ヶ月（約375日）とすることを目標とした家畜改良増殖目標（平成22年7月：農林水産省）と大きくかけ離れている状況にある。

このような背景から、受胎率向上や分娩間隔の短縮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利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明らかにし、妊娠黄体の形成に必要な不可欠な条件を解明することによって、哺乳動物の受胎率向上と繁殖サイクル（分娩間隔）の短縮に向けた新規技術開発に資する知見を提供することを目的とする。

### 3. 研究の方法

正常な発情周期を示す黒毛和種経産牛を用いて、人工授精後20-25日、40-45日、150-160日目に屠殺し、胚の存在を確認後に黄体を採取した（各n=4）。対照として発情周期10-12日目の非妊娠黄体を採取した（n=4）。採取した黄体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。組織から総RNAを抽出後、15kウシオリゴDNAマイクロアレイにより遺伝子発現を解析し、データマイニングソフトを用いてバイオインフォマティクス解析を行うとともに、リアルタイムPCR法を用いて遺伝子発現量を比較検討した。さらに、タンパク質発現を酵素免疫測定法ならびに免疫組織化学染色法を用いて検討した。

### 4. 研究成果

1)人工授精後20~25日、40~45日、150-160日目の黄体では、発情周期10-12日目の非妊娠黄体と比較して、それぞれ138個、265個、455個の遺伝子発現が変化し、妊娠の経過に伴って変動する遺伝子数が多くなることを明らかにした（図1）。

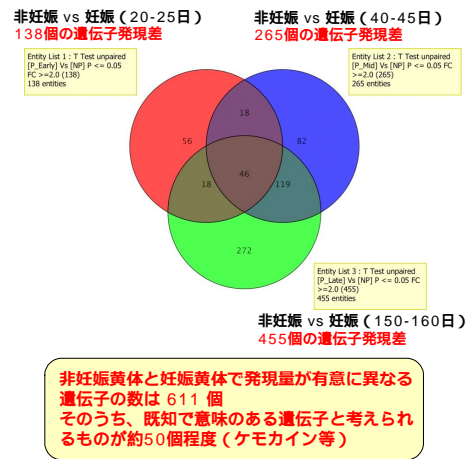


図1：マイクロアレイ解析によるウシ妊娠黄体と非妊娠黄体間の遺伝子発現の違い。

2)これらの遺伝子群の中で特に顕著な発現変化を示す遺伝子を解析した結果、ケモカインの一つであるエオタクシン(CCL11)発現が妊娠の経過に伴い大きく増加することが示された。さらに、リンフォタクチン(XCL1)やENA-78(CXCL5)の遺伝子発現が妊娠により減少することが明らかとなった。また、細胞外マトリックスであるコラーゲンやフィブロネクチンの遺伝子発現が妊娠黄体では有意に低いことが示され、妊娠黄体と非妊娠黄体が構造的に異なる一因であることが示唆された（表1）。

DNAマイクロアレイ解析結果（抜粋）

\*周期性黄体 (D10-12) と比較した発現差

サイトカイン (ケモカイン)	P20-25	P40-45	P150-160
CCL11 (Eotaxin)		223倍	2991倍
XCL1 (Lymphotactin)	7.82倍	10.6倍	16.8倍
CXCL5 (ENA-78)	6.65倍	6.51倍	
CXCL2 (Gro-b)		9.15倍	
細胞外マトリックス			
コラーゲン タイプI			3.10倍
コラーゲン タイプII			2.58倍
コラーゲン タイプIII			2.19倍
コラーゲン タイプIV			2.09倍
コラーゲン タイプVI			3.85倍
コラーゲン タイプXI			2.37倍
コラーゲン タイプXVIII			2.27倍
フィブロネクチン タイプI			3.87倍

表1：ウシ妊娠黄体におけるケモカインと細胞外マトリックスの遺伝子発現の変化。

3) マイクロアレイ解析の結果を踏まえ、リアルタイム PCR を用いて解析を進めた結果、エオタキシン (CCL11)、リンフォタクチン (XCL1)、ENA-78 (CXCL5) とそれぞれの受容体 (CCR3、XCR1、CXCR2) のウシ黄体における遺伝子発現が妊娠に伴い変化することが明らかとなった (図 2)。

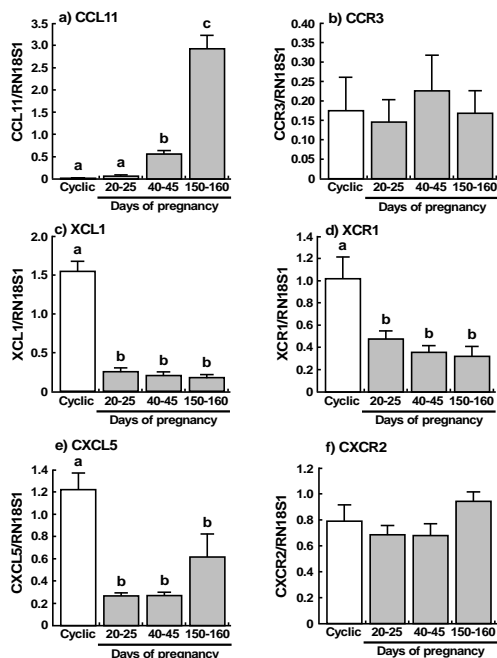


図 2 : ウシ妊娠黄体におけるケモカインとその受容体遺伝子発現の変化。異なるアルファベット間では有意差あり (P < 0.05)。

また、タンパク質レベルでエオタキシン (CCL11) とリンフォタクチン (XCL1) の発現を調べた結果、遺伝子発現と同様にタンパク質発現も変動することが確認された (図 3)。

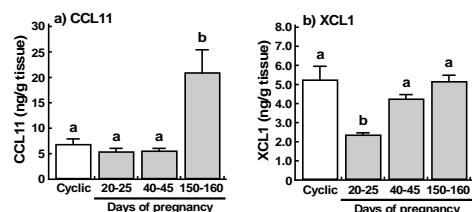


図 3 : ウシ妊娠黄体における a) CCL11 ならびに b) XCL1 タンパク質濃度の変化。異なるアルファベット間では有意差あり (P < 0.05)。

さらに、免疫組織化学染色により、エオタキシン受容体 (CCR3) が黄体細胞で確認され、リンフォタクチン受容体 (XCR1) が黄体細胞と血管内皮細胞で確認されたことから (図

4)、ケモカインが特異的受容体を介して妊娠黄体の機能調節、特に妊娠維持機構に関与する可能性が示された。

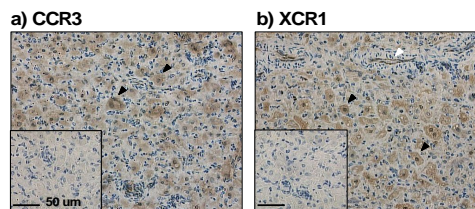


図 4 : ウシ妊娠黄体における a) CCR ならびに b) XCR1 タンパク質の局在。黒矢印は黄体細胞、白矢印は血管内皮細胞を示す。

本研究の結果から、ウシ黄体において、妊娠することにより特異的にその発現が変化する生理活性物質が明らかとなった。これらの知見をもとにしてケモカイン等の発現をコントロールすることにより、ウシの妊娠成立・維持を人為的に制御する新たな技術開発に貢献することが期待される。

#### 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 2 件)

1. Sakumoto R, Hayashi KG, Takahashi T. Different expression of PGE synthase, PGF receptor, TNF, Fas and oxytocin in the bovine corpus luteum of the estrous cycle and pregnancy. *Reproductive Biology* 2014, 14, 115-121.
2. Kawaguchi S, Bowolaksono A, Sakumoto R, Okuda K. Luteoprotective roles of luteinizing hormone are mediated by not only progesterone production but also glucocorticoid conversion in bovine corpus luteum. *Molecular Reproduction and Development* 2013, 80, 204-211.

[学会発表] (計 2 件)

1. Sakumoto R, Hayashi KG, Hosoe M, Iga K, Kizaki K, Okuda K. Differential gene expression profiles in the bovine corpus luteum (CL) of the estrous cycle and

pregnancy: Possible roles of eotaxin and lymphotactin in regulating CL function during pregnancy. 9<sup>th</sup> International Ruminant Reproduction Symposium (Hotel Nikko Northland Obihiro); August, 2014.

2. 作本亮介、林憲悟、細江実佐、伊賀浩輔、木崎景一郎、奥田潔. 妊娠初期におけるウシ黄体の網羅的遺伝子発現解析: ホメオボックス遺伝子と妊娠との関連. 第 107 回日本繁殖生物学会(帯広畜産大学)2014 年 8 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 ( )

研究者番号：

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：