

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07693

研究課題名(和文) 純粋な牛ゴナドトロフ細胞のモデルを用いた泌乳牛のLH・FSH分泌活性化法の開発

研究課題名(英文) Development of activation method for LH and FSH secretion in dairy cows based on pure bovine gonadotroph model

研究代表者

角川 博哉 (Kadokawa, Hiroya)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：80370592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-seq法により、ウシ下垂体前葉では、12,769遺伝子が発現していること、さらに発情期と排卵後期の間で比較すると、有意に発現量の異なる396遺伝子を発見した。396遺伝子の中には、新規のGPCR型受容体、ならびに、バインディングプロテインが含まれていた。ウシ下垂体前葉では、259の受容体と364のバインディングプロテインが発現していることも解明された。発情期と排卵後期の間で有意差のあった396遺伝子を用いて、重要なパスウェイを調べたところ、GPCRと遺伝子発現を結びつけるパスウェイ等が見つかった。新規のGPCR型受容体には、GnRH受容体を含む脂質イカダに乗るものもあった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine gene expression patterns in the anterior pituitary (AP) of heifers before and after ovulation via deep sequencing of the transcriptome (RNA-seq) to identify new genes and clarify important pathways. The bovine APs expressed 12,769 annotated genes at pre- or post-ovulation. The bovine AP showed differential expression of 396 genes ( $P < 0.05$ ) in the pre- and post-ovulation APs. The 396 genes included new G-protein-coupled receptor (GPCR) genes and binding proteins. The AP also expressed 259 receptor and other 364 binding proteins. Moreover, ingenuity pathway analysis for the 396 genes revealed a canonical pathway linking GPCR to gene expression. Thus, the present study clarified the novel genes found to be differentially expressed before and after ovulation and clarified an important pathway in the AP. Some of the new GPCR colocalizes with GnRH receptor on the lipid raft in the plasma membrane of gonadotrophs.

研究分野：繁殖

キーワード：ウシ ゴナドトロフ

1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉に存在するゴナドトロフ細胞は、性腺刺激ホルモン (LH) や卵胞刺激ホルモン (FSH) という、生殖のために非常に重要なホルモンを分泌する細胞であり、性機能調節のなかで中心的な役割を担っている。

しかし分娩後泌乳牛では、ゴナドトロフからの LH や FSH の分泌が抑制され、様々な繁殖障害の原因になっている。

ゴナドトロフからの LH・FSH の分泌は、GnRH が細胞膜上の受容体 (GnRHR) に結合することで刺激される。

しかし研究代表者らが調べた結果、分娩後泌乳牛に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 剤を投与しても、ゴナドトロフが血中に分泌する LH・FSH 量は抑制していた。

この分娩後泌乳牛のゴナドトロフ機能の回復遅延は、繁殖障害発生や分娩間隔延長の重要な原因であり、酪農家に年間数百万円の損失を生じているが、その原因は未解明である。

したがって分娩後泌乳牛のゴナドトロフには、未解明の抑制機構が存在すると考えられる。

動物における下垂体の研究では未解明な点が多く残っている。下垂体の研究が未発達な理由は2つである。まず下垂体前葉には成長ホルモン等の他ホルモンの分泌細胞等が共存し、全ての細胞中でゴナドトロフは約 18% のみと少ない事である。

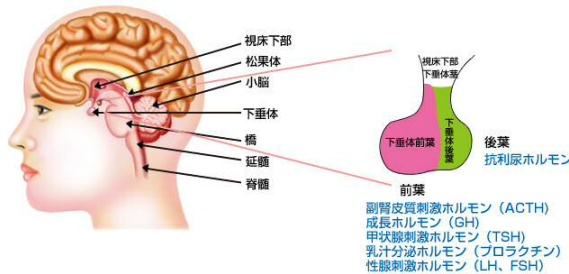


図1 多様な細胞からなる下垂体前葉

次に、複雑な細胞集団から純粋なゴナドトロフを調製する技術が実験動物も含め全動物種で未開発な事である。

そのような中、研究代表者は、最近、ウシ GnRHR に対する抗体 (抗ウシ GnRHR 抗体) と、それを利用してウシ下垂体前葉の複雑な細胞集団から、純度 100% のゴナドトロフを単離精製する技術の開発に成功した。

さらに研究代表者が、精製ゴナドトロフを共焦点顕微鏡で観察したところ、GnRHR はゴナドトロフの細胞膜上に均一には存在せず、脂質イカダ (脂質筏、Lipid Raft) とよばれる膜ミクロドメインに限局することも明らかになった。なお脂質イカダには多くの受容体が集積していて、受容体同士が相互に影響する可能性が最近明らかになり (Wehmeyer ら、J. Biol. Chem. 2014)、重要な研究ターゲットとして急浮上している。

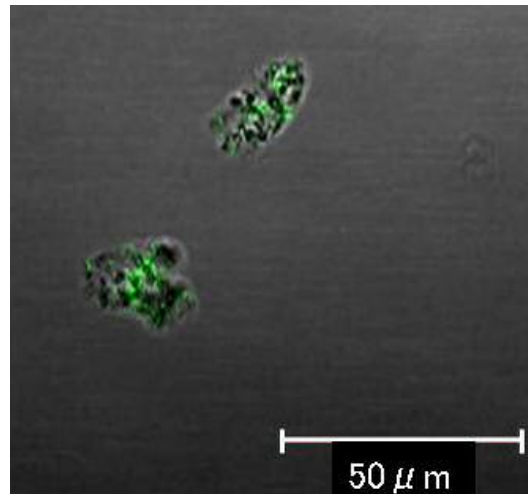


図2 ウシのゴナドトロフの細胞膜上特殊構造である脂質イカダ上に存在する GnRH 受容体 (細胞表面の明部)

また研究代表者は、低品質なサイレージや濃厚飼料に存在するカビ由来の毒物である、 $\alpha$ ゼアララノールの極微量が、ゴナドトロフの細胞膜上に存在する GPR30 受容体に、わずか数分間結合すると、GnRH により誘起される LH 分泌反応、GnRH 誘起 LH 分泌反応を抑制することを発見し、最近、報告した (Nakamura ら、2014)。

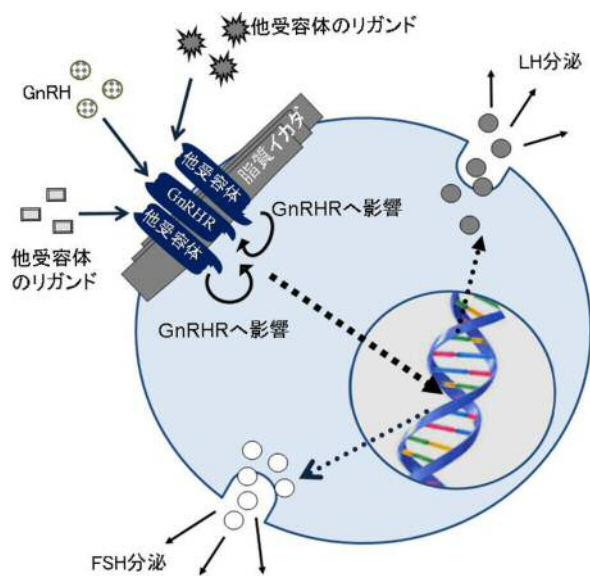


図3 ゴナドトロフの細胞膜上の脂質イカダに GnRH 受容体 (GnRHR) と同乗する他の受容体による GnRH、LH、FSH への効果

## 2. 研究の目的

これらのことから、次の仮説にいたった。

- 1) ウシのゴナドトロフには未解明の受容体が発現しており、その受容体に結合するリガンドの血中濃度に異常が生じると、LH・FSHの発現・分泌に異常が生じるという仮説。
- 2) ゴナドトロフがGnRHに反応しLHを分泌するまでの時間は数分間と非常に短い。そのためGnRH誘起LH分泌反応に短時間で影響できる受容体は、GnRHRが乗る脂質イカダに同乗する受容体で、そのような受容体へのリガンド結合量が異常になるとGnRHRに結合できるGnRH量が異常になるという仮説。

本課題は上記2つの仮説について調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

下垂体前葉は様々な重要な役割を担っていることはよく知られているが、発現遺伝子の全貌は、全ての動物種で明らかになっていない。そこで本研究では最初に、発情期と排卵後期におけるウシ下垂体前葉における発現遺伝子を網羅的手法である、次世代シーケンサーを用いたRNAseq法により解析した。

次に得られた結果を利用して、重要なパスウェイの発見にも努めた。

また適宜、免疫染色法や、リアルタイムPCR法や、ゴナドトロフ培養系へのリガンドの添加実験を用いて、新規の遺伝子の重要性を検証した。

## 4. 研究成果

次世代シーケンサーを用いたRNAseq法により次のことが解明した。まずウシ下垂体前葉では、12,769遺伝子が発現していた。

遺伝子の発現量の指標であるRPKM値の合計のうち、約30~40%は、下垂体前葉ホルモンが占めていた。

発情期と排卵後期の間で比較すると、有意に発現量の異なる396遺伝子が見つかった。396遺伝子の中には、新規のGPCR型受容体、ならびに、バインディングプロテインが含まれていた。ウシ下垂体前葉では、259の受容体と364のバインディングプロテインが発現していることも解明された。

発情期と排卵後期の間で有意差のあった396遺伝子を用いて、重要なパスウェイを調べたところ、GPCRと遺伝子発現を結びつけるパスウェイ等が見つかった。

次に新規のGPCR型受容体の細胞外領域に対する抗体を用いて、下垂体前葉の組織や細胞に対する免疫染色を実施し、リアルタイム

PCRで性周期の間にどのように発現量が変化するかも調べた。その結果、下垂体前葉細胞の中であって、新規のGPCR型受容体を発現する主要な細胞は、ゴナドトロフ細胞であることが明らかになり、特にLH分泌が活発になる黄体初期のゴナドトロフ細胞では発現量が低いことも明らかになった。またGnRH受容体を含む脂質イカダに乗る受容体であることも明らかになった。

新規のGPCR型受容体の遺伝子のプロモーター領域を解析したところ、エストロゲン受容体やプロジェステロン受容体の結合領域が存在することも明らかになった。さらにリガンドの候補とLH・FSHの分泌の関係は、前述の仮説を支持するものであった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

① Onalenna Kereilwe, Kiran Pandey, Vitaliano Borromeo, Hiroya Kadokawa. (2018) Anti-Müllerian hormone receptor type 2 is expressed in gonadotrophs of post-pubertal heifers to control gonadotropin secretion. *Reproduction, Fertility, and Development*, 査読有、印刷中、DOI: 10.1071/RD17377

② Hiroya Kadokawa, Kiran Pandey, Onalenna Kereilwe, Ashrafun Nahar. (2018) Reconsidering the roles of endogenous estrogens and xenoestrogens: the membrane estradiol receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates the effects of various estrogens. *Journal of Reproduction, and Development*, 査読有、印刷中、DOI: 10.1262/jrd.2017-153

③ Onalenna Kereilwe, Kiran Pandey, Hiroya Kadokawa. Influence of brain plasmalogen on gonadotropin secretion from the cultured bovine anterior pituitary cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 査読有、Vol. 64、2018、pp. 77-83. DOI: 10.1016/j.domaniend.2018.04.002

④ Kiran Pandey, Onalenna Kereilwe, Hiroya Kadokawa. Heifers express G-protein coupled receptor 153 in anterior pituitary gonadotrophs in stage-dependent manner. *Animal Science Journal*, 査読有、Vol. 89、No. 1、2018、pp. 60-71. DOI: 10.1111/asj.12920

⑤ Midori Otsuka, Hiroya Kadokawa. GPR30 mediates estrone, estriol, and estradiol to suppress gonadotropin-releasing hormone-induced luteinizing hormone secretion in the anterior pituitary of

heifers. Journal of Reproduction and Development、査読有、Vol. 63、No. 5、2017、pp. 519-525. DOI: 10.1262/jrd.2017-035

⑥ Kiran Pandey, Yoichi Mizukami, Kenji Watanabe, Syuiti Sakaguti, Hiroya Kadokawa. Deep sequencing of the transcriptome in the anterior pituitary of heifers before and after ovulation. Journal of Veterinary Medical Science、査読有、Vol. 79、No. 6、2017、pp. 1003-1012. DOI: 10.1292/jvms.16-0531.

⑦ Kiran Pandey, Onalenna Kereilwe, Vitaliano Borromeo, Hiroya Kadokawa. Heifers express G-protein coupled receptor 61 in anterior pituitary gonadotrophs in stage-dependent manner. Animal Reproduction Science、査読有、Vol. 181、2017、pp. 93-102. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.020

⑧ Kiran Pandey, Ashrafun Nahar, Hiroya Kadokawa. Method for isolating pure bovine gonadotrophs from anterior pituitary using magnetic nanoparticles and anti-gonadotropin-releasing hormone receptor antibody. Journal of Veterinary Medical Science、査読有、Vol. 78、No. 11、2016、pp. 1699-1702. DOI: 10.1292/jvms.16-0157

[学会発表] (計 1 件)

① Kiran Pandey, Yoichi Mizukami, Kenji Watanabe, Syuiti Sakaguti, Hiroya Kadokawa. (2015) Deep Sequencing of Transcriptomes of Anterior Pituitary before and after Ovulation in Japanese Black Heifers. 第 108 回日本繁殖生物学会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

① 名称：卵胞刺激ホルモン分泌促進剤  
発明者：角川博哉  
権利者：国立大学法人山口大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-212350  
出願年月日：平 29. 11. 2  
国内外の別：国内

② 名称：卵胞刺激ホルモン分泌促進剤  
発明者：角川博哉  
権利者：国立大学法人山口大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-231717  
出願年月日：平 29. 12. 1  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角川 博哉 (KADOKAWA, Hiroya)  
山口大学・共同獣医学部・准教授  
研究者番号：80370592

(2) 研究分担者

水上 洋一 (MIZUKAMI, Yoichi)  
山口大学・大学研究推進機構・教授  
研究者番号：80274158

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し