

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580389

研究課題名(和文) 繁殖能力向上のための成長ホルモン作用メカニズム

研究課題名(英文) Sexual maturation in Growth hormone receptor deficiency chicken.

研究代表者

塚田 光 (Tsukada, Akira)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：20343212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：成長ホルモン受容体(GHR)欠損型矮性品種(矮性鶏)は低体重、短足で、インスリン抵抗性、免疫機能の低下、腹腔内脂肪の過剰蓄積等がみられる。本申請では、性成熟遅延メカニズムの解明を試みる。成長ホルモンが未成熟期、精細管発達遅延を引き起こすことを明らかとした。精細管の発達と精巣GHR発現に逆相関し、GHR mRNAが8週齢精巣、特に間質で発現が高いことを示した。マイクロアレーやサブトラクション法、TOF-MASを用いGHR下流に存在する候補遺伝子をいくつか同定した。定量的発現解析を行い、新さらに培養実験やその他in vitroアッセイを行い、GHR依存的な発現であることを証明しつつある。

研究成果の概要(英文)：Growth hormone (GH) plays a various role in controlling cell proliferation and development, nutrient metabolism, protein synthesis and reproduction as well as normal growth. GH actions are exerted after binding to GH receptor (GHR) localized in target tissues. Sex-linked dwarf (SLD) chicken lacking functional GHR is good experimental model for study of GH actions. We investigated effect of GHR deficiency on sexual maturation in chicken. Testicular GHR mRNA was expressed at 5-12 weeks old in male. Testicular GHR mRNA expression was high until 12 weeks old, but which was not detected in 16-weeks old and matured males. Maturation of seminiferous tubule in male was delayed in SLD chicken. Present results suggested that GH was directly or indirectly affected to sexual maturation. Especially, negative correlation with GHR mRNA expression and area of testicular tubule was suggested that GH strongly effect on testicular development, before spermatogenesis.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：成長ホルモン 成長ホルモン受容体 成長ホルモン作用 精巣 セルトリ細胞 ライディッヒ細胞 精原細胞

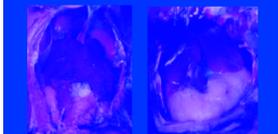
1. 研究開始当初の背景

成長ホルモン受容体 (GH-R) 欠損型矮性品種の同定：ニワトリにおける矮性品種はいくつか報告されている。現在までに、日本に存在する矮性品種である GH-R 欠損鶏を探索・同定した。その中でも GH-R 欠損品種は、体が小さく、足が短い、腹腔内脂肪の蓄積が多いなど古くからその存在が知られていた。また、GH-R は性染色体 (Z 染色体) 上にあり、伴性遺伝することからその表現系も得られ易かった。これらの表現系は GH 作用と一致することからその原因遺伝子の特定も容易だった。しかしながら近年世界的にみられる家禽遺伝子資源の消失にともないこれらの品種も危機にさらされている。右図、岐阜県の系統もすでに失われている。GH-R 欠損系は GH-R ゲノムに特異的なミューテーションをもちゲノム DNA から容易に探索できる。また RNA 分子も容易に見分けられる。GH 作用の欠損からみられる各種ホルモン濃度、外見の特徴と特異的である。日本中の矮性品種を検討した。GH-R 欠損型矮性品種を同定し、この遺伝資源の保護を行っている。現在までに2つの異なる GH-R 遺伝子異常を同定、育種している。

成長ホルモン受容体 (GH-R) が正常なニワトリと 欠損したニワトリ



腹腔内脂肪の量に差が見られる

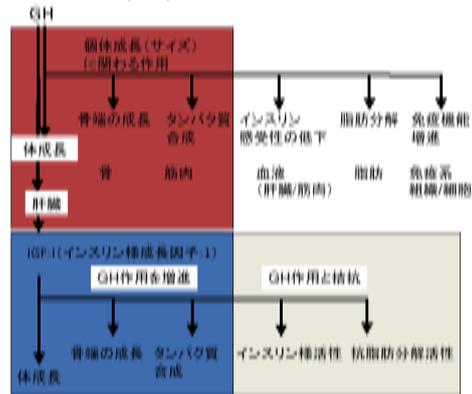


成長ホルモン受容体(GH-R)は成長ホルモンの作用を細胞へ伝える役割がある。この受容体を欠損したニワトリは体重が軽く足が短い、腹腔内脂肪の蓄積が高い等の特徴がある。

多様なはたらきを示す GH：GH は個体の成長や、細胞の増殖を促進することでよく知られている。GH により合成が促進される代表的な成長因子が IGF-I であり、IGF-I は GH と同様に細胞の増殖を促進、さらに骨端の成長に深く関与している。しかしながらこれらのことはヒトや一部の哺乳実験動物でしか明らか

かにされていない。申請者らはこれまでに GH は血糖の代謝、脂肪蓄積、タンパク質合成などに関与することを調査した。特に性成熟が遅延することに着目していくつかの予備的結果を得ている。下図にまとめたものを示す。GHR は精巣では春期発動期以前、ふ化後 12 週齢までしか発現していない。一方 GHR 欠損鶏では湿重量、間質面積の減少は起こらない。GHR を介した GH 作用の作用点がこの若齢期にあると推測しその作用メカニズムの解明は、産業動物である家禽の繁殖能力獲得に関与していると推測した。

成長ホルモン(GH)の生理作用



2. 研究の目的

産業動物である家禽では繁殖能力の獲得や、繁殖成績の向上はそのまま、経済形質に直結する。そこで GH 作用の繁殖能力獲得、繁殖成績への影響を GHR 欠損鶏をもちいて調査する。GHR の局在を知ることで GH 作用の推定が出来る；In situ ハイブリダイゼーション法をもちいて、GHR 局在を明らかにする。GH 応答遺伝子を見つけることでその作用を推測できる；正常鶏、矮性鶏の精巣をもちいてサブトラクション法を行う。GH 細胞内シグナル伝達系の解明；鳥類の GH-GH-R 細胞内シグナル伝達系は未だ明らかでない。現在、GH 依存的とされている遺伝子をもちいて、その細胞内シグナル伝達経路を解明中である (IGF-I 等)。この分野はすでに模範的な実験系が多く報告されているのでそれに倣う。申請者らはこの実験に必要な初代培養、初代培養細胞への遺伝子導入に成功し成果を出しつつある。さらに、GH-R 欠損鶏から得られた GH 依存的発現を示す遺伝子を同法により精査する。ことにより GH 作用の新たな展開が期待される。

精巣の GH の標的器官(GH-R が存在する組織)における遺伝子発現動態を網羅的に探索するこれにより畜産動物である家禽の GH の成長・増体への作用機序に関わる遺伝子を網羅的に同定する(サブトラクション法をもちいる)。これから得た成果はヒトを含む哺乳実験動物にも還元できる。現在、ヒトを含めた脊椎動物の中で GH-R 遺伝子欠損は、家禽を含めた畜産動物とヒトで報告されているのみでラットや、マウスなどの実験動物では見つけられていない。この点からも畜産動物である家禽からこの遺伝子が単離されたことは興味深い。また GH-R 遺伝子変異ゲノム構造はすでにいくつか報告されているこの情報をもとに PCR 法により容易に同定が可能である。その形態的特徴から GH-R 欠損に因らない矮性ニワトリの同定も可能である。これら特徴ある鶏種を用いることは現在マウスで行われているノックアウトなどの技術に勝るとも劣らない。またそれ自体が産業動物として完成されたモデル動物である。これら育種改良された特殊な品種における成長関連因子ゲノム構造における変異など遺伝的背景を明らかにすることは地鶏の生産性の向上に重要なツールとなる。このことは消費者のニーズに応えるだけでなく産業的にも重要な意味を持つ。本研究により鳥類の成長メカニズムの詳細が明らかになる。

現在ニワトリなど鳥類遺伝資源の保全是急務である。この数年間で多くの鳥類遺伝資源が失われた。米国では 2003 年の一年間に 5 研究機関で鳥類系統のすべてを消失した。我が国は有数の家禽遺伝資源国でありこれらの貴重遺伝資源を保全しなければならない。そのためには特にユニークな遺伝資源を効率よく見つけだしその特性を有用に活用することが急務である。GH-IGF 軸のメカニズムに関する研究は産業動物よりもむしろヒトの小人症等で研究が進んでいる。しかしながら、成長ホルモン作用機序は、哺乳類間、鳥類-哺乳類間において異なるという報告が多い。鳥類における成長促進のメカニズムは、1990 年代まで国外で Dr. Scans(USA)、Dr. Harvey(Canada)、Dr. Cogburn(USA)らによって進められていたが成果は未だ断片的でありそれぞれの因子の相互関係は未だ不明な点が多い。

3. 研究の方法

GH-R 欠損型矮性品種は、体が小さく、足が短い、腹腔内脂肪の蓄積が多いなどの外見的に特異な特徴がある。申請は現在までに GHR 欠損により GH 感受性が無くなったニワトリにおいて、インスリン抵抗性の低下、免疫組織重量の減少、免疫機能の減退、腹腔内脂肪の過剰蓄積などの症状が現れることを明らかにした。さらに性成熟が遅延することが分かってきた。ニワトリにおける性成熟の遅延は卵用鶏においては重大な問題である。これまでの予備実験で精細管発達が遅れることが分かってきた。精細管の発達と精巣 GHR 発現には負の相関が見られた。すなわち、間質(ライディッヒ細胞)の減少と正の相関がある。GH の直接作用を考える上で、精巣での GHR mRNA/蛋白の発現の局在を見ることが重要である。免疫組織染色や *in situ* ハイブリダイゼーション法をもちいて GHR が精巣のどこで発現しているかを確認する。

GHR 欠損矮性鶏をもちい正常鶏との比較をニワトリ cDNA マイクロアレイ法により網羅的に解析する。cDNA マイクロアレイは ARK-Genomics(Roslin, Midlothian, UK)から販売されているものを用いる。精巣より調整された cDNA プローブをもちいハイブリダイゼーションを行う。それぞれのハイブリダイゼーションシグナル強度はマイクロアレイスキャナーを用いて測定する。各ハイブリダイゼーションシグナルを解析し、個体ごとに得られたシグナル強度に再現性のあるクローンを選ぶことで真に発現量に差のあるクローンを判定する。またこれとは別にサブトラクション法を併用する。これにより、新規遺伝子の同定も可能である。得られた遺伝子の作用をこれまでの報告から推測する。GH 依存的発現を示すことを組織培養、細胞培養系をもちいて確認する。初代培養、細胞培養系の確立と発現調節領域の解析：各種ホルモン、成長関連因子の転写・発現の分子メカニズムを解明するためには、細胞培養系が必要であり、臓器の分化特異性をもっとも維持しているのは初代培養系である。これらの細胞に GH を添加し候補遺伝子を誘導させる。また、候補遺伝子の転写調節領域を単利シルシフェラーゼ解析をもちい、そのシスエレメントを同定する。上記で得られた結果より発現調節エレメントを推測し、決定するためにゲ

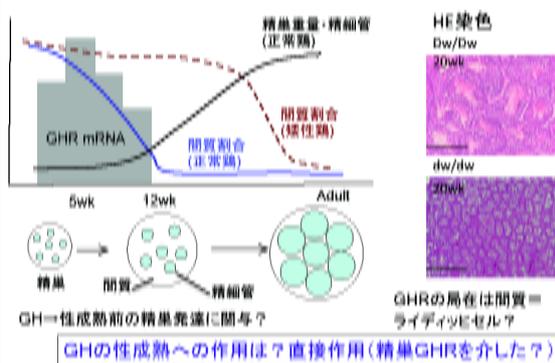
ルシフト解析を行う。さらに、このシスエレメントに対するトランスエレメントを決定するために各種抗体を用いたスーパーシフト解析を行う。また近年、遺伝子発現調節領域の決定をする上で不可欠な方法となっているクロマチン免疫沈降法をもちいて DNA 結合性転写因子や非結合性タンパク質のクロマチン上での局在を解析する。申請者はこれまでに肝臓における GH シグナルは GHR-JAK を介し Stat5b が標的遺伝子へ結合するとを明らかとしている。この抗体(ニワトリにも使用可能)を用いスーパーシフト解析、クロマチン免疫沈降法を行う。成長ホルモン依存的に発現する遺伝子の探索により成長ホルモンの精巣における作用解明のブレークスルーになりえる。

上記までの実験で精巣における GH 作用を推測でき繁殖能力の獲得における GH 作用の概要を推測することが出来る。しかしながら、GHR 欠損鶏 (KO, KI マウスでも同様であるが) では下垂体など内分泌器官、各種末梢組織同士のクロストークや情報交換を伴うフィードバック作用を排除できない。精巣 GHR への直接作用を証明したことにはならない。ニワトリは古くから発生学の研究にもちいられてきており、組織の移植などキメラ動物作成に有効な実験動物である。GHR 欠損ニワトリの精巣を GHR 正常ニワトリに移植することにより、GH の直接作用を生きた個体で証明できる。

4. 研究成果

申請者はこれまでに、成長ホルモン受容体 (GH-R) 欠損型矮性品種 (矮性鶏) をもちい、その特徴を調査し、得られた知見から成長ホルモンの作用について検討してきた。矮性鶏は体が小さく、足が短い、腹腔内脂肪の蓄積が多いなどの外見的に特異な特徴、インスリン抵抗性の低下、免疫組織重量の減少、免疫機能の減退、腹腔内脂肪の過剰蓄積などの症状が現れることを明らかにした。本申請では、性成熟が遅延のメカニズムを解明しようと試みる。これまでに、申請者は成長ホルモン受容体欠損鶏における性成熟遅延は低体重に因るものではなく成長ホルモンが未成熟期、精細管発達遅延を引き起こすことを明らかとした。精細管の発達と精巣 GHR 発現には負の相関が見られ、間質(ライディッヒ細

胞)割合の減少と正の相関を確認し、GHR mRNA が 8 週齢精巣、特に間質で発現が高いことを示した。マイクロアレーやサブトラクション法、TOF-MAS を用い成長ホルモン受容体下流に存在する候補遺伝子をいくつか同定した。その中から mRNA 発現を定量的解析法をもちい網羅的確認を行った。いくつかの有力な、新規の GH 依存的候補遺伝子を同定した。それら mRNA の配列を決定し、さらに培養実験やその他 in vitro (ルシフェラーゼアッセイ、スーパーシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法) を行い、GH-R 依存的な発現であることを証明しつつある。TOF-MAS をもちいたプロテオーム解析により蛋白質レベルで変化する物質を同定し、mRNA 配列の決定、ペプチド抗体を作成した。mRNA、タンパク発現の両方を検討することが出来良好な結果を得ている。



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)

① Saki Imai¹, Takayoshi Mamiya, Akira Tsukada, Yasuyuki Sakai, Akihiro Mouri, Toshitaka Nabeshima, Shizufumi Ebihara. Ubiquitin-Specific Peptidase 46 (Usp46) Regulates Mouse Immobile Behavior in the Tail Suspension Test through the GABAergic System. PLoS ONE (2012) 7(6): e39084. 査読有

② Tomomi Ito, Norio Yoshizaki, Toshinobu Tokumoto, Hiroko Ono, Takashi Yoshimura, Akira Tsukada, Norio Kansaku and Tomohiro

Sasanami

Progesterone is a sperm releasing factor from the sperm storage tubules in birds
Endocrinology (2011) 152: 3952-3962 査読有

③Kenji Nagao, Mai Oki, Akira Tsukada and Kazumi Kita. Alleviation of body weight loss by dietary methionine is independent of insulin-like growth factor-I in protein-starved young chickens. Animal Science Journal (2011) 82, 560-564 査読有

④ Mami Serizawa, Mihoko Kinoshita, Daniela Rodler, Akira Tsukada, Hiroko Ono, Takashi Yoshimura, Norio Kansaku, Tomohiro Sasanami. Oocytic expression of zona pellucida protein ZP4 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Animal Science Journal (2011) 82, 227-235 査読有

⑤Tetsuya Tachibana, Shunsuke Moriyama, Akiyoshi Takahashi, Akira Tsukada, Aiko Oda, Sakae Takeuchi, Tatsuya Sakamoto. Isolation and characterisation of prolactin-releasing peptide in chicks and its effect on prolactin release and feeding behaviour.
Journal of Neuroendocrinology (2011) 23: 74-81 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① Akira Tsukada and Ken-ichi Tahara、Growth hormone receptor signalling in chicken、17th ICCE 2013 - International Congress of Comparative Endocrinology July 15th-19th, 2013、Barcelona, Spain Universitat de Barcelona. Facultat de Biologia

②Riki Kuwahara, Manabu Sahashi and Akira Tsukada、Growth Hormone Dependency Testicular Gene Expression in Sex-linked Dwarf Chicken、THE 15th AAAP ANIMAL SCIENCE

CONGRESS、Thammasart University (Rangsit Campus), Bangkok / Pathum Thani, Thailand Nov.26- 30, 2012

③塚田光、桑原力、佐橋学、笹浪知宏、道羅英夫、田中実、成長ホルモン受容体欠損ニワトリにおける性成熟の遅延と遺伝子発現、日本家禽学会秋期大会、平成 24 年 9 月 5 日～平成 24 年 9 月 7 日、香川県高松市生涯学習センター「まなび CAN」(高松市片原町 1 1 番地 1)

④Hirofumi Okuyama, Akira Tsukada, Md. Sakirul Isram Khan, Tetsuya Tachibana、Effect of intracerebroventricular injection of orexigenic peptides on feeding behavior in dwarf chicks、10th International Symposium on Avian Endocrinology 2012 Gifu (ISAE2012 Gifu) June 5(Tue)-9(Sat)2012、Nagaragawa Convention Center 2695-2 Nagara Fukumitsu, Gifu-shi, Gifu 502-0817, Japan

⑤ Riki Kuwahara, Manabu Sahashi, Ai Hishinuma and Akira Tsukada、Sexual maturation of testis in sex-linked dwarf chicken、10th International Symposium on Avian Endocrinology 2012 Gifu (ISAE2012 Gifu)、June 5 (Tue) - 9 (Sat) , 2012、Nagaragawa Convention Center 2695-2 Nagara Fukumitsu, Gifu-shi, Gifu 502-0817, Japan

⑥Riki Kuwahara and Akira Tsukada、Retardation of sexual maturation in growth hormone receptor deficiency chicken、The 7th AOSCE Congress、3 - 7 March 2012, Kuala Lumpur (MALAYSIA)

⑦桑原力、村山至、小野ひろ子、吉村崇、佐橋学、菱沼愛、塚田光、ニワトリ精巣における成長ホルモン作用の解明、第 36 回鳥類内分泌研究会、2011 年 11 月 21 日 (月) ～11 月 22 日 (火)、神奈川県足柄下郡箱根町湯本茶屋 139-5、箱根 パークス吉野

⑧桑原力、菱沼亜衣、佐橋学、村井篤嗣、塚田光、ニワトリ精巣における成長ホルモン受容体 mRNA 発現、畜産学会 114 回大会 2011 年 8 月 26 日(金)～27 日(土)北里大学 (青森県十和田市)

⑨桑原力、菱沼亜衣、佐橋学、村井篤嗣、塚田光、成長ホルモン受容体欠損による卵巣への影響、家禽学会秋季大会 2011 年 8 月 25 日(木)、北里大学 (青森県十和田市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~aphysiol>

/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚田 光 (TSUKADA Akira)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号 : 2 0 3 4 3 2 1 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :