

主論文の要約

Establishment and analysis of *in vitro* model for hypothalamic neurons controlling reproduction in domestic ruminants

(反芻家畜の繁殖機能を制御する視床下部ニューロンの
in vitro 実験系の樹立と解析)

名古屋大学大学院生命農学研究科

生命技術科学専攻

生物生産技術科学講座

動物生産科学第1

末富 祐太

2017年3月

【第1章:序論】

世界人口の爆発的増加に伴い、動物性タンパク質食料の需要が増加している。世界食糧機関は、限られた資源の下で畜産物需要の高まりに応えるために、地球規模で家畜の生産性を向上させる必要性について指摘している。家畜生産性は効率的な繁殖を行うことで達成される。実際に、着床や妊娠の失敗は空胎期間の延長、仔ウシや泌乳牛の減少などをもたらし、家畜の生産性低下を招く。現在、ウシを扱うほとんどの畜産現場で、次世代の子ウシを得るために人工授精 (AI) が適用されているものの、AI 後の受胎率が年を追うごとに低下し続けていることが問題となっている。ウシの受胎率を向上させ、子ウシ生産をより効率化するために、繁殖機能を刺激する新たな薬剤および技術が強く求められている。そのためには、ウシの繁殖中枢の制御メカニズムを解明し、その知見を新技術の開発に応用することが必要不可欠である。

ウシなどの反芻家畜の繁殖機能は、視床下部-下垂体-性腺軸により制御される。視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、それに続く下垂体からの性腺刺激ホルモン (GTH) の分泌を刺激する。GnRH 分泌は、基底レベルから急激に上昇したのち指数関数的に減少する「パルス状」の分泌様式を示し、GTH のパルス状分泌と一対一で対応することが知られている。GnRH/GTH のパルス状分泌は、雌の卵巣における卵胞発育とそれに伴うステロイドホルモン (エストロジェン) の分泌を促す。GnRH および GTH のパルス状分泌は雌の繁殖機能を制御する上で欠かすことのできない生理的な分泌様式であるにもかかわらず、これらを制御する神経内分泌メカニズムの詳細は解明されていない。

GnRH/GTH 分泌は、卵巣由来のエストロジェンにより変化することが示されている。GnRH ニューロンはエストロジェン受容体 α (ER α) を発現しておらず、エストロジェンが GnRH 分泌を調節する機構は GnRH の発見以来の謎であった。2001 年に発見された「キスペプチン」は、動物の繁殖機能制御に関わる因子として近年注目されている。キスペプチンを産生する視床下部キスペプチンニューロンが ER α を発現することから、キスペプチンニューロンはエストロジェンを受容し、GnRH 分泌を上位で刺激するニューロンと考えられている。キスペプチンニューロンは視床下部の 2 カ所の神経核に局在している。なかでも、視床下部弓状核に存在するキスペプチンニューロンは、神経ペプチドであるニューロキニン B (NKB) およびダイノルフィン A (Dyn) を共発現することが、多くの哺乳類で明らかにされている。これらのニューロン群は、それぞれの神経ペプチドの頭文字をとって「KNDy ニューロン」と呼ばれている。KNDy ニューロンは、互いに密なネットワークを形成し、GnRH パルス発生中枢 (GnRH パルスジェネレーター) として機能することが強く示唆されているが、いまだに議論も多い。

GnRH パルス発生メカニズムの解明には、動物生体を用いた *in vivo* 実験系が多く実施されてきたが、これらの実験系では、個体差に加え、GnRH パルスジェネレーターを取りまく他のニューロンや内因性生理活性物質などの多くの制御因子の影響を強く受けるために、GnRH パルス発生機構における KNDy ニューロンの機能を詳細に解析することが難しい。そこで、単純かつ均一な *in vitro* 実験系を用いた細胞レベルでの機能解析が必要不可欠となる。現在までに、げっ歯類では、KNDy ニューロンに由来する不死化細胞株が樹立され、均一な *in vitro* 実験系の作出が行われてきた。反芻家畜の繁殖制御機構には、たとえば発情周期中に機能的黄体が存在する黄体期があるなど、げっ歯類とは様式が異なるが、これまで反芻家畜に由来する *in vitro* 実験系は報告されていない。それゆえに、反芻家畜の繁殖制御メカニズムの解明のためには、反芻家畜由来の KNDy ニューロンを用いた *in vitro* 実験系を樹立し、細胞レベルでの解析を行う必要がある。そこで、本研究は、ウシなどの反芻家畜のモデル動物としてシバヤギを用い、視床下部 KNDy ニューロン由来の不死化細胞株を用いた *in vitro* 実験系の樹立を目的とした。本研究で得られた知見ならびに樹立した *in vitro* モデルを活用し、ウシの受胎率向上に資する新規繁殖制御技術の開発などにつなげることをめざした。

【第2章:ヤギのニューロキニンB遺伝子(TAC3)のクローニングと転写制御領域の同定】

第2章では、ヤギ視床下部弓状核 KNDy ニューロンに含まれる NKB に着目し、NKB 遺伝子 (TAC3) の転写制御機構について分子生物学的に解析した。NKB は 10 アミノ酸からなる神経ペプチドであり、TAC3 にコードされているプレプロ NKB からプロセシングされて生成される。NKB は、KNDy ニューロンに発現する NKB 受容体を介して自身の神経活動を促進することが知られており、極めて重要な繁殖制御因子である。

ヤギのゲノムや遺伝子のデータベースは十分に整備されていないため、まず、シバヤギ TAC3 の全長 mRNA 配列とヤギ TAC3 の 5' 上流域配列を同定した。3 週齢の雄シバヤギから視床下部組織をサンプリング後、トータル RNA を抽出し、5'/3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を用いて、ヤギ TAC3 の全長 mRNA 配列を取得した。また、成熟雌シバヤギの血液由来のゲノム DNA を用いたゲノムウォーキング法により、ヤギ TAC3 の 5' 上流域配列を取得した。これらの取得した配列のシーケンス解析により各々の配列を同定し、ウシやヒトの配列と比較解析した。ヤギ TAC3 mRNA 配列は全長で 820 塩基であり、ウシと極めて高い相同性 (92%) を有していた。NKB のアミノ酸配列はヤギ、ウシおよびヒトで完全に一致していた。同定した TAC3

mRNA の 5'末端が転写開始点と推定され、ここを「+1」と定義した。また、ゲノムウォーキング法により、ヤギ *TAC3* の 5'上流域配列として翻訳開始点から 5'上流側の 3400 塩基を同定したところ、翻訳開始点の 694 塩基上流に推定転写開始点が位置していた。得られたヤギ *TAC3* の 5'上流域配列とウシ *TAC3* の 5'上流域配列の相同性は 89%と高かった。

次に、ヤギ *TAC3* の 5'上流域における転写活性をルシフェラーゼアッセイにより評価した。長さの異なるヤギ *TAC3* 上流域をルシフェラーゼ発現プラスミドに挿入し、5種類のレポーターベクター (pGL-2706、pGL-1837、pGL-834、pGL-335 および pGL-197) を作製した。マウス視床下部神経細胞由来細胞株 N7、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SK-N-AS を播種して、12 時間後にリポフェクション法により各レポーターベクターをトランスフェクションし、各細胞を通常培地内で培養した。トランスフェクションから 24 時間後に、1 nM あるいは 10 nM の 17 β -エストラジオール (E2) 添加培地または E2 非添加培地に交換して、さらに 24 時間細胞を培養した。その後、細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。ヤギ *TAC3* の 5'上流域を含む 5 種類すべてのレポーターベクターは、コントロールベクター (pGL-basic) に比べて高い活性を示した。N7 および SK-N-AS のどちらにおいても、ヤギ *TAC3* の 5'上流域の欠失によりルシフェラーゼ活性が上昇し、最短コンストラクト pGL-197 が最大のルシフェラーゼ活性を有していた。また、*TAC3* プロモーター活性における E2 の効果は有意ではなかった。以上の結果より、転写開始点の上流 197 塩基から下流 166 塩基を含むレポーターベクターが最大のルシフェラーゼ活性を示し、この領域にコアプロモーターが存在することが示唆された。また、転写開始点上流 336 塩基よりさらに 5'上流域には *TAC3* の転写抑制に関わる領域が存在することが示唆された。また、E2 は *TAC3* 転写活性に有意な影響を及ぼさなかった。

【第3章:ヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株の樹立とその解析】

第3章では、GnRH パルスジェネレーター細胞レベルでの解析を進めるために、反芻家畜 KNDy ニューロンに由来する不死化細胞株の樹立を試みた。雌シバヤギ胎仔の視床下部から弓状核組織を切り出し、弓状核由来の初代培養細胞にレンチウイルスを用いて癌原遺伝子 SV40 large T 抗原 (*T-Ag*) を導入することで不死化した。*T-Ag* が導入された細胞群から細胞クローニングを実施し、得られた細胞クローンから RNA を抽出し、cDNA を合成した。神経細胞マーカー (神経特異的エノラーゼ、*NSE*) およびグリア細胞マーカー (グリア線維酸性タンパク質、*GFAP*) の遺伝子発現を reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) により解析した。その結果、

61 個の不死化クローンのうち、36 個のクローンが *NSE* 陽性かつ *GFAP* 陰性を示し、これらを神経細胞由来クローンと同定した。次に、これらの神経細胞由来クローンを用いて、ヒツジ KNDy ニューロンにおいて発現することが報告されている神経ペプチド [キスペプチン (*KISS1*)、NKB (*TAC3*)、Dyn (*PDYN*)]、ステロイド受容体 [*ER α* (*ESR1*)、プロジェステロン受容体 (*PGR*)]、NKB 受容体 (*TACR3*) および Dyn 受容体 (*OPRK1*) の 7 種の遺伝子発現を解析した。36 個の神経クローンより、すべてを発現していた GA28 を選抜し、ヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株として樹立した。

次に、GA28 における神経ペプチドの発現を確認するために、GA28 を 24 ウェルプレートに播種して、48 時間培養後に氷冷メタノールで固定し、キスペプチン、NKB および Dyn のそれぞれについて蛍光免疫細胞化学染色を行うとともに、DAPI により核染色を行った。その結果、GA28 は 3 種すべての神経ペプチドを発現していた。

さらに、GA28 のステロイドホルモンに対する応答性を検証するために、ステロイドホルモン添加による *KISS1* 発現の変化を定量した。GA28 を 6 ウェルプレートに播種して 24 時間培養した後、E2 (0, 1, 10, 50, 100, 1000 pM) あるいはプロジェステロン (0, 1, 10, 50, 100, 1000 nM) を含む培地に交換して 24 時間培養した GA28 から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によりキスペプチン遺伝子 (*KISS1*) の相対発現量を定量した。その結果、E2 添加により GA28 における *KISS1* 発現が有意に抑制された ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's test)。しかし、プロジェステロン添加群では *KISS1* 発現に有意な差は認められなかった。

最後に、GA28 を用いてヤギ *TAC3* の 5' 上流域における転写活性をルシフェラーゼアッセイにより評価した。第 2 章で用いたものと同じの 5 種類のレポーターベクターを GA28 にトランスフェクションし、通常培地下で 24 時間培養した。その後、1 nM あるいは 10 nM の E2 添加培地または E2 非添加培地に交換して 24 時間細胞を培養し、細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、第 2 章における結果と同様に、転写開始点の上流 197 塩基から下流 166 塩基の領域にコアプロモーターが存在することが示唆された。また、転写開始点上流 198 塩基よりさらに 5' 上流域には *TAC3* の転写抑制に関わる領域が存在することが示唆された。また、E2 は *TAC3* 転写活性に有意な影響は及ぼさなかった。

【第4章: 考察・結論】

本研究では、ヤギ弓状核由来の KNDy ニューロン不死化細胞株 (GA28) の樹立に成功した。現在までに、げっ歯類に由来する KNDy ニューロン不死化細胞株は複数報告されているが (Jacobs et al., 2016; Treen et al., 2016)、ウシやヒツジを含めて反芻家

畜の KNDy ニューロンに由来する不死化細胞株はいまだに報告されていない。GA28 は、反芻家畜の KNDy ニューロンに特異的な遺伝子を発現しているだけでなく、キスペプチン、NKB および Dyn のすべてのペプチドを発現していたことから、GnRH パルス発生における KNDy ニューロンの機能を解析するのに有用な *in vitro* モデルであるといえる。また、GA28 は性ステロイドホルモン処理に応答することが確認されたことから、反芻家畜における GnRH のパルス状分泌や KNDy ニューロンの活動に対するステロイドホルモンのネガティブフィードバック作用 (Medan et al., 2005; Smith et al., 2007; Smith et al., 2008) のメカニズムを解析可能な細胞株であることが示された。さらに、GA28 とヤギ TAC3 の配列情報を組み合わせることで、ヤギ TAC3 の 5' 上流域に存在する、TAC3 コアプロモーターおよび TAC3 転写抑制領域を同定した。また、ヤギ TAC3 の転写活性はエストロゲンにより影響されないことも明らかになった。

以上より、GA28 を用いた実験系は、反芻家畜の GnRH パルス発生機構における KNDy ニューロンの機能を細胞レベルで解析するために極めて有用な *in vitro* 実験系であることが示された。今後は GA28 を用いた研究を通して蓄積される GnRH パルス発生機構の基礎的な知見とヤギ TAC3 プロモーターの情報を活用することで、ウシの受胎率向上、ひいては効率的な家畜の生産に貢献できると期待される。

【引用文献】

- Jacobs DC, Veitch RE, Chappell PE (2016) Evaluation of immortalized AVPV- and arcuate-specific neuronal kisspeptin cell lines to elucidate potential mechanisms of estrogen responsiveness and temporal gene expression in females. *Endocrinology* 157:3410-3419.
- Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Groome NP, Sharawy S, Taya K (2005) Follicular and hormonal dynamics during the estrous cycle in goats. *J Reprod Dev* 51:455-463.
- Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ (2007) KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 148:1150-1157.
- Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN (2008) Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 149:5770-5782.

Treen AK, Luo V, Chalmers JA, Dalvi PS, Tran D, Ye W, Kim GL, Friedman Z, Belsham DD
(2016) Divergent regulation of ER and kiss genes by 17beta-estradiol in hypothalamic
ARC versus AVPV models. *Mol Endocrinol* 30:217-233.