

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18574

研究課題名(和文)性経験によって促進する雄性行動制御の構造分子基盤

研究課題名(英文)Structural molecular basis of regulatory mechanism of male sexual behavior promoted by sexual experience

研究代表者

前嶋 翔(MAEJIMA, Sho)

埼玉大学・理工学研究科・研究支援者

研究者番号：10773286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：雄ラットの性行動の制御中枢である内側視索前核中心部(MPNC)において、性経験によって発現が変化する遺伝子を網羅的遺伝子発現解析によって探索し、候補分子であるVGFを同定した。組織学的解析により、性経験によって活性が上昇するMPNCのニューロンの一部がVGFを発現していることを明らかにした。VGFの発現をノックダウンするアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、MPNCに投与して行動解析を行うことで、経験後の性行動の亢進にVGFが関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：VGF, a neuropeptide expressing in the central part of the medial preoptic nucleus (MPNC: a regulatory center of male sexual behavior of rats), was identified as a candidate molecule whose expression changes after sexual experience by DNA microarray analysis. Histological analysis revealed that a part of MPNC neurons which activity is increased by sexual experience express VGF. An adeno-associated virus vector knocking down the expression of VGF was generated and behavioral analysis of male rat which administered virus vector into the MPNC revealed that VGF is involved in enhancement of sexual behavior after experience.

研究分野：神経科学・神経内分泌学

キーワード：雄性行動 性経験 内側視索前核

1. 研究開始当初の背景

(1) 有性生殖を行う生物にとって、異性との円滑なコミュニケーションの構築は子孫繁栄に重要である。性経験を有する雄ラットは、繁殖可能な雌に遭遇した際、性的未経験雄に比べ速やかに交尾行動を行うことができる。ラットの内側視索前核中心部 (MPNc) は雄優位な性的二型核 (雌雄で構造に性差のある神経核) であり、雄性行動の制御中枢であることが知られているが、経験によって促進された性行動の発現機構はいまだ不明である。

(2) 所属研究室の先行研究より、性経験を有する雄と性的未経験雄では、交尾後の MPNc における神経活性の上昇に差があり、2 度目の交尾時の活性は、1 度目の交尾時のそれと比べて減弱することが分かっている。これは性経験の前後で、雄性行動の制御中枢である MPNc の機能が変化し、性的覚醒に関わることを示唆しているが、MPNc の機能変化に関わる分子や神経回路の変化がどの様に生じているかも不明である。

2. 研究の目的

性経験後の MPNc の機能変化とそれに伴って促進される雄性行動の制御機構およびそれに関わる分子を明らかにすることを目的とし、MPNc において性経験後に発現が変化する遺伝子を網羅的発現解析によって探索する。得られた候補分子の機能を組織学的、分子生物学的、および行動学的解析によって明らかにし、性経験が促す雄性行動の制御機構において鍵となる分子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 雄ラットを性経験 (交尾および射精を指標とする) のない対照群と初めて射精を経験した群、2 度目の射精を経験した群の 3 群に分け、各群の MPNc から total RNA を回収し、DNA マイクロアレイによって各群の MPNc における遺伝子群の発現変化および群間における発現の差を網羅的に解析する。

(2) (1) の実験より得られた候補遺伝子の中から、神経伝達物質として機能する分子を選抜し、免疫組織学および分子生物学的手法によって MPNc における候補分子の発現局在や交尾経験による発現変化を解析する。候補遺伝子の発現を抑制するアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、ラットの MPNc へ投与してその後の行動を観察し、当該分子のノックダウンが性行動発現や性的モチベーションにおよぼす影響を解析する。

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイ解析により、交尾によって発現が増加する 27 の遺伝子の中から、さらに経験の差によって発現の異なる 12 の遺伝子を選抜した。各遺伝子の、1 度目の

射精時と 2 度目の射精時における発現変化を定量的リアルタイム PCR によって解析したところ、いずれの遺伝子も 2 度目の射精時の発現増加が 1 度目の射精による増加よりも低いという特徴的な発現パターンを示していた (図 1)。同定した遺伝子のうち、神経の活性化のマーカーとして広く用いられている c-Fos のタンパク質発現を免疫組織学的に解析したところ、射精経験を有する雄ラットの MPNc における c-Fos タンパク質発現は未経験雄に比べ有意に高かったが、2 度目の射精を経験した雄では射精による神経活性の増加が、1 度目に比べ減弱していることが分かった。これは交尾によって MPNc における神経活性が上昇するが、2 度目以降の交尾時には神経の応答性が低下していることを示唆している。同定した遺伝子の中には、コルチコトロピン放出ホルモン (CRH) および vgf nerve growth factor inducible (VGF) という 2 つの神経ペプチドをそれぞれコードする遺伝子を含まれており、両神経ペプチドが交尾経験後の MPNc の機能変化、引いては交尾経験が雄性行動を亢進する機構に関与していると考えた。

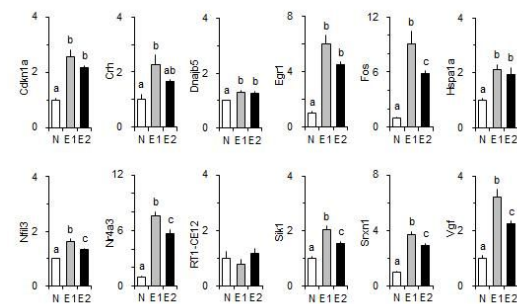


図 1

(2) CRH と VGF の MPNc における局在および発現変化を免疫組織学的および分子生物学的手法により解析したところ、CRH を含む神経細胞および神経線維は MPNc を中心とした神経核に分布しており、局所回路を形成していることが明らかになった。CRH の免疫陽性反応は、1 度目の射精群および 2 度目の射精群で共に低下していたが両群間で有意な差は見られなかった。したがって CRH は経験の差に依存せず、交尾の度に分泌され機能する神経ペプチドであることが考えられた。それを裏付けるように、リアルタイム PCR で CRH 遺伝子の発現変化を解析したところ、1 度目および 2 度目の射精経験群間で有意な差は認められなかった。一方 VGF は、MPNc を含む内側視索前野で広く発現しており、射精によって活性化した一部のニューロンは VGF 遺伝子を発現していた。MPNc における VGF の発現は、c-Fos 発現と同様に 1 度目の射精でピークを迎えており、2 度目の射精時には発現増加が減弱していたことから、VGF が MPNc の機能変化に深く関与していると推察された。

(3) VGF が交尾経験後の MPNc の機能変化および経験後の雄性行動亢進に参与しているならば、当該分子の発現を抑制することで経験後の雄性行動が変化すると考え、VGF の発現を抑制するアデノ随伴ウイルス (AAV) を作製した。まず、VGF 遺伝子の特異的に認識して合成を阻害する small interfering RNA (siRNA) を設計・合成して培養細胞に導入し、VGF 遺伝子発現におよぼす影響を解析した。設計した複数の siRNA のうち、最も遺伝子発現抑制能の高い配列をアデノ随伴ウイルス作製用ベクターへ導入し、siRNA 合成に必要な small hairpin RNA (shRNA) を発現する VGF shRNA-AAV を得た。

作製した VGF shRNA-AAV をラットの MPNc へ微量投与し、性経験前の発情雌ラットの匂いに対する選好性 (嗅覚選好性: 性的モチベーションの指標として用いられる)、雄性行動、交尾経験後の嗅覚選好性を行動学的解析により調べた。VGF を抑制しない control-AAV を投与された対照群のラットにおいて、1 度目の射精時の行動と 2 度目の射精時の行動を比較すると、マウント (雌ラットに対する乗駕行動) およびイントロミッション (性器の挿入を伴うマウント行動) の潜時が有意に短縮されており、雄性行動が亢進されていた (図 2)。加えて嗅覚選好性試験より、交尾経験後に発情雌ラットの匂いに対してより強い執着を見せるようになり、性経験によって性的モチベーションも上昇していることが示された。一方、VGF を抑制する VGF shRNA-AAV を投与された雄ラットでは、1 度目および 2 度目の射精時の雄性行動に顕著な差はなく (図 2)、交尾後の嗅覚選好性試験においても発情雌臭に対する執着は見られなかった。このことは、初めて交尾を経験する際に VGF が機能しないと、その後の性行動亢進や性的モチベーションの増加が生じないことを示唆しており、性経験後の行動亢進に VGF が重要な働きを担っている可能性が示された。VGF はプレプロホルモンであり、いくつかのペプチドが切り出されることが知られている。そこで VGF から産生される 2 種の神経ペプチド Neuroendocrine regulatory peptide-1 および -2 (NERP-1 および NERP-2) を、VGF をノックダウンした個体の側脳室へ投与し、同様の行動解析を行った。その結果、VGF のノックダウンによって消失した交尾経験後の性行動促進および性的モチベーションの増加が、NERP-1 および NERP-2 の投与によってわずかに回復する傾向が見られた。以上の結果から、MPNc に発現する VGF およびその由来ペプチドが、初めて交尾を経験する際に作用することで MPNc の機能変化を促し、経験後の性行動促進および性的モチベーションの上昇に参与していることが明らかになった。

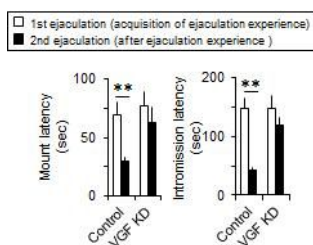


図 2

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 3 件) 全て査読有

Matsuda KI, Uchiyama K, Mori H, Maejima S, Yamaguchi S, Tanaka M, Tsukahara S. Sexual behavior-associated c-Fos induction in the sagittalis nucleus of the hypothalamus in male rat. *Neurosci. Lett.*, 2017, 661: 104-107.

Morishita M, Maejima S, Tsukahara S. Gonadal Hormone-Dependent Sexual Differentiation of a Female-Biased Sexually Dimorphic Cell Group in the Principal Nucleus of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in Mice. *Endocrinology*, 2017, 158(10): 3512-25.

Htike NT, Maekawa F, Soutome H, Sano K, Maejima S, Aung KH, Tokuda M, Tsukahara S. Arsenic Exposure Induces Unscheduled Mitotic S Phase Entry Coupled with Cell Death in Mouse Cortical Astrocytes. *Front. Neurosci.*, 2016, 10:297.

[学会発表](計 7 件)

前嶋 翔ほか、交尾経験が促進させる雄性行動の神経制御機構における神経ペプチドの関与、第 41 回日本比較内分泌学会及びシンポジウム、2016 年 12 月 9-11 日、神奈川

Sho Maejima et al., Involvement of neurons expressing corticotropin-releasing hormone (CRH) and vgf nerve growth factor inducible (VGF) in the central part of the medial preoptic nucleus on male sexual behavior in rats. *Neuroscience* 2016, 12-16 November 2016, San Diego, U.S.A.

前嶋 翔ほか、雄ラットの内側視索前核中心部に発現する VGF は交尾経験による性的動機づけの亢進に参与する、第 44 回日本神経内分泌学会学術集会、2017 年 10 月 21-22 日、神奈川

前嶋 翔ほか、交尾経験によって促進する雄性行動の神経制御における Vgf nerve

growth factor inducible (VGF) ニューロンの役割、第 25 回日本行動神経内分泌研究会、2016 年 9 月 13-15 日、静岡

前嶋 翔ほか、性経験が促進させる性行動の神経制御機構への Vgf nerve growth factor inducible (VGF) の関与、第 88 回日本動物学会大会、2017 年 9 月 21-23 日、富山

前嶋 翔ほか、性経験は内側視索前核中心部の vgf nerve growth factor inducible (VGF) ニューロンの活性化を介して雄ラットの性的動機づけを亢進する、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28-30 日、静岡

前嶋 翔ほか、Involvement of neurons expressing corticotropin-releasing hormone (CRH) and vgf nerve growth factor inducible (VGF) in the central part of the medial preoptic nucleus on male sexual behavior in rats、第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 20-22 日、神奈川

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
なし

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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前嶋 翔 (MAEJIMA, Sho)
埼玉大学・大学院理工学研究科・研究支援者
研究者番号： 10773286