

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19580321
研究課題名 (和文) サルソリノールによる反芻家畜の新しいプロラクチン分泌支配機構の解明
研究課題名 (英文) Clarification of new regulatory mechanisms of prolactin secretion by salsolinol in ruminants
研究代表者
橋爪 力 (HASHIZUME TSUTOMU)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：60124533

研究成果の概要：

サルソリノール (Salsolinol: SAL) が反芻家畜のプロラクチン (PRL) 分泌に及ぼす影響について *in vivo* 及び *in vitro* で検討した。その結果、SAL は生体内で反芻家畜の PRL 分泌に係る生理的な放出因子であることが初めて明らかになった。また SAL は主として視床下部を介して PRL を放出させること、さらに甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンやドーパミンと相互的に作用して PRL の分泌を修飾することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：生産機能制御

1. 研究開始当初の背景

プロラクチン (PRL) は、下垂体前葉から分泌される多種多様な生理作用を持つ不思議なホルモンである。哺乳類では乳管及び乳腺胞の発育を促す基本的なホルモンで乳汁分泌と密

接に関係したホルモンとして知られている。とりわけ、ウシなどの家畜においては、成長ホルモン (GH) と共に泌乳に関係しているため、乳生産に欠かせない家畜生産上極めて重要なホルモンである。

PRL は、GH、黄体形成ホルモン (LH)、甲状

腺刺激ホルモン (TSH)、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 等の下垂体前葉ホルモンとは異なり、視床下部からの放出ホルモンがまだ同定されていない唯一のホルモンであった。すなわち PRL は、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、オキシトシン、血管作動性腸ペプチド (VIP)、下垂体アデニール酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP)、アンジオテンシン II 等のペプチドで放出が刺激されることが報告されていたが、PRL のみを特異的にしかも強力に放出させる真の PRL 放出ホルモンはまだ見つかっていなかった。近年ラットで PRL を特異的に放出すると報告されたプロラクチン放出ペプチド (PrRP) も、その後の研究で、真の放出ホルモンでないことが明らかにされている。このような背景から、真の PRL 放出ホルモンを同定し、PRL 放出機構を解明することは生物学領域のみならず、動物産業分野やヒトの医療分野においても極めて重要な研究課題であった。本研究では、ドーパミン (DA) ニューロン内で合成される DA の誘導体、サルソリノール (Salsolinol: SAL) に着目し、PRL 放出との関係を反芻家畜で調べた。

2. 研究の目的

私たちは最近ウシの下垂体後葉中に反芻家畜の PRL を強力に放出させる物質が存在することを見出した (Hashizume *et al.* *Reprod. Dom. Anim.* 40:184-189, 2005)。その結果、海外から多くの問い合わせがあり、この研究をさらに発展させることが必要となった。中でも PRL の研究で世界的に有名なハンガリーの G. M. Nagy 教授 (Semmelweis 大学) からは、同氏らが最近ラットの下垂体中葉内に見出した PRL 放出因子 (SAL) との関係を共同で研究しようとの申し出がなされた。同氏らは SAL

が *in vitro* でラットの下垂体前葉細胞から特異的に PRL を放出させること、ラットの静脈内に SAL を投与すると PRL が急激に上昇すること、吸乳刺激によりラットの PRL が上昇すると下垂体中葉内の SAL は減少することを報告していた (Tóth *et al.* *J Neuroendocrinol* 13:1042-1050, 2001; Tóth *et al.* *Neurotoxicol and Teratol* 24:655-666, 2002)。またラットの視床下部や下垂体にも SAL が存在すること、さらにその結合部位は視床下部や下垂体にも存在することを報告していた。このように SAL は今まで報告された因子とは異なり、真の PRL 放出ホルモンの可能性が極めて高かったため、SAL による反芻家畜の新しい PRL 分泌支配機構を解明することを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

初めに、ウシの下垂体後葉中に SAL が存在するかどうか検討した。30-50 頭のウシから得た下垂体後葉を酢酸と冷アセトンで処理したのち、凍結乾燥してウシ下垂体後葉抽出物を調製し、Nagy 教授らの HPLC システムを用いて SAL の局在を検討した。次に反芻家畜でも SAL が PRL を生理的に放出させるかどうか成熟雌シバヤギ (ヤギ) の頸静脈内 SAL を投与して調べた。またヤギに SAL、TRH 又は SAL と TRH を同時投与したり、DA のアンタゴニスト (スルピリド) を単独、スルピリドと SAL 又は TRH を同時投与し、SAL、TRH 及び DA の関係を調べた。去勢ホルスタイン牛の第三脳室にカニューレを装着して、SAL を第三脳室に投与して SAL の中枢を介した PRL 放出作用を調べた。さらにウシの培養下垂体前葉細胞を用いて PRL 放出に及ぼす SAL、TRH 及び DA の下垂体前葉細胞に対する直接作用を調べた。

4. 研究成果

HPLC システムを用いて下垂体後葉中への SAL の局在を検討した結果、ウシ下垂体後葉中にも SAL が存在することが明らかになった。またヤギの頸静脈内に SAL (5, 10 mg/kg b. w.) を投与すると、血中 PRL 濃度は急速に上昇し、投与 10 分後に最高値を示すこと ($P < 0.05$)、そして徐々に減少し 80 分後にほぼ基礎濃度まで低下することが分かった。PRL の放出は 5 より 10 mg/kg b. w. の方が大きく用量依存的な反応を示した。SAL (5 mg/kg b. w.) と TRH ($1 \mu\text{g/kg b. w.}$) をヤギの頸静脈内に同時投与すると両物質による PRL の相加的な放出が見られた ($P < 0.05$)。またスルピリド (0.1 mg/kg b. w.) と TRH を同時投与した時の PRL 放出はスルピリド単独又は SAL との同時投与時よりも高かった ($P < 0.05$)。ウシの第三脳室内に SAL を 1 mg 投与しても PRL の有意な放出は見られなかったが、5 mg 投与すると血中 PRL 濃度は上昇し、投与 20 分と 40 分後に対照区に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。 *In vitro* でウシの培養下垂体前葉細胞に $10^{-5} \sim 10^{-9}\text{M}$ の SAL を 2 時間作用させ、培養液中に放出される PRL 量を対照区と比較した結果、 10^{-6} 及び 10^{-5}M SAL はウシの培養下垂体前葉細胞から PRL を有意に ($P < 0.05$) 放出させることが分かった。また SAL (10^{-6}M)、TRH (10^{-8}M)、SAL と TRH、DA (10^{-6}M)、DA と TRH 又は SAL をそれぞれ添加し、培養液中に放出される PRL 量の変化を調べた結果、SAL と TRH を同時添加しても PRL の相加的な放出は見られないこと、DA は SAL 又は TRH により誘起された下垂体細胞からの PRL 放出を抑制する ($P < 0.05$) ことが明らかになった。

本研究の結果から、SAL は生体内で反芻家畜の PRL 分泌に関係する生理的な放出因子であることが、初めて明らかになった。また SAL

は主として視床下部を介して PRL を放出させること、さらに TRH や DA と相互的に作用して PRL の分泌を修飾することが明らかになった。

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 6 件)

① Hashizume T. - Kasuya E. - Nagy G.M. (計 8 名)

Characteristics of prolactin-releasing response to salsolinol (SAL) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) in ruminants. Domestic Animal Endocrinology, 36, 99-104, 2009, 査読有

② Hashizume T., Kasuya E.

Methodology for the study of the hypothalamic-pituitary hormone secretion in cattle. Animal Science Journal, 80, 1-11, 2009, 査読有

③ Hashizume T. - Kasuya E. - Kuwayama H. - Suzuki H. - Nagy G.M. (計 8 名)

Interaction between salsolinol (SAL) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) or dopamine (DA) on the secretion of prolactin in ruminants. Domestic Animal Endocrinology, 34, 327-332, 2008, 査読有

④ Hashizume T. - Kasuya E. - Nagy G.M. (計 11 名)

Salsolinol is present in the bovine posterior pituitary gland and stimulates the release of prolactin both in vivo and in vitro in ruminants. Domestic Animal Endocrinology, 34, 146-152, 2008, 査読有

⑤ Kadokawa H., Suzuki S., Hashizume T.

Kisspeptin-10 stimulates the secretion of growth hormone and prolactin directly from cultured bovine anterior pituitary cells. Animal Reproduction Science, 105, 404-408, 2008, 査読有

⑥ Suzuki S., Kadokawa H., Hashizume T.

Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary

cells. Animal Reproduction Science, 103, 360-365, 2008, 査読有

[学会発表] (計7件)

- ①澤田 建 - 粕谷悦子 - 橋爪 力 (計8名)
Salsolinolの静脈及び脳室内投与はウシのプロラクチンを放出させる, 日本畜産学会第110回大会, 2009年 3月27日~29日, 藤沢・日本大学
- ②八重樫朋祥 - 橋爪 力 (計6名)
ヤギにおけるプロラクチン分泌の季節変化に関する研究, 日本畜産学会110回大会, 2009年 3月27日~29日, 藤沢・日本大学
- ③Hashizume T. - Kasuya E. - Nagy G. M. (計12名)
Salsolinol and prolactin secretion in cattle. 6th International Congress on Farm Animal Endocrinology, 14-16 November 2008, Roanoke・USA
- ④橋爪 力 - 粕谷悦子 (計7名)
Salsolinolと反芻家畜のプロラクチン分泌に関する研究, 第101回日本繁殖生物学会, 2008年 9月18日~20日, 福岡・九州大学
- ⑤Hashizume T. - Kasuya E. - Nagy G. M. (計8名)
Characteristics of prolactin secretion by salsolinol in ruminants. 16th International Congress on Animal Reproduction 13-17 July 2008, Budapest・Hungary
- ⑥橋爪 力 - 粕谷悦子 (計7名)
反芻家畜における Salsolinol のプロラクチン分泌特性に関する研究, 第100回日本繁殖生物学会, 2007年 10月 18日~22日, 東京・東京大学
- ⑦志田怜子 - 粕谷悦子 - 橋爪 力 (計5名)
Salsolinolによる反芻家畜のプロラクチン分泌作用とTRH, ドーパミンによる修飾, 2007年10月18日~22日, 東京・東京大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋爪 力 (HASHIZUME TSUTOMU)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 60124533

(2) 研究分担者(2007年度)

粕谷 悦子 (KASUYA ETSUKO)
(独) 農業生物資源研究所・研究員
研究者番号: 90355743

桑山 秀人 (KUWAYAMA HIDETO)
帯広畜産大学・畜産学部・准教授
研究者番号: 40125399

鈴木 裕之 (SUZUKI HIROYUKI)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号: 50211313

(3) 連携研究者(2008年度)

粕谷 悦子 (KASUYA ETSUKO)
(独) 農業生物資源研究所・研究員
研究者番号: 90355743