

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770056
 研究課題名 (和文) 鳥類ウズラにおける視床下部神経ペプチド (GnIH) による自律神経調節機構の解明
 研究課題名 (英文) Study on autonomic functions of a hypothalamic neuropeptide, GnIH, in the quail
 研究代表者
 浮穴 和義 (KAZUYOSHI UKENA)
 広島大学・大学院総合科学研究科・准教授
 研究者番号：10304370

研究成果の概要 (和文)：鳥類ウズラの視床下部で見出した生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン (GnIH) は、視床下部-下垂体-生殖腺軸において重要な働きをする新しい視床下部ホルモンである。本研究では、GnIH の神経内分泌系以外の生理機能を探ることを目的とし、GnIH 含有神経線維が密に投射している延髄の迷走神経背側運動核 (DMV) と室傍核の神経連絡、DMV 上での GnIH レセプターの同定、さらには DMV が支配している内臓組織の探索を行った。その結果、GnIH は DMV を介して内臓の運動支配を行っていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) is a novel avian hypothalamic neuropeptide which plays important roles in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. The previous study showed that the most prominent GnIH-immunoreactive fibers were seen in the median eminence of the hypothalamus and in the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) in the medulla oblongata, showing GnIH might participate not only in neuroendocrine functions but also in autonomic functions. In this study, we investigated the neural connections between the paraventricular nucleus in the hypothalamus and the DMV. In addition, the receptor for GnIH was localized in the DMV sending efferent fibers into the visceral tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：動物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：神経ペプチド、自律神経調節、鳥類、生理作用

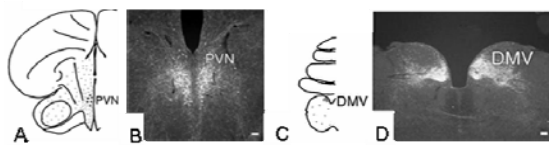
1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、最近、鳥類の脳から 12 アミノ酸残基からなり、C 末端がアミド化し

た新規の神経ペプチドを同定することに成功した。詳しく解析したところ、この神経ペプチドは正中隆起外層に終末する視床下部

室傍核の小細胞性ニューロンに局在しており、生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制することが分かった。これは脊椎動物から初めて見出されたものであり、生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン(Gonadotropin-inhibitory hormone; GnIH)と名付けた(BBRC 275:661-667, 2000; Biochem. J. 354:379-385, 2001)。さらに、哺乳類を含む他の脊椎動物の脳からもGnIHと構造のよく似た新規のペプチドを同定し、その局在と脳下垂体に及ぼす影響を解析してきた(FEBS Lett. 512:255-258, 2002; Eur. J. Biochem. 269:6000-6008, 2002; Endocrinology 144:3879-3884, 2003; J. Endocrinol. 182:33-42, 2004; PNAS 103:2410-2415, 2006 など)。その結果、いずれのペプチドもC末端側にLPXRFamide(X=L or Q)構造を有しており、脳下垂体ホルモン調節に重要な働きをしている視床下部神経ペプチドであることが明らかとなった(Mass Spectrom. Rev. 24:469-486, 2005 総説論文; Peptides 27:1121-1129, 2006 総説論文)。また、鳥類においては、GnIHの発現が松果体で合成・分泌されるメラトニンにより調節を受けていることを発見した(PNAS 102:3052-3057, 2005; Endocrinology 147:1187-1194, 2006)。さらに、鳥類のGnIHレセプターの候補蛋白質をクローニングし、レセプター結合実験からGnIHレセプターであることを確認し、GnIHレセプターを世界で初めて同定した(J. Endocrinol. 184:257-266, 2005)。

一方、このGnIHの脳内分布から、脳下垂体ホルモン調節以外の作用も担っていることが示唆された。視床下部と脳下垂体を繋ぐ連絡部位である正中隆起外層以外で最も神経線維が密に投射している脳部位として、延髄の迷走神経背側運動核(DMV)がある(下図)(Cell Tissue Res. 312:73-79, 2003)。この神経核は、内臓運動などをコントロールする中枢であり、GnIHが心拍動や消化管運動などの自律神経調節に関与していることが考えられた。



[図説]

- A: 視床下部の室傍核(PVN)を示す脳地図
 B: 室傍核(PVN)におけるGnIH産生神経細胞
 C: 迷走神経背側運動核(DMV)を示す脳地図
 D: 迷走神経背側運動核(DMV)に密に終末するGnIH神経線維

2. 研究の目的

以上のような研究背景を踏まえて、本研究では、GnIHの自律神経調節機構の詳細を明らかにすることを目的とし、(1) GnIHが合成される間脳・視床下部の室傍核と延髄の迷走神経背側運動核との神経連絡、(2) 迷走神経背側運動核上でのGnIHレセプターの存在、(3) 迷走神経背側運動核が支配している内臓の同定を明らかにすることで、GnIHが担っている自律神経調節機構を解明する研究を行った。

3. 研究の方法

研究材料には、研究課題にある通り、研究代表者がこれまで研究を進めてきた鳥類のウズラ(3ヵ月齢の成体オス)を用いた。

(1) 視床下部神経ペプチド・GnIHニューロンと延髄の迷走神経背側運動核との神経連絡の解析

脳定位固定装置によりGnIHが存在している視床下部の室傍核領域にトレーサー試薬である標識デキストランアミンを注入後に3日間生存させ、順行性標識を行った。その後、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)免疫陽性を示す迷走神経背側運動核ニューロン上での上記デキストランアミンを二重染色により検出した。さらに、隣接切片を用いてGnIH免疫陽性神経線維の投射の様子を観察した。また逆に、延髄の迷走神経背側運動核へ標識デキストランアミンを注入し、逆行性標識を行い、視床下部室傍核のGnIH産生ニューロン内へのデキストランアミンの取り込みを観察した。

(2) 迷走神経背側運動核におけるGnIHレセプターの解析

先行研究で既に我々はGnIHのレセプターを同定している。そこで、迷走神経背側運動核でのGnIHのレセプターの発現をin situ ハイブリダイゼーション法により解析した。GnIHレセプターに対するDIG標識RNAアンチセンスプローブを作成し、最終的にアルカリフォスファターゼの酵素活性により迷走神経背側運動核上でのGnIHレセプターの発現を検出した。さらに、隣接切片を用いてGnIH免疫陽性神経線維の投射の様子、及びChAT免疫陽性細胞であるかどうかを観察した。

(3) 迷走神経背側運動核からの遠心性経路と内臓支配の解析

迷走神経背側運動核は心臓や消化管などの内臓を支配している領域であることが知られているので、末梢内臓組織にエバンスブルーを投与し、逆行性標識によりGnIHがシナプス連絡している迷走神経背側運動核を

解析した。つまり、GnIH が支配している迷走神経背側運動核からの最終的な内臓の標的組織を解析した。

4. 研究成果

(1) 視床下部神経ペプチド・GnIHニューロンと延髄の迷走神経背側運動核との神経連絡の解析

GnIH が存在している視床下部の室傍核領域にトレーサー試薬である標識デキストランアミンを注入し、その後、ChAT 免疫陽性を示す迷走神経背側運動核ニューロン上でのデキストランアミンと GnIH 免疫陽性神経線維の染色具合を多重染色により解析した。その結果、視床下部室傍核の GnIH ニューロンの神経終末が延髄の迷走神経背側運動核へ投射していることが確認できた。

また、逆に迷走神経背側運動核から視床下部室傍核への逆行性標識を試みたが、標識が上手くされなかった。

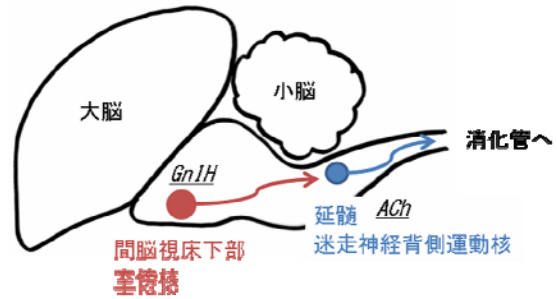
(2) 迷走神経背側運動核におけるGnIHレセプターの解析

迷走神経背側運動核での GnIH のレセプターの発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した結果、迷走神経背側運動核に GnIH レセプターが発現していることが確認できた。これは、アンチセンスプローブを用いた場合にのみ反応が見られ、センスプローブでは全く反応が無かったため、プローブの特異性が示された。また、隣接切片を用いた解析から GnIH レセプターが発現している細胞は、ChAT 免疫陽性細胞であることも分かった。GnIH の免疫染色から、これらの GnIH レセプター発現・ChAT 免疫陽性細胞に GnIH 免疫陽性線維が密に投射していることが明らかになった。

(3) 迷走神経背側運動核からの遠心性経路と内臓支配の解析

消化管に逆行性色素を注入した後に3日間飼育し、GnIH 神経線維が密に投射している迷走神経背側運動核の細胞体が標識されるかどうかを観察した。その結果、消化管に投与した標識色素が迷走神経背側運動核の細胞に検出できた。この標識された細胞の周辺には GnIH の神経線維が密に分布していた。

以上の一連の研究から以下の図に示す神経回路があると考えられる。鳥類ウズラにおいて、間脳・視床下部の室傍核で合成される GnIH が延髄の迷走神経背側運動核のアセチルコリン (ACh) 作動性ニューロンに作用し、その細胞が消化管運動を制御していると考えられる。



[図説]

- ① GnIH が合成される間脳の視床下部室傍核から延髄の迷走神経背側運動核への直接の神経連絡がある。
- ② 延髄の迷走神経背側運動核に GnIH レセプターが発現しており、GnIH が運動ニューロンを制御している。
- ③ GnIH がシナプス連絡をしている延髄の迷走神経背側運動核からの遠心性経路として消化管があり、蠕動運動を制御している可能性が考えられる。

我々は、生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制する新規の視床下部神経ペプチドである GnIH を同定し、その脳下垂体ホルモン調節に着目して生理機能を解析してきた。本研究の推進により、GnIH の神経線維の投射部位の解析から、GnIH の脳下垂体ホルモン調節に加え、延髄の迷走神経背側運動核を介した内臓運動支配も担っていることが強く示唆された。これまで、GnIH が合成される視床下部の室傍核と延髄の迷走神経背側運動核との神経連絡については全く解析がされておらず、直接的な神経線維の投射があるのかどうかは不明であったが、その直接的な連絡が初めて示された。また、GnIH のレセプターが迷走神経背側運動核の神経細胞上に発現しているのかも解析されていなかったが、本研究により初めて明らかとなった。さらに、GnIH がシナプス連絡している迷走神経背側運動核がどの内臓組織を支配しているかが GnIH の生理機能を解明する上で極めて重要な課題であった。消化管から逆行性標識された迷走神経背側運動核の細胞体上に GnIH レセプターが発現しており、GnIH が消化管運動を制御している可能性が示された。

一方、我々は、これまでに GnIH の脳室内投与が鳥類の摂食を促進させる効果があることも見出している。本研究の成果と合わせて考えると、GnIH 投与により消化管運動の亢進が起こり、結果としてその情報が脳に伝わり、摂食行動が促進された可能性がある。哺乳類でも消化管からのコレシストキニンやグレリンの放出が脳に伝わり、摂食行動を調節していることが知られている。このようなことが鳥類でも生じているのかもしれない。

今回、末梢に逆行性標識色素を投与し、迷走神経背側運動核を標識できたのは、消化管の一部のみであった。今後は、正確な消化管組織の領域とそれを支配している迷走神経背側運動核の部位をより詳細に解析することで、どの消化管の領域の運動を GnIH が支配しているのかが明らかになると思っている。また、今回の解析では消化管組織のみの解析であったが、心臓などの別の組織にも逆行性標識を行うことで、消化管以外の組織の運動制御に関する知見も得られるであろう。尚、GnIH の C 末端側 5 残基である LPLRFamide をニワトリに投与すると心拍動を増強する効果があることが他の研究グループの解析により分かっている。消化管運動のみならず様々な内臓の運動に GnIH が関与している可能性が高い。今後は、脳室内及び延髄内に GnIH を投与し、GnIH の迷走神経背側運動核を介した消化管や運動心電・心拍動への作用を *in vivo* において張力トランスデューサーを用いて解析していく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Tsutsui K, Saigoh E, Yin H, Ubuka T, Chowdhury VS, Osugi T, Ukena K, Sharp PJ, Wingfield JC, Bentley GE. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds: discovery, progress and prospect. **J. Neuroendocrinol.** 21: 271-275 (2009)
(査読有)
- ② Tachibana T, Masuda N, Tsutsui K, Ukena K, Ueda H. The orexigenic effect of GnIH is mediated by central opioid receptors in chicks. **Comp. Biochem. Physiol. A** 150:21-25 (2008)
(査読有)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浮穴 和義 (KAZUYOSHI UKENA)
広島大学・大学院総合科学研究科・准教授
研究者番号：10304370

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：