

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20880042
 研究課題名（和文） シバヤギ雄効果フェロモンをモデルとした哺乳類繁殖機能促進に関わる神経機能の解明
 研究課題名（英文） The neural circuit of “male effect” pheromone signaling pathway in goat brain
 研究代表者 若林 嘉浩 (WAKABAYASHI YOSHIHIRO)
 独立行政法人農業生物資源研究所・脳神経機能研究ユニット・任期付研究員
 研究者番号：00510695

研究成果の概要（和文）：ヤギにおける雄効果フェロモンは、非繁殖期の雌に受容され、性周期を回帰させる効果を持つ。このフェロモンは、主嗅覚系・鋤鼻系によって受容され、最終的に視床下部へと情報が伝達されるが、脳内における伝達経路は未だ解明されていない。本研究では、シバヤギを用い、このフェロモン伝達経路を形態学的に明らかにした。フェロモン情報の中継地点である扁桃体内側核からの神経投射が、弓状核に存在するキスペプチンニューロンへと伝達される可能性を電気生理学のおよび形態学的に示した。これらのことから、雄効果フェロモンは、扁桃体内側核から弓状核キスペプチンニューロンに受容され、その結果、GnRH分泌を促進すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In goats, the pheromone produced by the male induces out of seasonal ovulation in anestrus females, the “male effect”. This pheromonal information is transmitted to the hypothalamus via main and/or vomeronasal systems, although it remains unclear about this pathway. In this study, we used goats and we investigated about this pathway in the brain using morphological techniques. The medial amygdaloid nucleus (MeA) that is one of the major nuclei for transmission of pheromone signals, connect to kisspeptin neurons in the arcuate nucleus (ARC). This result suggests that signal of “male effect” pheromone is transmitted to kisspeptin neurons in the ARC, then evokes GnRH release.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・基礎畜産学、応用動物

キーワード：キスペプチン、弓状核、GnRH、

1. 研究開始当初の背景

雄効果は、ヒツジとヤギだけで知られているフェロモン作用である。ヤギでは、これまでの申請者の研究などにより、雄効果フェロモンの受容・産生メカニズムの詳細が明らかにされている (Iwata *et al.*, 2000; Wakabayashi *et al.*, 2000)。すなわち、雄効果フェロモンは成熟した雄で産生されるが、去勢するとフェロモンの産生能力は消失し、去勢した雄にアンドロジェンを投与すると、フェロモン産生が回復される。また、このフェロモンは、頭頂部付近に存在する皮脂腺で限局して産生されている。これらの情報をもとに、シバヤギでは、雄効果フェロモンの単離同定の研究が精力的に進められている。一般的に、哺乳類ではフェロモンの受容・情報処理は鋤鼻神経系（鋤鼻器→副嗅球→扁桃体内側核）で行われていると考えられているが、申請者らのフェロモン受容体の研究から、シバヤギでは、鋤鼻神経系だけでなく主嗅覚系（嗅上皮→主嗅球→梨状葉・扁桃体皮質核）もフェロモン情報の受容・処理に関与していることが示唆されている (Wakabayashi *et al.*, 2002, 2007)。

また、シバヤギでは、脳アトラスと脳定位固定装置が開発され、脳内の特定部位における神経活動の解析が可能となっている (Mori *et al.*, 1991)。その手法を用い、雄効果フェロモンが視床下部からの性腺刺激ホルモン分泌ホルモン (GnRH) 分泌を刺激することが示唆されているが (Hamada *et al.*, 1996)、フェロモン情報がどのような神経回路を介して GnRH 分泌を刺激するのか、そのメカニズムに関しては一切解っていない。

近年、キスペプチンは、GnRH 分泌を強力に促進する作用を持つことが示され、繁殖機能の制御に重要な役割を担う生物活性物質として大きな注目を集めている (Gottsch *et al.*, 2004)。シバヤギにおいても視床下部弓状核にキスペプチンニューロン群が存在することが示され、このキスペプチンニューロン群が、GnRH 分泌調節に関与している可能性が示唆されている。

これらの背景をもとに、雄効果フェロモンの情報はキスペプチンニューロンを介して視床下部 GnRH ニューロンを刺激することによって、GnRH 分泌を引き起こす、という新

たな仮説を立て、実験条件の整ったシバヤギを実験動物として、この仮説を立証することにした。

2. 研究の目的

雄効果フェロモンが、GnRH/LH 分泌を促進する過程で、弓状核キスペプチンニューロンがその情報伝達経路に関与するか否かを、電気生理学的に明らかにする。

主嗅覚系・鋤鼻系からの入力、弓状核キスペプチンニューロンへ伝達される経路を、形態学的に明らかにするために、鋤鼻系の情報伝達における主要な神経核の一つである、扁桃体内側核と、弓状核キスペプチンニューロン間の、神経回路の有無について、トレーサーと免疫組織化学染色を用いて明らかにする。これらの研究から、シバヤギ雄効果フェロモンの受容から GnRH 分泌促進という生理機能発現にいたるまでの神経回路を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

雄効果フェロモン呈示に対する神経活動の変化が、弓状核キスペプチンニューロン群から得られるかを検討するために、弓状核キスペプチンニューロンをターゲットとして記録電極留置手術を行った。卵巣除去シバヤギを脳定位固定装置に固定した後、座標および脳室造影に従って、目的部位に記録電極を留置した。術後の回復期をおいた後、雄効果フェロモンの呈示に起因する神経活動を覚醒下で連続記録すると同時に、頸静脈より連続採血を行った。弓状核より記録される一過性の神経活動の上昇と、血中 LH 濃度の上昇が同期して起こることを確認する目的で、LH 濃度の測定を行った。フェロモン呈示に対して応答する神経活動を記録できた個体については、還流固定したのち、記録電極が弓状核キスペプチンニューロンに正確に挿入されていたかどうかを確認した。

雄効果フェロモンの神経伝達経路を調べる目的で、鋤鼻系の主な情報伝達における主要な神経核である扁桃体内側核に順行性トレーサーを微量注入した。2週間後に脳を採材し、トレーサーの検出、およびキスペプチン抗体を用いた免疫組織化学染色を行って

両者の位置関係を解析した。また、弓状核に逆行性トレーサーを微量注入し、扁桃体内側核におけるトレーサー陽性細胞体の局在を解析した。

4. 研究成果

シバヤギ弓状核キスペプチンニューロン近傍に、記録電極を留置し、周期的に起こる、一過性の神経活動上昇 (MUA ボレー) を記録することができた。この一過性の神経活動上昇は、パルス状 LH 分泌と同期することが明らかになった。この MUA ボレーを記録可能な個体の、電極留置部位を形態学的に解析した。これらの個体の電極先端は、弓状核キスペプチンニューロンの細胞が多数存在する部位の近傍に留置されていた事が明らかとなった。逆に、この部位から離れた領域に電極先端が位置していた個体では、MUA ボレーボレーは記録できなかった。これらのことから、弓状核キスペプチンニューロンが、GnRH パルスジェネレーターの本体である可能性が示された。また、雄効果フェロモンの呈示により、MUA ボレー及び、それに追従する LH 分泌を惹起することができた。これらのことから、雄効果フェロモンの情報が、弓状核キスペプチンニューロンに伝達されることによって、GnRH/LH 分泌が引き起こされることが、電気生理学的に示された。

次に、雄効果フェロモン情報伝達経路を解明する目的で、鋤鼻神経系の情報伝達経路において主要な神経核である、扁桃体内側核に、順行性トレーサーを微量注入した。組織切片を、抗キスペプチン抗体で免疫染色し、トレーサー陽性神経軸索との位置関係を観察した。これらの実験より、扁桃体内側核から弓状核へと投射する神経軸索は、キスペプチンニューロン近傍を走行し、一部で細胞体と接触する像が観察された。また、弓状核に逆行性トレーサーを注入し、扁桃体内側核を観察した結果、扁桃体内側核に、トレーサー陽性細胞体が観察された。

これらの結果から、弓状核キスペプチンニューロンに、雄効果フェロモン情報を伝達する経路は、扁桃体内側核を経由する可能性が考えられた。

以上の結果から、嗅上皮または鋤鼻器によって受容されたシバヤギ雄効果フェロモン情報は、扁桃体内側核を経由して、弓状核キスペプチンニューロンに伝達され、これらのニューロンが刺激されて発火することにより、GnRH/LH 分泌を促進しているものと考えられた。

本研究により、これまで明らかとされていなかった、シバヤギ雄効果フェロモン情報伝達に関する神経回路が明らかとなり、今後、様々な哺乳類のフェロモン情報伝達の解明にとって、必要不可欠な基礎的な情報を得る

ことができた。

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 3 件)

Murata K., Wakabayashi Y., Kitago M., Ohara H., Watanabe H., Tamogami S., Warita Y., Yamagishi K., Ichikawa M., Takeuchi Y. Okamura H. and Mori Y.

Modulation of GnRH Pulse Generator Activity by the Pheromone in Small Ruminants. Journal of Neuroendocrinology 査読有、Vol. 21、2009 pp346-350、

Ohkura S., Takase K., Matsuyama S., Mogi K., Ichimaru T., Wakabayashi Y., Uenoyama Y., Mori Y., Steiner RA., Tsukamura H., Maeda K-I., Okamura H. Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goats. Journal of Neuroendocrinology 査読有、Vol. 21、2009、813-821、

Wakabayashi Y., Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Steiner RA, Okamura H.

Neurokinin B and Dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile GnRH secretion in the goat. The Journal of Neuroscience, 査読有、Vol. 30、2010、pp. 3124-3132、

[学会発表] (計 11 件)

Wakabayashi Y., Mogi K, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mori Y, Maeda K.I, Okamura H. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of goats receive neural projections from the medial nucleus of amygdala, a key nucleus for the pheromone signaling pathway. 1st World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain 平成 20 年

Nakada T, Wakabayashi Y., Ohkura S, Maeda K.I, Okamura H. Distribution of kisspeptin neurons in the shiba goat brain: An immunohistochemical study using two polyclonal antibody against different epitopes of goat kisspeptin 1st World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain 平成 20 年

若林嘉造・大蔵聡・村田健・森裕司・前多敬

一郎・岡村裕昭 ヤギ視床下部におけるキ
ス ペ プ チ ン / Neurokinin B (NKB) /
Dynorphin A (Dyn) 免疫陽性神経細胞の
分布 第24回下垂体研究会 平成21年

若林嘉浩・大蔵聡・中田友明・村田健・Navarro
VM・森裕司・束村博子・前多敬一郎・Steiner
RA・岡村裕昭

シバヤギ弓状核キスペプチンニューロン神
経活動に対する Neurokinin B の作用
第102回日本繁殖生物学会大会 平成21年

村田健・若林嘉浩・坂本光平・大蔵聡・武内
ゆかり・森裕司・岡村裕昭 ヤギオス効果フ
ェロモンに対する GnRH パルスジェネレータ
ーの反応性の解析 第102回日本繁殖生物
学会大会 平成21年

坂本光平・若林嘉浩・村田健・大蔵聡・前多
敬一郎・森裕司・岡村裕昭 性腺ステロイド
ホルモンによる視床下部弓状核キスペプ
チンニューロンの制御 第102回日本繁殖生
物学会大会 平成21年

若林嘉浩
シバヤギ弓状核キスペプチン神経機能の解
析 日本畜産学会第111回大会・若手企画シ
ンポジウム 平成21年

Wakabayashi Y., Nakada T., Murata K.,
Ohkura S., Navarro V.M., Mori Y., Tsukamura
H., Maeda K.-I., Steiner R.A., Okamura H.
Neurokinin B as a cotransmitter in kisspeptin
neurons in the regulation of pulsatile GnRH
secretion. 39th Society for Neuroscience
Annual meeting 平成21年

Ohkura S., Wakabayashi Y., Nakada T.,
Murata K., Navarro V.M., Mori Y., Tsukamura
H., Maeda K.-I., Steiner R.A., Okamura H.
Functional significance of dynorphin as a
cotransmitter in kisspeptin neurons in the
regulation of pulsatile GnRH secretion. 39th
Society for Neuroscience Annual meeting.
平成21年

Ohkura S., Wakabayashi Y., Uenoyama Y.,
Steiner RA., Tsukamura H., Maeda K.-I.,
Okamura H. Gonadotropin-releasing
hormone pulse generator activity from the
arcuate nucleus kisspeptin neurons in the
goat hypothalamus. 14th International
congress of endocrinology. 平成22年

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 嘉浩 (WAKABAYASHI YOSHIHIRO)
独立行政法人農業生物資源研究所
脳神経機能研究ユニット 任期付研究員
研究者番号: 00510695

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: