

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570091

研究課題名(和文) 光周期と異なるウズラの鳴声刺激による生殖リズムの制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of reproductive rhythms by male quail call stimulus that is different from the photoperiod.

研究代表者

産賀 崇由 (Ubuka, Takayoshi)

東京医科歯科大学・教養部・非常勤講師

研究者番号：10594286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は動物の生殖リズムが社会的環境により如何に調節されるかを明らかにすることを目的とした。生殖リズムを調節する最も大きな要因は明暗の光サイクルであるが、生殖は本来社会的活動であるから同性や異性からの社会的刺激からも大きな影響を受ける。本研究では短日条件下にあるために非繁殖の状態にあるウズラに雄の鳴声を長日条件と同様に長時間聞かせると発現が著しく高まる遺伝子が同定された。その遺伝子産物の局在を調べたところ、中脳聴覚野に存在するニューロン群が同定された。雄ウズラの鳴声はこれらニューロン群で情報処理され、GnRHニューロンに伝えられ、明暗の光サイクルと無関係にLHの分泌を制御するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to reveal how the social environment regulates reproductive rhythms in the animal. The strongest factor that regulates reproductive rhythms is the photoperiod in photoperiodic animals in the temperate zone. However, because reproduction is a social activity in nature, reproductive activity is also influenced by social stimuli from males and females of the same species. In this project, we identified a gene that its expression level was significantly increased in the quail brain by male quail call stimulus for a long period under short day photoperiod. We further investigated the location of the gene product and found that it is expressed in neuronal clusters in the auditory nucleus in the quail brain. These results suggest that the male quail call stimulus is processed in these neurons in the auditory nucleus and transferred to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and regulate luteinizing hormone (LH) secretion independent from the short day photoperiod.

研究分野：Neuroendocrinology

キーワード：生殖リズム 社会的環境 雄の鳴声 聴覚野 GnRH LH

### 1. 研究開始当初の背景

個体の生存や種の保存を有利にするため、動物の生理と行動には日周期、季節繁殖、成長、性成熟等のリズムがある。多くの動物において生体リズムを調節する最も大きな要因は1日の明暗サイクルである。動物の生殖活動についても明暗サイクルが大きな調節要因となり、そのメカニズム(光周性)についてはこれまでに多くの研究がおこなわれた。しかし、社会的動物では同種の動物からの社会的刺激によっても生殖活動は大きな影響を受ける。これは本来生殖活動が同性、異性間の相互作用を伴う社会的活動であるからと考えられる。

光周期による生体リズムの調節機構については多くの研究がある。鳥類においてその概日活動リズムを制御するものは松果体や網膜から暗期に分泌されるホルモンであるメラトニンであると考えられている(Gaston and Menaker, 1968, Science 63, 1125-1127; Zimmerman and Menaker, 1979, Proc Natl Acad Sci U S A 76, 999-1003; Gwinner and Benzinger, 1978, J Comp Physiol 127, 209-213)。哺乳類ではメラトニンの分泌リズムが季節繁殖をも制御すると考えられているが、鳥類ではその効果は弱いまたは無関係という見解も多い。最近のウズラを用いた研究では、非繁殖期から繁殖期にかけての変化は、先ず光刺激により下垂体隆起葉で甲状腺刺激ホルモン(TSH)が発現し、TSHが脳室上衣細胞層に働いて低活性型の甲状腺ホルモンであるT4(サイロキシン)を活性型のT3(トリヨードサイロニン)に変換する2型脱ヨウ素酵素(DIO2)の発現を局所的に誘導し、T3が正中隆起の形態変化をもたらす、下垂体からの生殖腺刺激ホルモンの分泌を促進する視床下部神経ホルモンである生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の分泌が高まることによると考えられた(Yoshimura et al., 2003, Nature 426, 178-181; Nakao et al., 2008, Nature 452, 317-322)。また、同じくウズラにおいて、下垂体からの生殖腺刺激ホルモンの分泌を抑制することにより生殖腺の発達や機能維持を抑制する新規視床下部神経ホルモンである生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン(GnIH)が研究されている(Tsutsui et al., 2000, Biochem Biophys Res Commun 275, 661-667; Ubuka et al., 2006, Endocrinology 147, 1187-1194)。GnIHはGnRHニューロンを抑制することによっても生殖腺刺激ホルモンの分泌を抑制する(Ubuka et al., 2006, Endocrinology 149, 268-278)。GnIHにおいて興味深いのはGnIHの発現や放出をメラトニンが促進するという点である(Ubuka et al., Proc Natl Acad Sci U S A 102, 3052-3057; Chowdhury et al., 2010, Endocrinology 151, 271-280)。

### 2. 研究の目的

ウズラを含む多くの鳥類において鳴声は同種間の社会的相互作用を媒介する最も重要な手段の一つである。ウズラは明期が12時間より長い長日に生殖腺を発達させる。また、雄の鳴声は明期およびその前後に聞かれる(Wada M, 1981, Horm Behav 15, 147-157)。

そこで、本研究においては、社会性の高い長日繁殖動物である鳥類のウズラを用い、雄の鳴声を、短日条件下にあるために非繁殖の状態にある雄ウズラに聞かせ、雄の脳の変化、生殖に関わるホルモンレベル、生殖腺の発達の程度を調べた。

### 3. 研究の方法

先ず、成熟した雄ウズラを短日条件(明期8時間:暗期16時間)の環境におき生殖腺を退化させる。この生殖腺の退化したウズラに録音した雄の鳴声を明期の始まりから20時間毎日聞かせる。コントロール群のウズラには明期の間だけ8時間毎日雄の鳴声を聞かせる。このシステムにより実験群では光周期は本来非繁殖期をもたらず短日条件でありながら雄の鳴声による社会的環境は繁殖期と同じであるという環境が作られる。

### 4. 研究成果

雄ウズラの総排出口腺の大きさは、血液中アンドロゲン濃度と比例し、精巣の発達の程度を表すが、光長日条件(明期16時間:暗期8時間)で飼育した雄ウズラを光短日条件(明期8時間:暗期16時間)におくと、3週間で総排出口腺が著しく萎縮した。この総排出口腺が著しく萎縮した雄ウズラに対し、光短日条件(明期8時間:暗期16時間)にありながら録音した雄の鳴声を明期の始まりから20時間毎日聞かせると、4週間で総排出口腺の大きさは繁殖期と同程度となった。光短日条件(明期8時間:暗期16時間)で4週間、録音した雄の鳴声を明期の始まりから20時間毎日聞かせた群と8時間毎日聞かせた群では精巣重量に著しい違いがあった。

総排出口腺が著しく萎縮した雄ウズラに対し、光短日条件(明期8時間:暗期16時間)にありながら録音した雄の鳴声を明期の始まりから20時間毎日聞かせると、4週間で総排出口腺の大きさが繁殖期と同程度となることがわかったが、録音した雄ウズラの鳴声を明期の始まりから20時間短日条件(明期8時間:暗期16時間)の雄ウズラに聞かせると、その翌日にサンプリングした脳においてGnRH mRNAの発現が、血液において生殖腺刺激ホルモンの濃度がコントロール群に比較し著しく増加することがわかった。

そこで、録音した雄の鳴声を明期の始まりから20時間光短日条件下のウズラに聞かせた翌日にサンプリングした脳と雄の鳴声を聞かせなかったコントロール群の脳にお

いて(それぞれ4例)ウズラの聴覚野における発現が異なる遺伝子をマイクロアレイ法により解析した。その結果、録音した雄の鳴声を明期の始まりから20時間短日条件のウズラに聞かせると著しく発現の高まる遺伝子と著しく発現の低下する遺伝子がそれぞれ20-30同定された。その内最も発現の高まる遺伝子と発現の低下する遺伝子の遺伝子産物の局在を免疫染色法により調べたところウズラの聴覚野に存在するニューロンが染色された。

問題は録音した雄ウズラの鳴声を明期の始まりから20時間短日条件の雄ウズラに聞かせるとその翌日に脳の聴覚野において発現が著しく高まる遺伝子と発現が低下する遺伝子の産物が如何にGnRH mRNAの発現を制御するかである。そのためには、これら遺伝子産物を含有するニューロンがGnRHニューロンに投射するのかを調べる必要がある。また、これら遺伝子の発現変動、発現制御機構、受容体を解析しこれら遺伝子がどのようにウズラの生殖活動を制御するのか詳しく分析する必要がある。

#### 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32件)

#### 原著論文

(1) T. Ubuka, K. Tsutsui, Evolution of gonadotropin-inhibitory hormone receptor and its ligand. *Gen. Comp. Endocrinol.* 209, 148-161 (2014). 査読有  
doi: 10.1016/j.ygcen.2014.09.002

(2) N. T. Ashley, T. Ubuka, I. Schwabl, W. Goymann, B. M. Salli, G. E. Bentley, C. L. Buck, Constant illumination alters optic per2 expression, plasma melatonin, and locomotory activity in arctic-breeding songbirds, Lapland longspurs (*Calcarius lapponicus*). *J. Biol. Rhythms.* 29, 456-469 (2014). 査読有  
doi: 10.1177/0748730414552323

(3) B. McConn, G. Wang, J. Yi, E. Gilbert, T. Osugi, T. Ubuka, K. Tsutsui, V. Chowdhury, M. Furuse, M. Cline, Gonadotropin-inhibitory hormone-stimulation of food intake is mediated by hypothalamic effects in chicks. *Neuropeptides.* 48, 327-334 (2014). 査読有  
doi: 10.1016/j.npep.2014.09.001

(4) Y. Tobar, Y. L. Son, T. Ubuka, Y. Hasegawa, K. Tsutsui, A new pathway mediating social effects on the endocrine

system: female presence acting via norepinephrine release stimulates gonadotropin-inhibitory hormone in the paraventricular nucleus and suppresses luteinizing hormone in quail. *J. Neurosci.* 34, 9803-9811 (2014). 査読有  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.3706-13.2014

(5) T. Osugi, T. Okamura, Y. L. Son, M. Ohkubo, T. Ubuka, Y. Henmi, K. Tsutsui, Evolutionary origin of GnIH and NPFF in chordates: insights from novel amphioxus RFamide peptides. *PLoS One.* 9, e100962 (2014). 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0100962

(6) Y. L. Son, T. Ubuka, M. Narihiro, Y. Fukuda, I. Hasunuma, K. Yamamoto, D. D. Belsham, K. Tsutsui, Molecular basis for the activation of gonadotropin-inhibitory hormone gene transcription by corticosterone. *Endocrinology* 155, 1817-1826 (2014). 査読有  
doi: 10.1210/en.2013-2076

(7) T. Ubuka, S. Haraguchi, Y. Tobar, M. Narihiro, K. Ishikawa, T. Hayashi, N. Harada, K. Tsutsui, Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviors by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat. Commun.* 5, 3061 (2014). 査読有  
doi: 10.1038/ncomms4061

(8) S. Haraguchi, S. Hara, T. Ubuka, M. Mita, and K. Tsutsui, Possible role of pineal allopregnanolone in Purkinje cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 21110-21115 (2012). 査読有  
doi: 10.1073/pnas.1210804109

(9) T. Osugi, D. Daukss, K. Gazda, T. Ubuka, T. Kosugi, S. A. Sower, and K. Tsutsui, Evolutionary origin of the structure and function of gonadotropin-inhibitory hormone: Insights from lampreys. *Endocrinology* 153, 2362-2374. (2012). 査読有  
doi: 10.1210/en.2011-2046

(10) Y. L. Son, T. Ubuka, R. P. Millar, and K. Tsutsui, Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits GnRH-I induced gonadotropin subunit gene transcriptions by inhibiting AC/cAMP/PKA-dependent ERK Pathway in L8T2 cells. *Endocrinology* 153, 2332-2343 (2012). 査読有  
doi: 10.1210/en.2011-1904

(11) N. Treen, N. Itoh, H. Miura, I. Kikuchi, T. Ueda, K. G. Takahashi, T. Ubuka, K.

Yamamoto, P. J. Sharp, K. Tsutsui, and M. Osada, Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: A primitive endocrine system controlling reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 167-172 (2012). 査読有  
doi: 10.1016/j.ygcen.2012.01.008

(12) T. Ubuka, M. Mukai, J. Wolfe, R. Beverly, S. Clegg, A. Wang, S. Hsia, M. Li, J. S. Krause, T. Mizuno, Y. Fukuda, K. Tsutsui, G. E. Bentley, and J. C. Wingfield, RNA interference of gonadotropin-inhibitory hormone gene induces arousal in songbirds. *PLoS One* 7, e30202 (2012). 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0030202

(13) S. Haraguchi, T. Koyama, I. Hasunuma, S. Okuyama, T. Ubuka, S. Kikuyama, J. L. Do Rego, H. Vaudry, and K. Tsutsui, Acute stress increases the synthesis of 7 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, a new key neurosteroid stimulating locomotor activity, through corticosterone action in newts. *Endocrinology* 153, 794-805 (2012). 査読有  
doi: 10.1210/en.2011-1422

(14) T. Ubuka, K. Inoue, Y. Fukuda, T. Mizuno, K. Ukena, L. J. Kriegsfeld, and K. Tsutsui, Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 153, 373-385 (2012). 査読有  
doi: 10.1210/en.2011-1110

#### 総説論文

(1) L. J. Kriegsfeld, T. Ubuka, G. E. Bentley, K. Tsutsui, Seasonal control of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *Front Neuroendocrinol.* 37, 65-75 (2015). 査読有  
doi: 10.1016/j.yfrne.2014

(2) 産賀崇由、神経ペプチドによる神経ステロイドの合成制御. 比較内分泌学 「新しい内分泌現象」 41, 3-7 (2014).  
<http://doi.org/10.5983/nl2008jsce.41.3>

(3) T. Osugi, T. Ubuka, K. Tsutsui, An evolutionary scenario for GnIH in chordates. *J. Neuroendocrinol.* 27, 556-566 (2014). 査読有  
doi: 10.1111/jne.12246

(4) T. Ubuka and K. Tsutsui, Review: neuroestrogen regulation of socio-sexual behavior of males. *Front. Neurosci.* 8, 323

(2014). 査読有  
doi: 10.3389/fnins.2014.00323

(5) 産賀崇由、筒井和義、生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン (GnIH) はニューロエストロゲン合成を促進することにより雄ウズラの攻撃性を抑制する. 日本生殖内分泌学会雑誌第 19 巻「トピックス」 57-59 (2014). 査読有  
[www.seishoku.org/14\\_19kan/19-14topix1.pdf](http://www.seishoku.org/14_19kan/19-14topix1.pdf)

(6) T. Ubuka, K. Tsutsui, Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits aggressive behavior of male quail by increasing neuroestrogen synthesis in the brain beyond its optimum concentration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 49-54 (2014). 査読有  
doi: 10.1016/j.ygcen.2014.03.014

(7) T. Osugi, T. Ubuka, K. Tsutsui, Review: evolution of GnIH and related peptides structure and function in the chordates. *Front. Neurosci.* 8, 255 (2014). 査読有  
doi: 10.3389/fnins.2014.00255

(8) T. Ubuka, Y. L. Son, Y. Tobar, M. Narihiro, G. E. Bentley, L. J. Kriegsfeld, K. Tsutsui, Central and direct regulation of testicular activity by gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 8 (2014). 査読有  
doi: 10.3389/fendo.2014.00008

(9) 産賀崇由、井上和彦、筒井和義、ハムスターの GnIH の同定及び発現制御と生理機能の解析. 日本生殖内分泌学会雑誌第 18 巻「研究フロンティア」 27-33 (2013). 査読有  
[www.seishoku.org/13\\_18kan/10-frontier2.pdf](http://www.seishoku.org/13_18kan/10-frontier2.pdf)

(10) V. S. Chowdhury, T. Ubuka, K. Tsutsui, Review: Melatonin stimulates the synthesis and release of gonadotropin-inhibitory hormone in birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 175-178 (2013). 査読有  
doi: 10.1016/j.ygcen.2012.08.005

(11) T. Ubuka, G. E. Bentley, and K. Tsutsui, Neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in seasonally breeding birds. *Front. Neurosci.* 7, 38 (2013). 査読有  
doi: 10.3389/fnins.2013.00038

(12) T. Ubuka, Y. L. Son, G. E. Bentley, R. P. Millar, and K. Tsutsui,

Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 10-17 (2013). 査読有  
doi: 10.1016/j.ygcen.2013.02.030

(13) V. S. Chowdhury, T. Ubuka, and K. Tsutsui, Review: Melatonin stimulates the synthesis and release of gonadotropin-inhibitory hormone in birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 175-178 (2013). 査読有  
doi: 10.1016/j.ygcen.2012.08.005

(14) K. Tsutsui, T. Ubuka, G. E. Bentley, L. J. Kriegsfeld, Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Front. Neurosci.* 7, 60 (2013). 査読有  
doi: 10.3389/fnins.2013.00060

(15) 筒井和義、大杉知裕、戸張靖子、孫ヨリ、産賀崇由、生殖を制御する新規脳ホルモン GnIH の起源と分子進化. *比較内分泌学* 38, 76-82 (2012).  
10.5983/nl2008jsce.38.76

(16) T. Ubuka, Y. L. Son, Y. Tobar, and K. Tsutsui, Review: Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 3, 148 (2012). 査読有  
doi: 10.3389/fendo.2012.00148

(17) T. Ubuka, T. Mizuno, Y. Fukuda, G. E. Bentley, J. C. Wingfield, and K. Tsutsui, RNA interference of gonadotropin-inhibitory hormone gene induces aggressive and sexual behaviors in birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 179-186 (2012). 査読有  
doi: 10.1016/j.ygcen.2012.09.010

(18) K. Tsutsui, T. Ubuka, G. E. Bentley, and L. J. Kriegsfeld, Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177, 305-314 (2012). 査読有  
doi: 10.1016/j.ygcen.2012.02.013

〔学会発表〕(計1件)

産賀崇由、長谷川喜久、中野真樹、丸山雄介、服部淳彦、筒井和義 鳴声刺激は短日条件下にあるウズラの生殖活動を高める 日本動物学会 2012年9月13、14、15日 大阪

〔図書〕(計5件)

(1) K. Tsutsui and T. Ubuka, RFamide peptide family. In: Takei Y., Ando H., Tsutsui K. (eds). *Handbook on Hormones. Part 1 Peptides and proteins in vertebrates, Section 1.1. Neuropeptides.* Elsevier B.V., In press (2015). 査読有

(2) Tsutsui and T. Ubuka, Gonadotropin-inhibitory hormone. K. In: Takei Y., Ando H., Tsutsui K. (eds). *Handbook on Hormones. Part 1. Peptides and proteins in vertebrates, Section 1.1. Neuropeptides.* Elsevier B.V., In press (2015). 査読有

(3) T. Osugi, T. Ubuka and K. Tsutsui, PQRamide peptide. In: Takei Y., Ando H., Tsutsui K. (eds). *Handbook on Hormones. Part 1. Peptides and proteins in vertebrates, Section 1.1. Neuropeptides.* Elsevier B.V., In press (2015). 査読有

(4) T. Ubuka, and G. E. Bentley, Avian gonadotropin-releasing hormone (GnRH): Structure, function and regulation. In: Sills S. ed. *Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH): Production, Structure & Function.* Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 69-83 (2013). 査読有

(5) Tsutsui, and T. Ubuka, Gonadotropin-inhibitory Hormone. K. In: Kastin A. J. and Vaudry H. (eds). *Handbook of biologically active peptides. Section on brain peptides.* Academic Press, London, pp. 802-811 (2012). 査読有

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者  
産賀崇由 (UBUKA, Takayoshi)  
東京医科歯科大学・教養部・非常勤講師  
研究者番号：10594286

(2)研究分担者  
服部淳彦 (HATTORI, Atsuhiko)  
東京医科歯科大学・教養部・教授  
研究者番号：70183910