

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18571

研究課題名(和文) 松果体ニューロステロイド合成の概日リズムとその生理機能の解析

研究課題名(英文) Physiological significance of pineal neurosteroids and the circadian rhythms in their synthesis

研究代表者

原口 省吾 (Haraguchi, Shogo)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：20592132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では鳥類を用いて松果体アロプレグナノロン合成の概日リズムとその生理機能を解析した。その結果、松果体ニューロステロイド合成は明暗環境下において概日リズムを示すことがわかった。さらに、不適切な光環境下においては松果体アロプレグナノロン合成が変容し、その結果、小脳において神経保護作用を持つPACAP遺伝子の発現低下を導くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to examine the action of pineal neurosteroids. Following pinealectomy, we found that the reduced concentration of allopregnanolone induced apoptosis in the Purkinje cells of the cerebellum. However, administration of allopregnanolone to pinealectomized chicks prevented apoptosis in these cells. Subsequently, we have demonstrated that mRNA expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), an endogenous neuroprotective factor, is decreased following pinealectomy in the developing cerebellum of chicks. These findings suggest that the neuroprotective effect of pineal allopregnanolone is associated with an increase in PACAP mRNA expression during the early stages of neuronal development. We therefore provide new evidence that pineal allopregnanolone may be involved in Purkinje cell survival mediated by PACAP action during development.

研究分野：神経内分泌

キーワード：光環境 松果体 ステロイド 小脳 アロプレグネノロン PACAP

1. 研究開始当初の背景

脳で作られるステロイドホルモン、ニューロステロイドは主に脳内の海馬、視床下部、小脳などで合成されることが知られていた。しかし、研究代表者らの研究により、脳に存在する内分泌器官である松果体がニューロステロイドを合成していることが新たに明らかになった。さらに松果体で合成されるニューロステロイドのうち、合成量が顕著に多いアロプレグネノロンは小脳の適切な発達に不可欠であることも明らかにした。

2. 研究の目的

松果体は暗期に合成されるホルモン、メラトニンを合成・分泌することが知られている。この様に松果体は光環境に応答する器官であることから、松果体ニューロステロイドの合成・分泌にも日周リズムが存在することが考えられた。そこで本研究では、松果体ニューロステロイドの合成・分泌に日周リズムが存在するのかが明らかにすることを目的とした。加えて、松果体ニューロステロイド合成に日周リズムが観察された場合、その生理的な役割はどのようなものであるのか探索を行うことも目的とした。

3. 研究の方法

松果体ニューロステロイド合成の解析

白色レグホーンの雄の雛を孵化後 6 日間、12 時間明期/12 時間暗期あるいは 24 時間暗期で飼育した。その後、2 群のニワトリ雛の松果体を 7 日目に 4 時間おきにサンプリングし、リアルタイム PCR によるステロイド合成酵素の mRNA 発現量の測定、ステロイド合成酵素の活性測定、ステロイド濃度をエレクトロスプレーイオン化液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析(LC-ESI-MS/MS)法により測定した。

松果体ニューロステロイド合成の生理機能の解析

白色レグホーンの雄の雛を孵化後 6 日間、12 時間明期/12 時間暗期あるいは 24 時間暗期で飼育した。その後、脳の形成を終える孵化後 21 日目まで 12 時間明期/12 時間暗期で飼育した。それらの個体を用いて、脳の形態学的な変化、脳内のホルモン変化などを解析した。

PACAP 遺伝子座のヒストン修飾状態の解析

12 時間明期/12 時間暗期あるいは 24 時間暗期で飼育した 2 群の雛の小脳 PACAP 遺伝子座のヒストン修飾状態をクロマチン免疫沈降法(ChIP)とリアルタイム PCR で測定した。

4. 研究成果

松果体は、鳥類では光受容器として知られていることから、松果体ニューロステロイド合成が光環境により制御を受けている可能

性を考え、本研究で検討を行った。その結果、ニワトリ雛を明暗環境下での飼育した場合には、松果体アロプレグネノロン合成に日周リズムが見られた。しかし、恒暗環境下で飼育した場合には、松果体アロプレグネノロン合成に日周リズムが消失した(図 1)。このことは、松果体ニューロステロイド合成が、光刺激により制御されていることを示唆した。また、この結果から恒暗環境下での飼育は小脳においてアロプレグネノロン濃度の低下を導くことが予測された。そこでアロプレグネノロン濃度の測定を行ったところ、実際、恒暗環境下での飼育は小脳アロプレグネノロン濃度の低下を導く結果が得られた。

鳥類では、幼鳥期の日長が様々な遺伝子のエピゲノム状態に変化を及ぼすことが知られている。そこで小脳のアロプレグネノロン濃度の変化が、小脳の PACAP 遺伝子のエピゲノム状態にどのような変化を引き起こすのか解析した。その結果、松果体除去による小脳アロプレグネノロン濃度の低下は、PACAP 遺伝子座の H3K9me3 化を引き起こした(図 2)。

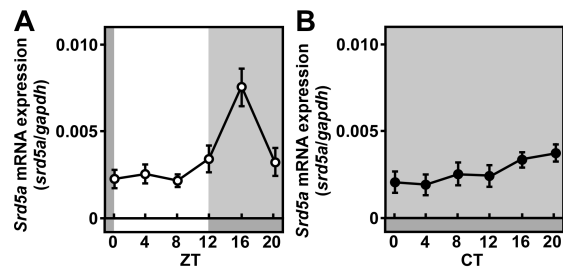


図 1 松果体におけるニューロステロイド合成酵素 mRNA の発現変動

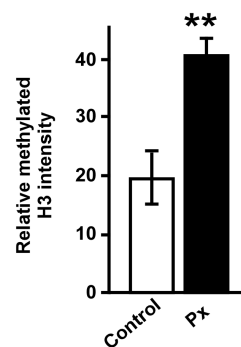


図 2 松果体除去による PACAP 遺伝子座のヒストン修飾状態の変化

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) Shishido Y, Baba T, Sato T, Shima Y,

Miyabayashi K, Inoue M, Akiyama H, Kimura H, Kanai Y, Ishihara Y, Haraguchi S, Miyazaki A, Rozman D, Yamazaki T, Choi MH, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi KI. Differential lactate and cholesterol synthetic activities in XY and XX Sertoli cells. *Scientific Reports*. 2017; 7: 41912. Doi: 10.1038/srep41912. (査読有)

(2) Ogura Y, Haraguchi S (Corresponding author), Nagino K, Ishikawa K, Fukahori Y, Tsutsui K. 7α -Hydroxypregnenolone regulates diurnal changes in sexual behavior of male quail. *General and Comparative Endocrinology*. 2016; 227: 130-5. Doi: 10.1016/j.ygcen.2015.11.010. (査読有)

(3) Haraguchi S, Yamamoto Y, Suzuki Y, Hyung Chang J, Koyama T, Sato M, Mita M, Ueda H, Tsutsui K. 7α -Hydroxypregnenolone, a key neuronal modulator of locomotion, stimulates upstream migration by means of the dopaminergic system in salmon. *Scientific Reports*. 2015; 5: 12546. Doi: 10.1038/srep12546. (査読有)

(4) Haraguchi S, Ikeda N, Abe M, Tsutsui K, Mita M. Nucleotide sequence and expression of relaxin-like gonad-stimulating peptide gene in starfish *Asterina pectinifera*. *General and Comparative Endocrinology*. 2016; 227: 115-9. Doi: 10.1016/j.ygcen.2015.06.017. (査読有)

(5) Mita M, Daiya M, Haraguchi S, Tsutsui K, Nagahama Y. A new relaxin-like gonad-stimulating peptide identified in the starfish *Asterias amurensis*. *General and Comparative Endocrinology*. 2015; 222: 144-9. Doi: 10.1016/j.ygcen.2015.07.002. (査読有)

(6) Toyoda F, Hasunuma I, Nakada T, Haraguchi S, Tsutsui K, Kikuyama S. Possible hormonal interaction for eliciting courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*. *General and Comparative Endocrinology*. 2015; 224: 96-103. Doi: 10.1016/j.ygcen.2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 24 件)

招待講演

(1) 原口省吾 松果体ニューロステロイドによる脳機能制御 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会「長崎大学医学部(長崎県長崎市) 2017 年 3 月 28 日-30 日」

(2) Haraguchi S, Tachibana T, Tokumoto T, Matsuda K, Tsutsui K. Pineal allopregnanolone saves cerebellar Purkinje cells from apoptosis via a membrane progesterin receptor-mediated mechanism. *The 8th Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE)*

(Seoul, Korea; June 20-24, 2016)

一般発表

(3) 原口省吾、野崎美月、佐藤未来、松田恒平、徳元俊伸、橘哲也、宮崎章、筒井和義 松果体アロプレグナノロンによる小脳プルキンエ細胞の細胞死抑制機構 第 41 回日本比較内分泌学会大会「北里大学(神奈川県相模原市) 2016 年 12 月 9 日-11 日」

(4) Haraguchi S, Kamata M, Sato M, Nozaki M, Matsuda M, Tokumoto T, Miyazaki A, Tsutsui K. Pineal Allopregnanolone Saves Cerebellar Purkinje Cells from Cell Death through PACAP Action. 第 39 回日本神経科学大会「パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016 年 7 月 20-22 日」

(5) 原口省吾、佐藤未来、鈴木悠子、筒井和義 ニワトリ雛の松果体におけるエストロゲン合成の日内変動 第 22 回日本時間生物学学会学術大会「早稲田大学(東京都新宿区) 2015 年 11 月 21 日-22 日」

(6) 原口省吾、鎌田真気、時田巧磨、田代溪一郎、松田恒平、筒井和義 松果体アロプレグナノロンは PACAP を介して小脳プルキンエ細胞の細胞死を抑える 第 86 回大会日本動物学会「朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市) 2015 年 9 月 17 日-19 日」

(7) Haraguchi S, Ikeda N, Abe M, Tsutsui K, Mita M. Starfish gonadotropin, relaxin-like gonad-stimulating peptide: the gene and its expression. *The third meeting of the North American Society for Comparative Endocrinology (NASCE 2015)* (Ottawa, Canada; June 21-25, 2015)

他に一般発表 17 件

〔図書〕(計 4 件)

(1) Tsutsui K, Haraguchi S. Neurosteroids. In: *Handbook of Hormones*, First Edition. Takei Y, Ando H, Tsutsui K (eds), Elsevier, pp 537-539.

(2) Tsutsui K, Haraguchi S. Pregnenolone sulfate. In: *Handbook of Hormones*, First Edition. Takei Y, Ando H, Tsutsui K (eds), Elsevier, pp 540-541.

(3) Tsutsui K, Haraguchi S. 7α -Hydroxypregnenolone. In: *Handbook of Hormones*, First Edition. Takei Y, Ando H, Tsutsui K (eds), Elsevier, pp 542-543.

(4) Tsutsui K, Haraguchi S. Allopregnanolone. In: *Handbook of Hormones*, First Edition. Takei Y, Ando H, Tsutsui K (eds), Elsevier, pp 544-545.

〔その他〕
ホームページ等
<https://sites.google.com/site/shogoharaguchi/>

6．研究組織

(1)研究代表者

原口 省吾 (HARAGUCHI, Shogo)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：20592132