

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700446

研究課題名（和文）神経ペプチド（GnIH）による中脳ドーパミン系を介した社会性行動の制御機構の解明

研究課題名（英文）GnIH regulates social behavior through midbrain dopaminergic neurons.

研究代表者

戸張 靖子（TOBARI YASUKO）

早稲田大学・教育・総合科学学術院・助手

研究者番号：90453919

研究成果の概要（和文）：求愛行動の動機付けに関連した中脳ドーパミン系に生殖線刺激ホルモン放出抑制ホルモン（GnIH）神経が投射し、中脳ドーパミン神経に GnIH 受容体の発現がみられたことから、求愛行動のモチベーション制御に GnIH が関与することが示唆された。求愛行動へのモチベーションの異なる環境におかれたオス間で GnIH 発現を比較したところ、メス個体への求愛行動へのモチベーションが高い状態にあるオス群で GnIH の発現に有意な変化がみられた。

研究成果の概要（英文）：The ventral tegmental area (VTA) contains dopamine neurons that are important in modulating motivated behavior, addiction, and reward. Here, we show that VTA dopamine neurons express GnIH receptor mRNA and receive synaptic input that contains gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). Furthermore, we examined changes in the activity of GnIH neurons in the brain of male following a view of and sexual interaction with a female. The presence of female seems to result in a change in diencephalic GnIH mRNA levels of male. These data support a new role for central GnIH with possible implications for regulation of sexual motivation

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、融合社会脳科学

キーワード：動機付け、情動、神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

生殖線刺激ホルモン放出抑制ホルモン（gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH）は、下垂体からの生殖線刺激ホルモンの放出を抑制するペプチドホルモンとしてウズラの脳より発見された（Tsutsui et al., 2000）が、これまでの形態学的・行動学的知見から、生殖内分泌

系の制御のみならず、GnIHが多様な機能を持つことが示唆されている。申請者らの研究から、高い社会性を示す鳴禽類キンカチョウ脳にもGnIHが存在し、中脳腹側被蓋野(VTA)や中脳中心灰白質(GC)などの社会性行動の動機付けや報酬に関連した脳領域（中脳ドーパミン(DA)系）にも神経投射していることが明ら

かとなった。ドーパミン (DA) は様々な“親和行動”例えば、つがい形成 (一夫一妻)、求愛行動、交尾に深く関係することが報告されている。VTAとGCのDAニューロンは社会性行動を制御する脳領域に神経投射しており、特に鳴禽類では、歌の産出に関わる大脳の歌制御系にVTAとCGからDAニューロンが投射すること、オスがメスに対して求愛歌をうたっている時のみ、VTAのDA細胞の活動が著しく上昇することが報告されている (Yanagihara and Hessler, 2006; Hara et al. 2007)。

【参考文献】

- Hara et al.(2007) Role of the midbrain dopaminergic system in modulation of vocal brain activation by social context. *Eur J Neurosci* 25:3406-3416
- Tsutsui et al. (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275:661-667.
- Yanagihara and Hessler (2006) Modulation of singing-related activity in the songbird ventral tegmental area by social context. *Eur J Neurosci* 24:3619-3627

2. 研究の目的

視床下部ペプチド GnIHによる中脳 DA 系を介した社会性行動の制御機構の解明を目的とし、キンカチョウを被験体として、GnIH による求愛歌発現機構の制御を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GnIHの中脳 DA 作動性ニューロンへの直接投射経路

中脳 DA 神経系に対する GnIH の作用を明らかにするため、腹側被蓋野、中心灰白や黒室領域を含む脳切片に、抗 GnIH 抗体と抗チロシン水酸化酵素 (TH) 抗体を用いて二重染色し共焦点レーザー顕微鏡で切片を観察した。

(2) 中脳 DA ニューロンにおける GnIH 受容体の発現

GnIH の受容体の cDNA をクローニングした。得られた GnIH 受容体の cDNA 配列をもとに、RNA プローブを作製し in situ hybridization 法にて GnIH 受容体 mRNA の脳内分布を解析する。さらに、GnIH 受容体 mRNA に対する In situ hybridization 法と TH に対する免疫組織化学染色を行い、DA ニューロンに GnIH 受容体が発現しているかを確認した。

(3) 中脳 DA 系の細胞活性解析用マーカーの選定

DA ニューロンに GnIH 受容体が発現していたことから、従来の細胞活性マーカーである

ZENK や C-Fos に加えて、細胞外シグナル調節性キナーゼ 1 および 2 (ERK1/2) がキンカチョウにおいて神経活性マーカーとして使用できるかを、抗体を用いた免疫組織化学染色法にて検討した。

(4) 様々な社会環境における GnIH 遺伝子発現変化の解析

オス個体を一羽の状態、オスを提示した状態、メスを提示した状態 (接触なし)、メスと自由に接触できる状態に一時間置き、間脳 GnIH 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。またメス個体に対しても同様な社会環境操作を行い、GnIH 遺伝子の発現レベルを解析した。

(5) 様々な社会環境における血漿ホルモン濃度測定

上記(4)の社会操作個体の血液を採取し、血漿中の黄体形成ホルモン、testosterone, estradiol, corticosterone, proterosterone を放射免疫測定と酵素免疫測定法で測定した。

4. 研究成果

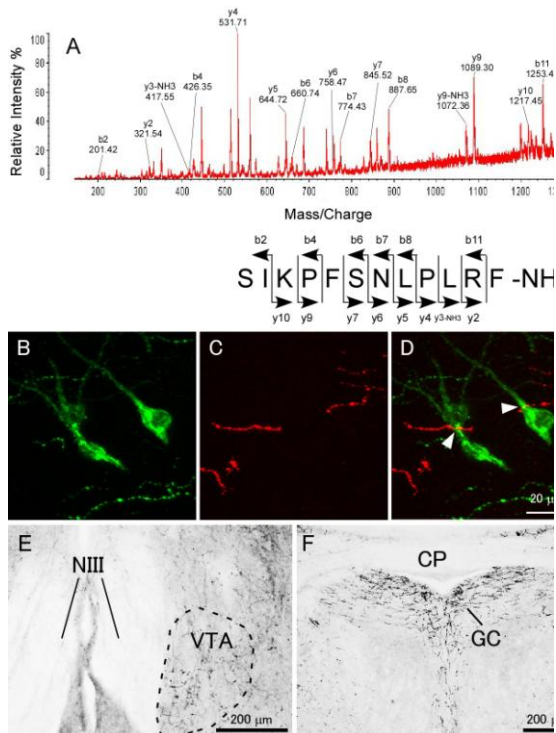
(1) 下垂体からの生殖線刺激ホルモンの放出を抑制するペプチドホルモンとして発見された GnIH が、求愛行動の動機付けに関連した中脳ドーパミン領域に神経投射していることを明らかにし (次項図参照)、求愛行動のモチベーション制御に GnIH が関与することが示唆された (本研究成果は国際雑誌 *Peptides* に掲載された)。さらに、GnIH ニューロンの神経終末がドーパミン作動性ニューロン細胞体の近接に存在することを観察した。

(2) キンカチョウ GnIH 受容体 cDNA の塩基配列を決定し、他動物種との比較から、保存性の高い cDNA 部分は受容体分子の高次構造とリガンドとの特異的結合に重要なことを推論した。受容体 mRNA は、脳の広範な領域に発現していたが比較的検出力の高い DIG-AP-NBT/BCIP 系を用いてもシグナル強度が低かったことから、GnIH 受容体の mRNA の発現はレベルは高くないことが推測された。In situ hybridization 法と抗 TH 抗体を用いた免疫組織化学染色との組み合わせの方法により、腹側被蓋野のドーパミン作動性ニューロンが GnIH 受容体 mRNA を発現していることが確認できた。また腹側被蓋野のその他のニューロン (GABA?) にも GnIH 受容体 mRNA が発現している結果をえた。

(3) 様々な社会環境における GnIH 遺伝子発現変化の解析の結果、オス個体が一羽の状態

(isolate) 群に比較して、メスを提示した状態 (接触なし) の実験群では、脳内 GnIH mRNA 発現が有意に変化していた。血漿ホルモン測定結果においても、黄体形成ホルモンと testosterone 血漿濃度が、GnIH の発現レベルに対応して変化することが明らかとなった。一方、メスにおいては GnIH においても血漿ホルモンにおいても有意な変化はみられなかった。社会環境が GnIH の発現に影響を及ぼすという報告は発表されていない。この結果は動物の社会環境変化の受容と生殖内分泌応答の新しい神経分子基盤の解明へつながる基礎的なデータとなりうる。

以上、これらの結果について第 36 回日本比較内分泌学会大会や 7th congress of Asia and Oceania society for comparative endocrinology 等国内外の学会で報告した。また中脳ドーパミン系への GnIH の入力については、国内外の中脳腹側被蓋野に注目する研究者達から問い合わせを受けた。



キンカチョウ GnIH

(A) キンカチョウ脳から抽出した GnIH の MALDI-TOF-MS による MSMS スペクトル構造解析とフラグメントパターン。(D) GnRH 神経細胞(B)と GnIH 神経繊維(C)の共焦点顕微鏡象。矢印は近接を表す。(E, F) GnIH 神経は、VTA や GC に神経終末を形成する。CP 後交連, NIII 動

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)

① 筒井和義・大杉知裕・戸張靖子・孫 ユリ・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** 印刷中

② Tobari Y, Iijima N, Tsunekawa K, Osugi T, Haraguchi S, Ubuka T, Okanoya K, Ukena K, Tsutsui K, Ozawa H. Identification, Localization and Functional Implication of 26RFa Ortholog Peptide in the Brain of Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). **Journal of Neuroendocrinology** 査読あり、23巻、9号、2011、pp 791-803、

③ Tobari Y, Okumura T, Tani J, Okanoya K. A direct neuronal connection between the telencephalic nucleus robustus arcopallialis and the nucleus nervi hypoglossi, pars tracheosyringalis in Bengalese finches (*Lonchura striata var. domestica*). **Neuroscience Research** 査読あり、71巻、4号、2011、pp. 361-368

④ Tobari Y, Iijima N, Tsunekawa K, Osugi T, Okanoya K, Tsutsui K, Ozawa H. Identification of gonadotropin-inhibitory hormone in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*): peptide isolation, cDNA cloning and brain distribution. **Peptides** 査読あり、31巻、5号、2010、pp362-370、

[学会発表] (計 5 件)

① Tobari Y et al., Identification and distribution of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in the brain of zebra finch. 7th congress of Asia and Oceania society for comparative

endocrinology. (2012年3月4日) Kuala Lumpur, Malaysia

- ② 戸張靖子 らキンカチョウの脳における生殖線刺激ホルモン放出抑制ホルモン (GnIH) の同定と脳内分布 第36回日本比較内分泌学会大会 (2011年11月23-24日) 東京
- ③ 戸張靖子 ら 鳴禽類の摂食・エネルギー代謝を調節する 26RFa ペプチドの同定 第36回鳥類内分泌研究会 (2011年11月22日) 箱根湯本
- ④ 戸張靖子 ら キンカチョウの脳における 26RFa ペプチドの同定と機能解析 第82回日本動物学会 (2011年9月21日) 旭川
- ⑤ Tobari Y. et al. Identification, localization and functional implication of 26RFa ortholog peptide in the Brain of Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). Society for behavioral neuroendocrinology 14th annual meeting (2010年7月18日) Toronto, Canada

[図書] (計1件)

高久 誉大 胡桃坂仁志 木本路子 戸張靖子
平尾一郎羊土社Ⅱ. 核酸の分離の原理と
プロトコール 3 アガロースゲル電気泳動
法 目的別で選べる核酸実験の原理とプ
ロトコール 2011 pp 76-84

[その他]

ホームページ等

所属研究室のホームページ

<http://www.f.waseda.jp/k-tsutsui/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸張 靖子 (TOBARI YASUKO)

研究者番号 : 90453919

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :