

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870842

研究課題名(和文)特異的ニューロン破壊法を用いた弓状核キスペプチンニューロンの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of KNDy neurons in goats by specific ablation techniques

研究代表者

山村 崇 (Yamamura, Takashi)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・主任研究員

研究者番号：60582723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：GnRHパルスジェネレータの活動制御には、ニューロキニン受容体の一種であるNK3Rが重要な役割を果たしていることをヤギを用いて明らかにし、ニューロキニンB(NKB)のメインターゲットであることが示唆された。また、弓状核に存在するNK3R発現ニューロンをサポリン複合体(NK3-SAP)により特異的に破壊する方法を用いたところ、LHパルスの振幅が減少し、キスペプチンニューロンの陽性細胞が減少する傾向が見られた。これらのことから、弓状核キスペプチンニューロン(KNDyニューロン)がNKB-NK3R系を介してLH分泌の調節に関与し、繁殖機能の制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Kisspeptin/neurokinin B (NKB)/dynorphin (KNDy) neurons of the arcuate nucleus (ARC) play a key role in control of pulsatile GnRH secretion. Recent evidence suggests that NKB plays a pivotal role in GnRH pulse generation. Firstly we found that NK3R, which is one of neurokinin receptors and preferentially binds to NKB, plays a predominant role in GnRH pulse generation of goats. Second, to study NK3R function in GnRH pulse generation, we used a method to selectively ablate KNDy neurons using NK3-SAP, a NK3R agonist conjugated to saporin. NK3-SAP was microinjected into the ARC of goats using stereotaxic surgery. After 3 weeks of injections, we took a blood sample for measurement of LH levels and perfused for immunocytochemistry for kisspeptin in the ARC. NK3-SAP treatments tended to reduce amplitude of LH pulses and a number of kisspeptin-immunoreactive neurons. The results suggested NKB-NK3R signaling may play a dominant role in the GnRH pulse generation of KNDy neurons.

研究分野：動物生理学

キーワード：GnRH パルス状分泌 ニューロキニン キスペプチン ターゲットトキシン

1. 研究開始当初の背景

日長、暑熱や栄養状態など繁殖機能に影響をおよぼす様々な環境要因の情報は、脳の視床下部で統合され、最終的には性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌のパルス頻度という信号により性腺の活動が制御される。しかし、このパルス状分泌がどのように制御されているのかは長い間不明であった。近年、キスペプチンが発見され、GnRH 分泌の重要な制御因子であることが示されつつある。

ヤギを用いた実験から、キスペプチンニューロンが局在する脳の視床下部弓状核では周期的な神経発火活動の上昇 (MUA ボレー) が起き、それと同期した血中黄体形成ホルモン (LH) のパルス状分泌が見られたことから、その神経活動が GnRH のパルス状分泌を制御している可能性を示している (引用文献①)。また、形態学的解析から弓状核キスペプチンニューロンには、ニューロキニン B (NKB) とダイノルフィン A (Dyn) が共局在しており、これらは KNDy ニューロンとも呼ばれている。さらに、NKB と Dyn の機能を解析したところ、弓状核の神経活動に対して NKB は促進的に、Dyn は抑制的に作用することを明らかにした (引用文献②)。また、KNDy ニューロンはニューロン同士の情報連絡を可能とする形態を持っていることを明らかにした (引用文献③)。これらのことから、KNDy ニューロンの神経活動は KNDy ニューロンより分泌される NKB および Dyn により制御されていることが示唆されるが、その詳細な機構については不明である。

2. 研究の目的

本研究は、KNDy ニューロンのパルス発生機構を明らかにするために、ヤギを実験動物として、促進的因子である NKB の作用機序を明らかにするとともに、サポリンを用いた特異的ニューロン破壊法により NKB の標的細胞を局所的に破壊した時の繁殖機能におよぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) NKB の作用機序の解析

GnRH パルス発生機構の制御に深く関与している NKB であるが、NKB はニューロキニンファミリーに属しており、そのファミリーの受容体として NK1R、NK2R および NK3R が知られている。そこで、それぞれの受容体に特異的な作動薬; GR73632 (NK1R)、GR64349 (NK2R) および senktide (NK3R) をヤギの末梢から投与した際の影響を調べる。

具体的には、KNDy ニューロン近傍に神経発火活動記録用電極を留置した卵巢摘出ヤギ 5 頭を供試し、2 つの MUA ボレーの midpoint で NK1R、NK2R および NK3R 作動薬を投与し、MUA ボレーの有無および LH 分泌を調べた。

(2) 弓状核へサポリン複合体を投与した際の繁殖機能に与える影響の解析

NKB 作動薬をリガンドとしたサポリン複合体 (NK3-SAP) を卵巢摘出ヤギの弓状核へ局所投与し、投与 1、2 および 3 週間後に頻回採血を行い、血中 LH 濃度を測定するとともに、灌流固定法により脳組織を採取し、免疫染色法によりキスペプチン陽性細胞数を調べる。

4. 研究成果

(1) NKB の作用機序の解析

3 種の作動薬全てで MUA ボレーおよび LH 分泌が誘導されたが、NK3R 作動薬では 50 nmol 量で 5 頭中 5 頭において有効であったが、NK1R および NK2R 作動薬では 1000 nmol 量でそれぞれ 5 頭中 2 頭および 4 頭で有効であった (図 1)。また、NK2R および NK3R 作動薬はエストロゲン代償投与ヤギにおいても有効であったが、その有効量はそれぞれ 1000 nmol および 50 nmol であった (図 2)。これらのことから、NK3R が GnRH 分泌制御において重要な役割を担っていることが明らかになり、NKB のメインターゲットであることが示唆された。

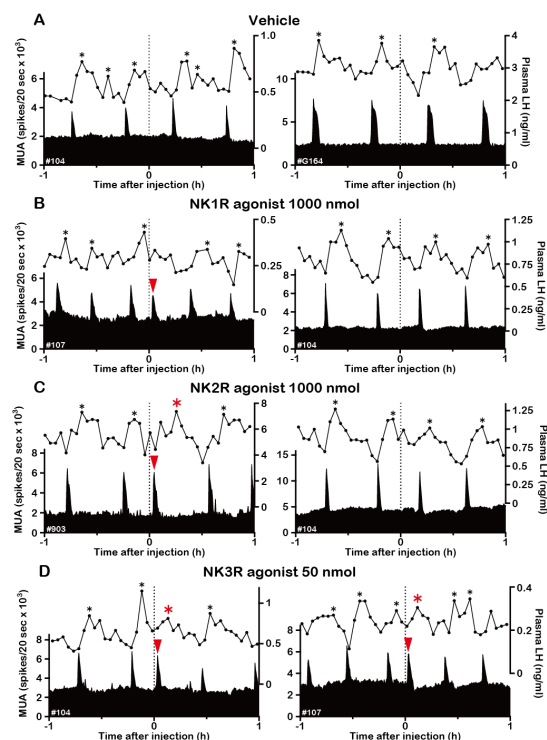


図 1 卵巢摘出ヤギにて、NK3R 作動薬 (50 nmol) の単回投与 (点線) により、神経発火活動 (矢頭) およびそれに伴う LH 分泌 (赤アスタリスク) が誘導された。一方、NK1R および NK2R 作動薬 (1000 nmol) の単回投与では、神経発火活動および LH 分泌が誘導される個体と誘導されない個体が観察された。

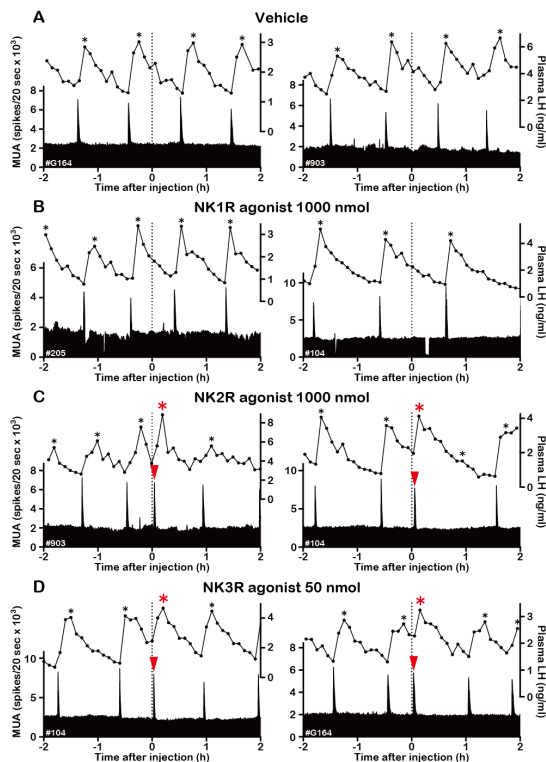


図2 エストロゲン代償投与と卵巣除去ヤギにて、NK2R 作動薬 (1000 nmol)、NK3R 作動薬 (50 nmol) の単回投与 (点線) により、神経発火活動 (矢頭) およびそれに伴う LH 分泌 (赤アスタリスク) が誘導された。

(2) 弓状核へサポリン複合体を投与した際の繁殖機能に与える影響の解析

NK3-SAP を卵巣摘出ヤギの弓状核へ 10 ng/100 nl 投与し、投与前、投与 1、2、3 週間後の血中 LH 濃度を計測した結果、LH パルスの頻度に影響はないものの、振幅が減少する傾向が見られた。また、弓状核のキスペプチンニューロンの免疫陽性反応を調べた結果、陽性細胞数が減少する傾向が見られた。

KNDy ニューロンのほぼ全てに NK3R が発現していることから、NK3-SAP は KNDy ニューロンに直接作用し、KNDy ニューロンを局所的に破壊したことが考えられた。これらのことから、KNDy ニューロンが LH 分泌の制御に関与していることを支持する結果が得られ、繁殖機能の制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

<引用文献>

- ① Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda KI, Okamura H. Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 813-821.
- ② Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, 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 gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 2010; 30: 3124-3132.

- ③ Wakabayashi Y, Yamamura T, Sakamoto K, Mori Y, Okamura H. Electrophysiological and morphological evidence for synchronized GnRH pulse generator activity among Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin A (KNDy) neurons in goats. *J Reprod Dev* 2013; 59: 40-48.

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 1 件)

Takashi Yamamura, Yoshihiro Wakabayashi, Satoshi Ohkura, Victor M Navarro, Hiroaki Okamura, Effects of intravenous administration of neurokinin receptor subtype-selective agonists on gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats., *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, Vol.60(1), pp. 20-29, 2015

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山村崇, 若林嘉浩, 三須良介, 大石真也, 大蔵聡, 藤井信孝, 岡村裕昭, ニューロキニン作動薬を用いた新たな卵胞発育制御技術の開発研究, 日本畜産学会第 119 回大会, 2015 年 3 月 29 日, 宇都宮大学 (栃木県宇都宮市)
- ② 山村崇, 若林嘉浩, 大蔵聡, 岡村裕昭, タキキニンファミリーの神経ペプチドが GnRH パルスジェネレータにおよぼす影響, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014 年 8 月 23 日, 帯広畜産大学 (北海道帯広市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 願状状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○ 取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山村 崇 (YAMAMURA, Takashi)
国立研究開発法人農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・任期付研究員→主任研究員
研究者番号：60582723

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：