

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成21年度博士課程 入学

氏 名 坂本光平

指導教員名 森 裕司

論文題目 反芻動物における雄効果フェロモンの中樞作用機構に関する研究

フェロモンとは同種個体間のコミュニケーションに使われる化学物質であり、多種多様な動物において、生存や生殖のために重要な役割を果たしていることが示されている。フェロモンは、大きく二種類に分けられ、受容した個体に行動的な変化をもたらすリリーサーフェロモンと、内分泌系に作用することで繁殖や発達に影響するプライマーフェロモンがある。季節繁殖動物であるヤギやヒツジでは、雄効果という強力なプライマーフェロモンの作用が知られており、性腺の活動が抑制されている非繁殖期にある雌が成熟した雄が発するフェロモンを受容すると、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) および、黄体形成ホルモン (LH) のパルス状分泌の頻度を上げる。その刺激により、エストロゲンの分泌を促進し、発情行動および LH サージによる排卵が誘起される。GnRH のパルス状の分泌頻度は、生殖の最上位の中樞である視床下部に存在する GnRH パルスジェネレーターにより制御されている。このことから、雄効果フェロモンの中樞内におけるターゲットは、GnRH パルスジェネレーターだと考えられている。しかし、未だに受容されたフェロモンの中樞での作用機構について不明なことが多い。したがって本研究は、嗅覚系で受容された雄効果フェロモンの情報が生殖の中樞である視床下部へと伝達され、ホルモン分泌を引き起こす機構の解明を目的とするものである。

第一章は総合緒言である。フェロモンによる生殖制御についてこれまでの知見を概観し、本研究の背景と目的を述べた。また、本研究では、視床下部へ留置した記録電極により、多ニューロンの発火活動 (MUA) を記録し、GnRH パルスジェネレーターの活動を観察している。GnRH、LH のパルス状の分泌と同期している MUA の特徴的な一過性の発火 (MUA ボレー) を観察することで、フェロモン作用をモニタリングすることが可能であることを説明した。また、MUA 記録により、雄効果フェロモンが、雌動物にだけでなく、去勢を行った雄動物にも作用することを示し、第二章で雄動物を用いている根拠を述べた。

第二章は、雄効果フェロモンの情報伝達路の解明を目的とした。哺乳類の嗅覚系は二種類存在し、嗅上皮で受容され主嗅球へ伝達される主嗅覚系と、鋤鼻器で受容され副嗅球へと伝達される鋤鼻系がある。一般的にフェロモンは鋤鼻系で受容されるとされているが、雄効果フェロモンの刺激で主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系双方が反応することが示され、主嗅覚系の関与も示唆されている。本章では、主嗅覚系および鋤鼻系からのフェロモンシグナルが統合される扁桃体内側核と、成熟雄ヤギ被毛の暴露により神経活性化の指標となる c-Fos が発現することが明らかとなっている分界条床核に着目し、トレーサー標識法を用い雄効果フェロモンの情報伝達経路について検討を行った。去勢雄を用いて、扁桃体内側核または分界条床核へ順行性トレーサーであるビオチン化デキストラミン (BDA) の投与後、脳の連続切片を作成し組織染色を行った。BDA 陽性線維の分布を観察し、シバヤギ脳内におけるフェロモンシグナルの伝達に関わる神経経路の模式図を作成した。その結果、扁桃体内側核、分界条床核ともに視床下部の腹内側核および弓状核へ多くの線維が投射していることが示された。また、扁桃体内側核から分界条床核への投射がみられた。このことから、ヤギにおいて雄効果フェロモンの情報伝達経路は、扁桃体内側核から直接視床下部へと伝達される経路と、分界条床核を経由し、視床下部へ伝達される 2 つの経路がある可能性が示唆された。

第三章では、弓状核のキスペプチンニューロンが GnRH パルスジェネレーターであるという仮説を立て、雄効果フェロモンの作用発現への関与について検討を行った。近年、GPR54 の内因性リガンドであるキスペプチンが GnRH の分泌を誘起することが発見された。キスペプチンは、ヤギやヒツジにおいては、視索前野および弓状核に発現が見られることが明らかになっており、弓状核に存在するキスペプチンニューロンがパルス状の GnRH 分泌に関与していると考えられている。まず第一節では、扁桃体内側核または分界条床核のニューロンから弓状核キスペプチンニューロンへの入力の有無を検討した。第二章で BDA を投

与したヤギの弓状核を含む組織を用いて、BDA とキスペプチンの二重染色を行ったところ、扁桃体内側核と分界条床核ともに、BDA 陽性陽性線維がキスペプチンニューロンへ密接していることが観察された。このことから、それら 2 つの神経核から弓状核キスペプチンニューロンへの直接投射が存在する可能性が示唆された。第二節では、雄効果フェロモンの作用発現にキスペプチンが必要であるか検討を行った。キスペプチン類縁体 TAK-683 は GPR54 受容体アゴニストとして働き LH 分泌促進作用をもつが、慢性投与することにより逆にパルス状の LH 分泌を抑制することが示されている。本実験ではそのアンタゴニストとしての作用を利用した。卵巣除去 (OVX) したヤギを用い TAK-683 を慢性投与中に雄ヤギ被毛の呈示を行い、フェロモン作用発現の有無を調べた。その結果、雄ヤギ被毛呈示後 60 秒以内に全頭 MUA ボレーが誘起されるが、その直後の LH 濃度の上昇が抑制されることが示され、雄効果フェロモンは、キスペプチンを介して LH 分泌作用を発現していることが明らかとなった。このことから、雄効果フェロモンのシグナルは、弓状核まで伝達されるとキスペプチンニューロンを活性化し、キスペプチンの分泌を促し、その下流である GnRH、LH の分泌を誘起することが示唆された。

第四章では、弓状核キスペプチンニューロンに共在しているニューロキニン B (NKB) のフェロモン作用への関与について検討を行った。弓状核のキスペプチンニューロンには NKB の受容体 (NK3R) も発現していること、キスペプチンニューロン同士が密なネットワークを形成していることが示されている。これらのことから、弓状核のキスペプチンニューロン群は NKB シグナルによって同期して発火をすることで、GnRH のパルス状の分泌を引き起こすと推測されている。実際に、ヤギにおいて NKB の投与は MUA ボレーとそれに続く LH のパルス状分泌を誘起することが示されている。この現象は、雄効果フェロモンによる MUA ボレー誘起作用と同様のものである。よって本章では、NKB が雄効果フェロモンによるキスペプチンニューロンの活性化を仲介しているという仮説を立て解析を行った。第一節では、NKB の LH 分泌作用にキスペプチンのシグナルが必要であるかを確かめるために、OVX ヤギに TAK-683 慢性投与したときの NKB 作動薬の投与を行った。その結果、フェロモン呈示時と同様に、MUA ボレーは誘起されるものの、LH の上昇は観察されなかった。したがって、NKB の作用はキスペプチンを介して発現することが示唆された。第二節では、NKB の弓状核キスペプチンニューロンへの影響を検討するために、雌ヒツジを用い、脳室内に NKB を投与した時の、キスペプチンニューロンの活性化を c-Fos 蛋白の発現により検討した。その結果、NKB 投与を行ったヒツジで弓状核キスペプチンニューロンの c-Fos の発現が有意に上昇することが観察され、NKB が弓状核キスペプチンニューロンを活性化し、パルス状の GnRH 分泌を制御していることが示唆された。第三節では、フ

フェロモンシグナル伝達への NKB の役割の検討を行うために、NKB 受容体のアンタゴニストを用いて、雄ヤギ被毛の呈示への影響を観察した。NKB 受容体のアンタゴニスト投与後に雄ヤギ被毛を呈示したところ、MUA ボレーおよび LH の上昇共に観察されなかった。このことから、MUA ボレーの誘起には NKB のシグナルが必要であることが示され、フェロモンによる弓状核キスペプチンニューロンの発火に NKB が関与している可能性が強く示唆された。これらの結果から、フェロモンと NKB のシグナルは並列の関係ではなく、フェロモンが上位のシグナルであることが推察された。

第五章は、総合考察である。今回の結果から、雄効果フェロモンシグナルは、鋤鼻系の伝達経路である扁桃体内側核、分界条床核を介し、弓状核キスペプチンニューロンへの直接伝達される可能性が示された。さらに弓状核では、キスペプチンニューロンを介し、NKB、キスペプチン、GnRH の一連の分泌を引き起こすことで作用を発現する可能性が示された。これまでは、雄効果フェロモンの暴露が GnRH および LH のパルス状分泌を誘起するという作用が知られていたが、GnRH 分泌に至る機構が明らかではなかった。本研究により、弓状核に存在するキスペプチンという新たな物質を介すことを明らかにし、フェロモンの中枢作用機構における新たな知見が得られた。雄効果フェロモンは、GnRH パルスジェネレーターの働きを促進させる数少ないシグナルである。このフェロモンを用いることで、GnRH パルスジェネレーターの解明に新たな進展が見られることが期待される。