

## 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

早稲田大学・教育・総合科学学術院/先端生命医科学センター  
産賀 崇由, 筒井 和義

### はじめに

生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン (GnIH) は、ウズラの視床下部から同定された神経ペプチドであり、下垂体からの生殖腺刺激ホルモンの分泌を抑制する [1, 2]。鳥類では GnIH を合成するニューロンの細胞体は室傍核に存在し、その神経線維は正中隆起に投射する [1, 3]。しかし、GnIH 免疫陽性神経線維は視索前野 (POA) や中脳中心灰白質など動物の性行動や攻撃行動などを制御する脳領域にも密に存在しており、これらの脳領域には GnIH 受容体も発現している [4, 5]。したがって、GnIH は動物の性行動や攻撃行動などを直接制御すると考えられる。

そこで、われわれは GnIH による行動制御を明らかにするために、社会性に富む鳴鳥類であるムクドリは GnIH の発現を RNA 干渉法により抑制してさまざまな行動を調べた [6]。その結果、GnIH の RNA 干渉によりムクドリの活動量および他個体を警戒する発声が増加した。また、新規雄の鳴声を聞かせると GnIH を RNA 干渉された雄では縄張りを主張する鳴声が増加した。これらの結果から、GnIH は動物の覚醒レベルを抑制し、雄では攻撃性を抑制することが分かった [6]。

本研究では、GnIH が雄の攻撃性を抑制するメカニズムを明らかにするために、攻撃性に富む鳥類であるウズラを用いて解析した [7]。これまでの研究により、雄ウズラの攻撃性は去勢により失われ、テストステロン等の雄性ホルモンの投与により回復することから、精巣から分泌される雄性ホルモンの依存性と考えられている。しかし、血中テストステロン濃度と雄ウズラの攻撃性には相関関係がないことが知られている [8]。また、去勢雄の攻撃性はエストラジオール (E2) に芳香化される雄性ホルモンであるテストステロンやアンドロステンジオンの投与により回復するが、E2 に芳香化されないダイハイドロテストステロンの投与では回復しないこと、テストステロンを芳香化阻害剤と同時投与すると雄

ウズラの攻撃性は回復しないことなどから、雄の攻撃性は精巣から分泌されたテストステロンが脳で芳香化酵素 (アロマターゼ) の働きによりニューロエストロゲン (E2) に変換されて制御されることが考えられている (アロマターゼ仮説) [8-10]。そこでわれわれは、GnIH による雄ウズラの攻撃性抑制作用は GnIH が脳においてアロマターゼ活性の変動を導いてニューロエストロゲン濃度を変化させることによりなされるのではないかと考え、以下に述べる一連の実験を行った [7]。

### 雄ウズラの攻撃性とニューロエストロゲン (E2) 合成の日内変動

本研究で用いた雄ウズラは精巣の発達と攻撃性を維持するため、長日条件下 (16時間明期, 8時間暗期) で飼育した。雄ウズラの攻撃行動は威嚇、つつき、くわえ、馬乗り、総排泄腔線接合という一連の動作よりなされるが、これらの動作の発現は明期前半に高く、明期後半に著しく低下することが分かった [7]。雄ウズラの攻撃行動の発現が高い明期前半に GnIH を脳室投与すると、投与30分後に攻撃行動の発現が抑制された [7]。GnIH の脳室投与30分後に血中テストステロン濃度には変化がなかったことから、GnIH の脳室投与による攻撃行動の抑制は血中テストステロン濃度を低下させることによるものではないと考えられる [7]。

POA は多くのアロマターゼ免疫陽性ニューロンを有しており、ニューロエストロゲン (E2) を活発に合成することが知られている [11]。そこで、POA の E2 濃度を EIA 法により測定したところ、明期前半に低く、明期後半に著しく高くなることが分かった [7]。また、マイクロダイアリシス法により POA 内に分泌される E2 を定量すると、明期前半に低く、明期後半に著しく高くなることが分かった [7]。次に、POA の E2 濃度の日内変動はニューロエストロゲン (E2) 合成の日内変動によるものかを調べるために、アロマターゼ活性の日内変動を調べた [7]。アロマターゼ活性の測定は各時間

帯に採取した POA を主に含む脳組織のホモジェートをトリチウム標識したアンドロステジオンとインキュベートし、合成されたトリチウム標識の E2 を HPLC により分離して定量して行った。その結果、POA のアロマトラーゼ活性は明期前半に低く、明期後半に著しく高くなることが分かった [7]。また、血中のテストステロン及び E2 濃度には日内変動はなかったことから、POA の E2 濃度の日内変動はニューロエストロゲン (E2) 合成の日内変動によるものであることが明らかになった [7]。

GnIH は POA においてアロマトラーゼ活性を高めてニューロエストロゲン (E2) 合成を促進する

GnIH は POA においてアロマトラーゼ活性を変動させるかどうかを明らかにするために、POA に存在するアロマトラーゼ免疫陽性ニューロンへの GnIH 免疫陽性神経線維の投射、アロマトラーゼ免疫陽性ニューロンにおける GnIH 受容体 mRNA の発現を免疫組織化学法及び *in situ* hybridization 法により調べた [7]。その結果、POA におけるアロマトラーゼ免疫陽性ニューロンには GnIH 免疫陽性神経線維が密に投射すること、ほとんどのアロマトラーゼ免疫陽性ニューロンには GnIH 受容体 mRNA が発現していることが明らかになった [7]。さらに、POA において GnIH は活発に放出されることもマイクロダイアリシス法により分かった [7]。

次に、GnIH による POA におけるアロマトラーゼ活性の変動作用を解析した。まず、POA を主に含む脳組織を組織培養して培地にさまざまな濃度の GnIH と一定濃度のトリチウム標識したアンドロステジオンを加えて 1 時間後に脳組織を採取し、脳組織で合成されたトリチウム標識の E2 を定量したところ、添加した GnIH の濃度依存的にアロマトラーゼ活性が高まり、E2 合成が促進されることが分かった [7]。また、POA を主に含む脳組織を組織培養して GnIH を添加すると、脳組織の E2 濃度は著しく高まるが、この E2 濃度の上昇は GnIH 受容体のアンタゴニストである RF9 やアロマトラーゼ阻害剤のフアドロゾールを GnIH とともに培地に添加すると阻害された [7]。これらの結果から、GnIH はアロマトラーゼ含有ニューロンに発現する GnIH 受容体を介してアロマトラーゼ活性を高めて E2 合成を促進することが分かった [7]。

これまでのウズラの視床下部組織を用いた研究から、

アロマトラーゼの活性はリン酸化により抑制されることが明らかになっている [12]。GnIH 受容体は GnIH と結合すると細胞内で G<sub>αi</sub> タンパク質と相互作用して細胞内の cAMP 合成を抑制することが知られている [13]。われわれは、マウス由来ゴナドトロフ株化細胞 (LβT2) を用い、GnIH は GnIH 受容体と結合して細胞内における cAMP 合成を抑制し、PKA や ERK のリン酸化を抑制することを明らかにしている [14]。そこで、GnIH はアロマトラーゼのリン酸化を抑制することによりアロマトラーゼ活性を促進するのではないかと考えた。GnIH を雄ウズラに脳室投与して 30 分後に POA を主に含む脳組織を採取し、リン酸化されたアロマトラーゼ量を Phos-Tag SDS PAGE 法 [15] により定量した [7]。その結果、GnIH の脳室投与により POA におけるアロマトラーゼのリン酸化が抑制されてリン酸化されたアロマトラーゼ量が減少することが分かった [7]。

高濃度のニューロエストロゲン (E2) は雄ウズラの攻撃性を低下させる

GnIH を雄ウズラの攻撃性の高い明期前半に脳室投与すると、30 分後に雄ウズラの攻撃性は低下し、行動実験直後に採取した POA を主に含む脳組織における E2 濃度は著しく高まった。これまでの去勢雄ウズラを用いた研究では、雄ウズラの攻撃性はテストステロンが脳でアロマトラーゼにより E2 に変換されて制御されていることが知られている [8-10]。そこで、雄ウズラの攻撃性を維持するためには脳において適量の E2 が存在することが必要であるが、脳内の E2 が高濃度になると逆に雄ウズラの攻撃性が抑制されるのではないかと考えて実験を行った [7]。明期前半に 1 ng から 10 μg の E2 を脳室投与してウズラの攻撃性を定量した [7]。その結果、1 ng の E2 投与により総排泄腔線接合の頻度が増加したが、100 ng 以上の E2 投与により、つつき、くわえ、馬乗り、総排泄腔線接合の頻度が対照群と 1 ng の E2 投与群に比較して著しく減少することが分かった [7]。したがって、脳において低濃度の E2 は雄ウズラの攻撃性の維持に必要なことが、GnIH の作用により E2 が高濃度になると逆に攻撃性を低下させることが明らかになった [7]。

おわりに

本研究は、神経ペプチドがニューロステロイド合成酵

素であるアロマトーゼの活性を直接制御する初めての報告である [7]. われわれはヒトを含む哺乳類の脳から GnIH を同定しており, GnIH ニューロンはヒトを含む哺乳類の視床下部に存在することを明らかにしている [16]. 今後は, 本研究で明らかになった GnIH による攻撃性制御機構がヒトを含む哺乳類においても存在することを明らかにする必要がある.

## 引用文献

1. Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 661-667.
2. Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, Bentley GE, Tsutsui K (2006) Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* 147, 1187-1194.
3. Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K (2003) Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. *Cell Tissue Res* 312, 73-79.
4. Ubuka T, Kim S, Huang YC, Reid J, Jiang J, Osugi T, Chowdhury VS, Tsutsui K, Bentley GE (2008) Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology* 149, 268-278. Erratum in: *Endocrinology* 149, 4229.
5. Yin H, Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K, (2005) A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): identification, expression and binding activity. *J Endocrinol* 184, 257-266.
6. Ubuka T, Mukai M, Wolfe J, Beverly R, Clegg S, Wang A, Hsia S, Li M, Krause JS, Mizuno T, Fukuda Y, Tsutsui K, Bentley GE, Wingfield JC (2012) RNA interference of gonadotropin-inhibitory hormone gene induces arousal in songbirds. *PLoS ONE* 7, e30202.
7. Ubuka T, Haraguchi S, Tobari Y, Narihiro M, Ishikawa K, Hayashi T, Harada N, Tsutsui K (2014) Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat Commun* 4, 3061.
8. Tsutsui K, Ishii S (1981) Effects of sex steroids on aggressive behavior of adult male Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol* 44, 480-486.
9. Yahr P (1979) Data and hypotheses in tales of dihydrotestosterone. *Horm Behav* 13, 92-96.
10. Schlinger BA, Callard GV (1990) Aromatization mediates aggressive behavior in quail. *Gen Comp Endocrinol* 79, 39-53.
11. Balthazart J, Surlemont C (1990) Androgen and estrogen action in the preoptic area and activation of copulatory behavior in quail. *Physiol Behav* 48, 599-609.
12. Balthazart J, Baillien M, Ball GF (2006) Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. *Endocrinology* 147, 359-366.
13. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M (2000) New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2, 703-708.
14. Son YL, Ubuka T, Millar RP, Kanasaki H, Tsutsui K (2012) Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits GnRH-induced gonadotropin subunit gene transcriptions by inhibiting AC/cAMP/PKA-dependent ERK pathway in *LβT2* cells. *Endocrinology* 153, 2332-2343.
15. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* 5, 749-757.
16. Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE (2009) Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS ONE* 4, e8400.