



Title	神経ホルモンによる本能行動制御の分子機構
Author(s)	浦野, 明央
Description	特集: 比較内分泌学における新しい展開 : ホルモンの脳科学 その5
Citation	日本比較内分泌学会ニュース, 94, 3-8
Issue Date	1999-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/43968
Rights	©1999 日本比較内分泌学会. 利用は著作権の範囲内に限られる.
Type	journal article
File Information	JSCEN94_3-8.pdf



比較内分泌学における新しい展開

—ホルモンの脳科学—

比較内分泌学会ニュースでは、新企画として昨年8月号より、特集「比較内分泌学における新しい展開—ホルモンの脳科学」を掲載してきました。内分泌系と脳神経系の境界領域における最新の研究成果から「脳の新たな側面」を見いだし、みなさんと一緒に「脳とは何か」を改めて考えるこの企画は今回でとりあえず終了となります。「ホルモンの脳科学」シリーズは起承転結から構成され、関連分野の先生方にその内容に添って執筆をお願いしてきました。その1(筒井)・その2(前多・東村)「起」、その3(西原先生、岡先生)「承」、その4(川戸先生、松島先生)「転」に続いて、今回はその5「結」として浦野先生と菊地・石居先生の二編を掲載します。神経内分泌学や神経行動内分泌学の領域で精力的にホルモンの脳研究を推進されている先生方の論文は、「ホルモンの脳科学」シリーズを締め括るにふさわしい素晴らしい内容です。(K. T. & K. M.)

ホルモンの脳科学 その5

神経ホルモンによる本能行動制御の分子機構

浦野 明 央 (北海道大・院・理)
aurano@sci.hokudai.ac.jp

しばしば本能行動は遺伝的にプログラムされていると言われる。では本能行動の遺伝子プログラムとはどのようなものなのだろうか。私たちの研究室では、サケの母川回帰を題材とし、その実体の解明を目指して研究を進めている。この欄に書く機会を得たことを利用させていただき、このような研究をやるに至った背景と何を考えて研究を進めているのかを述べてみたい。

視床下部神経内分泌系との出会い

脳について研究してみたいとはっきり考えるようになったのはいつの頃だったのだろうか。おそらく大学院に進む時になり、どこかの講座に身を置く必要に迫られた時だったのではなかったかと思う。ところがどの先生につけば脳にさわられるのかと動物学教室の中を物色してみても行き先が見えてこない。悩ん

でいても仕方がない、スキーにでも行ってくるかと乗った蔵王行きの生協のスキーバスの車中で、動物教室の博士課程にいた3人の院生に出会ったのである。そのうちの二人がなんと小林英司先生の弟子で、先生なら脳をやっている、他の先生の所では脳の研究はできないと言う。

まだ純情だった時代だから、おじさんみたいなD2、D3の先輩が言うのなら本当なのだろうと素直に信じ、スキーから帰るのもどかしく先生に話を伺いにいったのである。脳のことがやりたいというだけで具体的なことは何も考えていなかったし、小林先生の研究のこともまったく知らずに飛び込んでいったのだから、今にして思えばひどい学生だったし、先生の方も困られたのではなかっただろうか。しばし考えておられて、ぼそぼそと「そうですか。脳のことがやりたいのですか。

では視床下部のモノアミンオキシダーゼの組織化学でもやって下さい。形を知ることが大事ですから」とテーマを出して下さったのである。

電気生理学への転進

学位となる仕事で、バソプレシンの分泌が α 受容体を介して促進的に、 β 受容体を介して抑制的に制御されていることを示した。このアドレナリン性の相反する制御機構が同一ニューロンの上にあるのかどうかどうしても知りたくて、微小電気泳動法が学べる研究室に席をおいたのだが、研究室のテーマであるネコの眼球追従運動で四苦八苦している間に、答えはカナダのグループに先に出されてしまった。そうこうしているうちにシアトルのGorbman教授の所でカエルのmate callingの神経内分泌機構を研究する機会があり、ネコからカエルに鞍替えして視床下部の世界に舞い戻ることができた。

Gorbman教授の研究室では、視索前核前部(APON)のニューロンが種特有のmating callにตอบสนองしてスパイクの発射頻度を高めること、聴覚情報は網様体を經由する非特殊な信号としてAPONに伝えられると考えられることなどを示した。APONは哺乳類の生殖行動の中核である視索前野に相同な部位で、カエルではmate callingの引金中枢になっている。

この頃(1980年前後)、視床下部のペプチドニューロンが、神経下垂体だけでなく、脳内のいくつかの領域に投射していることが分かってきた。この形態学的な事実は「神経分泌系は神経系と内分泌系の機能を時間調和的に支配し本能行動を発現させる」ことを示すものではないかと考え、石居進先生と共著の本(UPバイオロジー「神経分泌」)にもそれを書かせてもらった(図1)。図はシアトルから戻ってすぐに描いたものだが、描きながら、これだ、これからこれを実証して本能行動の神経内分泌機構を明らかにしていこうと決めたことが今でも思いだされる。

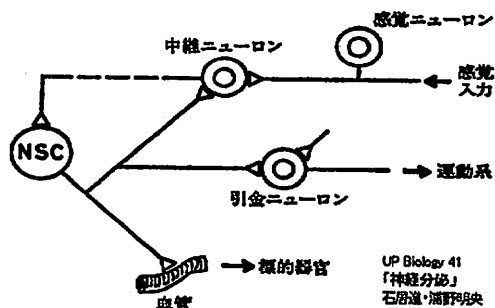


図1 神経分泌細胞(NSC)の多元支配

UP Biology 41
「神経分泌」
石居進・浦野明央

ヒキガエルでの形態学的研究

いくつかの理由から実験動物をヒキガエルに決め、「形を知る」ところから研究を始めた。視索前核の細胞構築と亜核構造の解析、性的二型性の解析、逆行性HRP法による入力繊維の起源の同定、ゴルジ様免疫染色による神経ホルモン産生ニューロンの投射パターンとその季節変動の解析、バソトシンニューロンとGnRHニューロンの個体発生の解析などにより、ヒキガエルの視床下部とくに視索前核の構造がかなりよく分かってきた。

それらの中で生殖行動における神経ホルモンの役割を調べていくのに重要と思われるのは、バソトシン、GnRHおよびTRHの免疫陽性繊維がAPONと神経下垂体の両方に投射していたことである。バソトシン繊維とGnRH繊維はさらに脳内に広く分布しており、その投射部位には生殖行動に関わる感覚系や運動系が含まれていた。

以上の観察から、形態学的には「神経分泌系は神経系と内分泌系の機能を時間調和的に支配し本能行動を発現させる」と言えるのだという確信を得ることができた。

ヒキガエルでの生理学的研究

形態学的方法では「神経ホルモンが脳と下垂体の両方に作用している」ということを証明できない。ましてや行動を制御しているとは到底言えない。そこで手始めにバソトシン、GnRHおよびTRHを冬眠状態のヒキガエルの脳室内に μg オーダーで微量注入し、行

動の変化を脳波と関連づけて観察した。GnRHとTRHは脳波を睡眠状態から高度に覚醒した状態に変えるとともに歩行活動も高めたが、バソトシンは作用を現さなかった。

次いで、雄のヒキガエルに筋弛緩剤を投与し、脳波を記録するとともに血管に挿入したカニューレから適宜採血できるようにして、脳室内にGnRHを微量注入したところ、脳波の振幅の増大と血中テストステロン濃度の上昇が見られた。脳室内に注入したGnRHがどのようにしてテストステロンの血中レベルを上げたのかという点に疑問は残るが、こうしてGnRHが神経活動と内分泌活動をある程度同調的に制御していることが確認できた。

さらに、繁殖期直前のヒキガエルを材料として、微小電気泳動法によりAPONニューロンの神経ホルモン感受性を解析したところ、調べたうちで20%ほどのニューロンで、GnRHとTRHにより濃度依存的にスパイクの発射頻度が高まった。同一ニューロンで両者に対する感受性を調べることはできなかった。またGnRHおよびTRHに対する興奮性の応答が繁殖期に特に高まっているものかも確認できていない。とは言っても、上の結果は、GnRHとTRHに生殖行動の中枢であるAPONニューロンを興奮させる作用があることを確かにしたものである。

遺伝子プログラム解明への方向転換

上に述べたところまで分かってきたところで深刻な問題が出てきた。神経ホルモンの個々のニューロンに対する作用の速さ、脳室内投与による脳波の活性化＝行動の発現までの時間、それと血中テストステロン濃度の上昇する時間という三者の間に、時間的なギャップがあり、それが生理学的には説明できないのである。これは遺伝子の発現を介した現象がどこかに含まれるためであることは容易に予想できる。しかもその遺伝子レベルの現象は、典型的な本能行動である生殖行動の遺伝子プログラムの一環であるに違いない。

この時点で、研究室には合成オリゴヌクレ

オチドを用いて神経ペプチドmRNAを検出する *in situ* hybridization (ISH) 法を開発した実績はあったが、組換えDNA実験をやる体勢も研究費もなかった。もともと合成オリゴヌクレオチドを用いるISH法を開発したのは、組換え実験の設備のない貧しい研究室でも、塩基配列が報告されている神経ホルモン遺伝子の発現なら調べられるだろうというさもし根性に根ざしたものであった。しかも、哺乳類の神経葉ホルモンの塩基配列に対するプローブでは、カエルの神経葉ホルモンのmRNAは検出できないという苦い経験をしたばかりであった。そのままヒキガエルで研究を続けても、知りたいことの本質に切り込めないという状況で身動きが取れなくなったのである。

困りはてていた時に水産庁のバイオテクノロジープロジェクトが動き出すという話が聞こえてきた。そこで思い切って研究の対象をサケの産卵回遊に変え、その遺伝子プログラムの解明に取り組むことにした。

サケの産卵回遊：生殖のための本能行動

典型的な本能行動であるサケの回遊はいくつかの相に分けられる。銀化した稚魚の降海回遊、若い成体の索餌回遊、成熟個体の産卵回遊などである。広い海洋を回遊しながら成長した個体は、やがて性成熟が始まると母川に回帰して溯上し、産卵して一生を終わる。このようなサケの産卵回遊は生殖のための本能行動であり、「遺伝的にプログラムされている」と言われている。

産卵回遊の制御には、ヒキガエルのAPONに相同な視索前野(POA)と呼ばれる領域が重要な役割を持つと考えられる(図2)。これまでの多くの報告から、真骨魚の脳内ではこの領域がさまざまな入力情報を統合し、神経内分泌系を介して生殖腺を成熟させる一方で、性行動の引金中枢として、脳内の運動系に動機づけ信号を送って行動そのものを発現させていることが明らかになっている。北大・水産学部附属洞爺湖臨湖実験所の上田宏先生の発

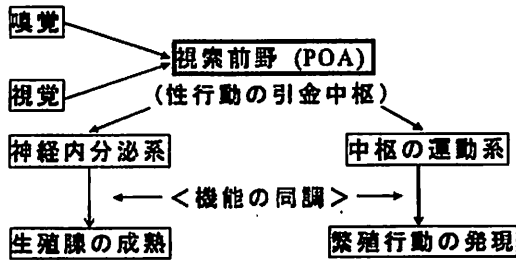


図2 サケの産卵回遊：生殖のための本能行動

案に始まるGnRHアナログのベニザケおよびヒメマスへの投与実験では、性成熟の促進と再放流後の母川回帰に要する日数の短縮が見られた。ヒキガエルと同様、おそらくはGnRHニューロンが神経系と内分泌系の機能を同調させることが重要なのであろう。

神経ホルモンcDNAと遺伝子DNA

遺伝子プログラムを研究するための第一歩は、産卵回遊のどの段階でどのような遺伝子がどれだけ発現しているか定量することである。神経ホルモンについては、脳内のどの部位でどれだけ発現しているのかという情報も必要になる。こういったことを考え、まずクローニングと配列解析に取り組むことにした。

産卵回遊は生殖のための本能行動ではあるが、それにとまらざるにさまざまな生理機能の制御には、GnRH以外の視床下部神経ホルモンも関わっている可能性がある。母川回帰の途上でのストレスへの適応にはCRHが、また海洋から母川に遡上する時の淡水適応に必要な下垂体ホルモン、プロラクチン、の放出にはTRHが関わっているかもしれない。産卵回遊の最後の段階では、産卵行動の発現に神経葉ホルモンのバソトシンが関わっている可能性がある。

一方、サケが母川に帰ってきた時にはさまざまな下垂体ホルモンの血中濃度が変動することが知られている。しかも、ある下垂体ホルモンの分泌調節には複数の神経ホルモンが関わるのがふつうである。したがって、産卵

回遊の遺伝子プログラムの実体を明らかにするためには、GnRH遺伝子の発現だけではなく、できるだけ多くの視床下部神経ホルモン遺伝子の発現について解析する必要がある。ということで、いくつかの神経ホルモンcDNAおよび神経葉ホルモンとGnRHの配列を明らかにしてきた。(最近、魚類の視床下部と下垂体の関係を哺乳類と同じと考えてはいけないことを示すデータがいくつか報告されている。)

ホルモンmRNAの定量

身近なようでも母川に帰ってくるサケは野生動物である。気候の変動、海洋環境の変動が神経ホルモンや下垂体ホルモンの遺伝子の発現に影響を与えることを想定して研究を進める必要がある。分子プローブが揃ったからといって安易にその場限りのノーザンブロットやRT-PCRをやるのは禍根を残すだけである。このように考え、まず神経葉ホルモンmRNAの定量法の開発に取り組んだ。試行錯誤の末に、一本鎖のセンスDNAをスタンダードとして標準曲線を描き検量する方法を確立した。この方法を用いて回帰してきた石狩川系シロザケ視床下部の神経葉ホルモンmRNA量を数年にわたって定量し、淡水に移行した時のmRNA量の変動に雌雄差があることをはっきりとさせた。しかもこの変動が淡水適応ではなく、最終性成熟にとまらざるものであることを示すことができた。

下垂体ホルモンをコードするmRNAも同様の方法でルーティンに測れるようになったので、下垂体ホルモン一式について、母川回帰時の遺伝子発現の変動を解析することができた。北海道の石狩川と三陸の大槌川、長さが大きく違うそれぞれの川に回帰してきたシロザケ下垂体の測定結果を比較したところ、生殖腺刺激ホルモン(GTH II)のサブユニット遺伝子の発現が、母川の長さには関係なく、産卵場までの距離に依存して変動することが分かった。興味あることに、ベニザケ下垂体におけるGTH IIサブユニット遺伝子の発現の時

間経過もシロザケのそれと似ていた。これは最終性成熟時の遺伝子プログラムの時間経過が、系群間だけでなく、近縁のサケ属の間でも似ていることを示すものであろう。

これまでに得られたこのようなホルモン mRNA の定量的結果は、産卵回遊の最終段階におけるいくつかのホルモン遺伝子の発現の変動が遺伝子プログラムに依存していることを示すものではないだろうか。ここにきて、産卵回遊の遺伝子プログラムの実体がチラッと見えたように思われる。さらに、産卵回遊の進行にともなう神経葉ホルモンおよび下垂体ホルモン遺伝子の発現の変動には、年による気候変動の違いや母川の違いを越えた一般性ないしは普遍性があることが確かめられた。

転写調節機構の理解への第一歩

サケの産卵回遊は生殖のための本能行動である。これまでの結果は、だからであろう、その遺伝子プログラムの解明に、分子レベルでの脳—下垂体—生殖腺系の機能の理解が必須であることを示している。

石狩川系のシロザケでは遡上にともない GnRH 遺伝子の発現および GTH II β 遺伝子の発現が高まっていた。またベニザケを用いた GnRH アナログの投与実験では、GTH α および II β の遺伝子の発現が GnRH により高まるという結果が得られている。GnRH は脳内でもいくつかの遺伝子の発現に関わっている可能性があるが、中枢ニューロンにおける GnRH の転写調節機構の解析は現時点では不可能である。というわけで、GnRH による GTH II β 遺伝子の転写調節の機構を解析することにした。この仕事が進み始めると、近いうちに転写調節因子を同定することが必要になってくるはずである。

遺伝子プログラムの実体解明を目指してサケの回遊の研究に取り組み始めた時に転写調節因子のことが頭になかった訳ではないのだが、よく知られている重要な転写調節因子ですらほとんど調べられていないサケ科魚類で、転写調節因子を一つの研究室でやっていくこ

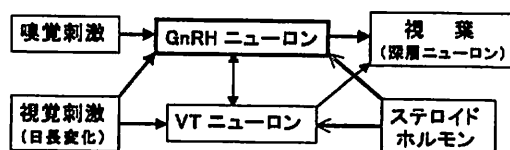


図3 これから取り組む研究の対象とその関係

とには大きなためらいを感じている。

今後の研究の進め方

視床下部と辺縁系によって制御されている本能行動の中枢機構の本質は、ヒトでもサケでも同じはずである。それならば、大脳皮質(新皮質)がほとんど発達していないサケを用いる方が、本能行動の本質を理解するのに適しているであろう。では、どこまでやれば動物の本能行動のメカニズムが多少は分かった気になれるのだろうか。できればここまではやってみたいということを行なってみた(図3)。

1) 産卵回遊にともなうホルモン遺伝子の発現変動の解析

春先、北洋から日本に向かって泳ぎ始めたサケは、秋になって日本に帰り着く。その産卵回遊の各ステージで、脳および脳下垂体におけるホルモン遺伝子の発現レベルがどのように変動しているのかを定量的に調べる。とくに地域特異的な神経ホルモン遺伝子の発現レベルの変動は、mRNA の極微量定量、*in situ* hybridization、免疫組織化学等により解析する。これまでこのような研究はなかったが、こういった解析により、産卵回遊の遺伝子プログラムの実体を解明するために必要な最も基本的なデータを得ることができる。

このような仕事では解析する試料を採取した個体の系群を同定できないと意味がないので、そのための方法も開発する。

2) GnRHニューロンの活動を制御する入力刺激の同定

サケ科魚類では短日条件によって生殖腺の発達が促進されることが分かっているので、視覚系もしくは松果体が短日状態を検出し、それを POA に伝えているメカニズムを調べる。一方、一般に嗅覚刺激も生殖行動の発現

に関わっていることがよく知られているので、嗅覚情報がGnRHニューロンに伝えられるメカニズムも明らかにする。

3) 神経ホルモンによる視葉深層ニューロンの機能制御

視葉深層は、魚類も含めて、脊椎動物の定位行動を制御する中枢であるが、ここにはGnRHニューロンあるいはバソトシンニューロンからの投射がある。視葉深層ニューロンが定位行動である母川回帰に関わっていることは十二分にあり得るので、その電気活動がGnRHおよびバソトシンによってどう修飾しているのか、またGnRHおよびバソトシンがどのような細胞内情報伝達系を介して深層ニューロンの活動を制御しているのか、といったことはぜひ解析してみたい。

4) 神経ホルモン産生ニューロンにおける電気活動と遺伝子発現の調節

本能行動の遺伝子プログラムがあるとしても、それだけでは行動の発現機構は理解できない。行動の発現に向けてそのプログラムの流れを制御している主要な要因として、ニューロンの電気活動を無視することはできない。遺伝子プログラムの実体を明らかにしようと思えば、現在の研究を行っているそもそもの動機がそこにあるからである。では何を知らなければならないのか？

神経伝達物質とステロイドホルモンはGnRHニューロンおよびバソトシンニューロンの電気活動をどう変えるのか？

電気活動が神経ホルモン遺伝子の発現の調節に関与するのか？

ステロイドホルモンは神経ホルモン遺伝子の発現をどのように調節しているのか？

2)から4)に述べたことを明らかにしていくためには、同定したニューロンの電気活動を記録し、その同定ニューロンについて遺伝子の発現がどのように変動するか解析する必要があるだろう。どのような方法でやってい

けばいいのか難しいところであるが、初めに電気活動を細胞内Caの変化として光学的に記録し、それを記録したニューロンの遺伝子発現を*in situ* hybridizationで解析してみようかと考えている。

サケ科魚類を用い、その産卵回遊を対象として、本能行動の遺伝子プログラムの実体を解明しようという研究に手をつけてからもう10年余になるが、分子レベルの仕事に追われおろそかにしてきたことがある。ヒキガエルの時に、まず最初に取り組んだ「形を知る」という事である。上に述べた研究のそれぞれに手をつけ始めて、基本的なサケの脳の神経解剖学的データが研究室にないことを思い知らされ愕然としていたところである。小林先生の「形を知ることが大事ですから」という一言が身に沁みて思い出される今日このごろである。

[文 献]

本稿で引用した実験結果についての個々の論文は以下の総説を参照していただきたい。

石居進・浦野明央：神経分泌、UPバイオロジー41、東京大学出版会（1980）

浦野明央・石原勝敏（編）：ヒキガエルの生物学、裳華房（1987）

Urano, A. : Neuroendocrine control of anuran anterior preoptic neurons and initiation of mating behavior. *Zool. Sci.* 5 : 925-937 (1988)

Urano, A. *et al.* : Molecular neuroendocrine basis of spawning migration in salmon. in : *Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology.* pp 46-56. H.S. Kwon *et al.* eds. HRC, Chonnam National Univ./Kwangju (1999)