

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20770054

研究課題名 (和文) 単離培養 GnRH ニューロンを用いたペプチド開口放出動態の細胞生理学的解析

研究課題名 (英文) Cellular Physiological analysis of peptidergic exocytotic events using primary culture system of isolated GnRH neurons

研究代表者 阿部 秀樹 (ABE, HIDEKI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：90396804

研究成果の概要 (和文)：

中枢神経系においてニューロン間の神経伝達や興奮性などを調節するペプチドを放出するペプチドニューロンにおける単一ニューロン発火活動とペプチド開口放出の関連をあきらかにするために、申請者が確立した魚類終神経 GnRH ニューロンの単離培養系を用いて、同培養ニューロンに単一細胞エレクトロポレーション法を用いて開口放出関連分子と蛍光タンパク質の融合遺伝子を導入し、それらの動態をタイムラプスイメージングする方法を確立した。

研究成果の概要 (英文)：

To understand the excitation-secretion dynamics of peptidergic neuron from various cellular compartments, we recently established a primary culture system of isolated fish terminal nerve (TN)-gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuron. In this study, we examined the electrophysiological properties of the cultured TN-GnRH neurons. They showed subthreshold spontaneous membrane potential oscillations and could be induced to fire in phasic or tonic patterns. Then, we applied a single cell electroporation method for introducing exogenous genes to visually identified TN-GnRH neurons. We successfully introduced plasmids encoding fusion proteins of GFP and exocytotic vesicle components to identified TN-GnRH neurons. Exogenous expression of those genes constructs showed distributions of punctate fluorescence in the soma and neurites. Time-lapse imaging of those fluorescence enabled visualization of movements and exocytosis of peptides in a peptidergic neuron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：GnRH、開口放出、脳・神経、神経修飾、ペプチド放出、神経ペプチド、興奮・分泌関連、細胞培養

1. 研究開始当初の背景

GnRH ペプチド神経系には向下垂体ホルモンとして働く視床下部 GnRH 系以外に神経修飾に関わる中脳 GnRH 系と終神経 (TN)-GnRH 系が存在している。申請者は、

GnRH ニューロンが明瞭な細胞塊を形成しており、顕微鏡下で同定可能であるという他の脊椎動物にはない利点を持つ小型熱帯魚ドワーフグラミーの全脳 *in vitro* 標本を

用いて TN-GnRH ニューロンが示す電気生理学的特性を中心に研究を行ってきた。

GnRH をはじめとする神経修飾作用に関わるペプチドを産生するニューロンは、一般に少数の散在した細胞集団が脳内広範囲に分枝した軸索を伸長するという共通した形態学的特徴を持っている。それらのニューロンから放出されるペプチドは、明瞭なシナプス構造からは放出されずに軸索終末ばかりでなく軸索途中のバリコシティや細胞体からも“*en passant*”に放出され、標的ニューロンに存在する代謝型受容体の活性化→イオンチャネル等の修飾を介して膜興奮性を調節すると考えられている。

申請者は「TN-GnRH ニューロン細胞体における自発発火活動が広範囲に分枝したニューロン各所での $[Ca^{2+}]_i$ 変化、ひいてはペプチド放出にいかなる影響を与えるのか、すなわち、特徴的な形態とその電気生理学的特性がペプチド放出にどう関わっているか」を明らかにすることに興味を持った。

国内外の神経生物学分野における上記設問に対する研究を俯瞰すると、シナプス小胞からの神経伝達物質の（所謂、早い）開口放出の素過程に関する研究は盛んに行われているが、有芯小胞からのペプチド開口放出について、特に開口放出過程と細胞形態の関係に着目した研究は全く行われていない。一般に神経細胞体における脱分極は、活動電位として神経突起末端やバリコシティなどへ伝播し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入を介して開口放出を引き起こす。これら細胞局所間では、電位依存性 Ca^{2+} チャネル・細胞内 Ca^{2+} ストア・細胞質 Ca^{2+} 結合タンパクの局在、そして局所細胞質体積の差、等を反映して細胞内 Ca^{2+} 濃度が異なる動態を示すのではないかと予測されている。

しかしながら TN-GnRH ニューロンをはじめとするペプチドニューロンは、脳内広範囲にわたって立体的に神経突起を投射しており、神経突起周囲は他ニューロンの細胞体や神経突起、そしてグリア細胞などに取り囲まれている。そのため、単一 TN-GnRH ニューロンの分枝した神経終末やバリコシティの位置を同定した状態で、細胞体から電気活動を記録、または刺激を加えながら、神経突起における $[Ca^{2+}]_i$ 変化や引き続き生じるペプチド開口放出等、各種シグナルの時空間的変化を同時に記録することは不可能であった。そこで申請者は、ペプチドニューロン一般における膜興奮性と細胞局所からのペプチド開口放出の動態を、TN-GnRH ニューロンの特徴的な形態を培養環境下で平面状に再現して電

気生理・イメージングなどの技術を駆使した多角的研究を行うことで解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

GnRH をはじめとする神経修飾作用に関わるペプチドを産生するニューロンは、一般に少数の散在した細胞集団が脳内広範囲に分枝した軸索を伸長するという共通した形態学的特徴と規則的な自発発火活動を示すという特徴を持っている。「ペプチドニューロン細胞体における自発発火活動が広範囲に分枝したニューロン各所での細胞内 Ca^{2+} 濃度変化からペプチド放出にいかなる影響を与えるのか」を明らかにするために、申請者はペプチドニューロンの一つ、TN-GnRH ニューロンを単離して同ニューロンの特徴的な形態を生体外で平面状に再現した培養系を確立した。

本研究では、(1) 単離培養 TN-GnRH ニューロンの電気生理学的特性を解析し、ペプチド放出に関わる電気活動に重要なイオンチャネルを明らかにする。(2) シナプス小胞や有芯小胞の構成タンパクと GFP との融合タンパク質や、開口放出に応じて蛍光強度が変化する GFP バリエーションなどの外来性遺伝子を培養 TN-GnRH ニューロンに遺伝子導入する方法を確立し、神経突起とバリコシティの伸長・形成過程、ペプチド含有小胞の細胞内における移動、開口放出の動態を可視化する。(3) 電気生理・電気化学・イメージング手法を組み合わせ、TN-GnRH ニューロンにおける興奮-分泌連関の時空間的動態を実験的に解析する。(4) 培養 GnRH ニューロンにおける膜興奮・細胞内 Ca^{2+} 濃度変化・（開口放出）の動態についてマルチコンパートメントモデルによるシミュレーション実験系の構築を試み、ペプチドニューロンにおける興奮-局所分泌連関の実験的・理論的な解析基盤を構築することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 単離培養 TN-GnRH ニューロンが示す電気生理学的特性の解析

単離培養したドワーフグラミー TN-GnRH ニューロン（ペプチドニューロン）が示す発火特性、そして発現している電位依存性チャネルの種類と特性を、ホールセルパッチクランプ法の電流固定法・電位固定法により解析し、従来 TN-GnRH ニューロンの電気生理学的研究に使用してきた全脳 *in vitro* 標本中の intact な TN-GnRH ニューロンの電気生理学的特性と比較・検討した。

(2) 単一ペプチドニューロンに対する外来

性遺伝子導入法の確立

パッチ電極内に充填した電解質を特定の単一細胞内に導入する単一細胞エレクトロポレーション法を利用して、培養 TN-GnRH ニューロンに対して外来性遺伝子を導入・発現方法を検討した。

- (3) 培養 TN-GnRH ニューロンにおけるペプチド開口放出の蛍光タンパク質による可視化とその動態の解析

前項で述べた培養 TN-GnRH ニューロンに対する遺伝子導入法を使用して、開口放出のレポータータンパク、シナプトフルオリンを導入・発現させ、培養 TN-GnRH ニューロンにおけるペプチド放出の時空間的動態を解析する。さらに、開口放出過程をより高時間分解能で、かつ定量的に解析できる GnRH の微小炭素繊維電極(CFE)による電気化学的検出法（申請者が所属する研究室が開発）や膜容量測定法等、特性の異なる最新の検出方法を併用する。これら記録手法の特性を生かして、細胞体における発火活動が、複雑に分枝した TN-GnRH ニューロンの細胞局所における $[Ca^{2+}]_i$ 変化を起し、それが分泌小胞の移動・開口放出を誘起する動態を同時計測することを目指した。

4. 研究成果

- (1) 単離培養 TN-GnRH ニューロンが示す電気生理学的特性の解析

前採択課題期間に確立に成功した終神経 GnRH ニューロンの単離初代培養細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、同ニューロンの電気生理学的特性を解析したところ、同ニューロンが脳内で示す自発発火活動は平常時は消失するものの細胞を刺激することにより規則的発火活動を誘発できることが明らかとなった。

また(3)において述べるペプチドニューロンの発火活動に応じたペプチド開口放出動態を解析するために、単一終神経 GnRH ニューロンが示す自発発火活動波形のパターンをいくつか記録し、その電位変化波形を元にしてホールセルパッチクランプの電位固定法を行う action potential clamp 法を行った。その結果、ペースメーカー活動における一発の活動電位発生時の Ca^{2+} 電流を単離・計測することが可能となった。

またこれら研究の過程において TN-GnRH が NPFF という別のペプチドを産生し、それらが自己傍分泌的にペースメーカー頻度を抑制

性に調節することや、TN-GnRH ニューロンから放出されると考えられる GnRH が嗅球神経回路において僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達を前シナプス性に増強することが明らかとなり、これらを二編の論文として公表した。

- (2) 単一ペプチドニューロンに対する外来性遺伝子導入法の確立

培養 TN-GnRH ニューロンにおける刺激依存的な開口放出部位を蛍光色素 FM1-43 を用いて検索した。その結果、高濃度(60mM) K^+ による脱分極刺激により、細胞体と神経突起の両者において開口放出後の分泌小胞の再取り込みを反映した FM1-43 蛍光の上昇をリアルタイムイメージングで観察することができた。ここまでの(1)の内容の一部と併せて単離 TN-GnRH ニューロン培養系の確立として論文を一編公表した。しかしながら FM1-43 による開口放出現象の解析は時間分解能が悪く、またエンドサイトーシス・エクソサイトーシスをすべて反映してしまい特異性に限界があった。

そこで単一 GnRH ニューロンの細胞各所における GnRH 開口放出の調節メカニズムをリアルタイムかつ特異的に検出するために、GFP 改変蛍光タンパク質と GnRH との融合タンパク質などのプローブ遺伝子を特定の培養 GnRH ニューロンに単一細胞エレクトロポレーション法を用いて導入することを試みた。実験では標準的な GFP 発現ベクターである pEGFP の単一細胞エレクトロポレーションによる培養 TN-GnRH ニューロンへの導入を試み、培養ニューロン全体への GFP 蛍光の発現を指標として遺伝子導入の成否を確認した。その結果、約 60%の培養 GnRH ニューロンに目的とする外来遺伝子を導入することに成功した。

- (3) 培養 TN-GnRH ニューロンにおけるペプチド開口放出の蛍光タンパク質による可視化とその動態の解析

培養GnRHニューロンに二種類の分泌小胞構成タンパク質と蛍光タンパク質の融合遺伝子を前述の方法により導入し、タイムラプスイメージングによりそれらの動態を解析した。

その結果、シナプス小胞構成タンパク質の一種、シナプトフィジンと EGFP の融合タンパク質を導入した例では、細胞体とバリコシティにおいて EGFP 蛍光が GnRH を含む有芯小胞とは共局在せず点状に集中分布し、バリコシティ内外へ出入りする様子をタイムラプス観察することに成功した。一方、pH 感

受性の蛍光タンパク質（フルオリン）とシナプス小胞や有芯小胞に共通した小胞膜貫通タンパク質、シナプトブレブリンの融合タンパク質で、開口放出による小胞内膜の pH 変化（酸性→中性）を蛍光強度変化に変換することで開口放出を可視化・計測できるシナプトフルオリンを導入したニューロンでは、細胞興奮性の増大により、神経突起末端・途上では持続性に蛍光強度が増大したが、細胞体では一過性の蛍光強度増大が起こることが明らかとなった。これらの成果を複数の学会において公表した。

以上の実験により確立した蛍光タンパク質による開口放出現象解析と、炭素繊維電極を用いた電気化学的GnRH開口放出測定法、ならびに活動電位波形による電位固定法を組み合わせることで、単一ペプチドニューロンにおける興奮分泌連関を定量的に解析可能な実験系の構築が完成し、次の段階の実験を継続している。

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 6 件）

1. Kawai, T., Abe, H., Akazome, Y., and Oka, Y. (2010) Neuromodulatory effect of GnRH on the synaptic transmission of the olfactory bulbar neural circuit in goldfish, *Carassius auratus*. *J. Neurophysiol.* 104: 3540-3550 (査読有) .
2. Saito, T., Nakane, R., Akazome, Y., Abe, H., and Oka, Y. (2010) Electrophysiological analysis of the inhibitory effects of FMRFamide-like peptides on the pacemaker activity of Gonadotrophin releasing hormone neurones. *J. Neurophysiol.* 104: 3518-3529 (査読有) .
3. Kanda, S., Nishikawa, K., Karigo, T., Okubo, K., Isomae, S., Abe, H., Kobayashi, D., and Oka, Y. (2010) Regular pacemaker activities of GnRH 2 neurons in comparison with spontaneous activities of GnRH1 and 3 neurons recorded from GFP-transgenic medaka *Endocrinology* 151: 695-701 (査読有) .
4. Kawai, T., Abe, H., Wakabayashi, K., and Oka, Y. (2009) Calcium oscillations in the olfactory non-sensory cells of the goldfish, *Carassius auratus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790: 1681-1688 (査読有) .
5. Abe, H. and Oka, Y. (2009) Primary culture of the isolated terminal nerve - GnRH neurones derived from adult teleost (dwarf gourami, *Colisa lalia*) brain for the study of peptide release mechanisms. *J. Neuroendocrinol.* 21: 489-505 (査読有) .
6. Abe, H., Keen, K.L., and Terasawa, E. (2008) Rapid action of estrogen on intracellular calcium oscillations in primate LHRH-1 neurons. *Endocrinology* 149: 1155-1162. (査読有) .

〔学会発表〕（計 24 件）

1. 阿部秀樹, 入江高行, 岡良隆, “外来遺伝子導入により可視化した終神経 GnRH ニューロンにおける分泌小胞の移動”, 第 81 回日本動物学会大会、東京、2010 年 9 月
2. 高橋晶子, イスラムサディクル, 神田真司, 赤染康久, 阿部秀樹, 大久保範聡, 岡良隆, “メダカを用いた GnRH2・GnRH3 神経の形態解析と時期特異的機能阻害”, 第 81 回日本動物学会大会、東京、2010 年 9 月
3. 相川雅人, 神田真司, 赤染康久, 阿部秀樹, 大久保範聡, 岡良隆, “ゴナドトロピン分泌制御機構のトランスジェニックメダカを用いた解析”, 第 81 回日本動物学会大会、東京、2010 年 9 月
4. Abe, H., Irie, T., and Oka, Y., Visualization of peptidergic dense cored vesicles in the terminal nerve (TN)-gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons by single cell electroporation of exogenous genes, 39th Annual Meetings, Society for Neuroscience, Chicago, USA, 2009, Oct.
5. Karigo, T., Kanda, S., Aikawa, M., Abe, H., Okubo, K., and Oka, Y., Diurnal regulation of GnRH1 neuronal activities and gonadotropin subunit transcription in a daily spawning fish, medaka, 39th Annual Meetings, Society for Neuroscience, Chicago, USA, 2009, Oct.
6. Kawai, T., Abe, H., and Oka, Y., Neuromodulatory effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on the synapse transmission in the goldfish olfactory bulb

- (*Carassius auratus*), 39th Annual Meetings, Society for Neuroscience, Chicago, USA, 2009, Oct.
7. 田中純・阿部秀樹・岡良隆・大谷-金子律子、”メダカ GnRH1 ニューロン初代培養系の確立”、第80回日本動物学会大会、静岡、2009年9月
 8. 苅郷友美・神田真司・相川雅人・阿部秀樹・大久保範聡・岡良隆、”メダカにおける視床下部 GnRH ニューロン活動と下垂体遺伝子発現の日内変動”、第80回日本動物学会大会、静岡、2009年9月
 9. 西川圭・神田真司・阿部秀樹・岡良隆、”トランスジェニックメダカを用いた GnRH2 ニューロンの生理学的解析”、第80回日本動物学会大会、静岡、2009年9月
 10. 河合喬文・阿部秀樹・岡良隆、”キンギョ嗅球神経回路における GnRH ペプチドの神経修飾作用”、第80回日本動物学会大会、静岡、2009年9月
 11. 阿部秀樹・入江高行・岡良隆、”単一細胞電気穿孔法を用いて外来遺伝子導入した終神経 GnRH ニューロンにおける分泌小胞の可視化”、第32回日本神経科学学会大会、名古屋、2009年9月
 12. 土谷昌史・赤染康久・阿部秀樹・岡良隆、”GnRH1/isotocin 発現ニューロンに対する kisspeptin 作用の分子生物学/電気生理学的解析”、日本動物学会関東支部第61会大会、埼玉、2009年3月
 13. 西川圭・神田真司・阿部秀樹・岡良隆、”生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)2 ニューロンの生理学的特徴”、日本動物学会関東支部第61会大会、埼玉、2009年3月
 14. 三谷優太・赤染康久・河合喬文・阿部秀樹・岡良隆、”*kiss1* パラログ遺伝子 *kiss2* の脳内発現および受容体 *kiss1/2* 活性化作用の解析”、日本動物学会関東支部第61会大会、埼玉、2009年3月
 15. 齊藤健・阿部秀樹・岡良隆、”終神経 GnRH ニューロンへの FMRamide ペプチドの過分極性作用に関する電気生理学的解析”、第31回日本分子生物学会大会、神戸、2008年12月
 16. Abe, H. and Oka, Y., Primary culture of the isolated terminal nerve - gonadotropin releasing hormone neurons derived from adult teleost brain and their electrophysiological properties, 38th Annual Meetings, Society for Neuroscience, WashingtonDC, USA, 2008, Nov.
 17. Kawai, T., Abe, H., and Oka, Y., Calcium oscillation of the olfactory non-sensory cells in the goldfish, 38th Annual Meetings, Society for Neuroscience, WashingtonDC, USA, 2008, Nov.
 18. Kanda, S., Okubo, K., Isomae, S., Abe, H., Kobayashi, D., Takeda, H., Aida, K., Nagahama, Y., and Oka, Y., Electrophysiological and anatomical characterization of three distinct GnRH neuronal populations in the GFP transgenic medaka, 38th Annual Meetings, Society for Neuroscience, WashingtonDC, USA, 2008, Nov.
 19. Abe, H., and Oka, Y., Primary culture system of fish GnRH neurons for the cellular physiological studies of effects of kisspeptin, 1st World Conference Kisspeptin, Coldoba, Spain, 2008 October.
 20. 齊藤健・阿部秀樹・岡良隆、”終神経 GnRH ニューロンへの FMRamide ペプチドの過分極性作用に関する電気生理学的解析”、第79回日本動物学会大会、福岡、2008年9月
 21. 尾崎令・阿部秀樹・岡良隆、”終神経 GnRH ニューロンにおける規則的発火活動と細胞内 Ca²⁺濃度の動態”、第79回日本動物学会大会、福岡、2008年9月
 22. 河合喬文・阿部秀樹・岡良隆、”キンギョ嗅上皮におけるカルシウム振動”、第79回日本動物学会大会、福岡、2008年9月
 23. 入江高行・尾崎令・阿部秀樹・岡良隆、”単一細胞電気穿孔による終神経 GnRH ニューロンへの外来分子導入法”、第79回日本動物学会大会、福岡、2008年9月
 24. 阿部秀樹、”終神経 GnRH ニューロン単離培養系：神経修飾ペプチド系の動作解明のために”、第12回鋤鼻研究会、裾野、2008年6月
- [図書] (計0件)
[産業財産権]
○出願状況 (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

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/naibunpi/Abe/abe.htm>

<http://researchmap.jp/habe/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部秀樹 (ABE, Hideki)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：90396804

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし