

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32823

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590284

研究課題名(和文) ラットゴナドトロピン放出ホルモンニューロンの興奮性を規定するイオンチャネルの解明

研究課題名(英文) Ion Channels Related to Cell Excitability of GnRH Neurons

研究代表者

加藤 昌克 (Kato, Masakatsu)

東京医療学院大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90143239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、GnRHニューロンの膜興奮性を規定するイオンチャネルの研究である。第一に、ソマトスタチン(SST)で活性化されるKチャネルについて解析した。SSTは膜コンダクタンス上昇をともなう弱い抑制を引き起こした。ソマトスタチン受容体Sstr2が高発現であった。次にGnRHニューロンにみられる緩徐後過分極にSKチャネルとKv7(KCNQ)チャネルが関与することが明らかになった。陽イオンチャネルについては、Nalcn, Unc-80, HCNの発現が明らかになった。これらのイオンチャネルがGnRHニューロンの静止膜電位を決めていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to determine ion channels which closely related to the excitability of rat GnRH neurons. First, we analyzed K channels and found an involvement of somatostatin receptors (Sst), SK channels, and Kv7 channels. SK and Kv7 are involved in the generation of afterhyperpolarization. Second, cationic channels were analyzed in oligo-cell RT-PCR. GnRH neurons express Nalcn (Na leak channel), Unc-80 (associate protein to Nalcn), and HCN (Hyperpolarization-activated cNucleotide gated Cationic channels). These ion channels may determine the cell excitability of GnRH neurons.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：GnRH neuron SK channel Kv7 channel Nalcn ucn80 HCN channel

1. 研究開始当初の背景

我々は生殖機能の神経内分泌的制御に着目し、その解明を目指している。生殖神経内分泌系における脳からの最終出力共通路を構成するのは GnRH ニューロンであり、その生理学的解析は不可欠である。我々は GnRH ニューロン特異的に緑色蛍光タンパク (EGFP) を発現するトランスジェニックラットを作成し、GnRH ニューロンの細胞生理学的解析を進めてきた (Kato et al., 2003, 2006)。本課題の研究もその一環である。なお、作成したトランスジェニックラットは京都大学 NBRP に寄託し、広く研究者に公開されている (Wistar-Tg(GnRH-EGFP)Nphy)。

2. 研究の目的

ラット GnRH ニューロンに発現するイオンチャンネルと受容体の解明である。我々はすでに、膜電位依存性カルシウムチャンネルの解析を行い、GnRH ニューロンには L, N, P/Q, R 及び T 型のチャンネルが発現していることを報告した (Kato et al., 2003, Tanaka et al., 2010)。なかでも R 型の発現が高いことを見出した。そこで本研究では K チャンネルと Na チャンネルに的を絞り、膜興奮性と静止膜電位を規定するイオンチャンネルの解析を目的とした。

3. 研究の方法

GnRH-EGFP ラットから麻酔下に脳を摘出し、スライス標本および酵素処理による分散細胞標本作製し、実験に供した。膜電位・膜電流をホールセルパッチクランプ法で記録し、細胞外電流をオンセルパッチクランプ法で記録した。受容体・イオンチャンネル mRNA 発現は、分散標本から顕微鏡下に GnRH-EGFP ニューロンを分離採取し、少細胞 RT-PCR 法で解析した。また、GnRH ニューロン - ソマトスタチンニューロン間の密な接触の有無は共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

第一に、ソマトスタチン (SST) で活性化される K チャンネルについて解析した。スライス標本上で Cell-attached patch-clamp 法で活動電流を細胞外記録し、SST の効果を検証した。その結果、約 60 - 70% の細胞で抑制がみられた。また、Whole-cell patch-clamp では約 30% の細胞で膜コンダクタンスの増加を確認した。逆転電位は -62.5mV であった。この値はカリウムの平衡電位よりも浅い。カリウム以外の透過性が関与しているのか、あるいはスライス内の局所の細胞外カリウム濃度が正常よりも高いのか、どちらかによると

思われる。さらにソマトスタチン受容体の発現を RT-PCR で検証した結果、Sstr1-5 の発現がみられ、特に Sstr2 が高発現であった。次に SST ニューロンと GnRH ニューロンの形態学的関係を共焦点顕微鏡で解析した。GnRH ニューロンの線維とソマトスタチンニューロンの線維はどちらも終板器官に豊富に存在するが、すみわけが行われており、密な接触は少なく、ラット 1 個体あたりの数は、約 30 個であった。以上の結果から、ソマトスタチンは GnRH ニューロンに弱い抑制を及ぼすと考えられ、その作用はシナプスを介するのではなく、液性調節であることが示唆された。

第 2 に、GnRH ニューロンに発現する緩徐後過分極に關与するイオンチャンネルの解析を行った。特異的な拮抗薬を用いた薬理的な解析の結果、アバミンによる抑制は既報の 66 - 77% (Kato et al., 2006) と同様の値であった。残余の電流は Kv7 チャンネルの阻害薬である XE-991 の投与で消失した。また、XE-991 の単独投与でも 50% 以上の抑制がみられた。以上の結果からラット GnRH ニューロンにみられる緩徐後過分極には SK チャンネルと Kv7 (KCNQ) チャンネルが関与することが明らかになった。おそらく SK チャンネルと Kv7 チャンネルは膜上で何らかの相互作用をしていると考えられる。これら 2 種類のチャンネルの関係を現在解析中である。RT-PCR の結果、SK1-3 が発現していたが、SK3 がもっとも高い発現を示した。Kv7 チャンネルについては、Kv7-2 が高発現を示し、Kv7-5 の発現もみられた。以上から GnRH ニューロンの緩徐後過分極は SK3 チャンネルと Kv7-2 チャンネルの活性化で起こる可能性が高いと考えられる。

最後に、上記に加えてナトリウムチャンネルの発現を RT-PCR 法で解析した。NaIcn (Na⁺ leak channel) およびその結合タンパクである Unc-80 の発現と過分極で活性化される HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic-Nucleotide-gated channel) チャンネルの発現が明らかになった。以上の K チャンネル、Na チャンネルと K2P, Kir, GIRK などの関与によって GnRH ニューロンの膜興奮性が規定され、約 -60 mV の静止膜電位が作られていると考える。

【位置づけ・インパクト・展望】我々はラット GnRH ニューロンの研究を行っているが、多くのグループはマウス GnRH ニューロンの研究を行なっている。両者のデータを比較してみると類似点もあるが相違するところも多いことが判明した。また、個体レベルでの実験はラットの方が容易である。これらの理由からマウスでなくラットで行う意義があると考えられる。さらに GnRH ニューロン研究の

動向をみると、イオンチャネルや受容体に着目し、詳細な研究を行っているグループは少ない。今回の研究成果は新規なものであり、ラット GnRH ニューロンの機能を考えるうえで重要なものである。特に、緩徐後過分極については、関与するイオンチャネルが、海馬ニューロンなどと異なり、SK チャネルであること (Kato et al, 2006) を明らかにしたが、今回の研究でさらに Kv7 チャネルも関与することが明らかになった。GnRH ニューロンにとどまらず、神経系に広くみられる緩徐後過分極の理解を深めるのに貢献すると考える。今後、SK チャネルと Kv7 チャネルが膜上でどのように発現しているのかを解明していきたい。さらに、今回発現が明らかになったナトリウムチャネルの生理学的解析も進めたい。

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 2件)

(1) 雑誌論文

Koyama M, Yin C, Ishii H, Sakuma Y, Kato M. Somatostatin inhibition of GnRH neuronal activity and the morphological relationship between GnRH and somatostatin neurons in rats. *Endocrinology* 153: 806-814, 2012. Doi: 10.1210/en.2011-1374 査読あり

加藤昌克、佐久間康夫 . GnRH ニューロンに発現するイオンチャネルとその機能 . 内分泌・糖尿病・代謝内科 36(Suupl. 4): 105 - 109、2013 . 査読なし

[学会発表](計 4件)

1. 石井寛高、尹成珠、棟朝亜理紗、梶尾円香、加藤昌克、宮本武典、小沢一史、佐久間康夫 : ラット GnRH ニューロンおよび GT1-7 細胞における GABA_A 受容体の発現・機能解析 . 第 90 回日本生理学会大会、2013 3 28

タワーホール船堀 (東京)

2. 尹成珠、石井寛高、佐久間康夫、加藤昌克 : ラット GnRH ニューロンの緩徐後過分極電流は SK チャネルと KCNQ チャネルの活性化により惹起される . 第 39 回日本神経内分泌学会学術集会、2012 9 29 北九州国際会議場
3. 尹成珠、石井寛高、佐久間康夫、加藤昌克 : ラット GnRH ニューロンの s AHP 電流は SK チャネルと KCNQ チャネルの活性化で起こる . 第 89 回日本生理学会大会、2012, 3、松本
4. 小山麻希子、尹成珠、石井寛高、佐久間康夫、加藤昌克 : 終板器官における性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロンとソマトスタチンニューロンの形態学的関係と生理的意義 . 第 34 回日本神経科学大会、2011, 9、パシフィコ横浜

[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

6. 研究組織
(1) 研究代表者

加藤 昌克 (Kato Masakatsu)
東京医療学院大学・保健医療学部・教授
研究者番号：90143239

(2)研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3)連携研究者

石井 寛高 (Ishii Hirotaka)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：20445810

佐久間康夫 (Sakuma Yasuo)
東京医療学院大学・保健医療学部・学長・
教授
研究者番号：70094307