

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23770072

研究課題名（和文） 単一ペプチドニューロンにおける興奮～開口放出過程のリアルタイムイメージング

研究課題名（英文） Real-time imaging of excitation-secretion coupling process from the single peptidergic neuron

研究代表者

阿部 秀樹（ABE HIDEKI）

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：90396804

研究成果の概要（和文）：ペプチドニューロンが多様な環境変化に対応して柔軟に個体活動を調節する機構の基盤である単一ペプチドニューロンが示す入出力関係を明らかにすることを目的として、魚類終神経 GnRH ニューロン単離培養系と、同ニューロンへの外来遺伝子導入法を活用し、単一ペプチドニューロンにおける有芯小胞からのペプチド分泌動態に神経活動が及ぼす影響の解析を試みた。その結果、単一ペプチドニューロン細胞局所での分泌小胞移動、開口放出イベントの計測が可能となり、また開口放出の成因となる発火パターン制御に重要なイオン機構を解析した。

研究成果の概要（英文）：

To understand fine tuning mechanisms of the central nervous system by peptidergic neurons, we investigated the excitation-secretion relationship of single peptidergic neuron using a primary culture system of isolated fish terminal nerve (TN)-gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuron and gene transfer of exogenous genes by single cell electroporation. As a result, we enabled measurement of the movement of secretory vesicles and their exocytotic events from the subcellular region of single peptidergic neuron. We also analyzed the ionic mechanisms of the firing pattern control of TN-GnRH neurons that are the origin of exocytosis of GnRH peptide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、動物生理・行動

キーワード：神経生物、ペプチド放出、GnRH、開口放出、興奮分泌連関、細胞培養

1. 研究開始当初の背景

GnRH を初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、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。

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 系が存在する。代表者は、大型の GnRH ニューロンが明瞭な細胞塊を脳表面で形成しており、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を材料にして TN-GnRH 系の性質について電気生理学的特性を中心に研究し、1)TN-GnRH ニューロンが内在性イオンチャネルの性質により規則的自発発火活動を示すこと、2)その規則的自発発火活動が、自身が産生する GnRH による代謝型受容体の活性化を介して二相性に修飾されること、3)同現象に複数の電位依存性 Ca^{2+} 、 K^+ 電流の修飾が関与していることなどを明らかにしてきた。

代表者は、単一ペプチドニューロンの自発発火活動パターンにより何時何処からペプチドが放出され、放出されたペプチドが中枢神経回路をどのように修飾した結果、ペプチドニューロンが多様な環境の変化に対応して柔軟に個体活動を調節するのか、その全貌を神経生物学的に明らかにすることを研究の目標として研究を展開している。国内外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ものの、ペプチドを含む有芯小胞からの開口放出について、単一ニューロンレベル、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。

一般に神経細胞体の脱分極は活動電位として神経突起末端やバリコシティへ伝播し、 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。これら細胞局所では、 Ca^{2+} チャネル・細胞内 Ca^{2+} ストア・細胞質 Ca^{2+} 結合タンパク質局在、そして局所細胞質体積、等を反映して細胞内 Ca^{2+} 濃度が場所によって異なる動態を示すことが予測される。代表者はペプチドニューロンの発火活動は、発火頻度やパターンを変えることで細胞局所（神経突起末端やバリコシティ、そして細胞体）からのペプチド開口放出動態を differential に調節しているという作業仮説を立てている。ところがペプチドニューロンは一般に脳内広範囲に立体的に神経突起を投射し、神経突起周囲が他の細胞に取り囲まれているため、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・刺激しながら、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変化を記録することは事実上不可能であった。

そこで代表者は初めに述べたペプチドニューロン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、神経突起伸長を培養平面上に再構成したニューロンを用いて電気生理・イメージングなどの技術を駆使した多角的研究によって解明することを構想して本研究課題を行った。

2. 研究の目的

ペプチドニューロンが多様な環境変化に対応して柔軟に個体活動を調節するアルゴリズムの全貌を解明する一環として、単一ペプチドニューロンの入出力関係を明らかにすることを目的とした。そのために代表者が確立したペプチドニューロンの形態的生理学的特徴を *in vitro* で再構成した魚類 TN-GnRH ニューロン単離培養系と、同ニューロンへの単一細胞 electroporation による各種蛍光遺伝子導入法を活用し、単一ペプチドニューロンにおける有芯小胞からのペプチド分泌の動態、特に、単一ペプチドニューロンにおける細胞体での膜興奮が、細胞局所における $[Ca^{2+}]_i$ 変化、ペプチド分泌過程（分泌小胞の放出部位への移動～開口放出）に及ぼす影響の多角的解析を目指した。

3. 研究の方法

(1) ペプチドニューロンにおける分泌小胞移動・蓄積過程のリアルタイムイメージング

魚類 TN-GnRH ニューロン単離培養系と、同ニューロンへの単一細胞 electroporation による各種蛍光遺伝子導入法を用いて、蛍光タンパク質を発現させることで標識した分泌小胞の（バリコシティ・神経突起等への）移動・蓄積過程を落射蛍光顕微鏡によりタイムラプス観察・解析する。これによって定常状態で培養 TN-GnRH ニューロンにおける分泌小胞の移動・蓄積動態を検討し、また、 K^+ 刺激等の薬理刺激により膜興奮性・細胞内 Ca^{2+} 濃度を細胞全体的に変化させ、生じた小胞移動変化を解析した。

(2) 培養 TN-GnRH ニューロンにおける $[Ca^{2+}]_i$ 変化・ペプチド開口放出の蛍光タンパク質によるイメージング

培養 TN-GnRH ニューロンにおける局所 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を Inverse Pericam や G-CaMP2 等の蛍光 $[Ca^{2+}]_i$ センサータンパク質を遺伝子導入・発現させることで可視化・解析することを試みた。またペプチド分泌の最終過程である開口放出現象の時空間分布・変化を、特異的レポータータンパク、シナプトフルオリンを導入・発現させ薬理的に刺激し、開口放出に伴う蛍光強度変化を検出することを試みた。

(3) 単一ペプチドニューロンにおける細胞興奮制御～ペプチド開口放出の同時記録

パッチ電極から細胞内通電刺激や電場刺激を行うことで細胞興奮を促し、シナプトフルオリン蛍光によって開口放出を検出する。特に活動電位クランプ法を使用して TN-GnRH ニューロンが示す様々な発火パターンを人為

的に再現して、発火頻度や活動電位の持続時間・振幅等を系統的に変化させることによって発火パターンと開口放出の関係を直接的に明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) ペプチドニューロンにおける分泌小胞移動・蓄積過程のリアルタイムイメージング

前採択課題期間に確立したドワーフグラミ一終神経 GnRH ニューロンの単離培養細胞と同培養細胞への単一細胞 electroporation を用いた遺伝子導入法を利用して、シナプトフィジンと EGFP、およびニューロペプチド Y と Venus (改変型 YFP) の融合遺伝子を導入・発現させることで、分泌小胞の細胞体から軸索・樹状突起への移動の様子についてタイムラプスイメージングを行った。その結果、シナプトフィジンと EGFP の融合タンパク質を発現させた場合、同蛍光タンパクは GnRH ペプチドを含む有芯小胞と共局在していないが、ニューロペプチド Y と Venus の融合タンパク質は GnRH と共局在を示しており、TN-GnRH ニューロン内にペプチドを含む有芯小胞とシナプス小胞の両者が存在することが示唆された。またこれらの発現させた蛍光蛋白質の両者について神経突起途中に存在するバリコシティ様構造へ集積される様子と、同箇所への小胞の出入りを反映した蛍光輝点の移動・蛍光量の増減、細胞体と神経突起での異なる蛍光動態の可視化に成功した。現在、以上の結果を取りまとめて論文投稿を準備中である。

この研究と並行して、個々の同定したペプチドニューロンに異なる種類の荷電分子を迅速に導入可能な単一細胞 electroporation 法の特徴を活かして、脳内で終神経 GnRH ペプチドニューロンが形成する細胞塊内での個々のニューロン間連絡を、隣接するニューロンへの異なる蛍光色素導入と共焦点顕微鏡像の三次元立体解析によって調べ、ペプチドニューロンにおける同期したペプチド放出に寄与する傍分泌調節の元となると考えられる形態構造の詳細な立体形態を明らかにした。

また、この形態学的解析の途中に前申請課題中に明らかにした NPFY という TN-GnRH ニューロン自身が産生するペプチド以外に、脳内視床下部で産生される RFRP というペプチドが TN-GnRH ニューロンが示す自発発火活動を抑制的に制御すること、そしてその際のイオンメカニズムが NPFY とは異なることが明らかとなり、この結果を論文として公表した。

(2) 培養 TN-GnRH ニューロンにおける $[Ca^{2+}]_i$ 変化・ペプチド開口放出の蛍光タンパク質による

イメージング

開口放出による pH 環境の変化によって蛍光強度が増大する蛍光蛋白質、シナプトフルオリンを培養 TN-GnRH ニューロンに遺伝子導入・発現させたところ、同ニューロンの細胞体と神経突起では細胞外 K^+ 刺激による脱分極によって蛍光強度変化がそれぞれ異なる時間経過をたどることを示した。また神経突起上における単一開口放出イベントの時間推移の可視化に成功した。これらの結果は電気化学的 GnRH 開口放出測定法や、前申請課題期間中に記録した培養 TN-GnRH ニューロンにおける FM1-43 蛍光増大の結果と一致しており、TN-GnRH ニューロン細胞体と神経突起における異なる開口放出制御機構の存在が示唆された。

一方、蛍光 $[Ca^{2+}]_i$ センサータンパク質、Inverse Pericam を発現させた培養 TN-GnRH ニューロンでは蛍光強度が低く、代表者が有するイメージングシステムでは十分な蛍光強度変化を撮影することが困難であった。このため現在、異なる蛍光 $[Ca^{2+}]_i$ センサータンパク質を用いること、また低分子量蛍光 $[Ca^{2+}]_i$ 色素を用いることで実験系の再構築を検討している。

(3) 単一ペプチドニューロンにおける細胞興奮制御～ペプチド開口放出の同時記録

実際に TN-GnRH ペプチドニューロンが示す発火パターンによって膜電位を厳密にコントロール可能な action potential clamp 法の適応を試み、まず同方法によって TN-GnRH ニューロンが示す発火活動・パターン変化のいずれが同ニューロンからの開口放出を誘起するのに必要な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に最も寄与するかを解析した。そのために、実際に TN-GnRH ニューロンから記録した、異なるベースライン・振幅・持続時間をもつ活動電位波形や異なる発火頻度・発火パターンの膜電位変化を膜電位固定のコマンド電位として与えたときの Ca^{2+} 電流応答を記録した。その結果、単一活動電位波形を変化させた時には、単一活動電位あたりの Ca^{2+} 電流の電荷量に顕著な差は認められなかった。一方で発火頻度よりも発火パターンの変化によって顕著に Ca^{2+} 電流総電荷量が増大することが判明した。これにより、終神経 GnRH ニューロンにおいて細胞内に流入する Ca^{2+} 総電荷量、つまり GnRH の放出量、は主に発火パターンに依存して変化する可能性が強く示唆された。また、上記を支持する結果が同時並行して行っていたキンギョ TN-GnRH ニューロンを用いた電気生理実験により得られ (TN-GnRH ニューロン細胞塊周囲のコリン作動性線維の賦活化による TN-GnRH ニューロンの過分極が一過

性バーストを生じさせる)、これらの結果を現在公表準備中ならびに論文投稿している。

本申請課題の研究計画当初は Action potential clamp 法によって得られた結果をもとに、様々な TN-GnRH ニューロン発火活動変化に応じた GnRH ペプチド放出をタイムラプスイメージングにより計測・解析する計画であったが、代表者が研究機関を移動し、実験システム・実験系自体の再構築を行わざるを得なかったために到達できなかった。このため、単一 TN-GnRH ニューロンの発火活動を制御した状態で GnRH 開口放出のイメージングによる検出を行うことは今後の研究課題として継続して行うこととなった。

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 4 件)

1. Umatani, C., Abe, H., Oka, Y. (2013) Neuropeptide RFRP inhibits the pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons, *J. Neurophysiol.* 109:2354-2363. (査読有り)
2. Karigo, T., Kanda, S., Takahashi, A., Abe, H., Okubo, K., Oka, Y. (2012) Time-of-Day-dependent changes in GnRH1 neuronal activities and gonadotropin mRNA expression in a daily spawning fish, medaka. *Endocrinology* 153:3394-3404. (査読有り)
3. Kawai, T., Abe, H., and Oka, Y. (2012) Dopaminergic neuromodulation of synaptic transmission between the mitral and granule cells in the teleost olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 107:1313-1324. (査読有り)
4. Abe, H. and Oka, Y. (2011) Mechanisms of neuromodulation by a non-hypophysiotropic GnRH system controlling motivation of reproductive behavior in the teleost brain. *J. Reprod. and Devel.* 57:665-674. (査読有り)

[学会発表] (計 22 件)

1. 近藤千香, 苅郷友美, 相川雅人, 神田真司, 赤染康久, 大久保範聡, 阿部秀樹, 岡良隆, 遺伝子改変メダカを用いた黄体形成ホルモン (LH) 放出の中枢制御機構の解析, 日本動物学会関東支部第 65 会大会、東

京工業大学、2013 年 3 月

2. Okuyama, T., Yokoi, S., Abe, H., Taniguchi, Y., Okubo, K., Kamei, Y., Shimada, A., Naruse, K., Takeda, H., Oka, Y., Kubo, T., Takeuchi, H. Neural mechanisms of female sexual preference in medaka, 42nd Annual Meetings, Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2012, Oct.
3. Umatani, C., Abe, H., Oka, Y., Neuropeptide RFRP inhibits the pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons, 42nd Annual Meetings, Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2012, Oct.
4. Abe, H., Nishikawa, H., Suenami, S., Oka, Y. Neuro-neuronal connections among the cluster of terminal nerve Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) peptidergic neurons: A model for studying the synchronization of peptidergic neurons, 42nd Annual Meetings, Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2012, Oct.
5. 河合喬文・阿部秀樹・岡良隆, 終神経 GnRH ニューロンにおけるバースト活動の誘起、第 105 回近畿生理学談話会、関西医科大学、2012 年 9 月
6. 河合喬文・阿部秀樹・岡良隆, “キンギョ嗅球におけるドーパミンによる神経修飾作用”、第 34 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011 年 9 月
7. 竹内秀明、横井佐織、末廣勇司、今田はるか、田中実、川崎隆史、島田敦子、阿部秀樹、成瀬清、武田洋幸、久保健雄、奥山輝大、”メダカの性選択の神経基盤”、第 34 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011 年 9 月
8. 奥山輝大、末廣勇司、今田はるか、阿部秀樹、島田敦子、田中実、成瀬清、武田洋幸、岡良隆、久保健雄、竹内秀明、”メダカにおける視覚情報依存の配偶者選択行動の神経基盤”、第 34 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011 年 9 月
9. 奥山輝大、横井佐織、阿部秀樹、末廣勇司、今田はるか、田中実、川崎隆史、谷口善仁、亀井保博、島田敦子、成瀬清、武田洋幸、岡良隆、久保健雄、竹内秀明, Neural mechanisms of female sexual preference in medaka, *Oryzias*

- latipes (メダカにおける、メスの配偶者選択行動の神経機構), 第35回日本神経科学大会, 名古屋, 2012年9月
10. 馬谷千恵・阿部秀樹・岡良隆、Neuropeptide RFRP inhibits the pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons (RFRPによる終神経 GnRHニューロン発火活動抑制作用の解析), 第35回日本神経科学大会, 名古屋, 2012年9月
 11. 河合喬文・阿部秀樹・岡良隆, Burst induction mediated by cholinergic input in terminal nerve gonadotropin releasing hormone neurons (終神経 GnRHニューロンにおけるコリン作動性入力を介したバースト活動の誘起), 第35回日本神経科学大会, 名古屋, 2012年9月
 12. 阿部秀樹, 西川穂高, 末次翔太, 岡良隆, Neuro-neuronal connections among the cluster of terminal nerve GnRH peptidergic neurons (終神経 GnRH ペプチドニューロン細胞塊における GnRHニューロン間結合様式), 第35回日本神経科学大会, 名古屋, 2012年9月
 13. 奥山輝大, 阿部秀樹, 末廣勇司, 今田はるか, 島田敦子, 川崎隆史, 弓場俊輔, 谷口善仁, 亀井保博, 田中実, 成瀬清, 武田洋幸, 岡良隆, 久保健雄, 竹内秀明, 小型魚類を用いた視覚情報依存的な配偶者選択行動の分子・神経基盤解析, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月
 14. Okuyama, T., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Abe, H., Tanaka, M., Naruse, K., Takeda, H., Oka, Y., Kubo, Y., and Takeuchi, H. Analysis of the molecular and neural mechanism of female mating acceptance depending on visual information in small fish medaka, 1st medaka strategic meeting, Okazaki, JAPAN, 2011, Nov.
 15. Kawai, T., Kanda, S., AkazomeY, Abe, H., and Oka Y. Functional role of GnRH receptors for neuromodulation in the goldfish olfactory bulb, 41st Annual Meetings, Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 2011, Nov.
 16. Karigo, T., Aikawa, M., Kanda, S., Abe, H., Akazome, Y., Okubo, Y., and Oka, Y. Analysis of regulatory mechanisms of gonadotropin secretion using transgenic medaka (*Oryzias latipes*), 41st Annual Meetings, Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 2011, Nov.
 17. Okuyama, T., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Abe, H., Tanaka, M., Naruse, K., Takeda, H., Oka, Y., Kubo, Y., and Takeuchi, H. Analysis of the molecular and neural mechanism of female mating acceptance depending on visual information in small fish medaka, 41st Annual Meetings, Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 2011, Nov.
 18. 島田洋之・神田真司・赤染康久・大久保範聡・阿部秀樹・岡良隆, "トランスジェニックメダカを用いた kiss1ニューロンの電気生理学的解析", 第82回日本動物学会大会, 旭川, 2011年9月
 19. 馬谷千恵・阿部秀樹・岡良隆, "脳内ペプチド RFRPによる終神経 GnRHニューロン抑制作用の解析", 第82回日本動物学会大会, 旭川, 2011年9月
 20. 河合喬文・阿部秀樹・岡良隆, "キンギョ嗅球におけるドーパミンによる神経修飾作用", 第82回日本動物学会大会, 旭川, 2011年9月
 21. 阿部秀樹・西川穂高・岡良隆, "ドワーフグラミー終神経 GnRHニューロン細胞塊における GnRHニューロン間結合様式", 第82回日本動物学会大会, 旭川, 2011年9月
 22. Okuyama, T., Abe, H., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Kawasaki, T., Yuba, S., Taniguchi, Y., Kamei, Y., Tanaka, M., Naruse, K., Takeda, H., Oka, Y., Kubo, Y., and Takeuchi, H. Analysis of the molecular and neural mechanism of female sexual preference that depends on visual information in small fish medaka, 第17回小型魚類研究会, 三島, 2011年9月
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
- ホームページ等
- <http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hikaku/>
- <http://hidekiabe.web.fc2.com/>
- <http://researchmap.jp/habe/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 阿部 秀樹 (ABE HIDEKI)
- 名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：90396804

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし