

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460312

研究課題名(和文) GnRHニューロンにおいてGABAが興奮性である機能的意義の解明

研究課題名(英文) The role of GABA in the functional regulation of GnRH neurons

研究代表者

渡部 美穂 (Watanabe, Miho)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：10399321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：GnRHニューロンへの興奮性GABA入力役割について、GnRHニューロンのみでKCC2を発現誘導させることにより特定の時期にGABA入力を興奮性から抑制性に可逆的に変化させることができる独自に作成した遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。GABA入力を抑制性に変化させると、性周期が乱れ、排卵、妊娠が認められず、低濃度のGABAA受容体アゴニストによりGnRHニューロンが示す自発発火の低下がみられた。以上の結果より、興奮性GABA入力によるGnRHニューロンの活動の増加が生殖機能の維持に重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the functional role of the excitatory action of GABA in the regulation of GnRH neurons in vivo, we generated transgenic mice with conditional overexpression of KCC2 restricted in GnRH neurons in a reversible manner using tetracycline controlled gene expression system. Female mice, which expressed KCC2 in GnRH neurons, showed abnormal estrous cyclicity, no ovulation and no pregnancy. The application of low dose muscimol, GABAA receptor agonist, inhibited spontaneous firing of GnRH neurons. These results suggested that the excitatory action of GABA increased the activity of GnRH neurons and have an important role in the regulation of female reproduction.

研究分野：神経内分泌学、神経科学

キーワード：GnRHニューロン GABA KCC2 クロライド 生殖 視床下部

1. 研究開始当初の背景

脳による生殖内分泌調節の最終共通路は視床下部に存在する GnRH ニューロンである (図 1)。成熟雌マウスでは 4 日に一度排卵が起こる。これは卵の成熟に伴い卵巣から分泌されるエストロジェンの作用により、GnRH ニューロンから GnRH が大量分泌され、その結果、下垂体から黄体形成ホルモン (LH) が大量分泌されるためである。通常の GnRH および LH はパルス状に分泌されており、卵胞成熟や精子形成に関与している。GnRH ニューロンは細胞数が少なく、視床下部に散在しているにもかかわらず、周期的な GnRH の大量分泌やパルス状分泌を引き起こすメカニズムは明らかにされていない。性成熟が起きる思春期前までは GnRH 分泌は低く抑えられており、思春期開始に伴い GnRH ニューロンの活動性が高まり、周期的な GnRH の大量分泌が起きるようになるが、そのメカニズムも明らかにされていない。GnRH ニューロンはエストロジェン受容体を発現している GABA ニューロンから投射を受けたり GABA_A 受容体を発現していることから、GABA による GnRH ニューロンの制御が想定されている。これまでに我々は GnRH ニューロンに蛍光蛋白 EGFP を特異的に発現させたトランスジェニックラットを作成し、EGFP 蛍光を指標に同定した GnRH ニューロンへの GABA 作用を検討し、GABA が GnRH ニューロンでは成熟動物においても興奮性に作用していることを明らかにしている。GABA に対して興奮性を示す GnRH ニューロンの割合には性差があること、性周期に伴う変動があること、日内変動があることを示した。成熟動物の脳内において主要な抑制性伝達物質である GABA が興奮性に作用していることは、GnRH ニューロンに非常に特異的な性質であり、GABA 興奮性作用の GnRH ニューロンの機能制御への関与が強く示唆される。GABA 作用が興奮性であるか抑制性であるかは細胞内 Cl⁻ 濃度により決定される。Cl⁻ を細胞外にのみ出す K⁺-Cl⁻ 共役担体 (KCC2) の発現が低いと細胞内 Cl⁻ 濃度が高くなり GABA は興奮性に作用し、KCC2 の発現が高いと細胞内 Cl⁻ 濃度が低くなり、GABA の作用は抑制性になる (図 2)。GnRH ニューロンでは GABA が興奮性に作用していることから、KCC2 の発現が低くおさえられていると考えられる。

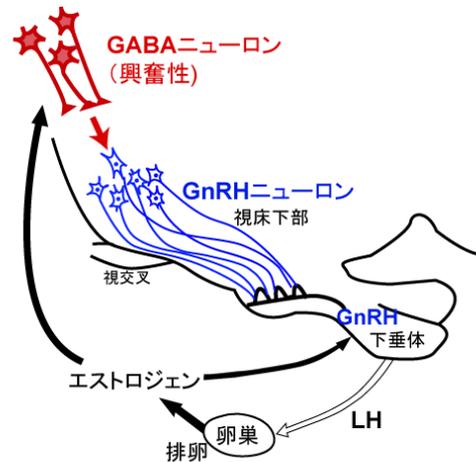


図 1. 性周期は視床下部 - 下垂体 - 生殖腺軸で制御される。GABA ニューロンは GnRH ニューロンに興奮性に作用する。

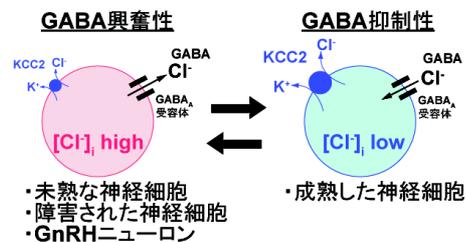


図 2. K⁺-Cl⁻ 共役担体 (KCC2) の発現が低いと細胞内 Cl⁻ 濃度が高く GABA は興奮性に作用する。KCC2 の発現が高いと細胞内 Cl⁻ 濃度が低くなり、GABA は抑制性に作用する。

2. 研究の目的

成熟動物においても GABA が興奮性に作用するという GnRH ニューロンに特異的な性質に注目し、独自に作成した GnRH ニューロンへの GABA 作用を特定の時期に興奮性から抑制性に可逆的に変化させることができる遺伝子改変マウスを用いて、生殖機能制御における興奮性 GABA 入力役割について個体レベルで明らかにすることを目的とした。また、光により GnRH ニューロンの活動を操作し、排卵を引き起こすことができるか検討するために、GnRH ニューロンに光活性化タンパク質チャネルロドプシン 2 を発現させたマウスの作成を行った。

3. 研究の方法

GnRH ニューロン制御における興奮性 GABA 入力の役割について個体レベルで明らかにするために、テトラサイクリン遺伝子発現誘導系をマウス個体に応用し、GABA 入力を抑制性に維持する分子である KCC2 を GnRH ニューロンに発現誘導させることにより、GnRH ニューロンへの GABA 入力を興奮性から抑制性に変化させることができる独自に作成した遺伝子改変マウス (GnRH-tTA::KCC2-tet0 マウス) を用いて解析を行った (図 3)。GnRH ニューロンで tTA (テトラサイクリン制御性トランス活性化因子) を発現するマウス (GnRH-tTA マウス) と KCC2 の翻訳開始部位直前に tet0 配列をノックインしたマウス

(KCC2-tet0 マウス) を交配させたダブルトランスジェニックマウス (GnRH-tTA::KCC2-tet0 マウス) では、ドキシサイクリン (DOX、テトラサイクリンの誘導体) 投与中止で、GnRH ニューロンで KCC2 を発現させることができ、DOX 再投与で KCC2 の発現を元のレベルに戻すことができる (Tet-off システム)。GnRH-tTA::KCC2-tet0 マウスでは DOX 投与中止後、どのくらいの期間で KCC2 蛋白を発現誘導できるかについて、KCC2 抗体を用いた免疫染色法により調べた。DOX 投与を中止し、GnRH ニューロンへの GABA 入力を抑制的に変化させ、排卵を引き起こす LH 大量分泌、卵胞成熟に関わる通常の GnRH/LH 分泌、排卵、卵胞形成、性周期、性行動、思春期開始などの生殖機能への影響を調べた。さらに、GnRH ニューロンへの GABA 入力を抑制的に変化させた時に生殖機能の変化を引き起こす要因となる GnRH ニューロンの細胞生理学的変化を調べるために、GnRH-tTA::KCC2-tet0 マウスと tet0-ChR2(C128S)-EYFP ノックインマウスをかけあわせ、GnRH ニューロンを可視化し、GnRH ニューロンから loose patch clamp 法により自発発火を記録し、GABA_A 受容体アゴニストのムシモルを作用させた時の自発発火の変化を調べた。オプトジェネティクス技術を用いて GnRH ニューロンの活動を制御するために、GnRH-tTA マウスと tet0-ChR2(C128S)-EYFP ノックインマウスをかけあわせ、GnRH ニューロンでチャンネルロドプシン 2 を発現するマウスを作成し (図 4)、解析を行った。このマウスで青色光刺激により GnRH ニューロンが活性化されるか確認するために、GnRH ニューロンから loose patch clamp 法により記録を行い、青色光で刺激し、活動電位を記録した。

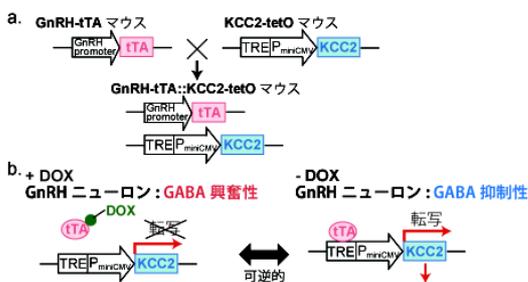


図 3. 遺伝子改変マウス DOX 投与中止により、GnRH ニューロンで KCC2 が発現誘導され、GnRH ニューロンへの GABA 入力が興奮性から抑制性になる。

GnRH-tTA::tetO-ChR2(C128S)YFP マウス

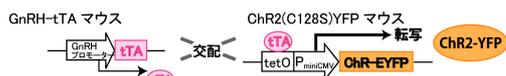


図 4. ChR2 を発現するマウス: DOX 投与中止により tTA が tetO に結合し ChR2-YFP を発現させる。

4. 研究成果

GnRH-tTA::KCC2-tet0マウスでは、DOX投与中止3-4日後からKCC2蛋白の発現がみられ、5-6日後には十分なKCC2蛋白が発現されることがKCC2抗体を用いた免疫染色法により確認できた(図5)。DOX投与中止によりKCC2を発現誘導させ、GnRHニューロンへのGABA入力を興奮性から抑制的に変化させた時の生殖機能への影響を調べた。性周期への影響を膣スミア採取により調べたところ、発情期が長く続き性周期が乱れていた。発情前期の翌日でも排卵がみられず、野生型雄マウスと3ヶ月同じケージに入れ繁殖テストを行ったが、妊娠は認められなかった。排卵を引き起こす周期的なLH大量分泌への影響を調べるために、排卵日前日の血中LH量をEIA法により測定したところ、LH分泌量がやや低下していたが有意な差はみられなかった。定常時のLH分泌量は検出限界以下であった。GnRHパルス状分泌への影響を調べるために、急性視床下部スライス標本を作成し、7.5分間隔で3時間のサンプリングを行い、細胞外液へのGnRH分泌量をRIA法により測定したが、検出限界以下で測定することが出来なかった。そのため、視床下部スライス標本を2時間培養してGnRH分泌量を測定したが、差は認められなかった。卵巣を観察したところ、成熟卵胞が認められず、小さな卵胞が多数観察された。思春期開始への影響を調べるために、出生後すぐにDOX投与を中止したところ、膣開口日が1.5日早まることがわかった。また、雄のGnRH-tTA::KCC2-tet0マウスと野生型雌マウスを3ヶ月同じケージに入れ繁殖テストを行ったが、雄の繁殖行動には影響がみられなかった。以上の結果から、GnRHニューロンへのGABA入力は雌の生殖機能の維持に重要な役割を持つことが示唆された。

さらに、GnRHニューロンへのGABA入力を抑制的に変化させた時に個体レベルでみられた生殖機能の変化を引き起こす要因となるGnRHニューロンの細胞生理学的な変化を明らかにするために、GnRH-tTA::KCC2-tet0マウスとtet0-ChR2(C128S)-EYFPノックインマウスをかけあわせGnRHニューロンを可視化し、視床下部スライス標本を作成し、EYFP蛍光を指標に同定したGnRHニューロンからloose patch clamp法により自発発火の記録を行った。GABA_A受容体のアゴニストであるmuscimolを低濃度の1 μMで作用させるとGnRHニューロンの自発発火の増加がみられたが、GABA入力を抑制的に変化させるとmuscimolにより自発発火が抑制された(図6)。よって、GABA入力を抑制的に変化させることにより、GnRHニューロンの活動性が低下し、生殖機能に影響がみられた可能性が示唆された。細胞外のGABAからの興奮性入力により引き起こされるGnRHニュー

ーロンの自発活動の増加が雌の生殖機能に重要な役割を持つと考えられた。

オプトジェネティクス技術を用いてGnRHニューロンの活動を制御するために、GnRHニューロンにChR2を発現するマウスを作成し解析を行った。GnRHニューロンからloose patch clamp法により記録を行い、青色光で刺激したところ、活動電位を発生させることができた。青色光刺激を停止すると活動電位が引き起こされなくなった。今後はマウスの視床下部に青色LEDプローブを留置し、光刺激によりGnRHニューロンを刺激し、排卵を引き起こすことができるか検討していく。

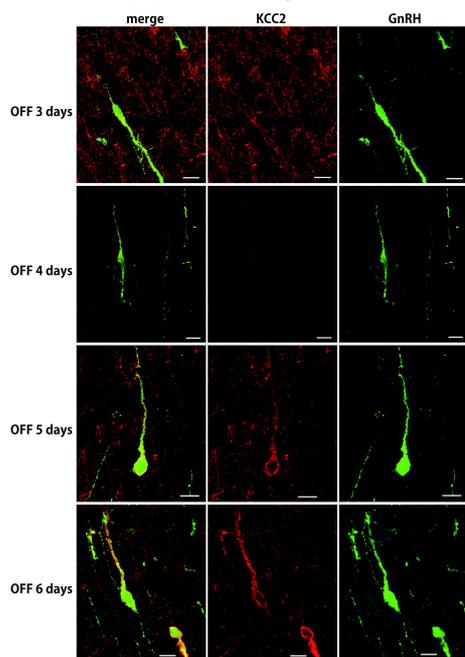


図5. DOX投与中止3-4日でGnRHニューロンのみでKCC2蛋白が発現誘導されはじめ、5-6日で十分なKCC2蛋白が発現誘導される。緑：GnRHニューロン、赤：KCC2

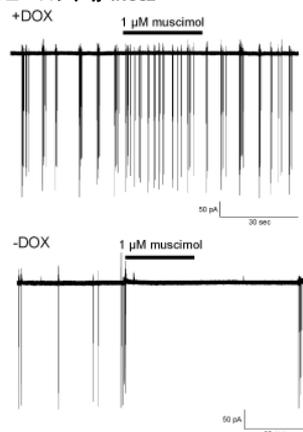


図6. 1 μM muscimolにより自発発火が増加するが、DOX投与中止によりKCC2を発現誘導させGnRHニューロンへのGABA入力を抑制性になると、muscimolにより自発発火が抑制される。

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2件)

Watanabe M*, Fukuda A, Nabekura J: The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Frontiers in Neuroscience*, 査読有, 8: 387, 2014. *corresponding author DOI: 10.3389/fnins.2014.00387

Watanabe M, Fukuda A: Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 査読有, 9: 371, 2015. DOI: 10.3389/fncel.2015.00371

[学会発表](計9件)

渡部美穂、鍋倉淳一、福田敦夫
GnRHニューロンでGABAの興奮性入力を抑制的に変化させると生殖機能に異常がみられる、第36回日本神経科学学会、2013.6.20、国立京都国際会館(京都)

渡部美穂、福田敦夫
生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロン制御におけるGABA興奮性入力の影響、第17回浜松医科大学シンポジウム、2014.07.25、浜松医科大学多目的ホール(浜松)

柿沢圭亮、渡部美穂、大川雄太、大石敏弘、山下美保、柳川右千夫、沖隆、福田敦夫
GAD67-GFP knockinマウスを用いたCRHニューロン制御におけるGABAの役割についての検討、第41回日本神経内分泌学会、2014.11.1、都道府県会館(東京)

柿沢圭亮、渡部美穂、柳川右千夫、沖隆、福田敦夫
GAD67-GFP knockinマウスを用いたCRHニューロン制御におけるGABAの役割についての検討、第61回中部日本生理学会、2014.11.7、名古屋市立大学(名古屋)

渡部美穂、岩田暁美、古川智範、熊田竜郎、内田琢、廣瀬伸一、福田敦夫
Functional regulation of neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 (カリウム-クロライド共役担体 KCC2 の機能制御)、第92回日本生理学会大会、2015.3.23、神戸国際会議場(神戸)

柿沢圭亮、渡部美穂、柳川右千夫、沖隆、福田敦夫
視床下部-下垂体系のCRH放出制御における新たなGABAの役割、第38回日本神経科学大会、2015.7.28、神戸国際会議場(神戸)

柿沢圭亮、渡部美穂、大川雄太、大石敏弘、山下美保、柳川右千夫、沖隆、福田敦夫

CRH ニューロン制御におけるGABAの新たな役割についての検討、第42回日本神経内分泌学会、第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会、2015.9.19、仙台市戦災復興記念館(仙台)

福田敦夫、柿沢圭亮、渡部美穂、大川雄太、大石敏弘、山下美保、柳川右千夫、沖隆
CRH 放出機構における新規GABA作用の発見、第42回日本脳科学会、2015.11.12、ANAホリディインリゾート宮崎(宮崎)

渡部美穂、福田敦夫
生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロン制御における興奮性 GABA 入力の影響、第18回浜松医科大学シンポジウム、2016.3.11、浜松医科大学多目的ホール(浜松)

〔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.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seiri1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 美穂 (WATANABE, Miho)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号： 10399321

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：