

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840111

研究課題名(和文)キスペプチン神経系によるイソトシン・バソトシンニューロンの直接間接制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of direct and indirect regulation of kisspeptin neurons on isotocin/vasotocin neurons

研究代表者

神田 真司(Kanda, Shinji)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：50634284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メダカを用いたCa<sup>2+</sup>イメージングでKiss2がバソトシンニューロンのCa<sup>2+</sup>を直接的に上昇させることを示した。次に、Kiss2の前駆体に対する特異的な抗体を作成、特異性を厳密に証明した上で、バソトシンEGFPトランスジェニックメダカにこの抗体を適用したところ、Kiss2ニューロンの神経線維がバソトシンニューロンの細胞体近傍の神経線維に密に接していることが明らかになった。これらより、バソトシンニューロンがキスペプチンニューロンの支配を受けていることが強く示唆された。さらに、各種ノックアウトメダカを作成、全脳でRNAseq解析を行い、いくつかの神経ペプチド発現に異常が出るということがわかっている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used physiological and histological approaches to examine the regulation of kisspeptin neural system on vasotonergic neural system in medaka. First, Ca<sup>2+</sup> imaging experiments demonstrated that vasotocin neurons increase their intracellular calcium level in response to synthetic Kiss2 peptide. Moreover, by using a newly generated Kiss2 specific antiserum and a transgenic lines whose vasotocin neurons are labeled by GFP, close apposition of Kiss2 and vasotocin fibers was demonstrated. These lines of evidence strongly suggest that Kiss2 neurons regulate vasotocin neuronal activities. In addition to these neuroanatomical approaches, we established knockout medaka for kisspeptin or vasotocin related genes. RNA seq analysis of their brains suggested some candidate neurotransmitters that can be regulated by kisspeptin or vasotocin neural systems in the brain. The analysis of these neuronal systems, which may be related to kisspeptin and/or vasotocin system, is underway.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：キスペプチン バソトシン GnRH Ca<sup>2+</sup>イメージング トランスジェニック

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の生殖は、視床下部に存在する GnRH ニューロンが制御する脳下垂体 FSH および LH の放出によって制御されていると考えられている。これまで最終共通経路と考えられてきた、GnRH ニューロンの制御は長年謎であったが、近年発見されたキスペプチンニューロンが血中のエストロゲン濃度に応じてゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) の放出を制御することにより生殖機能をコントロールするという仮説がほ乳類では定説になろうとしている。しかし、真骨魚類キスペプチンは GnRH ニューロンに作用せず、血中 LH の上昇を引き起こさない。また、鳥類はキスペプチンの遺伝子をすべて失っているが繁殖している。すなわち、キスペプチンによる生殖制御は哺乳類で独自に獲得したと考えられる。しかし、申請者の今まで行ってきた一連の研究により、キスペプチンニューロンは性ステロイドに対する感受性を示すことは、魚類を含む脊椎動物の幅広い種で保存されていることがわかってきた。そこで、性ステロイド感受性キスペプチンニューロンが、生殖以外のどのようなシステムに作用しているのかを調べた。そうしたところ、さまざまな末梢臓器の内分泌制御に関わることが知られているイソトシン・バソトシンニューロン (ほ乳類でのオキシトシン・バソプレシンニューロン) がキスペプチン受容体を発現していることが二重 *in situ* hybridization 法を用いたところ明らかになった。

### 2. 研究の目的

本研究では、キスペプチンニューロンのイソトシン、バソトシンニューロンへの直接、間接的制御の作用機序 (細胞体、脳下垂体軸索終末の各レベル) と、その制御がもたらす個体レベルでの変化を明らかにすることを目的とした。また、研究の途中で、直接、間接制御の両方が存在することがわかってきたので、間接制御を介するニューロンの同定を行い、制御全体の理解を行うこととした。

### 3. 研究の方法

トランスジェニック技術を用いることが可能なメダカの利点を活かして研究を行った。研究協力者から供与されたバソトシン GFP トランスジェニックメダカに AM 体としてカルシウムインジケータである *fura-2* を負荷した標本を用いてカルシウムイメージングを行った。また、メダカ Kiss2 前駆体に特異的な抗体を作製した。この抗体を用いてバソトシンニューロンとの形態学的な関係性を二重免疫組織化学で解析した。

さらに、キスペプチンニューロンによる制御をより詳しく解析するために、キスペプチン受容体である *gpr54-1* を発現するニューロンを GFP でラベルしたトランスジェニックメダカを用い、形態学的な解析や、その同定

を行うため、解離回収した GFP 発現ニューロンの次世代シーケンスを行った。

### 4. 研究成果

トランスジェニック技術を用いることが可能なメダカの利点を活かして研究を行った。研究協力者から供与されたバソトシン GFP トランスジェニックメダカに AM 体としてカルシウムインジケータである *fura-2* を負荷した標本を用いてカルシウムイメージングを行った。その結果バソトシンニューロンはキスペプチン合成ペプチドのバスアプリケーションにより細胞内カルシウムを上昇させることがわかった。この結果は神経回路を遮断するテトロドトキシンの存在下でも見られたので、キスペプチンニューロンは直接的にバソトシンニューロンに作用し得ることが明らかとなった。一方でメダカ Kiss2 前駆体に特異的な抗体を作製した。この抗体を用いてバソトシンニューロンとの形態学的な関係性を解析したところ、バソトシンニューロンの軸索の根元に近い位置に Kiss2 免疫陽性線維は密に投射していることが明らかとなった。

さらなるキスペプチンの機能を探索するため、既に作成済みのキスペプチン受容体を発現するニューロンを GFP で標識したメダカの脳を解離し、GFP 発現細胞のみを回収し次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。そうしたところ、脳下垂体に投射する群は、神経伝達物質として、ニューロペプチド B を発現していることがわかった。

さらに、*gpr54-1*-GFP トランスジェニックメダカの GFP とバソトシンの二重免疫組織化学をおこなったところ、*gpr54-1* を発現するニューロペプチド B の脳下垂体軸索終末は、バソトシンの神経終末を覆うような構造を示すことがわかった。したがって、キスペプチンニューロン、特に Kiss1 ニューロンは、ステロイドに応じて、ニューロペプチド B ニューロンを介し、バソトシンニューロンの神経末端での放出を制御していることを示唆する。なお、バソトシンニューロンは、バソトシンとして一般循環に放出されるものと、脳下垂体前葉の内分泌細胞に作用し、脳下垂体前葉ホルモン放出を促すものが存在するが、形態的な特徴から、ニューロペプチド B の作用、すなわちキスペプチンニューロンの制御を間接的に受けるものは、脳下垂体前葉ホルモンに作用するバソトシンニューロンの末端であると示唆された。

これらの結果から、Kiss2 ニューロンはバソトシンニューロンに直接的に作用し、Kiss1 ニューロンはニューロペプチド B ニューロンを介することで、脳下垂体末端におけるバソトシンの放出を制御することが示唆された。前者に関しては、形態学的、生理学的に神経回路は証明され、後者に関しては、現

時点では形態学的な示唆である。後者に関しても、引き続き、生理的な意義、作用機序に関する研究を進めている。

また、バソトシン、イソトシン、Kiss1, Kiss2, gpr54-1, gpr54-2 のノックアウトを作成し、全脳の mRNA を抽出、RNAseq 解析を行った。そうしたところ、バソトシンやイソトシンのノックアウトとキスペプチン遺伝子のノックアウトの間で、整合する遺伝子変動もいくつかみられた。一方で、全体的な印象として、バソトシンノックアウトのほうがキスペプチン関連遺伝子ノックアウトよりも明確に遺伝子発現変動を示すものも多く見られた。すなわち、キスペプチンニューロンによるバソトシンニューロンへの制御は、RNAseq である限り、神経修飾的なものであると考えられる。イソトシン・バソトシン神経系は、キスペプチン神経系以外にも、さまざまな神経入力を受けることが知られているので、今回の RNAseq の結果も、そのことを考えれば、リーズナブルであると考えている。

#### 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 2 件)

1. Female specific glucose-sensitivity of GnRH1 neurons leads to sexually dimorphic inhibition of reproduction in medaka. Hasebe M, Kanda S, Oka Y Endocrinology en20161352 2016 年 9 月[査読有り]
2. Evolution of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation in vertebrates revealed by knockout medaka. Takahashi A, Kanda S, Abe T, Oka Y Endocrinology en20161356 2016 年 8 月[査読有り]

[学会発表](計 29 件)

1. Kanda S, Arai Y, Takahashi A, Abe T, Oka Y. Kisspeptin may be one of the evolutionary choices specific to mammals for the promotion of folliculogenesis. 22nd International congress of zoology ; Invited Speaker; 2016/11/16; Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (Kunigami-son, Japan).
2. Ishida M, Yang C, Akazome Y, Oka Y, Kanda S. Characiform GnRH

neuronal systems provides a good model for functional compensation by paralogous genes. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society; 2016/11/14-19; Okiwana Conference Center (Ginowan, Japan).

3. Kayo D, Kanda S, Zempo B, Oka Y. Analysis of estrogen feedback mechanism of reproductive regulation in teleosts by using estrogen receptor knockout female medaka. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society; 2016/11/14-19; Okiwana Conference Center (Ginowan, Japan).
4. Nakajo M, Kanda S, Karigo T, Oka Y. The kisspeptin neuronal system regulates vasotocin/isotocin neurons via release of neuropeptide B from vPOA Gpr54-1-expressing neurons. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society; 2016/11/14-19; Okiwana Conference Center (Ginowan, Japan).
5. Shinya M, Kanda S, Takahashi A, Konno N, Hyodo S, Kagawa N, et al.. Electrophysiological and genetic demonstration that VT neuron is critical for water excretion in hypoosmotic conditions in medaka. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society; 2016/11/14-19; Okiwana Conference Center (Ginowan, Japan).

6. 神田真司. 魚類を用いて明らかにする脊椎動物中枢生殖制御機構の一般的原理とパラログ遺伝子の進化機構. 第 1 回次世代生命科学の研究会; 2016/8/13; 徳島大学、(徳島県徳島市).
7. Kanda S, Arai Y, Takahashi A, Abe T, Oka Y. GnRH receptor in LH cells is a critical green signal for LH surge. The 8th International Symposium of Fish Endocrinology; Invited Speaker; 2016/6/30; Gothenburg, Sweden.
8. Kanda S, Nakajo M, Karigo T, Oka Y. Sex steroid-sensitive kisspeptin regulation of various endocrine systems Asia Oceania Society for Comparative Endocrinology; Invited Speaker; 2016/6/21; Seoul, Korea.
9. 神田真司. メダカの特徴を活かした脊椎動物の生殖中枢制御機構の解析. サントリー生有研シンポジウム「性と成熟: その普遍性と多様性を支える機構」; 2016/02/05; サントリー生物有機化学研究所(京都府相楽郡).
10. Kanda S. Making the most of a small fish brain -elucidation of neuropeptide functions and neuronal network in medaka-. 日本分子生物学会【ワークショップ】小型魚類解体新書; 2015/12/2; 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市).
11. Arai Y, Kanda S, Karigo T, Hasebe M, Oka Y. Changes in GnRH sensitivity of LH cells play a key role in seasonal regulation of reproduction. Society for Neuroscience; 2015/10/19; Chicago, IL USA.
12. Hasebe M, Kanda S, Oka Y. Glucose-sensitivity of GnRH1 neurons cause down-regulation of GnRH1 neuronal activity by fasting, leading to the inhibition of the HPG axis. Society for Neuroscience; 2015/10/19; Chicago, IL USA.
13. 神田真司, 長谷部政治, 高橋晶子, 中城光琴, 苅郷友美, 鹿野悠, 小林由佳, 岡良隆. ペプチドニューロンをモデルにして脊椎動物神経系機能の進化を理解する. 日本動物学会 86 回大会シンポジウム 2015/9/18; 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市).
14. 中城光琴, 苅郷友美, 神田真司, 岡良隆. 脳下垂体制御におけるキスペプチン神経系の新規機能. 日本動物学会 第 86 回大会; 2015/09/17; 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市).
15. 長谷部政治, 神田真司, 岡良隆. HPG 軸による生殖中枢制御に絶食が及ぼす影響の神経生物学的解析. 日本動物学会 第 86 回大会; 2015/09/17; 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市).
16. 荒井勇樹, 神田真司, 苅郷友美, 長谷部政治, 岡良隆. メダカを用いたエストロジェンフィードバック機構の解析. 日本動物学会 第 86 回大会; 2015/09/17; 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市).
17. 神田真司. 遺伝子ノックアウト時のパラログ遺伝子による補償機能の解明. ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会; 2015/8/18; 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市).
18. Takahashi A, Kanda S, Akazome Y, Oka Y. Functional Analysis of

- Kisspeptin Neuronal System in Teleosts Using Knockout Medaka. ENDO; 2015/3/5-8; San Diego, CA USA.
19. Zempo B, Kanda S, Akazome Y, Oka Y. POA ER Alpha Neurons Transmit Estrogen Feedback Signal to GnRH1 Neurons for the Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis Regulation. ENDO; 2015/3/5-8; San Diego, CA USA.
  20. 安部智裕, 高橋晶子, 神田真司, 岡良隆. fshbおよびlhbそれぞれのノックアウトメダカを用いた真骨魚類生殖制御機構の解析. 日本動物学会 第 68 回関東支部大会; 2015/03/12; 神奈川大学(神奈川県横浜市).
  21. Hasebe M, Kanda S, Shimada H, Akazome Y, Oka Y. Electrophysiological analyses of sex steroid-sensitive Kiss1 neurons in a seasonal breeder, medaka. Society for Neuroscience; 2014/11/15; Washington, DC USA.
  22. Nakajo M, Karigo T, Kanda S, Oka Y. Multidisciplinary analyses of gpr54-EGFP transgenic medaka reveal novel functions of the kisspeptin neuronal system. Society for Neuroscience; 2014/11/15; Washington, DC.
  23. Shikano Y, Kanda S, Oka Y. Kisspeptin increases the spontaneous firing rate of vasotocin (VT) neurons in the brain of medaka. Society for Neuroscience; 2014/11/15; Washington, DC USA.
  24. Kanda S, Kitahara S, Oka Y. Hypothalamic NPY neurons decrease their npya expression after food depletion. Society for Neuroscience; 2014/11/15; Washington, DC USA.
  25. Kanda S, Oka Y. Functional divergence and evolution of steroid-sensitive kiss1/2 neuronal systems in vertebrates: amphibian as a model for understanding evolution of paralogous gene functions. The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology; Invited Speaker; 2014/11/ 7; Okazaki, Conference Center (愛知県岡崎市).
  26. 鹿野悠, 神田真司, 加川尚, 岡良隆. メダカ・バソトシンニューロンの自発発火活動に対するキスペプチンの効果の生理学的解析. 日本動物学会第 8 5 回大会; 2014/ 9/11; 東北大学 (宮城県仙台市)
  27. 善方文太郎, 神田真司, 赤染康久, 岡良隆. メダカ脳におけるエストロゲン受容体 発現ニューロンの可視化および神経線維投射の形態学的解析. 日本動物学会第 8 5 回大会; 2014/ 9/11; 東北大学 (宮城県仙台市)
  28. 中城光琴, 苅郷友美, 神田真司, 岡良隆. キスペプチン神経系の摂食・内分泌系に対する制御. 日本動物学会第 8 5 回大会; 2014/ 9/11; 東北大学 (宮城県仙台市)
  29. Kanda S, Hasebe M, Nakajo M, Shikano Y, Takahashi A, Karigo T, et al.. The input/output systems of kisspeptin neurons suggested by studies using transgenic medaka. 27th

Conference of European Comparative  
Endocrinologists; Invited Speaker;  
2014/ 8/29; Rennes, France.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/n  
aibunpi/kanda/](http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/n<br/>aibunpi/kanda/)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神田 真司 (KANDA, Shinji)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：50634284