

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15157

研究課題名(和文) 成長段階に応じて異なる発火活動を示すペプチドニューロンの生理機能と放出制御の研究

研究課題名(英文) Studies on physiological functions and release mechanisms of peptidergic neurons, which show various firing pattern during development

研究代表者

馬谷 千恵 (Umatani, Chie)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：60779346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は知覚・行動に関わる終神経生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン3 (GnRH3) ニューロンの発火活動と付随して放出される神経ペプチド・神経伝達物質の生理学的役割の解明を目的とした研究である。終神経GnRH3ニューロンを緑色蛍光タンパク質GFPで標識したメダカを用いて、単一細胞の電気記録(ホールセルパッチクランプ法)を行うとともに、神経ペプチドの放出をイメージングで解析した結果、グルタミン酸入力により終神経GnRH3ニューロンからペプチドの放出が生じていることが示唆された。そして行動解析により、終神経GnRH3ニューロンからの放出される物質による行動調節機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経ペプチドを産生・放出するペプチドニューロンの一つである終神経GnRH3ニューロンは種によって終神経に発現するパラログ遺伝子が異なるものの、脊椎動物を通してGnRHの発現は保存されている。本研究は脊椎動物におけるGnRHニューロンの作用機序についての理解が深まるとともに、複数の神経ペプチド・神経伝達物質を放出するペプチドニューロンが行動や生理機能を調節する機構の理解につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I analyzed the physiological functions of neuropeptides or neurotransmitters released from terminal nerve gonadotropin-releasing hormone 3 (TN-GnRH3) neurons, which play an important role in sensory recognition and behaviors. To examine firing activities and neuropeptide/neurotransmitter release, I recorded activities of GFP-labeled TN-GnRH3 neurons in medaka by whole cell patch clamp and Ca<sup>2+</sup> imaging. My results suggested that synaptic inputs of glutamate induce neuropeptide release from TN-GnRH3 neurons. In addition, behavioral analyses demonstrated that biomolecules released from TN-GnRH3 neurons modulate animal behaviors.

研究分野：神経生理学

キーワード：GnRH ペプチドニューロン 行動解析 真骨魚類 神経生理学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ペプチドニューロンは一般的な神経伝達物質に加え、神経ペプチドを産生・放出する神経細胞であり、動物の生理状態や行動を調節する。生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンは、脊椎動物の生殖機能・行動に重要な役割を果たすペプチドニューロンである (Herbison, *Nat Rev Endocrinol*, 2016; Umatani & Oka, *Zoological Lett*, 2019)。真骨魚類には3種類の *gnrh* パラログが報告されており、終神経 (TN) に細胞体が存在し、*gnrh3* を発現する TN-GnRH3 ニューロンは知覚・行動に重要であることが示唆されている。真骨魚類の全脳に投射する TN-GnRH3 ニューロンの研究に精力的に取り組んできた研究代表者は、ホールセルパッチクランプ法をはじめとする電気生理学的手法と局所的細胞イメージング手法を用いて、GnRH3 ニューロンの自発発火活動の新規調節因子 (Umatani et al, *J Neurophysiol*, 2013)、GnRH3 ペプチドによる感覚神経系の調節機構 (Umatani et al, *J Neurophysiol*, 2015)、個体の成長段階に応じた TN-GnRH3 ニューロンの多様な発火活動 (Umatani & Oka, *Endocrinology*, 2018) を世界に先駆けて見出すことに成功してきた。

このように、研究代表者らの研究をはじめ、TN-GnRH3 ニューロンの理解が進んでいるものの、TN-GnRH3 ニューロンが、(1) どのような発火活動のときに神経ペプチドまたは神経伝達物質を放出するのか、(2) 放出された神経ペプチドまたは神経伝達物質が個体の生理状態にどのような変化を与えるのかについては不明な点が多い。特に、TN-GnRH3 ニューロンは名前の由来となった GnRH3 ペプチドだけではなく、神経ペプチド FF (NPFF) やグルタミン酸も産生・放出することが形態学的に示唆されているものの、それぞれの役割については未だ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、TN-GnRH3 ニューロンの発火活動と神経ペプチド・神経伝達物質の放出機構の理解を通じ、TN-GnRH3 ニューロンの新たな生理機能を明らかにすることを目的とした。そして、本研究を通じて行動を司る神経機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

トランスジェニック技術と特徴的な性行動を示すメダカを用いて、下記の実験を行った。

#### (1) TN-GnRH3 ニューロンの多様な神経活動を引き起こす機構の解明

TN-GnRH3 ニューロンを蛍光緑色タンパク質 (GFP) 標識したメダカ (*gnrh3:EGFP*) を用いて、TN-GnRH3 ニューロンの神経活動を記録、および細胞内  $Ca^{2+}$  濃度をイメージングにより測定した。それにより、神経ペプチドを放出していると考えられる高頻度発火活動を引き起こすメカニズムを解析した。

#### (2) TN-GnRH3 ニューロンが行動を調節する機構の解明

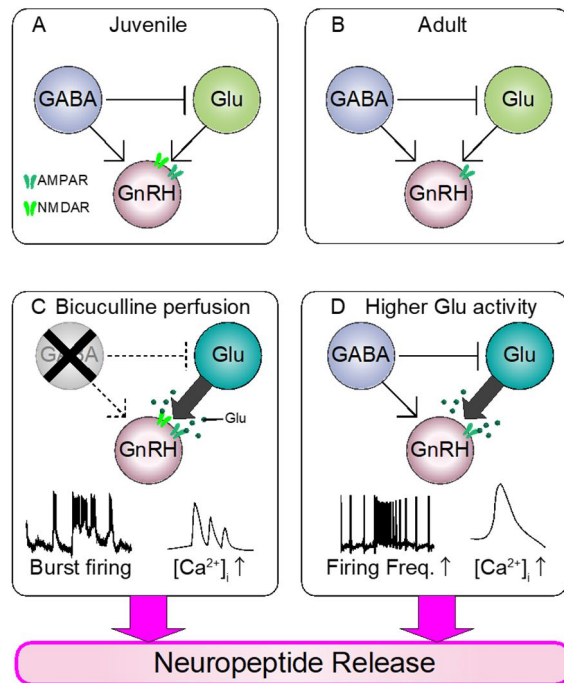
自動行動撮影システムを用いて TN-GnRH3 ニューロンで発現する神経ペプチドをノックアウトした個体の行動を詳細に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) TN-GnRH3 ニューロンの多様な神経活動を引き起こす機構の解明

研究代表者らの研究により、TN-GnRH3 ニューロンは不規則発火 (irregular)・規則的発火 (regular)・間欠的な高頻度発火 (bursting) を示すことがわかっている。そこで、本研究では、薬理的に TN-GnRH3 ニューロンがこれらの発火パターンを示す条件を解析した。具体的には、単一細胞記録法 (ホールセルパッチクランプ法) を用いて、TN-GnRH3 ニューロンの自発的な発火活動を解析するとともに、TN-GnRH3 ニューロンの神経活動を昂進する神経伝達物質、グルタミン酸および アミノ酪酸 (GABA) を投与した際の神経活動を解析した。まず、研究代表者の研究により、幼少期に自発的な間欠的な高頻度発火を示す確率が高く、自発的な不規則発火や規則的発火はあまり観察されない一方、成体期はほとんど規則的な自発発火活動を示すことがわかってきた。そこで、幼少期の個体と成体期の個体の両方を用いて解析を行ったところ、幼少期においても、成体期においても、グルタミン酸を投与した際に間欠的な高頻度発火を示すことが明らかとなった。さらに、この間欠的な高頻度発火の際に、神経ペプチドの放出が示唆される細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が生じているかどうか、イメージングにより解析した。この解析では、*gnrh3:EGFP* メダカの脳全体に  $Ca^{2+}$  濃度に応じて蛍光強度を変化させる Fura2-AM を投与して、EGFP 蛍光を指標に TN-GnRH3 ニューロンにおける細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化を観察した。すると、グルタミン酸投与の時に、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が著しく上昇することが明らかとなった。この上昇レベルは、*gnrh3* のパラログである、*gnrh1* を発現し、生殖周期の調節に関わる視床下部 GnRH1 ニューロンが GnRH1 を放出し、脳下垂体の LH (黄体形成ホルモン) 細胞から LH 放出を誘起する細胞内  $Ca^{2+}$  濃度レベル (Hasebe & Oka, *Endocrinology*, 2017) と同程度であった。したがって、間欠的な高頻度発火を示す TN-GnRH3 ニューロンから、神経ペプチド GnRH もしくは NPFF が放出されることが示唆された。

一方、幼少期に頻繁に観察された間欠的な高頻度発火には、グルタミン酸シナプス入力が入ったタイミングで生じること、その際、AMPA型のグルタミン酸受容体だけでなく、NMDA型のグルタミン酸受容体も関与していることがわかった。加えて、脳全体へのGABA受容体阻害剤 (bicuculline) の投与の実験の結果、この外部からのグルタミン酸シナプス入力は、さらにほかのGABAニューロンからのグルタミン酸ニューロンの抑制が外れること(グルタミン酸ニューロンの脱抑制)によって生じることが、明らかとなった。すなわち、TN-GnRH3ニューロンは、幼少期には、グルタミン酸シナプス入力を頻繁に受け取り、神経ペプチドを放出している一方で、成体期には、特定のタイミングでグルタミン酸シナプス入力を受けて、神経ペプチドを放出するという、成長段階により異なる機能を示すということが示唆された(図1)



## (2) TN-GnRH3ニューロンが行動を調節する機構の解明

TN-GnRH3ニューロンがどのように行動を調節するかを調べるため、研究代表者らが作出した、TN-GnRH3ニューロンで発現する神経ペプチドのノックアウトメダカの成体を用いて、様々な解析を行った。なお、どのノックアウト個体も野生型と同様の体サイズまで成長し、継代は可能であることが分かった。また、成体期メダカの全脳 *in vitro* 標本を用いて、TN-GnRH3ニューロンの神経活動を野生型と各神経ペプチドのノックアウト個体と比較したところ、定常状態の個体における自発発火活動には顕著な違いは見られなかった。したがって、定常状態においては、各神経ペプチドはTN-GnRH3ニューロンの自発発火活動にほとんど関与しないことが示唆された。次に、各ノックアウトメダカと野生型のメダカを用いて性行動の解析を行った。メダカは次のような一連の性行動を示す。まず、オスがメスを追いかける追尾、そして、オスがメスの鼻先を一回転する求愛円舞、メスがオスの求愛を受け容れると、オスは自身の尾緒を用いてメスを抱きかかえる抱接を示し、最終的に放卵放精が生じる。これら、一連の性行動に関して、野生型個体と各ノックアウト個体をそれぞれペアにし、行動解析を行ったところ、性行動との関連が強く示唆される結果が得られた。なお、自発的な運動には、顕著な違いは観察されなかった。さらに、各生体分子に対する受容体の発現部位と初期応答遺伝子との関連を組織学的に調べることで、性行動の動機付けの神経回路を明らかにしつつある。これまで、終神経GnRHニューロンと行動の関係については、終神経と視床下部で同じGnRH遺伝子を発現する種を用いてGnRHを投与する実験や、終神経のみに *gnrh3* 遺伝子を発現する種においても、TN-GnRH3ニューロンを外科的な手術により破壊した解析などにとどまっており、本研究の成果は実際脳内でどのように行動へ作用するかを非侵襲的なノックアウト個体を用いることにより、より精緻にTN-GnRH3ニューロンが行動を調節する機構を明らかにした。また、神経ペプチドを産生・放出するペプチドニューロンの一つである終神経GnRH3ニューロンは種によって終神経に発現するパラログ遺伝子が異なるものの、脊椎動物を通してGnRHの発現は保存されている。本研究は脊椎動物におけるGnRHニューロンの作用機序についての理解が深まるとともに、複数の神経ペプチド・神経伝達物質を放出するペプチドニューロンが行動や生理機能を調節する機構の理解につながると考えられる。

## <引用文献>

1. Herbison, A. E. (2016) Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinology*, 8:452-466.
2. Umatani, C. and Oka, Y. (2019) Multiple functions of non-hypophysiotropic gonadotropin releasing hormone neurons in vertebrates. *Zoological Lett*, 5, 23.
3. Umatani, C., Abe, H., Oka, Y. (2013) Neuropeptide RFRP inhibits the pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons. *J Neurophysiol*, 109, 2354-2363
4. Umatani, C., Misu, R., Oishi, S., Yamaguchi, K., Abe, H., Oka, Y. (2015) GnRH suppresses excitability of visual processing neurons in the optic tectum *J Neurophysiol*, 114, 2775-2784
5. Umatani, C. and Oka, Y. (2018) Juvenile-Specific Burst Firing of Terminal Nerve GnRH3 Neurons Suggests Novel Functions in Addition to Neuromodulation. *Endocrinology*, 159, 1678-1689

図1: TN-GnRH3ニューロンの多様な神経活動の機構。A: 幼少期のTN-GnRH3ニューロンの神経回路、B: 成体期のTN-GnRH3ニューロンの神経回路、C: 幼少期において間欠的な高頻度発火が生じる機構、D: 成体期において間欠的な高頻度発火が生じる機構

6. Hasebe, M. and Oka, Y. (2017) High-frequency firing activity of GnRH1 neurons in female medaka induces the release of GnRH1 peptide from their nerve terminals in the pituitary. *Endocrinology*, 158, 2603-2617

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Umatani Chie, Oka Yoshitaka	4. 巻 5
2. 論文標題 Multiple functions of non-hypophysiotropic gonadotropin releasing hormone neurons in vertebrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-019-0138-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 馬谷千恵	4. 巻 44
2. 論文標題 メダカの終神経GnRH3ニューロンにおける幼少期特異的なバースト発火活動の発見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 118-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5983/nl2008jsce.44.118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yukiko Kikuchi, Towako Hiraki-Kajiyama, Mikoto Nakajo, Chie Umatani, Shinji Kanda, Yoshitaka Oka, Keisuke Matsumoto, Hitoshi Ozawa, Kataaki Okubo	4. 巻 160
2. 論文標題 Sexually Dimorphic Neuropeptide B Neurons in Medaka Exhibit Activated Cellular Phenotypes Dependent on Estrogen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 827-839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2019-00030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chie Umatani, Yoshitaka Oka	4. 巻 159
2. 論文標題 Juvenile-specific burst firing of terminal nerve GnRH3 neurons suggests novel functions in addition to neuromodulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1678-1689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2017-03210.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梶原聖、池上花奈、馬谷千恵、中城光琴、神田真司、岡良隆
2. 発表標題 メダカを用いたエストロゲンによるGnRHニューロン制御機構の神経生理学的解析
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下舞凜子、富原壮真、中城光琴、馬谷千恵、岡良隆
2. 発表標題 HPG軸関連遺伝子欠損メダカを用いた生殖腺制御と性行動制御を結びつける機構の解明
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富田大貴、安齋賢、馬谷千恵、神田真司
2. 発表標題 研究用メダカで見られる原種とは違った表現型とその遺伝的基盤について
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田渚沙、馬谷千恵、赤染康久、岡良隆
2. 発表標題 神経修飾作用をもつTN-GnRH3ニューロンによる性行動の制御機構
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池上花奈, 馬谷千恵, 岡良隆
2. 発表標題 メダカを用いた排卵に重要なGnRHニューロンの高頻度発火発生機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田杭夕里佳, 武田進吾, 和井田洋世, 木村智貴, 神田真司, 岡良隆, 馬谷千恵
2. 発表標題 真骨魚類メダカを用いた繁殖期依存的な摂食行動の中制御機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 C. UMATANI, S. KANDA, T. KARIGO, Y. OKA
2. 発表標題 Coexpression of glutamate and multiple neuropeptides in the midbrain GnRH neurons suggests various neuromodulatory functions
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田彩華, 藤森千加, 馬谷千恵, 神田真司
2. 発表標題 脳下垂体自体光受容を介した体色変化の新規経路の解析
3. 学会等名 第44回 日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬谷 千恵, 岡良隆
2. 発表標題 終神経GnRH ニューロンは幼少期特異的に活発な神経活動を示す
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬谷 千恵, 岡 良隆
2. 発表標題 真骨魚類を用いた脳下垂体制御機能をもたない GnRH ニューロンの生理学的解析
3. 学会等名 日本動物学会 第88回 富山大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chie Umatani, Yoshitaka Oka
2. 発表標題 Synaptically induced high frequency firing of the terminal nerve gonadotropin-releasing hormone 3 neurons and their release activity
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

幼少期特異的に活発な活動をする脳内ペプチドニューロンの発見  
<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2018/5762/>  
 性行動に関するニューロンの幼少期における活発な働き  
[https://www.youtube.com/watch?v=sybb67R\\_cqU&feature=youtu.be](https://www.youtube.com/watch?v=sybb67R_cqU&feature=youtu.be)



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------