

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2013

課題番号：20247005

研究課題名（和文）多機能性GnRHペプチド神経系の生物機能に関する統合的研究

研究課題名（英文）Multidisciplinary studies on the biological functions of GnRH peptidergic neurons

## 研究代表者

岡 良隆 (Oka, Yoshitaka)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70143360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 37,100,000円、（間接経費） 11,130,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、脳内のGnRH1、GnRH2、GnRH3ニューロンのそれぞれが特異的にGFPを発現する遺伝子組換メダカを作り、それらを生きたまま可視化した。神経回路を保ったままの丸ごとの脳をin vitroに保ち、顕微鏡下で単一のGFP標識GnRHニューロンからの自発的な神経活動や神経修飾・伝達物質に対する神経応答を記録することにより、それらの機能を生理学的に解析した。また、脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモン放出をモニターできるような遺伝子改変動物を作成してホルモン放出の調節機構を解析した。これにより、進化の過程で多様な機能をもつに至った、GnRHペプチド神経系の機能に関する理解が飛躍的に深まった。

研究成果の概要（英文）：We generated GnRH1, GnRH2, and GnRH3 GFP-transgenic medaka to visualize each neuron in a whole brain in vitro preparation. We recorded spontaneous electrical activities and responses to various neurotransmitter/neuromodulator substances and analyzed their physiological functions. We also generated a transgenic medaka for monitoring the release activity of pituitary gonadotropin hormones and analyzed the central mechanisms of hormone release. Our research achievements enabled us to understand the multiple biological functions of GnRH peptidergic neurons that are based on their evolutionary history.

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 動物生理・行動

キーワード：ペプチド 生殖 性行動 神経生理学 トランスジェニック メダカ

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、申請者らが従来魚類脳の特徴を活かして世界をリードしてきた多機能性ペプチド GnRH を産生する 3 種の異なる GnRH ニューロン系の機能に関する研究を、トランシジェニックメダカを対象とした高度な電気生理記録技術や最新のニューロン特異的光学的破壊・イメージング、行動中の動物におけるテレメトリーや遠隔電気刺激、等の最先端の技術を導入して研究することにより飛躍的に発展させようとするものである。

## 2. 研究の目的

メダカの利点を活かし、神経内分泌性 GnRH ニューロンの電気生理学的性質、単一細胞でのチャネルや受容体の遺伝子発現、および分泌の調節機構に関して、脊椎動物一般に通用する機構を解明する。

## 3. 研究の方法

我々は、脳内の GnRH1、GnRH2、GnRH3 ニューロンのそれぞれが特異的に GFP を発現する遺伝子組換メダカを作り、それらを生きたまま可視化した。神経回路を保ったままの丸ごとの脳を *in vitro* に保ち、顕微鏡下で单一の GFP 標識 GnRH ニューロンからの自発的な神経活動や神経修飾・伝達物質に対する神経応答を記録することにより、それらの機能を生理学的に解析した。また、脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモン放出をモニターできるような遺伝子改変動物を作成してホルモン放出の調節機構を解析した。

## 4. 研究成果

進化の過程で多様な機能をもつに至った、GnRH ペプチド神経系の機能に関する理解が飛躍的に深まり、以下のような多数の研究成果の発表に至った。

## 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 39 件)

- 1 Karigo, T., and Oka, Y. (2013) Neurobiological study of fish brains gives insights into the nature of gonadotropin-releasing hormone 1-3 neurons. *Frontiers in Endocrinology (Experimental Endocrinology)*. "Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons", 4: 177. (Article 177, 1-10) doi: 10.3389/fendo.2013.00177. 査読有
- 2 Zempo, B., Kanda, S., Okubo, K., Akazome, Y., and Oka, Y. (2013) Anatomical distribution of sex steroid hormone receptors in the brain of female medaka. *Journal of Comparative Neurology* 521: 1760-1780. doi: 10.1002/cne.23255. 査読有
- 3 Umatani, C., Abe, H., and Oka, Y. (2013) Neuropeptide RFRP inhibits the pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons. *Journal of Neurophysiology* 109: 2354-2363. doi:10.1152/jn.00145.2012. 査読有
- 4 Kanda, S., Akazome, Y., Mitani, Y., Okubo, K., and Oka, Y. (2013) Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons. *PLoSOne* 8: e62776. doi:10.1371/journal.pone.0062776. 査読有
- 5 Hodne, K., Weltzien, F.-A., Oka, Y., and Okubo, K. (2013) Expression and putative function of kisspeptins and their receptors during early development in medaka. *Endocrinology* 154: 3437-3446. doi:10.1210/en.2013-1065. 査読有
- 6 Kawai, T., Abe, H., and Oka, Y. (2013). Burst generation mediated by cholinergic input in terminal nerve-gonadotrophin releasing hormone neurones of the goldfish. *Journal of Physiology-London* 591: 5509-5523. doi:10.1113/jphysiol.2013.258343. 査読有
- 7 Kanda, S., and Oka, Y. (2012) Evolutionary insights into the steroid sensitive kiss1 and kiss2 neurons in the vertebrate brain. *Frontiers in Genomic Endocrinology* "Estrogenic control of hypothalamic GnRH neurons" 3:28. (Article 28, 1-10) doi: 10.3389/fendo.2012.00028. 査読有
- 8 Kawai, T., Abe, H., and Oka, Y. (2012) Dopaminergic neuromodulation of synaptic transmission between the mitral and granule cells in the

- teleost olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* 107: 1313-1324. doi: 10.1152/jn.00536.2011.査読有
- 9 Kanda, S., Karigo, T., and Oka, Y. (2012) Steroid sensitive kiss2 neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 24: 897-906. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02296.x. 査読有
- 10 Karigo, T., Kanda, S., Abe, H., Okubo, K., and 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. doi: 10.1210/en.2011-2022.査読有
- 11 Hiraki, T., Takeuchi, A., Tsumaki, T., Zempo, B., Kanda, S., Oka, Y., Nagahama, Y., and Okubo, K. (2012) Female-specific target sites for both estrogen and androgen in the teleost brain. *Proceedings of the Royal Society. B, Biological sciences* 279: 5014-5023. doi: 10.1098/rspb.2012.2011.査読有
- 12 Abe, H., and Oka, Y. (2011) Mechanisms of neuromodulation by a non-hypophysiotropic GnRH system controlling motivation for reproductive behavior in the teleost brain. *Journal of Reproduction and Development*. 57: 665-674. 査読有
- 13 Okubo, K., Takeuchi, A., Chaube, R., Paul-Prasanth, B., Kanda, S., Oka, Y., and Nagahama, Y. (2011) Sex differences in aromatase gene expression in the medaka brain. *Journal of Neuroendocrinology* 23: 412-423. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02120.x. 査読有
- 14 Akazome, Y., Kanda, S., and Oka, Y. (2011) Expression of vesicular glutamate transporter-2.1 in medaka terminal nerve gonadotrophin-releasing hormone neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 23: 570-576. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02142.x. 査読有
- 15 Kanda, S., Okubo, K., and Oka, Y. (2011) Differential regulation of luteinizing hormone genes in teleosts and tetrapods due to their distinct genomic environments-insights into gonadotropin beta subunit evolution. *General and Comparative Endocrinology* 173: 253-258. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.05.015.査読有
- 16 Amiya, N., Amano, M., Tabuchi, A., and Oka, Y. (2011) Anatomical relations between neuropeptide Y, galanin, and gonadotropin-releasing hormone in the brain of chondrostean, the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Neuroscience Letters* 503: 87-92. doi: 10.1016/j.neulet.2011.08.008.査読有
- 17 Shimizu, Y., Tomikawa, J., Hirano, K., Nanikawa, Y., Akazome, Y., Kanda, S., Kazeto, Y., Okuzawa, K., Uenoyama, Y., Ohkura, S., Tsukamura, H., Maeda, K.-I., Gen, K., Oka, Y., and Yamamoto, N. (2011) Central distribution of kiss2 neurons and peri-pubertal changes in their expression in the brain of the male and female red seabream *Pagrus major*. *General and Comparative Endocrinology* 175: 432-442. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.11.038.査読有
- 18 Akazome, Y., Kanda, S., Okubo, K., and Oka, Y. (2010) Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain. *Special Issue of the Journal of Fish Biology; Reproductive Physiology STATE-OF-THE-SCIENCE, Journal of Fish Biology* 76: 161-182. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02496.x. 査読有
- 19 Oka, Y. (2010) Electrophysiological characteristics of gonadotrophin-releasing hormone 1-3 neurones: insights from a study of fish brains. *Journal of Neuroendocrinology* 22: 659-663. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02035.x. 査読有
- 20 Kanda, S., and Oka, Y. (2010) Transgenic medaka in neurobiological studies. *Laboratory Animal Technology and Science*. 22(5): 16-22. (In Japanese) 査読有
- 21 Maeda, K.-I., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., Oka, Y., Tsukamura, H., and Okamura, H. (2010) Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Research* 1364 (Review, Special Issue: New Insights into the Neurobiology of Reproduction and Puberty): 103-115. doi: 10.1016/j.brainres.2010.10.026. 査読有
- 22 Kanda, S.\* , Nishikawa, K.\* , Karigo, T., Okubo, K., Isomae, S., Abe, H., Kobayashi, D., and Oka, Y. (2010)

- Regular pacemaker activity characterizes gonadotropin-releasing hormone 2 neurons recorded from green fluorescent protein-transgenic medaka. (\*: equal contribution) *Endocrinology* 151: 695-701. doi: 10.1210/en.2009-0842. 査読有
- 23 Mitani, Y.\*, Kanda, S.\*, Akazome, Y., Zempo, B., and Oka, Y. (2010) Hypothalamic kiss1 but not kiss2 neurons are involved in estrogen feedback in medaka (*Oryzias latipes*). (\*: equal contribution) *Endocrinology* 151: 1751-1759. doi: 10.1210/en.2009-1174. 査読有
- 24 Nakane, R., and Oka, Y. (2010) Excitatory action of GABA in the terminal nerve gonadotropin-releasing hormone neurons. *Journal of Neurophysiology* 103: 1375-1384. doi: 10.1152/jn.00910.2009. 査読有
- 25 Amano, M., Moriyama, S., Okubo, K., Nagai, Y., Amiya, N., Takahashi, A., and Oka, Y. (2010) Biochemical and immunohistochemical analyses of a GnRH-like peptide in the neural ganglia of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* (Gastropoda). *Zoological Science* 27: 656-661. doi: 10.2108/zsj.27.656. 査読有
- 26 Amano, M., Yokoyama, T., Amiya, N., Hotta, M., Takakusaki, Y., Kado, R., and Oka, Y. (2010) Biochemical and immunohistochemical analyses of GnRH-like peptides in the nerve ganglion of the chiton, *Acanthopleura japonica*. *Zoological Science* 27: 924-930. doi: 10.2108/zsj.27.924. 査読有
- 27 Saito, T.\*, Nakane, R.\*, Akazome, Y., Abe, H., and Oka, Y. (2010) Electrophysiological analysis of the inhibitory effects of FMRFamide-like peptides on the pacemaker activity of gonadotropin-releasing hormone neurons. (\*: equal contribution) *Journal of Neurophysiology* 104: 3518-3529. doi: 10.1152/jn.01027.2009. 査読有
- 28 Kawai, T., Abe, H., Akazome, Y., and Oka, Y. (2010) Neuromodulatory effect of GnRH on the synaptic transmission of the olfactory bulbar neural circuit in goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Neurophysiology* 104: 3540-3550. doi: 10.1152/jn.00639.2010. 査読有
- 29 Oka, Y. (2009) Three types of gonadotrophin-releasing hormone neurones and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurones in teleosts. *Journal of Neuroendocrinology* 21: 334-338. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01850.x. 査読有
- 30 Kawai, T., Oka, Y., and Eisthen, H. (2009) The role of the terminal nerve and GnRH in olfactory system neuromodulation. *Zoological Science* 26: 669-680. doi: 10.2108/zsj.26.669. 査読有
- 31 Abe, H., and Oka, Y. (2009) Primary culture of the isolated terminal nerve-gonadotrophin releasing hormone (GnRH) neurones derived from adult teleost (dwarf gourami, *Colisa lalia*) brain for the study of peptide release mechanisms. *Journal of Neuroendocrinology* 21: 489-505. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01866.x. 査読有
- 32 Takase, K., Uenoyama, Y., Inoue, N., Matsui, H., Yamada, S., Shimizu, M., Homma, T., Tomikawa, J., Kanda, S., Matsumoto, H., Oka, Y., Tsukamura, H., and Maeda, K.-I. (2009) Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/Kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *Journal of Neuroendocrinology* 21: 527-537. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01868.x. 査読有
- 33 Amano, M., Amiya, N., Hiramatsu, M., Tomioka, T., and Oka, Y. (2009) Interaction between neuropeptide Y immunoreactive neurons and galanin immunoreactive neurons in the brain of the masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Neuroscience Letters* 462: 33-38. doi: 10.1016/j.neulet.2009.06.067. 査読有
- 34 Kawai, T., Abe, H., Wakabayashi, K., and Oka, Y. (2009) Calcium oscillations in the olfactory nonsensory cells of the goldfish, *Carassius auratus*. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1790: 1681-1688. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.09.009. 査読有
- 35 Amano, M., Okumura, T., Okubo, K., Amiya, N., Takahashi, A., and Oka, Y. (2009) Biochemical analysis and immunohistochemical examination of a GnRH-like immunoreactive peptide in the central nervous system of a decapod crustacean the kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Zoological Science* 26: 840-845. *Zoological Science Award*, 2010. doi: 10.2108/zsj.26.840. 査読有
- 36 Kanda, S., Akazome, Y., Matsunaga, T.,

- Yamamoto, N., Yamada, S., Tsukamura, H., Maeda, K., and Oka, Y. (2008) Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually-dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149: 2467-2476. doi: 10.1210/en.2007-1503.査読有
- 37 Haneda, K., and Oka, Y. (2008) Coordinated synchronization in the electrically coupled network of terminal nerve gonadotropin-releasing hormone neurons as demonstrated by double patch-clamp study. *Endocrinology* 149: 3540-3548. doi: 10.1210/en.2008-0299.査読有
- 38 Amano, M., Oka, Y., Nagai, Y., Amiya, N., and Yamamori, K. (2008) Immunohistochemical localization of a GnRH-like peptide in the brain of the cephalopod spear-squid, *Loligo bleekeri*. *General and Comparative Endocrinol.* 156: 277-284. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.01.008.査読有
- 39 Kato, K., Oka, Y., and Park, M.K. (2008) Identification and expression analysis of peroxisome proliferator-activated receptors cDNA in a reptile, the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Zoological Science* 25: 492-502. doi: 10.2108/zsj.25.492.査読有
- 〔学会発表〕(計 107 件)
- 1 Takahashi, A., Islam, S., Akazome, Y., Abe, H., Okubo, K., Oka, Y.. "Morphological analysis of the early development of GnRH neuron systems in the EGFP-expressing transgenic medaka lines" The 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2013, San Diego (9-13, November 2013)
- 2 Karigo, T., Oka, Y. "Neurobiological analysis of dopaminergic inhibition in the HPG axis regulation." The 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2013, San Diego (9-13, November 2013)
- 3 岡良隆 "生殖の中枢制御に関わるペプチドニューロン系の研究" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日) 平成 25 年度日本動物学会賞受賞者講演
- 4 岡良隆 "生殖・性行動調節にかかわる脳部位における性差" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 5 馬谷千恵、阿部秀樹、岡良隆 終神経 GnRH ニューロンが視覚神経回路に及ぼす作用の解析" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 6 奥山輝大、横井佐織、阿部秀樹、磯江泰子、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、亀井博、田中実、成瀬清、武田洋幸、岡良隆、久保健雄、竹内秀明 "メダカの配偶者選択の分子神経基盤" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 7 貝瀬峻、神田真司、岡良隆 "RFRP ニューロンの自発活動と GnRH1 ニューロン発火抑制に関する電気生理学的解析" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 8 長谷部政治、神田真司、島田洋之、岡良隆 "性ステロイド感受性を示す Kiss1 ニューロンの電気生理学的解析" 日本動物学会第 84 回大会、岡山 (2013 年 9 月 26 日 ~ 28 日)
- 9 Oka, Y. "GnRH neurons involved in central regulation of reproduction and reproductive behavior" 2013 Gordon Research Conference, Neuroethology: Behavior, Evolution & Neurobiology; Networks, Circuits, and Modules, Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA (17-25, August 2013) 招待講演
- 10 神田真司、岡良隆 "脊椎動物キスペプチド神経系の進化と未知の機能" : 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会、柏 (2013 年 6 月 22 日) 招待講演
- 11 岡良隆 "生殖の中枢制御の鍵を握るキスペプチドとその受容体 GPR54 を発現するニューロンへの新たな生理学的アプローチ" 第 10 回 GPCR 研究会、東京 (2013 年 5 月 10 日 ~ 11 日) 招待講演
- 12 Kanda, S. and Oka, Y. "Functional and evolutionary diversity of vertebrate kisspeptin neuron systems 脊椎動物キスペプチド神経系の進化と多様な機能" Hiroshi and Aya Irisawa Memorial Award Symposium, The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo (27-29, March 2013) 招待講演
- 13 Kanda, S., Nakajo, M., Lee, J., Oka, Y. "gpr54-1-EGFP Transgenic Medaka - a New Approach towards the Understanding of Novel Functions of Kisspeptin Neurons" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012) 招待講演
- 14 Okubo, K., Hodne, K., Kanda, S., Shimada, H., Oka, Y., Weltzien, F.A. "Embryonic Expression and Function of Kisspeptins and their Receptors in a Teleost Fish, medaka" The 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Tokyo (6-9, November 2012)
- 15 Shimada, H., Kanda, S., Akazome, Y., Abe, H., Okubo, K., Oka, Y.

- 月 18 日～21 日)
- 25 阿部秀樹、西川穂高、末次翔太、岡良隆  
“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 18 日～21 日)
- 26 莊郷友美、岡良隆 “生殖中枢制御に対するドーパミンを介した抑制作用に関する神経生物学的解析”日本動物学会第 83 回大会、大阪(2012 年 9 月 13 日～15 日)
- 27 北原翔一、神田真司、岡良隆 “絶食によるメダカ視床下部 NPY ニューロンの NPY mRNA 発現変動”日本動物学会第 83 回大会、大阪(2012 年 9 月 13 日～15 日)
- 28 神田真司、李淳馥、岡良隆 “キスペプチド受容体発現ニューロンの GFP 標識による未知のキスペプチド機能の探索”日本動物学会第 83 回大会、大阪(2012 年 9 月 13 日～15 日)
- スペースの都合により、以下割愛
- [図書](計 1 件)
- 1 Kanda, S., and Oka, Y. (2013) Structure, synthesis, and phylogeny of kisspeptin and its receptor. In: “Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology” (ed. by A. Kauffman and J. Smith), Chapter 2, Springer Verlag, New York, pp. 9-26. Adv Exp Med Biol. 2013;784:9-26. doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9\_2 査読有
- [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.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/nainbunpi/lab.html>
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
岡 良隆 (Oka, Yoshitaka)  
東京大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号 : 70143360
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
赤染 康久 (Akazome, Yasuhisa)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号 : 50302807
- 神田 真司 (Kanda, Shinji)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号 : 50634284