

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790234

研究課題名（和文）性周期形成のメカニズムにおける GABA 興奮性作用の役割

研究課題名（英文）The role of the excitatory action of GABA in the mouse estrous cycle.

研究代表者

渡部 美穂 (WATANABE MIHO)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教

研究者番号：10399321

研究成果の概要（和文）：

性周期を制御している生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンの制御機構における GABA 興奮性入力的作用を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、GnRH ニューロンで時期特異的に KCC2 を可逆的に発現誘導できるマウスの作出を行った。このマウスでは妊娠がみられなかったことから、生殖機能には GABA 興奮性入力が必要な役割を持つことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

I investigated the functional consequences of excitatory action of GABA responses on GnRH neuron physiology. A transgenic mouse was generated using tetracycline controlled gene expression system. In this mouse, KCC2 was overexpressed restricted in GnRH neurons reversibly in specific time point. This transgenic mouse could not show the pregnancy. These results suggested that the excitatory action of GABA in GnRH neurons has the important role in the regulation of the estrous cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経内分泌学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：GnRH、GABA、KCC2、性周期

## 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生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンである。成熟雌マウスでは、4日に一度、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、下垂体より黄体形成ホルモン (LH) の大量分泌が起こり、排卵が引き起こされる (図1、2参照)。通常の GnRH はパルス状に分泌されており、卵胞成熟に関与していると考えられている。GnRH ニューロンは視床下部

ニューロンから GnRH が大量分泌され、その結果、下垂体より黄体形成ホルモン (LH) の大量分泌が起こり、排卵が引き起こされる (図1、2参照)。通常の GnRH はパルス状に分泌されており、卵胞成熟に関与していると考えられている。GnRH ニューロンは視床下部

に散在しているにもかかわらず、パルス状分泌や周期的な大量分泌を引き起こすメカニズムは明らかにされていないが、多数のGnRHニューロンの活動性の同期が関与していると考えられる。

GnRHニューロンは、エストロゲン受容体を発現しているGABAニューロンからの投射を受けることやGABA<sub>A</sub>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、多くの研究がなされてきた。GABAやGABA<sub>A</sub>受容体作動薬/阻害剤の脳内投与など主に内分泌学的手法による研究から、GABAはGnRH/LH分泌に対して抑制的に作用していると考えられてきた。しかし、この方法ではGABAの作用部位がわからず、GnRHニューロンへの直接の作用をみているか不明であった。そこで、GnRHニューロンにEGFP蛋白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することにより、GnRHニューロンの可視化に成功し(研究代表者ら、Endocrinology, 2003)、生きた状態でのGnRHニューロンについて細胞生理学的研究を行うことが可能になった。研究代表者はEGFP蛍光を指標に同定したGnRHニューロンへのGABA作用をCa<sup>2+</sup>イメージング法により検討し、GABAがGnRHニューロンでは興奮性に作用していることを明らかにした。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な性質であり、GABAの興奮性作用のGnRHニューロンの活動性制御への関与が強く示唆される。

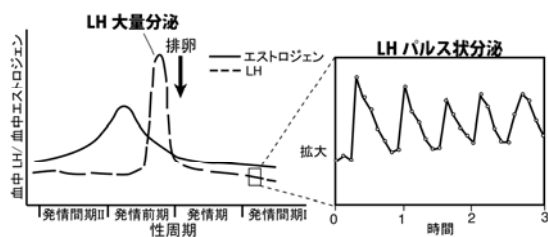


図 1. 性周期に伴うホルモンの変化

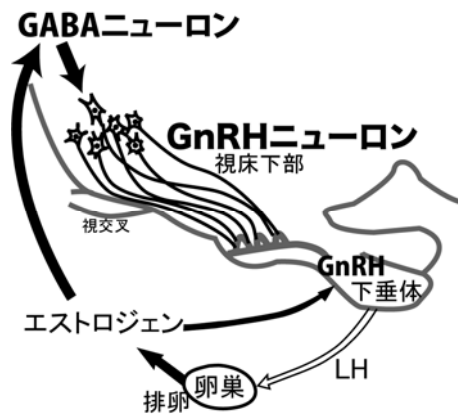


図 2. GnRH ニューロン制御機構の模式図 (視床下部矢状断)

## 2. 研究の目的

GABAに対する反応が興奮性か抑制性であるかは、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度により決定され、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度が低いと抑制的に作用し、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度が高いと興奮性に働く。発達に伴い、Cl<sup>-</sup>を細胞外にくみ出すK<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter (KCC2)の発現が増加することにより、GABA応答は興奮性から抑制性に変化する(図3参照)。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。未熟な神経細胞や障害された神経細胞ではGABAは興奮性に作用するが(研究代表者ら、J. Neurosci., 2007)、GABAに興奮性を示す細胞の特徴として、自発発火やCa<sup>2+</sup>オシレーションを示し、多数のニューロンが同調して活動することが知られている。GnRHニューロンでも自発発火やCa<sup>2+</sup>オシレーションがみられることから、GABAの興奮性作用により多数のGnRHニューロンが同期することが、GnRHのパルス状分泌や周期的な大量分泌のメカニズムに関与している可能性が考えられる。これまでに、興奮性GABA入力によるCa<sup>2+</sup>オシレーションにおける役割を検討し、Ca<sup>2+</sup>オシレーションを示すGnRHニューロンの株細胞にKCC2を強制発現させるとCa<sup>2+</sup>オシレーションが阻害されることを明らかにした。この結果から、GnRHニューロンの活動性の同期には興奮性GABA入力に関与している可能性が考えられる。

そこで、本研究ではテトラサイクリン遺伝子発現誘導系を用いて、GnRHニューロンで時期特異的にKCC2遺伝子を誘導できるマウスを作成し、さまざまな時期にGnRHニューロンでGABAの作用を興奮性から抑制性に変化させることにより、性周期形成のメカニズムにおけるGABAの興奮性作用の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

テトラサイクリン遺伝子発現誘導系をマウ

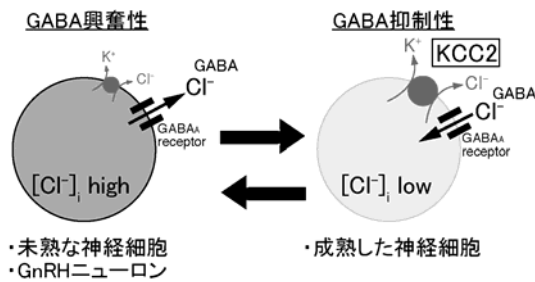


図 3. GABA 応答の興奮性/抑制性変化 (KCC2 発現変化)

ス個体に応用し、GnRH ニューロンで、KCC2 遺伝子発現誘導を時期特異的に行うことの出来る遺伝子改変マウスの作出を行った。GnRH ニューロン特異的に tTA 蛋白質 (テトラサイクリン制御性トランス活性化因子) を発現する遺伝子改変マウス (GnRH-tTA) と tetO 配列を発現させた遺伝子改変マウス (KCC2-tetO マウス) を作出し、交配を行い、GnRH-tTA/KCC2-tetO マウスを得た (図 4 参照)。GnRH-tTA/KCC2-tetO マウスの表現型の解析を行った。

### 4. 研究成果

作成した KCC2-tetO マウスでドキシサイクリン依存性に KCC2 を発現誘導できることを確認するために、すでに tTA が機能することが証明されている CamKII 発現ニューロンで tTA を発現しているマウス (CamKII-tTA マウス) と KCC2-tetO マウスを交配させ、得られたバイジェニックマウス

(CamKII-tTA/KCC2-tetO マウス) では、ドキシサイクリン非存在下で海馬、大脳皮質、線条体などで KCC2 mRNA の発現が誘導され (図 5 参照)、ドキシサイクリンの再投与により KCC2 の発現量が野生型マウスと同レベルまでもどり、ドキシサイクリン依存的に KCC2 の発現が制御できることが確認できた。

GnRH-tTA/KCC2-tetO マウスでは GnRH ニューロンでドキシサイクリン依存性に、GABA 入力を抑制性にする分子である KCC2 を発現誘導することができた。KCC2 を発現誘導させると GABA の平衡電位の過分極側へのシフトがみられたことから、発現誘導された KCC2 は機能していることが確認できた。このマウスを用いて生殖機能における GABA 興奮性入力の役割を調べるために、交配テストを行った。GnRH-tTA/KCC2-tetO 雌マウスをドキシサイクリン投与下で、GnRH ニューロンで GABA 入力が興奮性のまま育て、2~3 ヶ月齢になった時にドキシサイクリンの投与を中止し、

GnRH ニューロンへの GABA 入力を抑制性に変化させた。このマウスと wild 雄マウスを同じケージにいれ、4 ヶ月間観察を行った。その結果、GnRH ニューロンで KCC2 を過剰発現させることにより GABA 入力を抑制性にした GnRH-tTA/KCC2-tetO 雌マウスでは、妊娠がみられないことがわかった。よって、生殖機能には GABA の興奮性入力が重要な役割を持つことが明らかになった。

<GnRH ニューロンで tTA 発現> <tTA : Dox 非存在下で tetO に結合し KCC2 転写を開始>

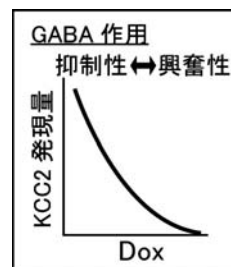
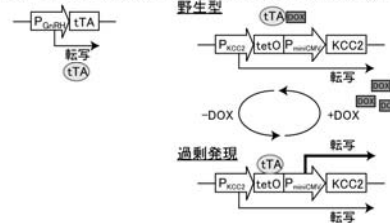


図 4. 作成した遺伝子改変マウス

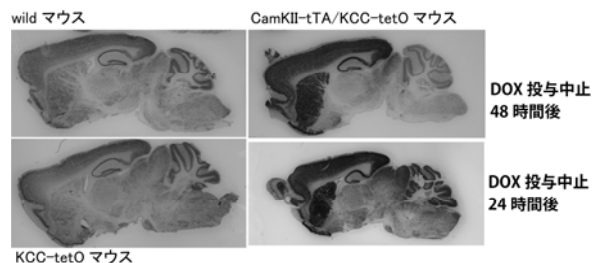


図 5. ドキシサイクリンによる KCC2 発現制御 : CamKII-tTA/KCC2-tetO マウス

### 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 3 件)

① Nakahata Y, Miyamoto A, Watanabe M, Moorhouse A J, Nabekura J: Depolarizing shift in the GABA-induced current reversal potential by lidocaine hydrochloride. *Brain Research*, 査読有, 1345, 2010, pp19-27

② Watanabe M, Wake H, Moorhouse A, Nabekura J: Clustering of neuronal K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 284, 2009, pp27980-27988

③ Watanabe M\*, Sakuma Y, Kato M: GABA<sub>A</sub> receptors mediate excitation in adult rat GnRH neurons. *Biology of Reproduction*, 査読有, 81, 2009, pp327-332 \*corresponding author

[学会発表] (計7件)

① 渡部美穂、鍋倉淳一  
発達/傷害によるカリウム-クロライド共役担体(KCC2)の機能制御、第1回放射線神経生物学研究集会、2011. 1. 29、群馬大学(群馬県)

② 稲田浩之、渡部美穂、内田琢、福田敦夫、柳川右千夫、鍋倉淳一  
生体脳において GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化は大脳皮質辺縁帯 GABA 作動性神経細胞の多方向性移動を促進する、第57回中部日本生理学会大会、2010. 10. 16、藤田保健衛生大学(愛知県)

③ 中畑義久、宮本愛喜子、渡部美穂、鍋倉淳一、石橋仁  
リドカインによるK<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体(KCC2)の機能抑制、第33回日本神経科学大会、2010. 9. 3、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

④ 鍋倉淳一、渡部美穂  
チロシンリン酸化による神経特異的カリウム-クロール共役担体の機能制御、第87回日本生理学会大会、2010. 5. 21、盛岡市民文化ホール(岩手県)

⑤ Moorhouse A, Watanabe M, Wake H, Nabekura J  
Modulation of KCC2 function by tyrosine phosphorylation. The 30th Annual Meeting of the Australian Neuroscience Society/ the 50th Anniversary Meeting of the Australian Physiological Society, 2010. 2. 1, Sydney convention & Exhibition Centre (Australia)

⑥ Watanabe M, Wake H, Nabekura J  
Clustering of neuronal K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter in the lipid rafts by tyrosine phosphorylation. 40th NIPS International Symposium-International Joint Symposium :

PAT-CVR, 2009. 8. 5, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

⑦ Nabekura J and Watanabe M  
Functional regulation of neuronal K-Cl transporter by tyrosine phosphorylation. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009. 8. 1, 国立京都国際会館(京都府)

[その他]

ホームページ等

[http://asrldu.dept.med.gunma-u.ac.jp/mwatanabe/miho\\_watanabe.html](http://asrldu.dept.med.gunma-u.ac.jp/mwatanabe/miho_watanabe.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 美穂 (WATANABE MIHO)  
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・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：