

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790283

研究課題名(和文) GABA興奮性作用による性周期の制御機構

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

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) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：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興奮性入力の影響を明らかにするために、独自に作成したGnRHニューロンへのGABA作用を興奮性から抑制性に操作できる遺伝子改変マウスを用いて調べた。このマウスでは性周期が乱れ発情期が続き、妊娠が認められず、卵巣には多数の小さな卵胞がみられたことから、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)：Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons form the final common pathway for the central regulation of reproduction. Previously, we reported that GABA, the main inhibitory neurotransmitter in the adult brain, exerts an excitatory action in adult GnRH neurons. To examine the functional role of the excitatory action of GABA in GnRH neurons in vivo, we generated transgenic mice with conditional overexpression of KCC2 or knockout of NKCC1 restricted in GnRH neurons in a reversible fashion using tetracycline controlled gene expression system. Female mice, which expressed KCC2 in GnRH neurons, showed no pregnancy and abnormal estrous cyclicity and abnormal ovary containing many small follicles. These results suggest that the excitatory action of GABA on GnRH neurons has an important role in the female reproduction.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：GnRHニューロン GABA KCC2 視床下部 神経内分泌学

1. 研究開始当初の背景

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)ニューロンは下垂体からの黄体形成ホルモン(LH)分泌を引き起こし、排卵を制御している。成熟雌マウスでは4日に一度排卵が起こるが、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LHが大量分泌されるためである(図1)。通常のLHはパルス状に分泌されており、卵胞成熟に関与している。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。そのメカニズムとして、多数のGnRHニューロンが同期活動している可能性が考えられる。

これまでに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ではGABAにより細胞内 Ca^{2+} 上昇がみられ、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報告している。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。

未熟な神経細胞では Cl^- を細胞内にくみ入れる $Na^+-K^+-2Cl^-$ 共役担体(NKCC1)の発現が高く、 Cl^- を細胞外にくみ出す K^+-Cl^- 共役担体(KCC2)の発現が低いため、細胞内 Cl^- 濃度が高く、GABAは興奮性に作用する。発達に伴い、NKCC1の発現が減少し、KCC2の発現が増加するため、細胞内 Cl^- 濃度が低くなり、GABAの作用は興奮性から抑制性に変化する(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、成熟動物においてもNKCC1の発現が高く、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、GABAに興奮性を示す細胞の特徴として、自発発火や Ca^{2+} オシレーションを示し、GABAに興奮性を示す細胞間で活動の同期がみられることが知られている。よって、成熟期においてもGABAに興奮性を示すという特徴をもつGnRHニューロンでも、GABAの興奮性作用により多数のGnRHニューロン間で同期活動を行うことにより、GnRHのパルス状分泌や周期的な大量分泌をおこし、排卵を引き起こしている可能性が考えられる。

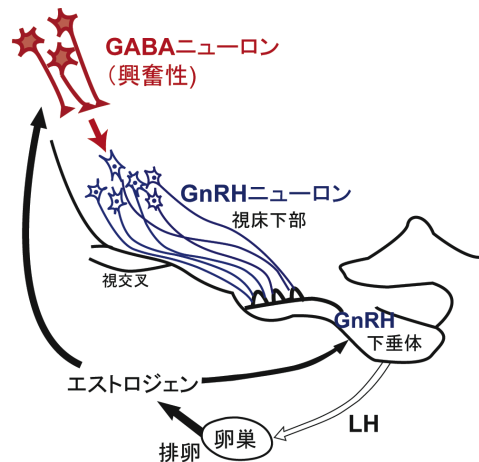


図1. 性周期は視床下部-下垂体-生殖腺軸で制御される。GABAニューロンはGnRHニューロンに興奮性に作用する。

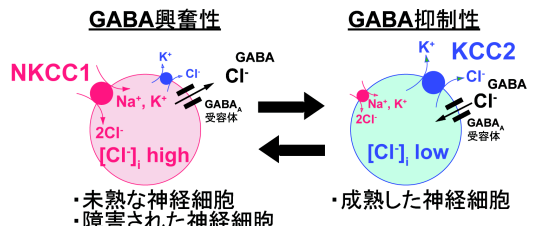


図2. $Na^+-K^+-2Cl^-$ 共役担体(NKCC1)の発現が高く、 K^+-Cl^- 共役担体(KCC2)の発現が低いと細胞内 Cl^- 濃度が高く、GABAは興奮性に作用する。NKCC1の発現が低く、KCC2の発現が高いと細胞内 Cl^- 濃度が低くなり、GABAは抑制性に作用する。

2. 研究の目的

本研究では、成熟動物においてもGABAが興奮性に作用するというGnRHニューロンに特異な性質に注目し、GnRHニューロンで特定の時期にGABA作用を興奮性から抑制性に操作することができる遺伝子改変マウスを用いて、性周期および卵成熟におけるGABA興奮性作用の役割を明らかにすることを目的とする。

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ス個体に応用し、GnRHニューロンでKCC2遺伝子発現誘導およびNKCC1発現抑制を特定の時期に行うことができる遺伝子改変マウスを使用した(図3)。独自に作成したGnRH遺伝子プロモーターの下流にtTA(テトラサイクリン制御性トランス活性化因子)およびtTS(テトラサイクリン制御性トランスサイレンサー)を挿入したBACトランスジェニックマウスを使用した(GnRH-tTAマウス、GnRH-tTSマウス)。GnRH-tTAマウスとKCC2の翻訳開始部位直前にtetO配列をノックインしたマウス(KCC2-tetOマウス)を交配させられるバイジェニックマウス(GnRH-tTA: $KCC2$ -tetO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)依存性に、GnRHニューロンでKCC2を発現誘導させることができる。すなわち、DOX投与中止でtTAはtetO配列に結合し下流の

KCC2遺伝子発現を誘導し、DOX投与によりtTAはtetO配列に結合できずKCC2発現を誘導しない(Tet-offシステム)。GnRH-tTSマウスとNKCC1の翻訳開始部位直前にtetO配列をノックインしたマウス(NKCC1-tetOマウス)を交配させ得られるバイジェニックマウス(GnRH-tTS::NKCC1-tetOマウス)の作成を行った。このマウスではDOX投与中止でtTSはtetO配列に結合し、下流のNKCC1遺伝子発現を抑制することができる。

GnRH-tTA::KCC2-tetOマウスでDOX投与中止により、KCC2 mRNA および KCC2 蛋白を発現誘導することが出来るか *in situ* hybridization、免疫染色法により確認した。GnRH-tTA::KCC2-tetO 雌マウスを用いて、排卵周期における GABA の興奮性作用の役割を明らかにするために、性成熟後 DOX 投与を中止し、KCC2 を発現誘導することにより GABA 作用を抑制性にし、性周期への影響について膣スミアを採取し調べた。Wild雄マウス1匹とGnRH-tTA::KCC2-tetO雌マウス1匹を同じケージに入れることにより交配テストを行い、妊娠可能かどうか検討した。また、GABA 入力を抑制性に变化させた際の卵巣の変化を形態学的に解析した。

さらに、GABA の作用を抑制性に变化させた時の GnRH ニューロンの細胞生理学的性質に变化がみられるか検討を行った。GnRH ニューロンが示す同期活動に变化について、GnRH ニューロンの活動性の指標として Ca²⁺オシレーションを記録し調べた。GnRH ニューロンを同定するために、GnRH-tTA::KCC2-tetO マウスと tetO-ChR2(C128S)-EYFP ノックインマウスまたは tetO-ChR2(C128S)-EYFP BAC トランスジェニックマウスをかけあわせ、GnRH ニューロンの可視化を行った。このマウスの視床下部スライス標本を用いて、YFP 蛍光を指標に GnRH ニューロンを同定し、Ca²⁺イメージング法により Ca²⁺オシレーションを記録し、その同期性に变化がみられるか調べた。

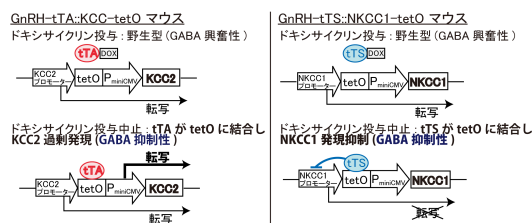


Fig.3 遺伝子改変マウス ドキシサイクリン (DOX) 投与中止により、GnRH ニューロンで KCC2 過剰発現および NKCC1 の発現抑制により、GnRH ニューロンへの GABA 作用が興奮性から抑制性に变化する。

4. 研究成果

GnRH-tTA::KCC2-tetOマウスではDOX投与中止により、KCC2mRNAおよびKCC2タンパクが発現誘導されることを確認した(図4)。性成熟後にDOX投与を中止し、GnRHニューロンへのGABA入力を興奮性から抑制性に变化させ、膣スミ

アを採取し、性周期への影響を調べたところ、発情期が長く続き、性周期が乱れることがわかった(図5)。DOXの再投与により、正常な性周期が回復した。性周期が乱れている時の卵巣を組織学的に観察したところ、卵巣にはたくさんの小さな卵胞がみられた(図6)。野生型の雄マウスと同居させ交配テストを行った結果、妊娠率の低下がみられ、DOXの再投与により、妊娠が認められた。GnRHニューロンへのGABA入力を抑制性に变化させた際にみられる変化の要因を明らかにするために、KCC2の過剰発現により、GnRHニューロンが示すCa²⁺オシレーションやその同期など細胞生理学的性質に变化がみられるか調べるために、GnRH-tTA::KCC2-tetOマウスとtetO-ChR2(C128S)-EYFPノックインマウスまたはtetO-ChR2(C128S)-EYFP BACトランスジェニックマウスをかけあわせ、GnRH-tTA::KCC2-tetO::tetO-ChR2(C128S)-EYFPノックインマウスおよびGnRH-tTA::KCC2-tetO::tetO-ChR2(C128S)-EYFP BACトランスジェニックマウスを作成し、GnRHニューロンの可視化を行った。ノックイン、BACトランスジェニックマウスともにDOX投与を中止しても、EYFP蛍光の発現がほとんどみられなかったが、交配中からDOX投与を中止することで、多くのGnRHニューロンでEYFP蛍光の発現が認められた(図7)。このマウスの視床下部スライス標本を用いてCa²⁺オシレーションを記録するために、Ca²⁺蛍光指示薬Rhod3のbath loadingまたはbolus loadingを行ったが、GnRHニューロンにloadすることができなかった。loadされた他の細胞からはCa²⁺オシレーションを記録できた。loading条件を検討したが改善されなかったため、今後はパッチクランプ法によりGnRHニューロンの細胞生理学的性質の変化を検討する。また、GnRH-tTA::KCC2-tetO::tetO-ChR2(C128S)-EYFPマウスを作成することが出来たので、このマウスを用いて光によりGnRHニューロンの活動を操作できるか検討を行う。

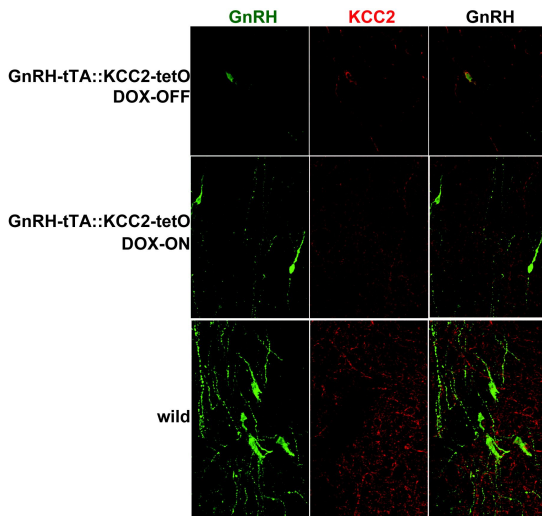


図 4. GnRH-tTA::KCC2-tetO マウスではドキシサイクリン (DOX) OFF により、GnRH ニューロンで KCC2 タンパクが発現誘導される。DOX ON マウス、wild マウスでは GnRH ニューロンで KCC2 の発現がみられない。

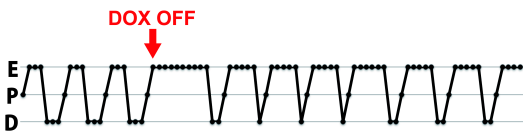


図 5. GnRH-tTA::KCC2-tetO マウスでは正常な性周期 (発情前期 (P)、発情期 (E)、発情間期 (D)) がみられるが、ドキシサイクリン (DOX) OFF により、性周期が乱れ、E の日が長く続いた。

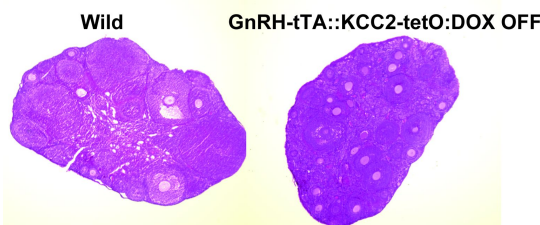


図 6. GnRH-tTA::KCC2-tetO マウスでは DOX OFF により、多数の小さな卵胞がみられる。

GnRH-tTA::KCC2-tetO::tetO-ChR2(C128S)-EYFP ノックインマウス

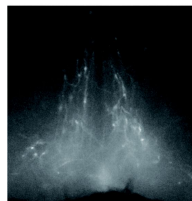


図 7. GnRH-tTA::KCC2-tetO::tetO-ChR2(C128S)-EYFP マウスでは DOX-OFF により、GnRH ニューロンで EYFP を発現し、GnRH ニューロンを可視化することができた。

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 3 件)

Eto K, Ishibashi H, Yoshimura T, Watanabe M, Miyamoto A, Ikenaka K, Moorhouse A, Nabekura J: Enhanced GABAergic activity in the mouse primary somatosensory cortex is insufficient to alleviate chronic pain behavior with reduced expression of neuronal

potassium-chloride cotransporter. *Journal of Neuroscience*, 査読有, 32, 16552-16559, 2012.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2104-12.2012.

Inada H, Watanabe M, Uchida T, Ishibashi H, Wake H, Nemoto T, Yanagawa Y, Fukuda A, Nabekura J: GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. *Plos One*, 査読有, 6: e27048, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027048

Eto K, Wake H, Watanabe M, Ishibashi H, Noda M, Yanagawa Y, Nabekura J: Inter-regional contribution of enhanced activity of the primary somatosensory cortex to the anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. *Journal of Neuroscience*, 査読有, 31: 7631-7636, 2011. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0946-11.2011

[学会発表](計 8 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、鍋倉淳一

GnRH ニューロンで KCC2 を過剰発現させたマウスでは雌の生殖機能に変化がみられる 第 90 回日本生理学会大会、2013.3.28、タワーホール船堀(東京)

稲田浩之、渡部美穂、内田琢、福田敦夫、柳川右千夫、鍋倉淳一

細胞外 GABA による大脳皮質 GABA 作動性神経細胞の多方向性移動の制御、第 90 回日本生理学会大会、2013.3.27、タワーホール船堀(東京)

Watanabe M, Fukuda A, Nabekura J Conditional Modulation of Excitation Action of GABA on GnRH Neurons *in Vivo* Causes Impairment of Migration, The 23rd CDB Meeting, Building multicellular systems from Cellular Cross-Talk, 2013.1.22, RIKEN CDB (Kobe)

渡部美穂

「GnRHニューロンの機能制御」 早稲田大学人間総合研究センター 第17回 「性と生殖」公開シンポジウム エストロゲンと本能行動、2011.12.4、早稲田大学(東京)

Watanabe M, Kato M Sakuma Y, Nabekura J
The role of excitatory action of GABA in
adult GnRH neurons. The second meeting of
International Society for Radiation
Neurobiology, 2011.12.3, Gunma
University(Gunma)

渡部美穂、加藤昌克、佐久間康夫、鍋倉淳
—
GnRHニューロンにおける興奮性GABA作用の役
割、第34回日本神経科学大会、2011.9.16、パ
シフィコ横浜(横浜)

江藤圭、和氣弘明、石橋仁、渡部美穂、鍋
倉淳—
一次体性感覚野と前帯状回の皮質間リモデリ
ングにより慢性疼痛行動が亢進する、第34回
日本神経科学大会、2011.9.16、パシフィコ横
浜(横浜)

〔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：