

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870007

研究課題名(和文)キスペプチン神経系による生殖と生殖行動の協調的制御機構の探索

研究課題名(英文) Investigation on coordinate regulation of reproduction and related behaviors by kisspeptin neuronal system

研究代表者

神田 真司 (Kanda, Shinji)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50634284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：生殖を制御するという報告があるキスペプチン神経系が持つその他の機能を包括的に理解するため、受容体を発現する細胞をGFPで可視化し、RNAseqによって同定するという新しいアプローチを用い、キスペプチンによって制御される神経系を同定した。また、この方法によって同定したニューロンに対して電気生理学的な手法によってキスペプチンの作用を解析した。キスペプチンによって、摂食や恒常性維持に関連するペプチド神経系、行動への関与が示唆されるペプチドニューロンに対し、持続的な脱分極を引き起こすことが示唆された。また関与が示唆されたいくつかの神経ペプチドについて、TALEN法によるノックアウト個体の作出を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, to unveil the novel neuronal circuits that are regulated by kisspeptin neurons in vertebrates, I visualized kisspeptin receptor-expressing neurons with GFP, and performed RNAseq of GFP positive neurons in medaka. It was shown that the peptidergic neurons that are suggested to be involved in feeding behavior and homeostasis are expressing kisspeptin receptor. These suggestion were finally confirmed by double labeling of GFP and mRNA of a certain neurotransmitter by in situ hybridization. Following electrophysiological examination showed that kisspeptin synthetic peptide depolarize these kisspeptin receptor expressing neurons. As peptidergic neurons such as isotocin and vasotocin neurons were shown to express kisspeptin receptor, knockout medaka lines of these transmitters by using TALEN technology. Further examination of these neural circuits will be examined by more detailed electrophysiology utilizing the generated knockout and transgenic medaka lines.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：キスペプチン in situ hybridization パッチクランプ トランスジェニック ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

近年の哺乳類を用いた研究から、新規ペプチド、キスペプチン(遺伝子は kiss1)を伝達物質として分泌するキスペプチンニューロンが生殖腺から性ステロイドを受け取り、それに応じて GnRH ニューロンの活動を調節する非常に重要な、かつ生殖に必須なニューロンであることが示唆された。ヒト、マウスにおいてキスペプチン受容体の欠損で性成熟が起こらなくなることも明らかとなり、生殖機能に必須なキスペプチンニューロンは現在神経内分泌学分野で大きな注目を浴びている。

しかし、申請者らが行った投与実験などでは、キスペプチンは真骨魚類において必ずしも生殖腺制御を直接的に制御しているわけではない可能性が強いことがわかってきた。したがって、脊椎動物由来の機能は生殖機能の制御ではないことが示唆される。そこで、脊椎動物の本来の機能を明らかにするために、まずは四足動物、真骨魚類の共通するキスペプチンの機能を明らかにする必要があると考えた。

イソトシン・バソトシンニューロンがキスペプチン受容体を発現しているという実験結果があり、かつ、キスペプチン受容体である gpr54-1 を発現する細胞に GFP を発現するトランスジェニックメダカを作成済みであったので、イソトシン・バソトシンニューロンに対するキスペプチンの作用、および、未知のニューロンに対するキスペプチンの作用を研究することにより、キスペプチンの機能を包括的に理解する研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記に記載した背景から、真骨魚類におけるキスペプチン神経系の機能を明らかにすることである。キスペプチンの受容体を発現する細胞を形態学的、および遺伝学的手法を駆使し、同定することにより、その神経回路、制御の作用機序を明らかにする。受容体を発現する細胞を可視化したトランスジェニックメダカからその神経回路を解析するという新しいアプローチを実用化する。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために、今回私がとった方法は大きく二つに分けられる。1つ目は既に明らかにしているキスペプチンのイソトシン・バソトシンニューロンへの経路を形態学的、生理学的に詳細に解析すること、それらの機能の相関を検証し、その制御の寄与を検討することである。2つ目は、未知の制御経路を発見するために、キスペプチン受容体を発現する細胞を可視化したトランスジェ

ニックメダカを用い、遺伝子発現解析(ニューロンの同定)、および生理学的解析を行う方法である。

生理学的解析には、パッチクランプ法を用いた。現段階では、簡易的に発火頻度を解析できるルースセル法を用い、キスペプチンなどの検証したいリガンドは、合成ペプチドを用い、灌流投与した。分子生物学的な方法でのキスペプチン受容体発現細胞の同定には、細胞回収後の次世代シーケンサーを用いた RNAseq 法を用いた。ただし、この方法では、周りの細胞の発現している RNA や、コンタミネーションが起こる虞があるので、この方法で推測された神経伝達物質を候補として、EGFP と in situ hybridization で検出する mRNA との二重標識を用いることにより、最終的な判断を行った。

4. 研究成果

本研究では、イソトシン・バソトシンニューロンにキスペプチン受容体が発現していることを二重 in situ hybridization 法によって明確に示した。また、バソトシンニューロンを蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックメダカを作成し、電気記録を開始した。その結果、キスペプチンの合成ペプチドを灌流投与した際に、発火頻度を上昇させるバソトシンニューロンが一定の割合存在することがわかった。実際に、キスペプチン受容体を mRNA レベルで検出できた細胞は成熟したメスで 4 割程度ということも明らかになったので、キスペプチンの入力があるものと、ないバソトシンニューロンが混在していることが示唆される。現段階では、効くニューロンと効かないニューロンの区別が困難なため、今後なんらかの他の方法を用いて、キスペプチンの作用するバソトシン神経系の特徴を調べていく。また、イソトシンバソトシンについて、近年発展したゲノム編集技術、TALEN 法を用いてノックアウトメダカを作成した。今後行う行動実験や、生理学実験の非常に有用な材料になることが期待される。

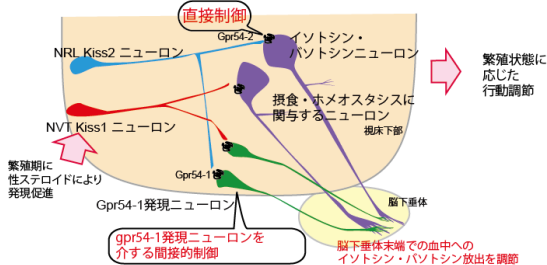
一方、キスペプチンの受容体を可視化したトランスジェニックメダカを用いた、キスペプチン神経系に支配される神経回路の同定に関しては、細胞回収後、次世代シーケンスを用いた解析から、複数の候補が見つかった。いくつかの摂食やホメオスタシス、行動に關与すると考えられているペプチド神経系がキスペプチン神経系の支配を受けていることが示唆された。これらは、GFP と in situ hybridization との二重標識によって、確かに co-localize することはすでに確認済みである。

また、電気生理学的な手法による解析も開始している。Gpr54-1 を発現する細胞へのパッチクランプ記録中に、キスペプチンのリガンドを投与することにより、持続的な脱分極が引き起こされることがわかってきた。今後、

この例数を増やし、また作用機序も解析していく。

これらの実験から明らかになったこと、および、この結果を元に明らかにしていく作業仮説を、図に示した(図1)。

図1.形態学的解析から示唆されるキスペプチンニューロンによる繁殖期特異的な行動調節の作業仮説



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)

Karigo, T., Aikawa, M., Kondo, C., Abe, H., Kanda, S. and Oka, Y.

Whole brain-pituitary in vitro preparation of the transgenic medaka (*Oryzias latipes*) as a tool for analyzing the differential regulatory mechanisms of LH and FSH release.

Endocrinology

査読有、Vol. 155, 2014, 536-547.

Zempo, B., Kanda, S., Okubo, K., Akazome, Y. and Oka, Y.

Anatomical distribution of sex steroid hormone receptors in the brain of female medaka.

J Comp Neurol

査読有、Vol. 521, 2013, 1760-1780.

Kanda, S., Akazome, Y., Mitani, Y., Okubo, K. and Oka, Y.

Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons.

PLoS One

査読有、Vol.8, 2013, e62776.

[学会発表](計 20件)

神田真司, 真骨魚類を用いた内分泌研究, 京都大学 研究大学強化促進事業百家争

鳴プログラム「ムシVSサカナ」, 京都大学, 2014/3/15, (招待講演)

神田真司, 遺伝子組み換え動物を活用したキスペプチン神経系の隠された機能の探索, 富山大学大学院理工学部研究部 テニュアトラック制度シンポジウム, 富山, 2014/3/4, (招待講演)

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, 2013/9/27

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, 2013/9/27

Kanda, S., Functional and evolutionary diversity of vertebrate kisspeptin neuron systems, Seminar in NIH, Rockville, 2013/6/26, (招待講演)

神田真司, 岡良隆, 脊椎動物キスペプチン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, 2013/6/22, (招待講演)

神田真司, 岡良隆, 脊椎動物キスペプチン神経系の進化と多様な機能, 第90回日本生理学会大会, 東京, 2013/3/27-2013/3/29, (招待講演)

小島瑠花, 高橋晶子, 神田真司, 岡良隆, 終神経ニューロン特異的な gnrh3 遺伝子機能障害, 日本動物学会関東支部 第65回大会, 東京, 2013/3/16

近藤千香, 苅郷友美, 相川雅人, 神田真司, 赤染康久, 大久保範聡, 阿部秀樹, 岡良隆, 遺伝子改変メダカを用いた黄体形成ホルモン(LH)放出の中枢制御機構の解析, 日本動物学会関東支部 第65回大会, 東京, 2013/3/16

吉村充史, 河合喬文, 善方文太郎, 赤染康久, 神田真司, 岡良隆, キンギョ性フェロモン 17,20 ?P による黄体形成ホルモン(LH)分泌中枢制御系の形態学的解析, 日本動物学会関東支部 第65回大会, 東京, 2013/3/16

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, 2012/9/13-9/15

神田真司, 李惇馥, 岡良隆, キスペプチン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ン機能の探索, 日本動物学会第83回大会, 大阪, 2012/9/13-9/15

Zempo, B., Kanda, S., Akazome, Y., Oka, Y., Steroid sensitive hypothalamic Kiss1 neurons in medaka do not co-express NKB or DYN, 2nd world congress of kisspeptin., Tokyo, 2012/11/6-9

Takahashi, A., Kanda, S., Akazome, Y.,

Oka, Y., Generation of kiss1 knockout medaka using efficient new genetic tools, TALENs, 2nd world congress of kisspeptin., Tokyo, 2012/11/6-9
Shimada, H., Kanda, S., Akazome, Y., Abe, H., Okubo, K., Oka, Y., Electrophysiological and morphological analysis of Kiss1 neurons in transgenic medaka, *Oryzias latipes*, 2nd world congress of kisspeptin., Tokyo, 2012/11/6-9
Okubo, K., Hodne, K., Kanda, S., Shimada, H., Oka, Y., Welzien, F.A., Embryonic expression and function of kisspeptins and their receptors in a teleost fish, medaka, 2nd world congress of kisspeptin., Tokyo, 2012/11/6-9
Nakane, R., Kanda, S., Oka, Y., Inhibitory regulation of gnRH3 neurons by rfrp neurons in medaka, 2nd world congress of kisspeptin., Tokyo, 2012/11/6-9
Karigo, T., Uenoyama, Y., Oishi, S., Fujii, N., Mitani, Y., Kanda, S., Oka, Y., Effects of kisspeptins on LH secretion and GnRH1 neuronal activities in goldfish and medaka, 2nd world congress of kisspeptin., Tokyo, 2012/11/6-9
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, 2nd world congress of kisspeptin, Tokyo, Japan, 2012/11/6-9
Kanda, S., Oka, Y., Direct regulation of kisspeptin system on vasotocin and isotocin neurons, Society for Neuroscience, New Orleans, LA, 2012/10/13-17

〔図書〕(計 1件)

Kanda, S. and Oka, Y. (2013). Structure, Synthesis, and Phylogeny of Kisspeptin and its Receptor. In *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology* (eds K. Alexander and S. Jeremy): Springer Science. pp. 9-26

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/naiibunpi/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生物科学専攻・助教

研究者番号：50634284

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし