

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月10日現在

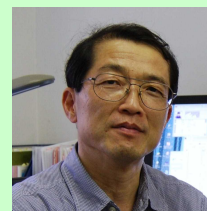
生殖と性行動の協調的制御に関わるペプチドニューロンの生物機能に関する
統合的研究

Coordinated regulation of reproduction and sexual
behavior by peptidergic neurons

課題番号：26221104

岡 良隆 (OKA YOSHITAKA)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要

我々が従来魚類脳の特徴を活かして研究を国際的にリードしてきた3種の異なる GnRH ニューロン系と2種の異なるキスペプチンニューロン系にフォーカスを当て、これらのペプチドニューロンを中心とする神経回路が生殖と性行動の協調的制御を可能にする機構とその進化的意義を遺伝子組換え技術・生理学・形態学・行動学等の最先端技術を有機的に統合して解明する。

研究分野：基礎生物学：動物生理・行動

キーワード：神経生物学、神経生理学、ペプチドニューロン、GnRH、キスペプチン

1. 研究開始当初の背景

動物の生殖という現象は、神経系と内分泌系の巧みな協調によって調節されている。神経系で受容された温度・日長等の情報が、神経系・内分泌系のしくみを通して処理されることにより、生殖腺・配偶子の発達と性行動を協調的に調節し、生殖を成功に導く。しかしながら、このような神経系と内分泌系の協調的制御の機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が従来魚類脳の特徴を活かして研究を国際的にリードしてきた3種の GnRH ニューロン系と2種のキスペプチンニューロン系にフォーカスを当て、これらペプチドニューロンが生殖と性行動の協調的制御に果たす役割とその進化的意義を解明する。さらにこれを、環境変化への適応における神経系と内分泌系の協調的制御の機構とその進化・多様性という一般的な問題に対する、他の追従を許さない多角的かつ独創的な神経内分泌科学的研究の創成へと発展させる。

3. 研究の方法

上述したようなペプチドニューロンにフォーカスを当てて、最先端の遺伝子組み換え技術（各種ペプチド・受容体遺伝子の GFP および Ca²⁺インジケーター標識メダカ）や遺伝子ノックアウト（KO）技術（同上遺伝子の TALEN や CRISPR/Cas9 を用いた KO）に加えて、トランスジェニック（TG）メダカを用いた電気生理学や ISH・IHC などの分子形態学実験及び KO メダカの行動解析等の最先端技術を多角的に組み合わせ用いる。

4. これまでの成果

平成26年度～28年度の3年間で、本研究計画に関連して、10報の重要な国際ジャーナルにおける原著論文と2報のレビュー論文・著作を発表し、うち3論文の内容に関して、添付資料のように広く情報の社会発信を行った。一方で、研究代表者の岡と連携研究者の神田は3年間で14の国内外の学会等で招待講演を行った。学会発表は、上述のような研究成果を、日本動物学会、日本神経科学学会、日本比較内分泌学会などの国内の学会で19演題発表するのみならず、国際的にそれぞれの分野で最も権威のある米国神経科学学会において6演題、米国内分泌学会において3演題など合計17演題を国際会議で発表した。それに加えて、研究代表者は、大会長として札幌で国際神経行動学会議（参加者約600名）を組織して開催した。以下に、上記のようにして発表した主要な研究成果を要約する。

1) キスペプチンニューロンの性ステロイドホルモンセンサー機能 本研究の一つの主なフォーカスである視床下部キスペプチンニューロン（遺伝子は *kiss1*）が、動物の繁殖状態に応じて神経活動や遺伝子発現を劇的に変化させるセンサーとしてはたらくことを発見した。これは、繁殖状態を日長条件で容易に実験的に制御できるメダカを用い、*kiss1* 発現ニューロンを GFP 標識して、その活動を電気生理学的に記録することで証明した。

2) GnRH1 ニューロンの下垂体内軸索終末における分泌活動のリアルタイム計測 もう一つの重要なフォーカスである GnRH ニューロ

ンは、細胞体で産生した GnRH ペプチドを脳下垂体の軸索終末で放出して、脳下垂体からの2種類の生殖腺刺激ホルモン(LHとFSH)の放出を促進する。哺乳類ではこれら2種類のホルモンが同一の脳下垂体細胞で産生されるが、メダカなどの真骨魚類では両者が独立した細胞群として存在し、しかもほ乳類のような門脈血管網を介さず GnRH1 ニューロン軸索終末から GnRH1 が放出されて直接 LH・FSH 細胞に作用するので、脳と下垂体が生体同様の機能を保った全脳 *in vitro* 標本を用いて、GnRH1 ニューロンからの GnRH1 放出を LH・FSH 産生細胞における Ca²⁺シグナル(ホルモンの開口放出に必須)としてリアルタイムに捉えることができる。そこでメダカの LH・FSH 細胞を独立に Ca²⁺インジケータ *inverse pericam* (IP) で標識した遺伝子組換えメダカを開発し、ほ乳類では実現不可能な GnRH1 ペプチドによる LH・FSH 放出動態の計測を、リアルタイムで可能にした。

3) GnRH1 ニューロンのもつグルコースセンサー機能 メダカでは栄養欠乏時にメスだけで生殖機能が抑制されるという興味ある現象を発見し、そのメス特異的な生殖抑制の脳内メカニズムの原因が GnRH1 ニューロンにある事を証明した。今まではほ乳類だけを用いた研究ではわからなかった、生物種や雌雄によって多様化した生殖と栄養状態の関係性を生み出すメカニズムを初めて明らかにした。このしくみは脊椎動物で広く保存されている可能性があり、生物種や雌雄毎に最適化された栄養状態依存的な生殖制御を理解する上で、大きな貢献が期待される。

4) 2種の脳下垂体ホルモンが生殖を調節するメカニズム 上記の脳下垂体ホルモン LH・FSH がそれぞれ異なる段階において生殖を調節するしくみを、メダカに最新のゲノム編集技術を応用して KO メダカを作成して表現型解析することで証明した。また、これらのホルモンの放出を促進する GnRH ペプチドが、ほ乳類だけでなく魚類を含む脊椎動物に共通して生殖に必須であることを初めて明らかにした。一方で、哺乳類と真骨魚類では異なる生殖機能制御のメカニズムをもつ事もわかり、LH・FSH と GnRH による生殖制御のしくみが脊椎動物において進化してきた道筋の今後の解明に興味を持たれる。

5) 終神経 GnRH3 ニューロンの行動制御機構 終神経 GnRH3 ニューロンの軸索が密に投射する真骨魚類の視覚中枢である視蓋の神経回路を電気生理学的に解析し、GnRH3 ニューロンが環境やホルモンなどの生理状態からの入力により GnRH3 ペプチド放出を変更し、GnRH3 ペプチドによる神経修飾が行動を修飾するという作業仮説を提唱した。

5. 今後の計画

1) 排卵周期の形成メカニズム: 雌の規則的な排卵周期(メダカでは1日)を形成するには、

GnRH1 ニューロンからの GnRH1 ペプチド放出がある時期に同期化して起きることが必要と考えられる。GnRH1 ニューロンを GFP で、脳下垂体 LH 細胞を Ca²⁺インジケータタンパク質で、それぞれ標識した TG メダカを掛け合わせたダブル TG メダカを用いて、GnRH1 ニューロンと脳下垂体を含む排卵周期の中枢制御の機構を、電気生理学と Ca²⁺イメージングを組み合わせて解明する。

2) HPG 軸調節機構を形成する神経回路への生殖腺からの性ステロイドホルモンの入力: 卵巣の作るエストロゲン(E)の上記神経回路への入力予想されるが、その作用機序は不明である。そこで、メダカ E 受容体3種それぞれの特異的 KO メダカの表現型解析を行い、脊椎動物でまだ十分に解明されていないこの入力の動作原理に迫る解析を行う。

3) GnRH3 ニューロンや終脳腹側野等の E 受容体(ER)発現ニューロンが形成する、生殖と性行動の協調的中枢制御機構を解明する。

4) キスペプチン受容体遺伝子発現ニューロンを GFP 標識した TG メダカを用いて、標識ニューロンの RNAseq 解析と電気生理学的・形態学的解析によりキスペプチンニューロンの脊椎動物共通の機能を解明する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1) Hasebe, M., Kanda, S., & *Oka, Y. (2016) Female specific glucose-sensitivity of GnRH1 neurons leads to sexually dimorphic inhibition of reproduction in medaka. *Endocrinology*, 157: 4318-4329.

2) Takahashi, A., Kanda, S., Abe, T., & *Oka, Y. (2016) Evolution of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation in vertebrates revealed by knockout medaka. *Endocrinology*, 157:3994 – 4002.

3) 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. Neurophysiology* 114: 2775–2784.

4) Kawai, T., Yoshimura, A., & *Oka, Y. (2015) Neurons in the preoptic area of the male goldfish are activated by a primer pheromone 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *J. Neuroendocrinology* 27: 123-130. doi: 10.1111/jne.12243

5) Hasebe, M., Kanda, S., Shimada, H., Akazome, Y., Abe, H., & *Oka, Y. (2014) Kiss1 neurons drastically change their firing activity in accordance with the reproductive state: insights from a seasonal breeder. *Endocrinology* 155: 4868–4880.

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/naibunpi/lab.html>