

## 論文の内容の要旨

……………論文題目……………

### Physiological studies on peptidergic neurons that act as sensors for physiological state of the animal

(動物の生理状態を感知するペプチドニューロンの生理学的研究)

氏名

長谷部 政治

#### **【序論】**

動物は外部環境に応じて生じた体内の状態変化を感知して、様々な行動や生理機能を適応的に調節していることが広く知られている。しかし、体内の状態変化を感知し、それに応じた行動や生理機能の制御を行う中枢メカニズムについては未解明な点が多く残されている。本研究では、体内の様々な生理状態の影響を受けることが示唆されており、全ての生物において必須である『生殖』に焦点を当て、上記の中枢メカニズムの解析に取り組んだ。

生殖は体内の様々な生理状態に応じて適切に制御されている。多様な生理状態の中で、特に(1)繁殖状態や(2)栄養状態は生殖や性行動の調節に深く関わることが示唆されているが、それらの生理状態を感知する中枢メカニズムについては理解が進んでいない。それは、この分野の研究に主に用いられているげっ歯類モデル動物が、明確な季節性繁殖能を失っており、基礎代謝が高いために栄養状態の調節が難しいことに起因する。そこで今回、繁殖状態・栄養状態に関する実験を行う上で様々な利点をもつ非哺乳類モデル動物「メダカ」を用いた解析を行った。

生理状態(繁殖状態・栄養状態)は継続的に変化し、生殖機能や性行動も持続的に調節される。この生理状態に応じた持続的な制御の中枢メカニズムとして、神経ペプチド放出を介して神経・内分泌機構の調節を行うペプチドニューロンに注目した。ペプチドニューロンの特徴として、外部入力によらない自発神経活動が見られることが知られている。今回、この自発神経活動が生理状態に応じて恒常的に調節されることで、神経ペプチド放出を介した持続的な生理機能制御に貢献していると仮定した(図 1)。この仮定に基づき、生殖制御に重要な役割を果たしていることが報告され

ていた視床下部ペプチドニューロンの自発神経活動について、生理状態(繁殖・栄養状態)に応じた調節メカニズムの解析を行った(1・2章)。また、今回着目した自発神経活動が、直接的に神経ペプチド放出を介した生理機能調節に関与しているかについても解析した(3章)。

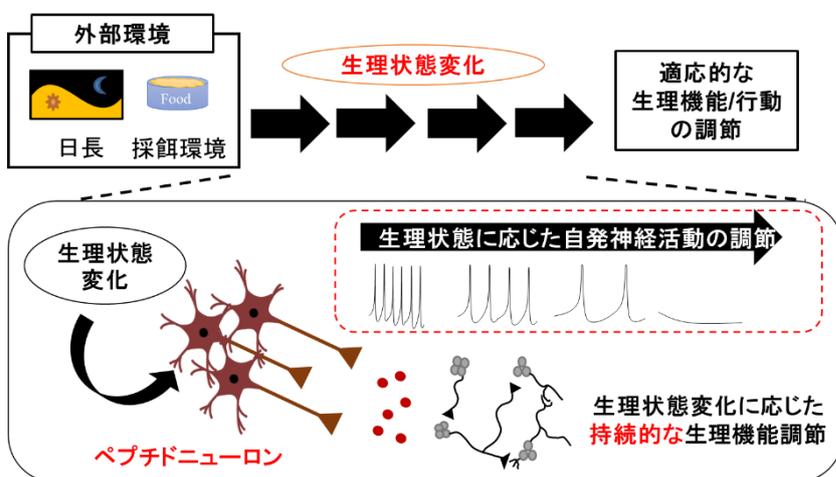


図1: ペプチドニューロンを中心とした、体内の状態変化に応じた行動や生理機能の調節メカニズム

## 1章. 繁殖期を感知する中枢神経メカニズム

多くの動物は季節性繁殖能を保持しており、適切な外部環境(温度・日長環境)でのみ繁殖する。このような外部環境に応じて生殖腺から分泌される性ステロイドが増減することで、生殖機能だけでなく、行動やその他の内分泌環境など、様々な生理機能が調節される。しかし、性ステロイドを受容し、繁殖期を感知する中枢メカニズムについては不明であった。

今回私は、脳内視床下部に局在する神経ペプチドであるキスペプチンの産生ニューロンに注目した。このキスペプチンニューロンは、哺乳類において生殖制御に必須な役割を果たしていることで注目されてきた。キスペプチンニューロンは哺乳類だけでなく脊椎動物で広く見られるが、その特徴として性ステロイド受容体が発現しており、キスペプチン遺伝子発現に性ステロイド感受性を示すことが報告されている(Kanda and Oka, 2012)。そこで、キスペプチンニューロンが性ステロイドを受容し、繁殖期を感知するはたらきをしていると考え、その繁殖状態に応じた自発神経活動の解析を行った。

**実験手法:** 実験には、メダカにおいて性ステロイド感受性を示すことが報告されているキスペプチン(Kiss1)ニューロン特異的に GFP 蛍光標識された遺伝子組み換えメダカを用いた。この遺伝子組み換えメダカの全脳 *in vitro* 標本を用いて、GFP 蛍光標識された Kiss1 ニューロンに対し、電気生理学的手法(パッチクランプ法)により、神経活動を解析した。

**結果:** 長日条件で飼育した繁殖状態メダカにおいて、Kiss1 ニューロンは高頻度発火を含む多様な自発神経活動を示した。一方で、短日条件飼育により非繁殖状態となったメダカでは、多くの Kiss1 ニューロンは自発発火を示さず(サイレント)、顕著に低い自発神経活動を示した。また、卵巣を除去し、性ステロイドレベルが低下したメスメダカでは、非繁殖状態同様、

顕著に低い自発神経活動を示した。一方で、卵巣除去メダカにエストロジェンを含むシリコンを埋め込んだ個体では、卵巣除去メダカよりも高い自発神経活動が見られた。

上記の結果より、Kiss1 ニューロンは性ステロイドに応じて自発神経活動を劇的に変化させ、繁殖期を感知する脳内センサーとしてはたっていることが示唆された。当初の想定とは異なり、近年メダカを含めた真骨魚類において、キスペプチンが生殖制御に必須でないことが報告されてきた (Takahashi et al., 2015; Tang et al., 2015)。一方、恒常性・社会性行動の制御への関与が示唆されているバソトシン・イ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が報告されている (Kanda et al., 2013)。そのため、Kiss1 ニューロンは繁殖期に応じたこれらの恒常性・行動の制御に関与すると考えられる(図 2 右)。

## 2 章. 栄養状態に応じた生殖制御の中核メカニズム

生殖には個体にとって膨大なエネルギーが必要とされるため、栄養状態に応じて適切に調節されている。一方で、同じ生物種でも、雌雄によって生殖に対するエネルギーコストや優先度が異なる。そのため、栄養状態に応じて雌雄毎に異なった生殖調節をするメカニズムが考えられるが、その解析はなされてこなかった。

そこで私は、絶食により栄養が欠乏した際の雌雄の生殖への影響に注目し、個体レベルからニューロンレベルまで解析を行った。中枢機構の解析の際に、脳内視床下部のペプチドニューロンである生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH1) ニューロンに着目した。GnRH1 ニューロンは、脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモン(LH・FSH)分泌を促進し、生殖制御で必須な役割を持つことが報告されている (Maeda et al., 2010)。そこで、GnRH1 ニューロンを栄養状態に応じた生殖調節のキーファクターと想定し、解析した。

**実験手法:** 絶食時の生殖機能・行動への影響の解析には、毎朝産卵・性行動が確認された野生型性成熟メダカを用いた。GnRH1 ニューロンの自発神経活動は、GnRH1:GFP 遺伝子組み換えメダカの全脳 *in vitro* 標本を用いて、パッチクランプ法により解析した。

**結果:** 個体レベルでの解析により、メスメダカでは絶食 3 日後から産卵がほとんど見られなくなったのに対し、オスメダカにおいては 2 週間の絶食期間で生殖機能・行動に顕著な影響が見られないことがわかった。そこで次に、栄養欠乏による GnRH1 ニューロンの自発神経活動への影響を解析した。通常給餌時の血糖値 (グルコースレベル) から、栄養欠乏状態を反映させた低グルコース記録条件に変更した所、メスにおいて GnRH1 ニューロンの自発神経活動が速やかに抑制された。一方、オスにおいては、2 週間絶食処理・低グルコース記録条件下でも GnRH1 ニューロンの自発神経活動への顕著な影響は見られなかった。

上記の結果は、グルコースレベルに応じた GnRH1 ニューロンのメス特異的な調節機構が、メスでのみ見られた栄養欠乏時の生殖抑制に寄与していることを示唆している(図 2 左)。

## 3 章. ペプチドニューロンにおける神経活動とペプチド放出の関係性

1, 2 章の実験より、ペプチドニューロン(Kiss1, GnRH1 ニューロン)が自発神経活動の調

節を介して、体内の生理状態変化を感知していることが示唆された。一方、ペプチドニューロンにおける、その神経活動と神経ペプチド放出を介した生理機能制御との一般的な関係性は、未だに不明瞭である。今回、GnRH1ニューロンが直接的に脳下垂体に投射しており、かつ全脳-脳下垂体標本という全脳から脳下垂体への投射を保った状態で解析が可能なメダカの利点を活かして、投射先である脳下垂体のLH分泌細胞においてGnRH1ペプチド受容時に起こるCa<sup>2+</sup>応答を解析することで、GnRH1ペプチド放出を間接的にモニターした。

**実験手法**：LH細胞特異的に蛍光Ca<sup>2+</sup>インジケーター：インバースペリカム(IP)が発現した遺伝子組み換えメダカの全脳-脳下垂体標本を用いて、Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った。

**結果**：GnRH1ニューロンを高頻度発火(>6~8Hz)させるような濃度の興奮性神経伝達物質グルタミン酸を全脳-下垂体標本に灌流投与したところ、LH:IP細胞においてCa<sup>2+</sup>応答が見られた。また、GnRH受容体アンタゴニストの共投与でこの反応は消失した。これらの結果は、GnRH1ニューロンが高頻度発火すると、その神経終末から下垂体LH細胞に対するGnRH1ペプチド放出が誘起されることを示唆している。

### 【まとめ】

今回の解析により、視床下部ペプチドニューロン(Kiss1・GnRH1ニューロン)において、生理状態(繁殖・栄養状態)に応じて自発神経活動が調節されることが明らかになった(1・2章)。また、GnRH1ニューロンにおいて、発火頻度上昇(>6~8Hz)により下垂体LH細胞に対するGnRH1ペプチド放出が誘導されることも示唆された(3章)。この結果は、生理状態(栄養状態)に応じて調節されるGnRH1ニューロンの自発神経活動が、GnRH1ペプチド放出を介した生殖制御に直接的に貢献していることを示唆している。本研究により、ペプチドニューロンを中心とした、体内の状態変化に応じた行動や生理機能の中核制御メカニズムの一端が明らかになった。

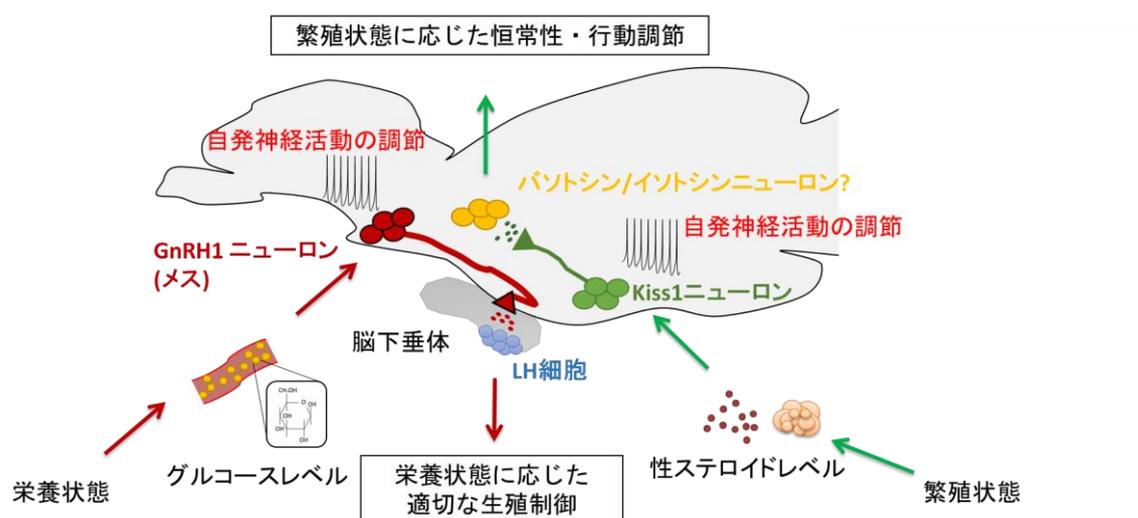


図 2: 今回の研究から示唆された、繁殖・栄養状態に応じた生理機能制御の概略図