

論文内容の要旨

論文題目

Neuroendocrinological studies on the central regulatory mechanisms of teleost reproduction with special reference to hypothalamic GnRH neurons

(視床下部 GnRH ニューロンを中心とした
真骨魚類生殖中枢制御機構に関する神経内分泌学的研究)

氏名 菟郷 友美

序論

生物は自然条件の変化に対応して、体内の内分泌環境を調節する。その一例として、繁殖期と非繁殖期でダイナミックに変化する生殖内分泌系が挙げられる。視床下部ニューロンより分泌される生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、脊椎動物の生殖中枢制御の鍵として、1970 年代の発見以来精力的な研究の対象になってきた。GnRH ニューロンより脳下垂体へと放出された GnRH ペプチドは、脳下垂体細胞からの LH(黄体形成ホルモン)や FSH(濾胞刺激ホルモン)等の生殖腺に作用するゴナドトロピンの分泌を促進し、性成熟や排卵、性ステロイド合成調節等の生殖現象を中枢制御している(図 1)。

多くの脊椎動物のメスは「種ごとに定まった正確な排卵の周期性」を有するという特徴をもち、これまでに卵巣における濾胞発育や排卵の内分泌基盤が盛んに研究されてきた。一方、「どのようにして正確に特定の時期に排卵を起こすか」という、周期性を厳密に調節する神経系・内分泌系の機構は明らかでない。その原因として、単一神経細胞レベルでの詳細な研究がマウスによる知見に限られていたことが挙げられる。マウスの研究では、遺伝学的手法の応用が可能である一方、脳のサイズや複雑さ等の実験

上の制約により、脳内の神経回路を生理的な状態に保ったまま実験的解析を行うのが難しい。生殖の中枢制御機構についての研究は哺乳類で盛んに行われているが、非哺乳類では血中ホルモン量変化を測定するなど個体レベルのみでの研究が多く、神経回路レベルでの研究はほとんど行われていない。

そこで私は、脊椎動物に共通する周期的な生殖調節機構を明らかにするため、これまでの研究から脊椎動物を通じて生殖中枢制御機構で中心的役割を果たすとされている視床下部 GnRH ニューロンに着目し、GnRH ニューロン自体・GnRH ニューロンからの出力・GnRH1 ニューロンへの入力という3つの観点から研究を行うことにした。そのため、1. 自然の性周期が規則的で1日と短く研究に適している、2. 遺伝学的手法が発達している、3. 神経回路が保存された標本作製やイメージングに最適な小型で透明度が高い脳を有する、という観点からモデル動物メダカを研究材料として選択し研究を行った。

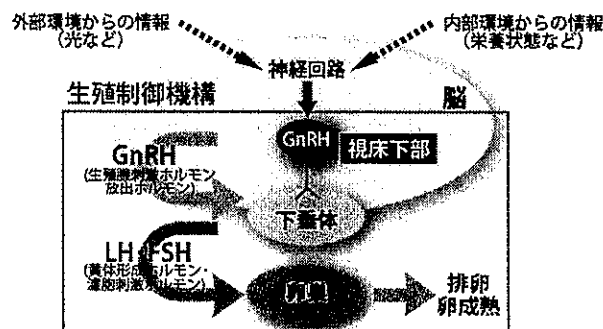


図 1. 脊椎動物で示唆されているメスの生殖中枢制御機構

視床下部に存在する GnRH ニューロンが脳下垂体からの LH や FSH といったゴナドトロピンの分泌を促進し、生殖腺機能を調節する

第一章. 性周期を通じた GnRH ニューロンの周期的活動と脳下垂体 LH 分泌調節

まず第一章では、生殖中枢制御機構において中心的な制御を担う GnRH ニューロンの性周期を通じた周期的活動とそれに伴うゴナドトロピンの時間的制御関係の解析を行った。

性周期の各段階で GnRH1 ニューロンがどのような活動をしているのかを明らかにするため、視床下部 GnRH1 ニューロン特異的に GFP を発現する遺伝子組換えメダカを用いて、脳内神経回路を保った全脳 *in vitro* 標本から、パッチクランプ法により単一 GnRH ニューロンの電気的活動を記録する実験系を確立した。そして一日の各時間帯において GnRH1 ニューロンの発火活動を電気生理学的に解析した。メスの GnRH1 ニューロンは午前到低頻度発火、午後を高頻度発火するという特徴を見出し、メダカ GnRH1 ニューロンが性周期の段階に応じて、異なる活動パターンを示すことを明らかにした。過去の知見より GnRH ニューロンの高頻度発火は LH の分泌を促し、排卵を誘起すると期待される。そこで LH の遺伝子発現にも周期性があるのかを、定量的 RT-PCR を用いて脳下垂体中の *lhb* 遺伝子発現量を解析したところ、明瞭な日内変動が存在し、GnRH1 ニューロンの発火活動の上昇に少し遅れて、*lhb* の mRNA 発現が上昇して朝に最大になっていることを見出した。さらに、脳下垂体の初代培養を用いた実験より GnRH ペプチドによる脳下垂体 *lhb* 転写促進は約 8 時間かかる遅い作用であることを明らかにした。GnRH は脳下垂体に作用してただちに LH 放出を促進する現象(第二章に詳述)と合わせ、午後における GnRH ニューロンの高頻度発火は短時間で LH 放出・排卵を引き起こすと共に、長時間かけて *lhb* 遺伝子転写促進にも作用すると示唆された。性周期が 1 日であるメダカを用いることで、初めて生殖周期を通じた GnRH ニューロンの活動変動および LH の調節様式を明らかにし、図 2 に示すような作業仮説を提唱した。

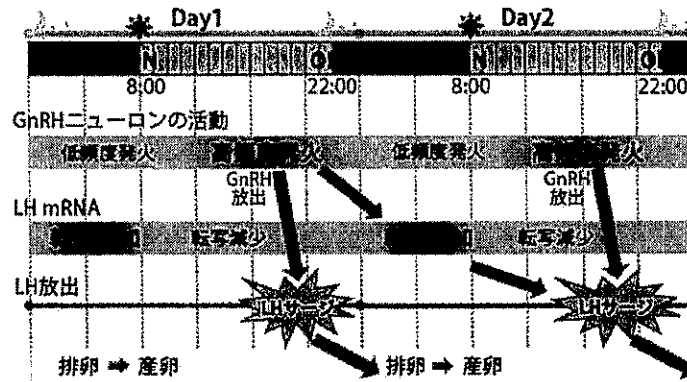


図 2. メダカにおける GnRH ニューロンによる LH 制御に関する作業仮説

一日の午後に GnRH ニューロンの発火頻度が増加し、それに伴い GnRH ペプチドが放出される。まず赤矢印で示した通り数分で脳下垂体からの LH 放出に働き、これが LH サージとなり排卵を引き起こす。次に青矢印で示した通り数時間かけて脳下垂体中の *lhb* mRNA の転写増加に働き、これにより合成・蓄積された LH は翌日の LH サージのためのストックになる。

第二章. GnRH により LH 細胞と FSH 細胞は異なる放出制御を受ける

次に、視床下部 GnRH ニューロンの主な出力先である脳下垂体に着目し、GnRH によるゴナドトロピン放出作用について解析を行った。

GnRH は脳下垂体に作用して 2 種類のゴナドトロピンである LH と FSH の放出を制御する。LH は排卵誘起、FSH は濾胞発育という異なる機能を持つため、性周期の異なるタイミングで分泌制御される必要がある。ところが哺乳類では 2 種類のゴナドトロピンが同一の脳下垂体細胞で産生されるため、それぞれに独立した解析を行うことが難しい。そのため、これまで LH 放出にのみ着目した研究が行われてきており、FSH 分泌調節に関する知見は少ない。一方、真骨魚類では 2 種類のゴナドトロピンは明瞭に独立した細胞群として存在しているため、独立に解析することが可能である。内分泌細胞では細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の上昇により開口放出が起こるため、 Ca^{2+} 上昇をホルモン開口放出のタイミングの指標として用いることができる。そこで魚類の特徴を活かし、LH・FSH 細胞を独立に YFP ベースの Ca^{2+} インジケータである *inverse pericam* で標識した遺伝子組換えメダカを作成した(図 3A)。この遺伝子組換えメダカを用いて GnRH ペプチドによる LH・FSH 放出のタイミングを初めて独立に計測することに成功した。解析の GnRH により LH 細胞は小胞体由来の早く一過的な Ca^{2+} 上昇を示す一方、FSH 細胞はゆっくりとした持続的な Ca^{2+} 上昇を示し、異なる分泌動態を示すことが示唆された。これによりメダカ LH 細胞と FSH 細胞は GnRH に対して異なる応答を示すことを初めて明らかにした(図 3B)。

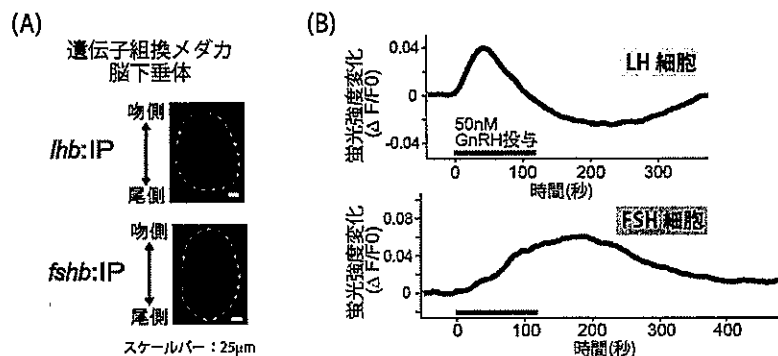


図 3. LH・FSH 細胞は GnRH に対して異なる Ca^{2+} 応答を示す

- (A) LH 細胞と FSH 細胞それぞれに特異的に *inverse pericam* (IP) を発現する遺伝子組換えメダカの脳下垂体。
 (B) GnRH ペプチド添加により LH 細胞は早く一過的な細胞内 Ca^{2+} 上昇を示すが、FSH 細胞はゆっくりとした持続的な細胞内 Ca^{2+} 上昇を示す。これにより LH と FSH は異なる分泌動態を示すことが示唆された。

第三章. GnRH ニューロン発火活動を調節する因子の探索

第三章では、視床下部 GnRH ニューロンおよび LH,FSH の放出リズムを制御する機構を明らかにするため、視床下部 GnRH ニューロンを制御する因子について解析を行った。

まず、近年哺乳類における研究から、視床下部 GnRH ニューロンを直接興奮性に制御すると明らかにされてきているペプチド、キスペプチンに着目した。キスペプチン投与でメダカ GnRH1 ニューロンの発火活動は変化を示さず、哺乳類で示されているような強い興奮性の作用は見られなかった。さらに、生殖内分泌研究に関する知見が豊富なキンギョを用いて、キスペプチンおよびキスペプチン受容体アゴニストの腹腔内・脳室内投与を行ったが、血中 LH 濃度上昇および排卵誘起は観察できなかった。

次に、古くから生殖調節に抑制的に作用すると考えられてきた神経伝達物質ドーパミン(DA)に着目した。これまで DA の個体への投与により GnRH や LH といったホルモン放出量が減少すると報告されていたが、具体的な作用点及び作用機序は不明であった。そこでまず、免疫組織化学により DA ニューロンは視床下部 GnRH1 ニューロン細胞体近傍に神経線維を投射していることを明らかにした。次に電気生理学的手法により DA は単一 GnRH1 ニューロンの神経活動を顕著に抑制することを明らかにした(図 4A)。さらに DA ニューロンは GnRH1 ニューロンだけでなく脳下垂体 LH・FSH 細胞にも直接投射していることも明らかにし(図 4B)、GnRH1 ニューロンとその下流の脳下垂体という 2 つのレベルで生殖制御に抑制的に作用していることが示唆された(図 4C)。

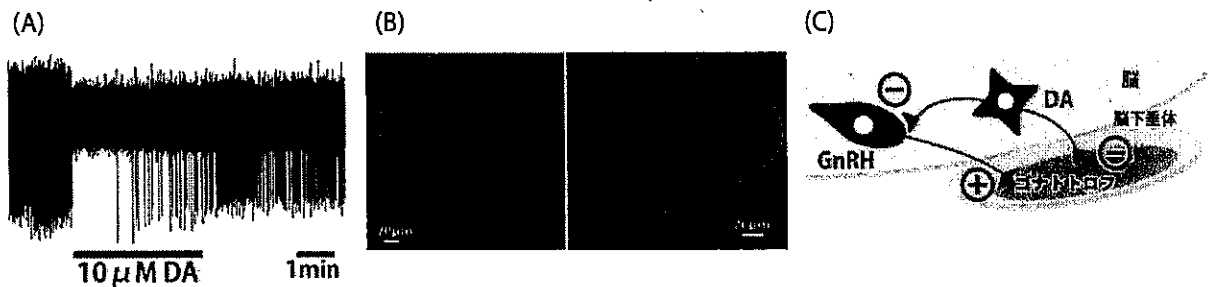


図 4. ドーパミン(DA)による抑制的な生殖機能制御

- (A) DA は GnRH1 ニューロンの神経活動を顕著に抑制する。
(B) DA ニューロンは脳下垂体中の LH・FSH 細胞に投射する。TH, チロシン水酸化酵素。DA ニューロンのマーカー; IHC, 免疫組織化学。
(C) DA ニューロンによる生殖抑制機構の模式図。DA ニューロンは GnRH ニューロンとゴナドトロフの両方に作用して、2つのレベルで生殖制御に抑制的に作用する。

まとめ

本研究では、新たなモデル動物のメダカを活用して、これまで哺乳類で断片的にしか示されていなかった性周期リズム調節機構の解明に取り組んだ。まず性周期の各段階に応じて GnRH1 ニューロンが活動変動することで、脳下垂体 LH・FSH がそれぞれ独立に放出・転写制御される一連の機構を初めて明らかにした。さらに GnRH1 ニューロン活動を上位から抑制する因子としてドーパミンを見出し、ドーパミンニューロンが脳と脳下垂体という 2 つのレベルで生殖制御に関与する作業仮説を提唱した。また、哺乳類では生殖制御に強く関与しているキスペプチンがメダカおよびキンギョでは作用しないことから、真骨魚類では哺乳類とは異なる中枢生殖調節機構が存在する可能性が示唆された。