

論文の内容の要旨

論文題目：Physiological analysis of GnRH release activities in the GnRH neurons

(GnRH 神経系における GnRH 分泌活動の生理学的解析)

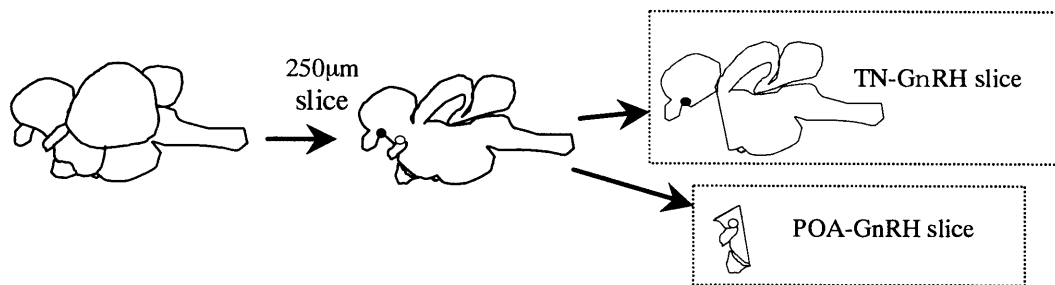
氏名 石崎 摩美

生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は下垂体からの生殖腺刺激ホルモン分泌を促進するホルモンとして発見されたが、これに関与する視索前野 GnRH 系の他にも複数の GnRH 系が脊椎動物の脳内に存在することが近年の研究から明らかになってきている。その一つである終神経 GnRH 系のニューロンは正中隆起には投射しておらず、生殖腺刺激ホルモンの放出には直接関わっていない。これまでの形態学的・生理学的知見から、終神経 GnRH ニューロンは脳全体に軸索を伸ばし、他のニューロンの興奮性や神経伝達物質の放出などを調節する神経修飾系として働いていると考えられている。そのような神経修飾作用は GnRH ニューロンからの GnRH 分泌を介して行われていると考えられるが、終神経 GnRH 系の分泌活動についてはこれまで調べられていない。また、視索前野 GnRH 系の分泌活動と終神経 GnRH 系の GnRH 分泌活動との違いも明らかではない。そこで本研究では、脊椎動物において GnRH ニューロンの解析に最も適した実験系の一つである淡水産熱帯魚ドワーフゲーラミー (*Colisa lalia*) の脳を用いて実験を行った。まず、脳・下垂体スライス標本からの GnRH 放出をラジオイムノアッセイ (RIA) で測定し、両 GnRH 系の分泌活動の違いを明らかにした。また終神経 GnRH 細胞の電気的活動と GnRH 分泌活動の関係について考察した。さらに、微小炭素繊維電極を作製して GnRH を電気化学的に測定する方法を開発し、この方法を用いて、脳・下垂体スライスにおける視索前野 GnRH ニューロン軸索終末領域から、ホルモン分泌活動のリアルタイム記録を行った。

第1章 終神経 GnRH 系と視索前野 GnRH 系の GnRH 分泌活動の測定

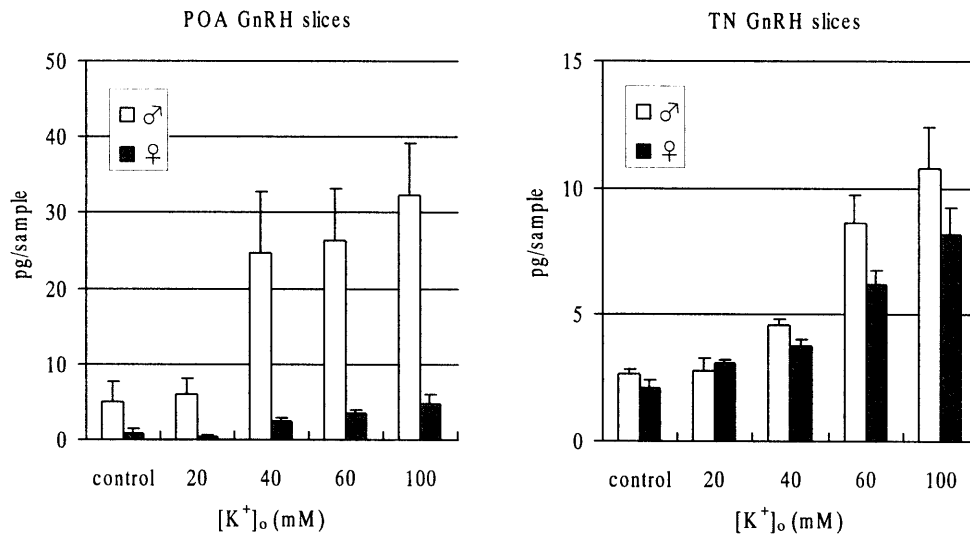
終神経 GnRH 系と視索前野 GnRH 系の GnRH 分泌活動の違いを調べるために、脳・下垂体スライス標本からの GnRH 放出を測定し、GnRH 分泌量の雌雄差などの点において両 GnRH 系で違いがあることを明らかにした。

まずドワーフグーラミーの脳・下垂体矢状断スライス標本を作製し、視索前野・下垂体を含む部分（視索前野 GnRH ニューロンの細胞体とその投射領域）と、それ以外の部分（終神経 GnRH ニューロンの細胞体とその投射領域の大部分）の2つに切り分けた（図1）。次にそれぞれをリンガー溶液中で培養し、その後培養液をアゴニスト等が含まれている溶液に替えて一定時間おき、回収した培養液中の GnRH 量を RIA で測定した。



（図1） 脳-下垂体スライスから放出された GnRH のラジオイムノアッセイによる測定に用いたグーラミー矢状断スライスの模式図。下垂体を含む2匹分の脳スライスを、視索前野 GnRH 系を含むスライス、終神経 GnRH 系を含むスライスの2つに切り分けた。

高 K^+ 溶液で 10 分間脱分極刺激を行った結果、視索前野 GnRH 系を含むスライスからの GnRH 放出量には雌雄差があり、雄の方が雌よりも多くの GnRH を分泌していることが分かった。一方、終神経 GnRH 系を含むスライスからの GnRH 放出には雌雄差が少なかった（図2）。脱分極刺激による GnRH 分泌は外液 Ca^{2+} 依存的であったことから、カルシウムチャネルの関与が予想されたのでその型を検討した。Nifedipine, ω -Conotoxin, ω -Agatoxin（それぞれ L-type, N-type, P/Q-type のカルシウムチャネルの阻害剤）を投与して高 K^+ 脱分極刺激を行った結果、視索前野 GnRH 系を含むスライスでは N-type のカルシウムチャネルが関与しており、終神経 GnRH 系を含むスライスでも主に N-type が関わっているがそれに加えて L-type も少し関与していることが示唆された。どちらのスライスでも P/Q-type のカルシウムチャネル阻害剤は GnRH 分泌を阻害しなかった。興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を投与した結果、どちらの GnRH 系を含むスライスでもグルタミン酸濃度依存的に GnRH 分泌量が増加する傾向がみられた。また、終神経 GnRH 細胞のパッチクランプによる電流固定法の実験から、同程度の濃度のグルタミン酸によって GnRH 細胞の自発的規則発火頻度が上昇することも明らかになった。以上の結果から、終神経 GnRH ニューロンではグルタミン酸の入力を受けて脱分極がおこり、主に電位依存性 N-type カルシウムチャネルが開いて Ca^{2+} が流入し、それによって GnRH 分泌が起こると推測することができる。

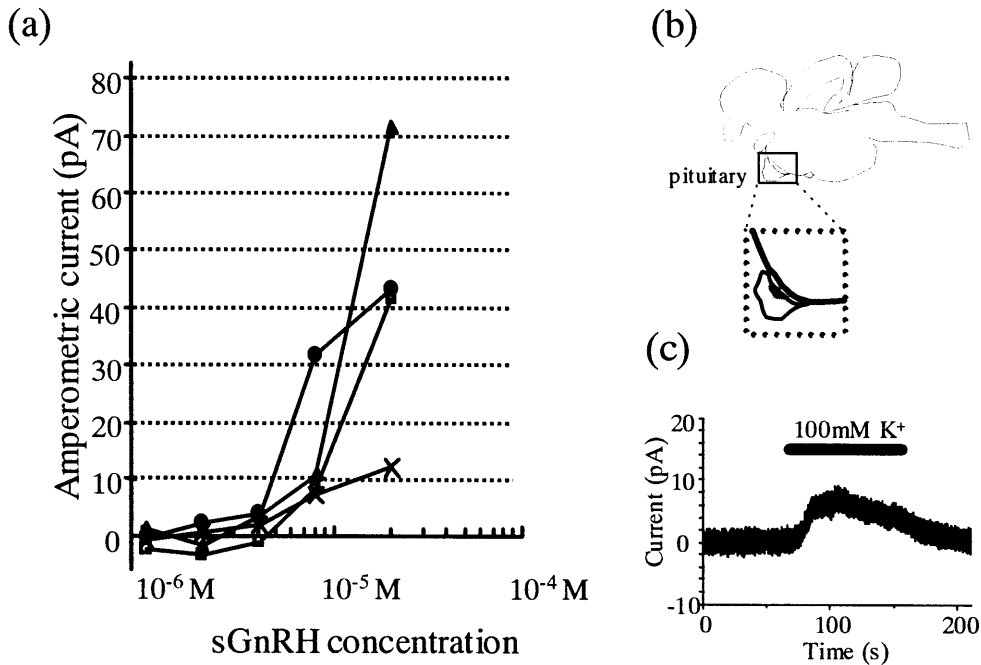


(図2) 高 K^+ 脱分極刺激による GnRH 放出。 左：視索前野 GnRH 系を含むスライスからの GnRH 放出。右：終神経 GnRH 系を含むスライスからの GnRH 放出。どちらのスライスにおいても、 K^+ 濃度依存的に GnRH 放出量が増加した。視索前野 GnRH 系を含むスライスでは、GnRH 分泌量に雌雄差がみられた (雄>雌) が、終神経 GnRH 系を含むスライスでは雌雄差は少なかった。

次に細胞内カルシウムストアの GnRH 放出への関与について調べた。細胞内カルシウムストアからの Ca^{2+} 放出を促進するためにカフェインを投与した結果、視索前野 GnRH 系を含むスライス・終神経 GnRH 系を含むスライスのいずれも、カフェイン投与により GnRH 放出量が自発放出に比べて有意に増加することはなかった。しかし、細胞内カルシウムストアへの Ca^{2+} 取り込みを阻害する Thapsigargin を投与すると、終神経 GnRH を含むスライスで GnRH 分泌量が減少した。Thapsigargin 感受性のカルシウムストアが自発的 GnRH 分泌に関わっている可能性もあるが、さらなる検討が必要である。また、カルシウムストアの枯渇によって引き起こされる細胞外からのカルシウム流入 (容量性カルシウム流入) が GnRH 分泌活動にどう関わっているか検討するために、外液 Ca^{2+} のない状態で細胞内カルシウムストアを枯渇させておき、その後外液 Ca^{2+} を再導入することによって容量性カルシウム流入を起こさせて、その時の GnRH 分泌量の変化を調べた。その結果、終神経 GnRH 系を含むスライスでは、容量性カルシウム流入が GnRH 分泌に寄与していることが示唆された。以上の結果から、終神経 GnRH 系の自発的 GnRH 放出には、細胞内カルシウムストアとストアへ Ca^{2+} を補充する役割を持つ容量性カルシウム流入が関わっている可能性が考えられる。

第2章 視索前野 GnRH 系の分泌活動のリアルタイム記録

微小炭素繊維電極を用いた電気化学的方法により、ドーパミンなどのカテコールアミン類やセロトニンなど酸化還元されやすい神経伝達物質の放出を培養細胞等においてリアルタイムに記録することが最近可能になった。GnRH は酸化されやすいアミノ酸である Trp、



(図3) 微小炭素繊維電極 (CFE) を用いた GnRH のリアルタイム測定。(a) sGnRH 溶液のアンペロメトリーによって得られた濃度・電流曲線。電極電位 900mV に固定した CFE の先端に濃度の異なる GnRH 溶液をバッファビペットでふきかけ、GnRH の酸化電流を記録した(n=4)。(b,c) 視索前野 GnRH ニューロンの軸索終末付近における分泌活動のアンペロメトリー。(b)下垂体における GnRH ニューロンの投射領域 (斜線部)。CFE をこの部位に接触させ、電極電位 900mV で記録を行った。(c) 高 K⁺脱分極刺激を行うと、GnRH 分泌活動を反映する酸化電流が記録された。

Tyr を含むペプチドなので、微小炭素繊維電極を用いて GnRH 分泌活動のリアルタイム記録ができると考えた。そこで、微小炭素繊維電極を自作して GnRH 溶液の電気化学的測定を行った。その結果、微小炭素繊維電極の電極電位をおよそ 600-800mV 以上にすれば GnRH の酸化電流を測定できることが分かった。このことから、微小炭素繊維電極の電極電位を 800mV 以上に保持することにより、脳・下垂体の局所的な場所からの GnRH 分泌を記録することができると考えられた。

この方法を利用して、ドワーフグーラミー矢状断脳スライス標本の下垂体における視索前野 GnRH ニューロンの軸索終末付近からの分泌活動のリアルタイム記録を行った(図3)。下垂体断面における視索前野 GnRH ニューロンの軸索終末が密集している場所に、微小炭素繊維電極を接触させて電極電位を 900mV に保持した。高 K⁺灌流液で脱分極刺激をすると、分泌活動を反映する酸化電流が K⁺濃度依存的に観測された。このとき電極電位を異なる値に保持して、同様に脱分極刺激を行い酸化電流を記録すると、600mV 以下の電極電位では酸化電流は観測されなかったことから、この酸化電流はドーパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の酸化電流ではないことが明らかである。RIAの結果と併せ、微小炭素繊維電極を用いて、スライス標本から GnRH ニューロンの分泌活動をリアルタイムに記録できることが示唆された。この方法は、GnRH を分泌する脳内の領域や細胞からの局所的な GnRH 放出のリアルタイム測定に応用することができ、GnRH 系の機能を解析する有効な手段になると考えられる。