

論文内容の要旨

論文表題 Physiological Studies on the Neural Inputs to Neuromodulatory GnRH Peptidergic Neurons

(神経修飾系 GnRH ペプチドニューロンへの神経入力に関する生理学的研究)

氏名 中根 亮

生殖の中枢制御において中心的な役割を果たす視床下部GnRHニューロンは、正中隆起（多くの脊椎動物）または脳下垂体（硬骨魚）に投射して生殖腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン）の放出を促す。これに対して、終神経GnRHニューロンはペースメーカー活動と呼ばれる規則的な発火活動を示し、脳内に広く神経線維を投射する。こうした特徴により、1) 終神経GnRHニューロンは広い範囲の脳の興奮性を一斉に調節して、動物行動の動機付けや覚醒状態を修飾するいわゆる神経修飾作用を示すニューロンである、2) ペースメーカー活動は脳全体に投射する軸索を伝導してGnRHペプチドや共発現物質の放出により神経修飾作用を発揮する、と考えられている。神経修飾系としてはたらくニューロンにはペプチド作動性ニューロンの他にカテコールアミン作動性ニューロンが知られるが、いずれもGnRHニューロンと共通の作用機構をもつことが示唆されている。それゆえ、ペースメーカー活動の頻度がどのような調節を受けるかを知ることは、終神経GnRHニューロンの機能を知る大きな手がかりになると考えられる。この調節機構に着目し、本研究では第1章でシナプス入力について、第2章で自己分泌・傍分泌について生理学的な研究を行った。形態学的研究により、終神経GnRHニューロンは嗅覚・視覚・体性感覚からの感覚入力を受けることが知られている。これに対応してキンギョ・サメにおいて体性感覚刺激（侵害刺激）によりペースメーカーの頻度が減少した。嗅覚・視覚等の感覚刺激に関しては、ペースメーカー頻度を変える刺激は見つからなかったが、コイにおいて嗅神経や嗅索を電気刺激した時に抑制性シナプス電位IPSPが生じてペースメーカー活動を抑制した。一方、感覚情報を主に伝達する物質の候補としてグルタミン酸の作用が調べられ、ペースメーカー活動に対して主に興奮性の作用を示すことが明らかになっている。そこでまず第1章では、嗅神経や嗅索を電気刺激した時にIPSPが生じることを踏まえて、ペースメーカー活動を抑制する物質の候補としてGABAに着目して、その生理作用を調べる実験を行った。一方、電子顕微鏡を用いた形態学的研究により、終神経GnRHニューロンの細胞体には

GnRHペプチドを含有する有芯小胞が存在し、ペプチドが細胞体から開口放出されることが示唆されている。終神経GnRHニューロンのペースメーカー活動はGnRHペプチドの投与により短時間抑制された後、長時間の興奮性作用を示すこと等から、GnRHペプチドは細胞体等から放出され、自己分泌・傍分泌的に作用するという仮説が提唱されている。さらに、魚から哺乳類に至る様々な動物において、終神経GnRHニューロンはGnRHの他にFMRFamide免疫陽性な何らかのペプチド（内在性FMRFamide様ペプチド）を共発現することも知られている。そこで第2章では、このペプチドの自己分泌・傍分泌作用について明らかにする目的で、FMRFamideの生理作用を調べる実験を行った。

実験動物：

ドワーフグーラミー *Colisa lalia*。終神経GnRHニューロンの神経生理学的実験が容易に行え、神経入力に関する形態学的な知見が豊富である。

実験手法：

脳から終脳-嗅球を切り出した全脳*in vitro*標本を用いパッチクランプ法でGnRHニューロンから記録を行った。薬理実験においてはホールセルパッチ法を行い、GABA_A応答の生理的な応答性を見る実験においては、細胞内Cl⁻組成を維持するCell-attachedパッチ法、グラミシジン穿孔パッチ法を行った。

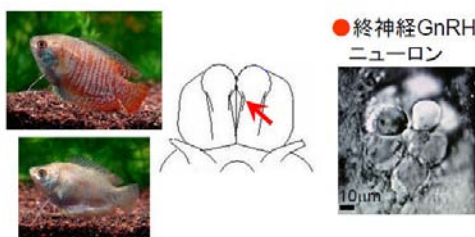


図1. ドワーフグーラミーとその終神経GnRHニューロン(赤矢印)

第1章の結果：

TTX（電位依存性Na⁺チャネル阻害剤）でシナプス入力を遮断した条件でホールセルパッチ記録を行った所、終神経GnRHニューロン上にはGABA_A受容体アゴニストmuscimolによって活性化されるイオンチャネル型GABA_A受容体の存在が示された。代謝型GABA_B受容体による応答は見られなかった。グラミシジン穿孔パッチ記録を行いmuscimolにより生じる電流の反転電位を測定した所、静止膜電位より脱分極側であった。また、特殊な方法を用いてCell-attachedパッチ法により細胞膜電位を測定した所、終神経GnRHニューロンはmuscimol投与により脱分極した。CNQX, AP-5でグルタミン酸作動性シナプス入力を遮断した条件で、Cell-attachedパッチ法により活動電流の測定を行った所、低濃度(5 μM)のmuscimol投与によりペースメーカーの頻度が上昇した。また、高濃度(50 μM)のmuscimol投与により頻度が急激に上昇後、発火が停止した。さらにCell-attachedパッチ法において、muscimolによる興奮性作用がCl⁻蓄積型トランスポーターNKCCのブロッカー(bumetanide 50 μM)の灌流投与により部分的に阻害された。これにより、興奮性GABA_A応答を生じる因子の一つはNKCCであることを明らかにした。以上より、終神経GnRHニューロンのGABA_A受容体応答はNKCCトランスポーターによる細胞内へのCl⁻蓄積機構により脱分極性となり、ペースメーカー活動に対して興奮性作用を示すことが分かった。ただし、GABAの濃度によっては部分的に抑制性にもなりうる。

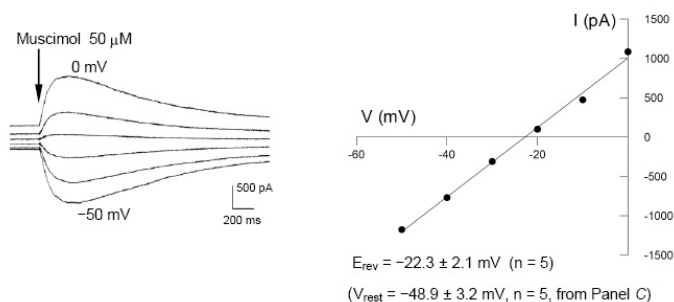


図 2. グラミシジン穿孔パッチ、反転電位の測定

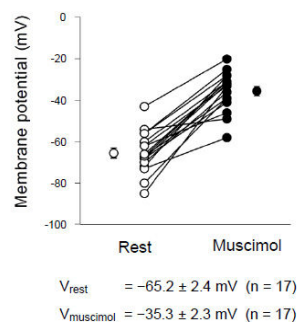


図 3. Cell-attached, 膜電位測定

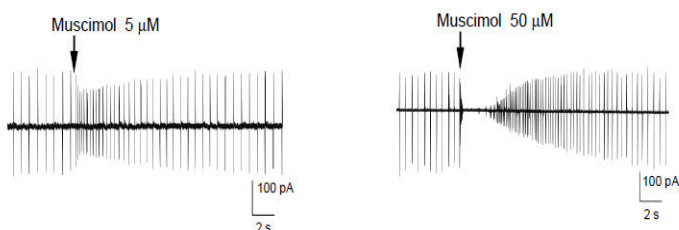


図 4. Cell-attached, 活動電流の測定

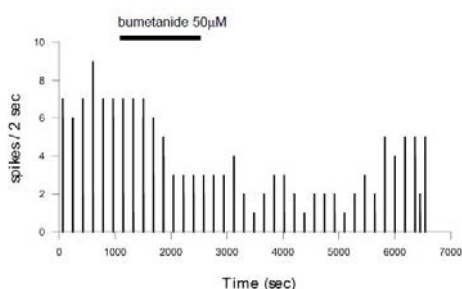


図 5. Cell-attached, NKCCブロッカーの効果

GABA_A応答が当初の予想に反して脱分極性であったことから、嗅神経・嗅索を電気刺激した時に生じるIPSPは別の伝達物質によるものと考えられるが、現在の所、その実体は不明である。興奮性GABA_A応答は発生期の脳によく見られるが成熟個体の脳においては少数のニューロンにおいてのみ見られる。ほ乳類視床下部GnRHニューロンのGABA_A応答も興奮性であるとされ、GnRHサージとの関連が示唆されている。また終神経・視床下部GnRHニューロンと発生の由来が同じ嗅受容ニューロンにおいてもCl⁻の細胞内蓄積が起きている。一方、同じく神経修飾系のドーパミン作動性ニューロンではGABA_A応答は抑制性である。したがって、興奮性GABA_A応答はGnRHニューロンに共通する性質である、発生活源に由来する性質である、等の可能性が考えられる。脳内のもう一つのGnRHニューロンである中脳GnRHニューロンのGABA_A応答を調べることで示唆が得られると期待される。

第2章の結果：

FMRFamideは終神経GnRHニューロンのペースメーカー活動を抑制した。すなわち、ホールセルパッチクランプ法において、FMRFamideの灌流投与により終神経GnRHニューロンのペースメーカー活動が濃度依存的に減少した($EC_{50} = 2.85 \mu M$)。また、頻度の減少はGDP- β -SによりGタンパク質共役型受容体の経路を遮断することで抑えられた。TTX存在下で、FMRFamideの灌流投与により終神経GnRHニューロンの膜電位は過分極した。さらに、FMRFamide投与により膜コンダクタンスが増大し、FMRFamideにより生じる電流の反転電位は細胞外K⁺濃度依存的に変化し、その変化はNernstの式から導き出されるK⁺平衡電位の理論値とほぼ一致していた。以上のことからFMRFamideは何らかのGタンパク質共役型受容体を介してK⁺コンダクタンスを増大させることで過分極応答を引き起こし、終神経

GnRHニューロンのペースメーカー活動を抑制することが明らかとなった。

FMRFamideの有効濃度がペプチドとしては高いので、内在性のペプチドを決定してその作用を調べることが今後の課題である。

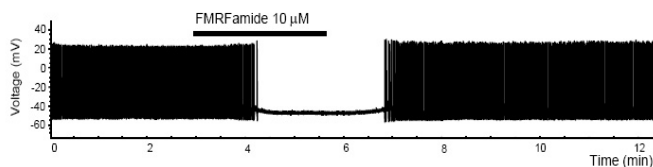


図 6. FMRFamideの灌流投与

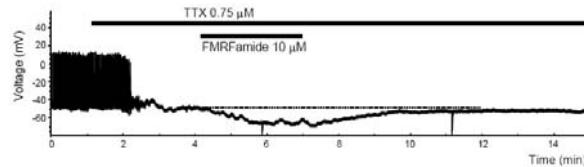


図 7. TTX存在下でのFMRFamide投与

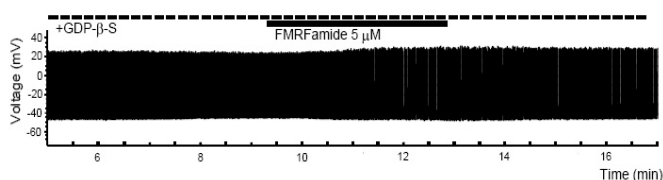


図 8. GDP-β-Sの抑制効果

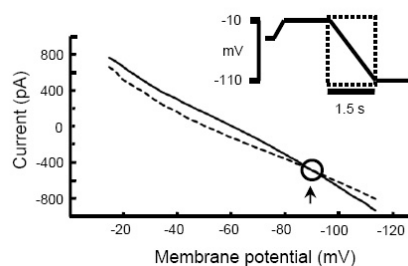


図 9. FMRFamideにより生じる電流の反転電位

考察：

本研究により、終神経GnRHニューロンにおいて、当初の予想に反してGABAがペースメーカー活動に対して興奮性に作用することが明らかとなった。また、これまで終神経GnRHニューロンのペースメーカー活動に対して抑制性作用を示す神経伝達物質・神経修飾物質が見つかっていなかったため、今回のFMRFamideが最初の報告ということになる。終神経GnRHニューロンは各種の感覚入力を受けており、グルタミン酸、GABAがこれを仲介すると考えられる。これらの興奮性入力により終神経GnRHニューロンは脱分極して、ペースメーカー頻度が上昇する。入力強度によっては細胞体からGnRHペプチドや内在性FMRFamide様ペプチドが放出される可能性が考えられ、近傍の終神経GnRHニューロンに対して、GnRHペプチドの場合は主にpositive feedback的な調節を、FMRFamide様ペプチドの場合は過興奮を防ぐ抑制的調節を行うというモデルを考えることが出来る。これらの自己分泌・傍分泌的なペースメーカー活動の調節により、感覚系からのシナプス入力と出力としてのGnRHペプチドや共発現物質の放出動態との関係が修飾を受けるものと考えられる。今後の課題としては、グルタミン酸およびGABAによる興奮性入力の生体内での意義付けと、内在性FMRFamide様ペプチドの決定およびその作用の検証、GnRHペプチドと内在性FMRFamide様ペプチドがどのような時に放出されるかを調べることが挙げられる。それらにより、終神経GnRHニューロンペースメーカー活動のより正確な調節機構を知ることが出来るものと期待される。