

1. 神経科学シリーズ

GnRH ニューロンに発現するイオンチャネル (1)

加藤 昌克

日本医科大学生理学講座 (システム生理学)

1. Neuroscience Series

Ion Channels in Rat Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons (1)

Masakatsu Kato

Department of Physiology, Nippon Medical School

Abstract

To understand neural mechanisms of reproductive physiology, we have generated promoter transgenic rats for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. Using these rats we have analyzed ion channels expressed in rat GnRH neurons by means of patch clamp experiments and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The study revealed that rat GnRH neurons exhibit voltage-gated Na^+ , K^+ and Ca^{2+} currents. There are delayed rectifier K^+ currents, large conductance voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ currents (BK currents carried through BK channels) and Ca^{2+} -activated K^+ currents (slow afterhyperpolarization currents carried through SK channels). Ca^{2+} currents are carried through five different Ca^{2+} channels, namely L-, N-, P/Q-, R- and T-types. Activation of these ion channels determines excitability of GnRH neurons and their firing pattern of action potentials.

(日本医科大学医学会雑誌 2007; 3: 193-197)

Key words: gonadotropin-releasing hormone neuron, Ca^{2+} channel, SK channel, BK channel, patch clamp

私は視床下部下垂体系の生理学的研究を行っています。主に下垂体細胞や視床下部小細胞性ニューロンの細胞生理学的解析です。これらの細胞はすべて興奮性細胞なので、まず興奮性膜の研究史を概説し、後段で私の研究を紹介します。

興奮性細胞とは神経細胞や筋細胞、内分泌細胞のように活動電位を発生する細胞のことです。その研究史において最初に登場するのはリンゲル液で有名な S. Ringer です。Ringer はカエルの心臓の摘出かん流標本を用いて、正常な拍動にはナトリウムとカリウム、

カルシウムが必要であり、さらに、これらのイオンの含まれる割合が重要であることを明らかにしました。

これは 1881 年から 1889 年にかけてなされた研究です。血中イオン濃度と心機能の関係につながる先駆的で重要な研究です。次は W. Nernst (1888) です。いうまでもなくネルンストの式を導いた人です。後に提出された Goldman-Hodgkin-Katz の式とともに現在も使われているものです。これらの研究に続いて J. Bernstein (1902, 1912) は静止膜電位の成因を細胞膜のカリウムに対する選択的透過性であることを明ら

Correspondence to Masakatsu Kato, Department of Physiology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: mkato@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

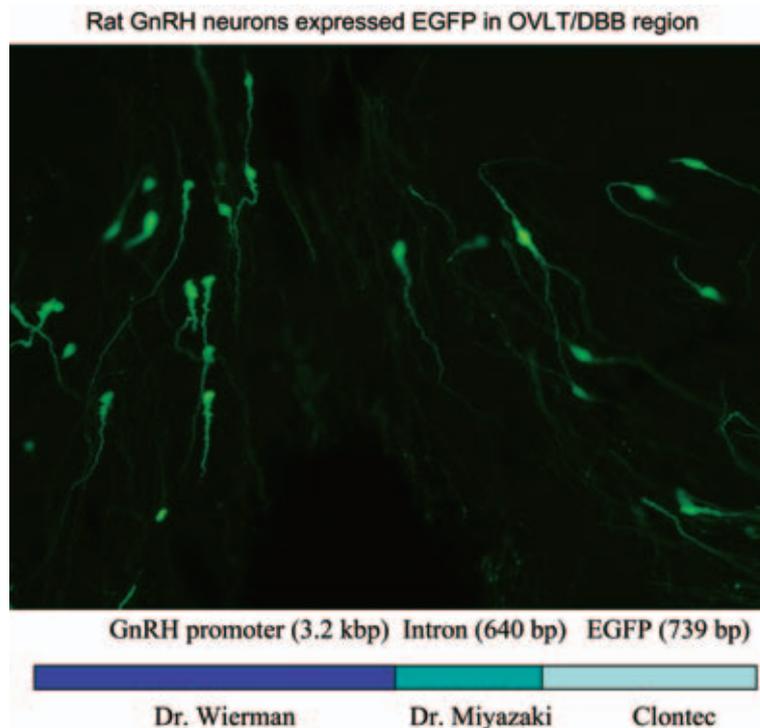


図1 GnRH-EGFP トランスジェニックラット

このトランスジェニックラットは、下段に示すDNAコンストラクトを用いて作製した。GnRH プロモータはコロラド大学の Dr. Wierman から、ウサギβ-グロブリンのイントロンは大阪大学の宮崎先生から供与された。本トランスジェニックラットでは、免疫陽性 GnRH ニューロンの30～40%でEGFPの強い発現がみられる。図はラット前額断切片で、第三脳室前壁のOVLT近傍を示している。中央下部の黒いところは第三脳室である。緑色のGnRHニューロンの細胞体と線維が見られる。この緑色蛍光を指標にすることによって、生きたままのGnRHニューロンの同定が可能となり、細胞生理学的研究ができるようになった。

かにしました。このことは、血中カリウム濃度の調節がいかに大切かを考えるときに大変重要なことです。さらに50年のときを経て、A.L. HodgkinとA.F. Huxley (1952)は活動電位のイオン機構を明らかにしました。イカの巨大軸索標本を用いて、膜電位固定法でナトリウム電流とカリウム電流を記録・解析し、H-Hモデルを提出しました。各電流の活性化と不活性化の過程を数式化し、1970年代にはじめて記録されたゲート電流の存在をも示唆する内容です。その後、分子生物学とパッチクランプ法の出現によりイオンチャネルの存在が実証され、それらをコードする100以上の遺伝子が知られるに至りました。この100年余の歴史で多くの基礎研究者が様々な思いで研究に携わりました。臨床応用に直接つながったものもあり、またほとんど臨床応用との関係を持たないものもあります。しかし、すべての研究は論文を通して共有財産となり、お互いに影響を与えあいながら発展してきたのです。この研究史のなかで、はっきりしている

ことは、多くの基礎研究者は応用を目指して研究を進めてきたのではなく、「これを知りたい」という強い好奇心が原動力となってきたのであり、今もこのことは変わらないと思います。

GnRH (gonadotropin-releasing hormone) ニューロンに発現するイオンチャネルとその機能

私自身の研究の紹介に入ります。GnRHニューロンはLHRH (luteinizing hormone releasing hormone)ニューロンともよばれ、下垂体からのゴナドトロピン(LH, FSH)の放出を制御するニューロンであり、雌雄の思春期発来や雌の性周期発現に重要な役割を演じます。われわれはこれらの機構を明らかにする目的で、トランスジェニックの手法を用いてGnRHニューロンに特異的に蛍光分子を発現するラットを作製し(図1)、GnRHニューロンの生理学的記録解析を可能にし、研究を進めています。ラットではGnRHニュー

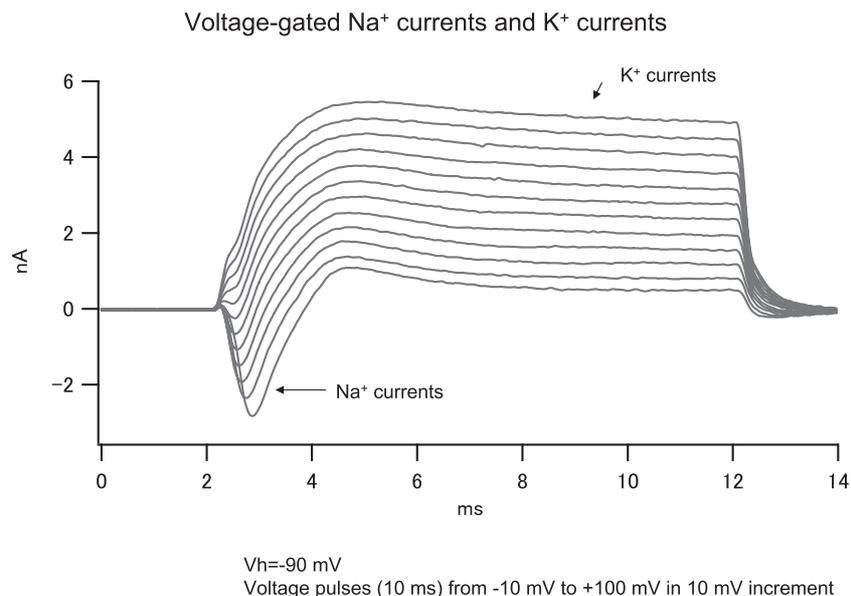


図2 膜電位依存性のナトリウム電流とカリウム電流

スライス標本の GnRH ニューロンからパッチクランプ法で記録したものである。膜電位を -90 mV に保持し、10 ms の電位パルスを -10 mV から $+100$ mV まで 10 mV 刻みで増加させた。下向きに振れている（内向き）のがナトリウム電流である。50 mV 付近で逆転しているのが分かる。少し遅れて上向きに振れている（外向き）のがカリウム電流である。図には示していないが、約 80% は遅延整流型カリウム電流であり、20% は電位カルシウム活性型カリウム（BK）電流である。ナトリウム電流は活動電位の脱分極相に、またカリウム電流は再分極相に対応する。

ロンの細胞体は内側中隔から視索前野にかけて散在し、軸索を正中隆起に投射しています。活動電位依存性に軸索末端から GnRH を放出し、下垂体門脈系を介して下垂体機能を調節しています。すなわち活動電位の発射頻度と発射パターンが軸索末端からの GnRH の放出を規定することになります。GnRH ニューロンの興奮性を規定するのは、GnRH ニューロンに発現するイオンチャンネルです。そこでわれわれは、研究の第一段階として、ラット GnRH ニューロンにどのようなイオンチャンネルが発現しているのかを、電気生理学的手技と RT-PCR 法を用いて明らかにすることにしました。

膜電位依存性ナトリウム電流とカリウム電流

GnRH ニューロンはほかのニューロンと同様に活動電位を発生します。関与するチャンネルは主にテトロドトキシン（TTX）感受性の膜電位依存性ナトリウムチャンネルと遅延整流性カリウムチャンネルです（図 2）。まさに Hodgkin と Huxley がイカの巨大軸索を用いて示したのと基本的に同様の活動電位が哺乳類のニューロンでも見られるのです。

膜電位依存性カルシウム電流

成熟ラットの GnRH ニューロンは 5 種類の膜電位依存性カルシウムチャンネルを発現していることが明らかになりました（図 3）。すなわち、L-, N-, P/Q-, R- および T-型です。L-型チャンネルは不活性化をほとんど示さない持続性の電流を発生させます。GnRH ニューロンでは全カルシウム電流の 25% がこのチャンネルを透過しています。循環器の治療に用いられるジヒドロピリジン系の薬はこの L-型チャンネルに作用します。ニューロンに比較的に特異的に発現する N-型と P/Q-型を通るカルシウム電流の割合は、それぞれ 20% と 12% です。GnRH ニューロンでは R-型チャンネルの貢献は高く、全カルシウム電流の 30% を占めます。低い膜電位で活性化される T-型チャンネルを透過するカルシウム電流の貢献は 10% です。これらのチャンネルを介して細胞外から流入するカルシウムイオンは膜興奮性に影響するだけでなく、細胞内で直接あるいはカルモジュリンや C-キナーゼなどを介して、開口分泌の調節や遺伝子発現、イオンチャンネル活性などを調節しています。カルシウムイオンは筋収縮の過程で重要な働きをすることはよく知られていますが、神経細胞でも多岐にわたる作用があり大変重要なイオンで

Voltage-gated Ca²⁺ currents

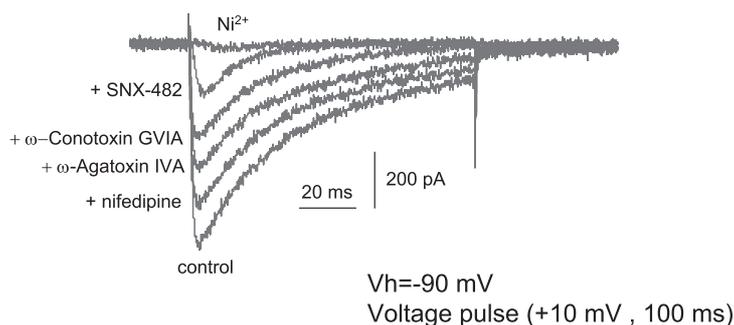


図3 膜電位依存性カルシウム電流

分散培養した GnRH ニューロンからの記録である。カリウム電流をセシウムとテトラエチルアンモニウムで阻害し、ナトリウム電流をテトロドトキシンで阻害し、カルシウム電流を単離した。L-型カルシウムチャネルの特異的阻害薬である nifedipine で電流の一部が抑制される。続いて ω-Agatoxin IVA (P/Q-型阻害剤), ω-Conotoxin GVIA (N-型阻害剤), SNX-482 (R-型阻害剤) を順次加えていくと電流は抑制され、最後に、Ni²⁺ (50 μM, T-型阻害剤) を追加するとカルシウム電流はほぼ完全に抑制される。すなわち L-, N-, P/Q-, R- および T-型チャネルが発現していることになる。図には示していないが、幼弱期のラットの GnRH ニューロンには T-型の発現は全く見られず、思春期以降に発現が高まる。また、幼弱期では R-型チャネルを透過するカルシウム電流は全カルシウム電流の 60% を占めており、比率は発達とともに減少する。

Slow afterhyperpolarization current

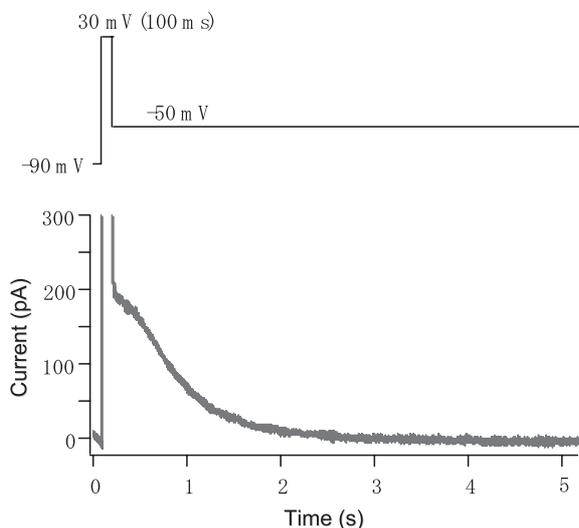


図4 緩徐後過分極電流

上段に示すように、膜電位を保持電位の - 90 mV から + 30 mV (100 ms) に脱分極し、引き続き - 50 mV にすると下段に示すような外向き (上向き) の電流が観察される。時間経過が長いことから緩徐後過分極電流とよばれ、細胞内カルシウム濃度の上昇で活性化されるものである。

す。上記5種類のカルシウムチャネルを通して流入するカルシウムイオンがそれぞれどのような機能と関係するのかを今後の研究で明らかにしなければなりません。細胞内カルシウム濃度の上昇は、イオンチャネルを介する細胞外からの流入だけではなく、細胞内小器官のひとつである小胞体 (ER) からの放出もあります。これは膜受容体の活性化により産生されるイノシトール三リン酸 (IP3) の作用によるものですが、ラット GnRH ニューロンに発現する膜受容体の研究は、いま始まったところで、次の機会に譲りたいと思います。

カルシウム感受性カリウム電流

上記のカルシウムチャネルが開きカルシウムイオンが細胞内に流入すると細胞質のカルシウムイオン濃度が上昇します。細胞が活動していない時すなわち静止時の細胞内カルシウムイオン濃度は 100 nM 前後ですが、活動時にはカルシウムチャネルが開きカルシウムイオンが流入することによって 1,000 nM 以上になります。また細胞膜のイオンチャネルのごく近傍では 100 μM 以上になると考えられています。このような細胞内カルシウム濃度の上昇によって活性化されるカリウムチャネルがあり、カルシウム活性化型カリウムチャネルと総称されています。GnRH ニューロンには 2 種類が発現しています。ひとつは細胞内カルシウム

Effect of apamin and Ni²⁺, Cd²⁺

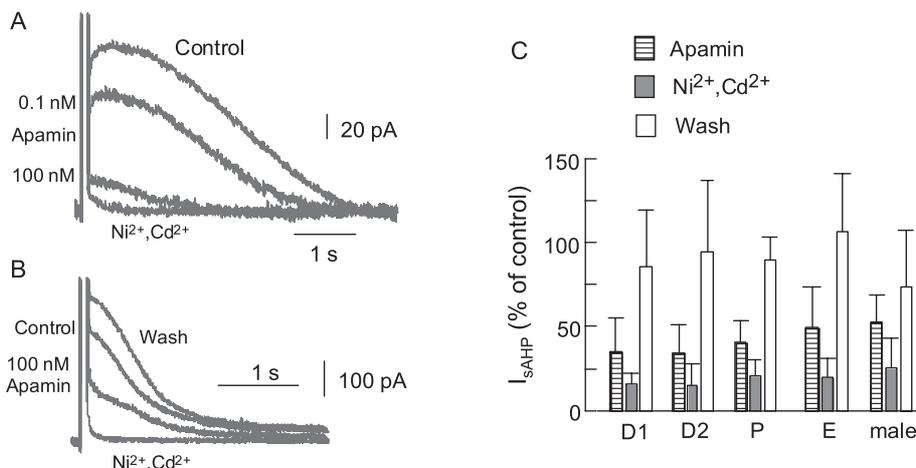


図5 緩徐後過分極電流に対するアパミンと Ni²⁺, Cd²⁺の阻害効果
 A, B, GnRHニューロンにみられる緩徐後過分極電流はSKチャネルの阻害剤として知られるアパミンで抑制される。細胞によって少し差はあるが, 100 nMで90%抑制される。また Ni²⁺ (100 nM)と Cd²⁺ (200 nM)でカルシウムチャネルを完全に阻害すると電流はほぼ100%抑制される。図には示していないが, GnRHニューロンはSKチャネルmRNAを発現している。C, アパミン, Ni²⁺, Cd²⁺による抑制効果と回復を雌の各性周期とオスについて示している。雌雄差, および性周期による影響は見られない。D, 発情間期; P, 発情前期; E, 発情期

イオン濃度の上昇だけに感受性を示すSKチャネルであり, 緩徐後過分極電流をおこします(図4, 5)。このチャネルは脱分極刺激に応じて持続的に活動電位を発生させるのに関与しています。さらに細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と膜電位(脱分極)の両方によって活性化されるBKチャネルがあります。これは活動電位の再分極過程に関与しますが, その発現はあまり高くありません。

ラットGnRHニューロンには以上のようにナトリウム, カリウムおよびカルシウムを透過するいくつかの種類イオンチャネルが発現しており, 膜興奮性と活動電位の発火パターンを決めていると考えられます。なお, これらの研究の詳細は文末の文献を参照して下さい。今後, 細胞膜上にどのような受容体が発現しているのかを明らかにし, GnRHニューロンの活動が脳のなかでどのように調節されているのかを解明したいと考えています。

これらの研究が臨床にどのような貢献をするのかは分かりません。役に立つか立たないかは重要なことですが, 基礎研究をこの基準だけで判断するのは大変危険なことだと思います。イオンチャネル研究の歴史(本

稿前半部)で記したとおりです。医学部以外に目を転じると, もっと明瞭になります。理学部や文学部がおかれている状況を少し見れば分かることです。何の役に立つかわからないような学問も大切なのです。それらによって少なくとも人は心を豊かにします。

文献

1. Kato M, Ui-Tei K, Watanabe M, Sakuma Y: Characterization of voltage-gated calcium currents in gonadotropin-releasing hormone neurons tagged with green fluorescent proteins in rats. *Endocrinology* 2003; 144: 5118-5125.
2. Watanabe M, Sakuma Y, Kato M: High expression of the R-type voltage-gated Ca²⁺ channel and its involvement in Ca²⁺-dependent gonadotropin-releasing hormone release in GT 1-7 cells. *Endocrinology* 2004; 145: 2375-2383.
3. Kato M, Tanaka N, Usui S, Sakuma Y: The SK channel blocker apamin inhibits slow afterhyperpolarization currents in rat gonadotropin releasing hormone neurones. *Journal of Physiology* 2006; 574: 431-442.

(受付: 2007年6月28日)

(受理: 2007年8月3日)