

論文審査の結果の要旨

氏名 和田恭高

多くの脊椎動物は、松果体や脳深部など網膜以外の組織においても光受容を行い、様々な生理機能を調節することによって環境に適応している。鳥類の場合、脳深部で受容した光情報をもとに日長を識別し、季節性生殖応答などの光周性応答を制御している。したがって、光周性の制御機構を分子レベルで解析するうえで、脳深部の光情報伝達経路の解明は極めて重要な課題である。本論文において論文提出者は、ハトを実験材料とし、脳深部光受容部位である外側中隔に発現する光受容蛋白質を探索し、さらにその情報伝達経路に関与する蛋白質群を解析した。

光周性生殖応答を誘起する光の作用スペクトルの解析結果から、脳深部の光受容物質は網膜の光受容物質（視物質）と同様の吸収波長特性を持ち、可視部の中波長領域（500nm 近傍）に吸収極大を有することが示唆されていた。中波長感受性の視物質としては、これまで桿体視物質ロドプシンと緑色感受性の錐体視物質（Green）が知られている。そこでまず、ハトロドプシンとハト Green をコードする cDNA の部分塩基配列をそれぞれ決定し、各々の遺伝子に対する PCR プライマーを作製した。外側中隔の RNA に対して RT-PCR を行った結果、ロドプシン遺伝子に対するプライマーを用いた場合にのみ期待長の DNA 断片が増幅された。そこでさらに、網膜と外側中隔からロドプシン cDNA をそれぞれ単離し、コード領域全長にわたって塩基配列を決定したところ、両者は完全に一致していた。以上の実験から、ハトの網膜と外側中隔には同一のロドプシン遺伝子が発現していることを明らかにした。また、ハトロドプシンの N 末端領域を認識する抗体（RhoN）を用いた免疫組織化学解析により、ハト外側中隔の側脳室周辺に局在するごく少数の細胞がロドプシンを発現していることを見出した。これらロドプシン発現細胞は、側脳室に向けた短い突起と、軸索様の長い突起を備えていることから、脳脊髄液接触神経であると推定された。

外側中隔にロドプシンが発現していることから、脳深部における光情報伝達経路は視細胞の光情報伝達経路に類似していると推測された。視細胞では、[光受容蛋白質の光活性化→三量体 G 蛋白質トランスデューシンの活性化→cGMP 分解酵素（phosphodiesterase; PDE）の活性化→細胞内の cGMP 濃度の低下→

cGMP 依存性カチオンチャネルの閉鎖] という光情報伝達経路を介して光情報が電気信号に変換される。そこで、トランスデュースン、cGMP-PDE ならびに cGMP 依存性チャネルに着目し、ハト外側中隔における発現の有無を調べた。

まず、桿体型トランスデュースンの α サブユニット (Gt1 α) に対する抗体を用いてハト脳切片に対する免疫染色実験を行い、Gt1 α が外側中隔の脳脊髄液接触神経に発現していることを見出した。さらに抗 Gt1 α 抗体と RhoN 抗体を用いた二重染色実験から、脳脊髄液接触神経にロドプシンと Gt1 α が共局在している事を明らかにした。次に、cGMP-PDE の触媒サブユニット (α , β , α') の間で保存された部分配列に対する縮重プライマーを用いて RT-PCR を行い、外側中隔に β サブユニット (桿体型サブユニット) が発現していることを見出した。同様の解析を cGMP 依存性チャネルの α サブユニットについて行ったところ、桿体型ではなく錐体型 α サブユニットが外側中隔に発現していることが判明した。そこで、錐体型チャネル α サブユニットの細胞外配列を抗原として抗体 (PCC-L5 抗体) を作製し、抗 Gt1 α 抗体と PCC-L5 抗体を用いて二重染色実験を行ったところ、ハト外側中隔の同一の細胞が陽性反応を示した。以上の実験結果から、ハト外側中隔の光受容細胞には、桿体型分子と錐体型分子の混成からなる光情報伝達経路が備わっていると推定された。

光周性の生殖応答が誘導される際に、光情報 (または日長情報) は性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 細胞に入力し、視床下部-下垂体経路を介して生殖腺に伝達されると考えられている。最近、ハトの視床下部において神経ペプチド VIP 陽性の軸索が、GnRH 産生細胞とシナプスを形成していることが報告された。また、ハト外側中隔の脳脊髄液接触神経には、VIP が発現していることが報告されていた。そこで、RhoN 抗体と抗 VIP 抗体を用いて二重染色実験を行い、外側中隔の脳脊髄液接触神経にロドプシンと VIP が共局在している事を見出した。以上の知見は、光 (または日長) 情報が脳深部光受容細胞から GnRH 細胞にシナプスを介して直接伝達される可能性を示唆している。

なお、本論文は、岡野俊行氏、深田吉孝氏、足立明人氏、海老原史樹文氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったものであり、論文提出者の寄与が充分であると判断する。

以上、本論文は博士 (理学) の学位にあたいするものと認められる。