

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 川口 奈々美

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(corticotropin-releasing hormone; CRH)はアミノ酸41個からなる神経ペプチドで、下垂体からの副腎皮質刺激ホルモンの分泌を促進し、ストレス応答に関わることが知られているが、魚類における研究は大きく立ち遅れている。

これまで、脊椎動物種はCRHファミリーとしてCRHとウロコルチン(Urocortin; Ucn)またはウロテンシンI(Urotensin I; UI)をもつと考えられてきた。しかし近年、哺乳類においてUcn2およびUcn3と呼ばれる新たなCRHファミリー分子が発見されたが、その他の脊椎動物ではそれらの存在は確認されていない。CRHファミリー分子の機能は、CRH受容体(CRH receptor; CRH-R)によって介在される。魚類においてもCRH-Rが単離されたが、CRH-Rの種類およびその発現部位は魚種により異なり、それらの生理学的機能はまったく解明されていない。

魚類のストレス応答を理解することは健全な魚類の増養殖を目指す上で極めて重要であるが、CRHファミリーおよびCRH-Rの構成因子の複雑さがその理解を遅らせる原因のひとつとなっている。現在までのところ、哺乳類以外ではひとつの動物種において全てのCRHファミリーとCRH-Rについての研究がなされた例はない。本研究は、ゲノム解析が進んでいて遺伝子の探索に有利であるメダカ(*Oryzias latipes*)を実験モデルに選定し、CRHファミリーおよびCRH-Rの探索、構造および発現解析を試みたものである。

### 第1章 CRHファミリー遺伝子とその構造

本章ではまず、メダカからCRHファミリーのクローニングを試みた。その結果、メダカからCRH、UIに加えて、新たに2種類のCRHファミリー遺伝子が単離された。これらは遺伝子のexon/intron構造、分子系統樹およびメダカのドラフトゲノムデータとヒトゲノムデータの間でのシンテニー解析から、これら4つの遺伝子は同じファミリーに属することが確認された。メダカで新たに得られた2つの遺伝子は分子系統樹から哺乳類のUcn2とUcn3とそれぞれ近縁であったため、本研究ではこれらの遺伝子をUcn2およびUcn3とした。

### 第2章 CRHファミリー遺伝子の発現

CRHは脳、生殖腺、尾部神経分泌系で、UIは脳、鰓、心臓、間腎腺、肝臓、生殖腺、尾部神経分泌系で、Ucn2は脳、鰓、尾部神経分泌系で、またUcn3は脳、鰓、間腎腺、生殖腺、尾部

神経分泌系で、それぞれ発現が認められた。これらの遺伝子が異なる発現部位を示したことから、CRHファミリー分子は異なる生理作用をもつことが示唆された。CRH遺伝子については、脳の広い範囲に発現し、特に中脳および小脳において強く発現する細胞群が確認された。

次に日周リズムによる影響を調べた結果、CRHファミリー遺伝子の中で唯一CRHだけが明期に暗期よりも有意に高い値を示した。体内のコルチゾル含量もCRH遺伝子と同様に、明期に暗期よりも有意に高かった。次に追い回しおよび拘束によりメダカに短期的ストレスを与えたところ、いずれのストレス時にも体内のコルチゾル含量は増加した。CRHファミリー遺伝子では、UIだけで発現の上昇がみられたが、この変動はコルチゾルの増加よりも遅れて生じた。以上のことから、明暗リズムに伴う基礎代謝の変動においてはCRHが脳-下垂体-間腎腺系の亢進に関与し、短期的ストレスに対してはUIが応答していることが示された。

### 第3章 CRH受容体cDNAの検索

メダカから2種類のCRH-Rが得られた。そのうちのひとつは分子系統樹上でCRH-R1のグループに属し、もう一方は、既知のCRH-R2のグループに属していたことから、これらの受容体をCRH-R1およびCRH-R2とした。CRH-R1は脳、心臓、鰓、生殖腺と尾部神経分泌系において発現が認められたのに対し、CRH-R2は脳、心臓、鰓、生殖腺、尾部神経分泌系、間腎腺および肝臓において発現が確認された。さらに脳を部位ごとに切り分けRT-PCRを行ったところ、双方の受容体遺伝子は広い範囲に発現していたが、下垂体においてはCRH-R1遺伝子の発現だけが認められた。これらの結果、CRH-Rは異なる生理的役割をもち、特に下垂体ではCRH-R1がCRHファミリー分子の作用を介することが示された。

以上、本論文は、メダカのCRHファミリー分子とその受容体であるCRH-R遺伝子の全てを、魚類で初めて単一種から単離し、これらの遺伝子の発現変動の解析からストレス応答についての新たな知見を得たもので、学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと判断した。