

論文審査の結果の要旨

氏名 榎本 匡宏

GnRH は、リガンド及び受容体の広範な発現分布から、自己・傍分泌因子として多様な生理機能をもつことが示唆されている。特に、脾臓、胸腺、卵巣においては、GnRH が細胞の増殖を促進あるいは抑制することで免疫修飾や卵胞の発育・退行制御作用をもつことが明らかになり、GnRH による細胞増殖制御の分子機構は細胞株や初代培養系を用いて国内外で盛んに研究が行われてきた。本論文の研究内容は、論文提出者が修士課程の研究で発見したコロニー形成に対する GnRH の正と負の制御に注目し、その詳細な特性と作用機序について 4 種類の細胞株 (TSU-Pr1, Jurkat, DU145, HHUA) を実験モデルとして行った結果をまとめた内容である。そして本研究で明らかになった多様な GnRH の生理機能の背後にある情報伝達系の共通性と各生理現象に特異的な分子機構を議論するとともに、その進化的意義についての考察が述べられている。

論文は 3 章からなり、先ず第 1 章では GnRH による正負のコロニー形成制御の特性を解析している。その結果、正と負の相反する GnRH の作用は異なるリガンド選択性を示すことを明らかにした。このようなりガンド選択性の違いは、正負の作用が異なる GnRH 受容体を介していることを示唆している。第 1 章の結果を受けて、第 2 章では各 GnRH 受容体サブタイプがいかにこの現象に関わっているかを解析している。ゲノム上に 2 種類存在することが知られているヒト Ⅰ型、Ⅱ型 GnRH 受容体の発現を RT-PCR により解析したところ、GnRH 刺激に対して正に応答する細胞株 (TSU-Pr1, Jurkat) と負に応答する細胞株 (DU145, HHUA) の発現パターンに明確な差異は見られなかった。しかし、RNA 干渉法を用いて各 GnRH 受容体サブタイプの発現を抑制し GnRH に対する応答を調べたところ、以下のような興味深い結果が得られた。Ⅰ型受容体は、正負どちらの作用においても 3 種すべての GnRH の作用に関して必須であった。また、Ⅱ型受容体は、正負どちらの作用においても GnRH-II と Cetrorelix の作用に必要であった。さらに、Ⅰ型受容体 splice variant は GnRH に対する正の応答に必要であり、反応の方向性の決定に関与することが示唆された。ヒト Ⅰ型 GnRH 受容体は、その遺伝子配列の欠陥から偽遺伝子であると考えられてきたが、本研究の結果は Ⅰ型受容

体が機能的であることを示している。

以上の研究過程において、GnRH により培養デッシュ上の細胞の局在が変化することを発見し、第 3 章ではその詳しい解析を行った。先ず、走化性や細胞移動の研究にしばしば用いられる modified Boyden chamber assay を用い、chamber の下側に conditioned medium を与えた際の細胞移動に対する GnRH の影響を調べた。その結果、TSU-Pr1 では細胞移動が促進されたが、DU145 では逆に抑制された。この結果から GnRH が細胞のアクチン骨格に影響を及ぼすことが予想されたため、phalloidin 染色によりアクチン骨格に対する GnRH の制御を調べた。その結果、GnRH により TSU-Pr1 は filopodia 形成の促進が、DU145 では stress fiber 形成の促進が観察された。また、このような細胞アクチン骨格系の変化には Rhoファミリー-G タンパク質 (Rac1, Cdc42, RhoA など) の関与が報告されているので、Rac1, Cdc42, RhoA の dominant-negative mutant (順に Rac1 T17N, Cdc42 T17N, RhoA T19N) を用いてその可能性を調べた。結果、TSU-Pr1 では Rac1 T17N, Cdc42 T17N の発現により GnRH 作用が観察されなくなり、DU145 では RhoA T19N の発現により GnRH 作用が見られなくなった。また、Rac1, Cdc42, RhoA の活性化は、正負の細胞移動の制御のみならず、正負のコロニー形成の制御にも関与していることも同様の実験で示された。

以上のような研究成果は GnRH 生理機能と GnRH 情報伝達系の進化を考える上で大変重要な知見であり、論文提出者の研究成果は博士 (理学) の学位を受けるにふさわしいと判定した。

なお、本論文の第 1 章の一部は、Seong, Jae Yong、川島誠一郎、朴民根と、第 1 章と第 2 章の一部は遠藤大輔、川島誠一郎、朴民根と、General introduction と General discussion の一部は朴民根と、そして第 3 章は、内海真理、朴民根との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験の計画と実施を行ったものであると認められる。したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。