

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤岡 仁美

ほ乳類の生殖機能は中枢神経系により高度に制御されており、その制御の要となるのが性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンである。GnRH ニューロンは発生期の嗅板で初めて検出され、前脳向かって遊走・侵入し、視索前野視床下部前部に移動してネットワークを形成するとともに、正中隆起を含む投射領域に軸索を伸ばす。本研究では、胎生後期の GnRH ニューロン系のネットワーク形成期に着目し、まず GnRH ニューロンを簡便に識別できる実験系の確立を目指した。続いて、中枢神経系の細胞による GnRH ニューロンの機能制御系として $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) による GnRH の転写活性制御に関しての検討を、GnRH ニューロンの形態変化制御系として神経突起伸長に関与する因子とその作用機序に関して検討を行った。

第一章では、GnRH ニューロンを簡便に識別可能な実験系の構築を目指し、ラット GnRH 5' 端転写制御領域に蛍光タンパク質である Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子を繋いだ組み換え DNA (pGnRHpro-EGFP) を作成し、*in vitro* での GnRH ニューロンの可視化を試みた。GT1-7、C-6、CHO-K1、JEG-3 の各細胞株へリポソーム法を用いて一過性遺伝子導入を行った結果、齧歯類由来の GnRH 産生細胞である GT1-7 と CHO-K1 特異的に EGFP を発現することが示された。そこで、第二章では、個体レベルでの GnRH ニューロン解析モデルとして、GnRHpro-EGFP 組み換え DNA を用いてトランスジェニック (TG) ラットの作出を行った。この TG ラットでは GnRH 免疫陽性 (ir) 細胞の約 76% で EGFP が発現していた。一方、GnRH-ir 細胞外では、EGFP の蛍光は観察されなかった。また、EGFP の発現量は GnRH 遺伝子転写活性を反映すると考えられることから、EGFP が観察されない GnRH ニューロンが存在することは、GnRH ニューロンが転写活性の異なる多様な細胞集団から構成されていることを示唆している。

第三章では、GnRH ニューロンのネットワーク形成期の GnRH 遺伝子制御系として、胎生後期の GnRH 遺伝子発現への GABA の作用を検討した。まず、胎齢 18.5 日のラットの脳組織を用いた免疫組織化学的実験により、GnRH ニューロンの存在する領域で広くグルタミン酸脱水素酵素 (GAD) 67 免疫陽性細胞が見られ、また GABA-A 受容体、GABA-B 受容体免疫陽性の GnRH ニューロンが存在することが明らかとなった。次に、胎齢 18.5 日 TG ラット視床下部初代培養を用いて、GABA の GnRH 遺伝子発現に対する影響を観察した。その結果、GABA とムシモール (GABA-A 受容体作動薬) 処置により、EGFP 陽性細胞数/GnRH-ir 細胞数の比率が上昇することが示された。これらの結果から、胎生後期の視床下部では、GABA が GnRH ニューロンでの GnRH の産生を促進する方向に働いていることが示唆された。GABA は GnRH ニューロンの生存を維持するとともに、GnRH の合成、分泌を促進することで、回路上 GnRH ニューロンの下流に存在する GnRH 受容体を持つ細胞

胞の活動や生存にも影響を与えていると考えられる。

第四章では、胎齢 18.5 日ラット視床下部初代培養を用いて、GnRH ニューロンの神経突起伸長に対する GABA、GnRH、インスリン様成長因子 (IGF) -1、及び繊維芽細胞成長因子 (FGF) -2 の影響を調べた。その結果、チロシンキナーゼ型受容体 (TKR) をもつ FGF-2 の処置では有意に神経突起が伸長し、IGF-1 処置では伸長する傾向が観察された。一方、GABA 及び GnRH の処置では神経突起伸長に影響は見られなかった。更に、PD98059 (MEK 阻害薬) の前処理により FGF による神経突起伸長効果が減弱されたことから、MEK/ERK 経路が FGF による GnRH ニューロンの神経突起伸長に関与することが示唆された。

以上、本研究により TKR を介するシグナルは GnRH ニューロンの形態変化に、脱分極シグナルは GnRH 転写制御を含む機能的制御に関与していることが示された。脱分極刺激が形態変化を促進することが報告されている神経モデルもあることから、これらの結果を更に吟味することで、各ニューロン系特異的なネットワーク形成機構の特徴が更に明らかになることが期待される。更に、本研究で上げられた因子や細胞内シグナル伝達経路の精査は、視床下部性腺機能低下症の発現機序の解明にも貢献するものと考えられ、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものとして認めた。