

## 論文の内容の要旨

論文題目 Comparative Biology on the Molecular Diversity of GnRH Systems

(GnRH 情報伝達系における分子多様性の比較生物学的研究)

氏名 池本 忠弘

生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、脳下垂体における生殖腺刺激ホルモンの合成と放出を促進する視床下部ペプチドとして同定された。その機能から、GnRH は脊椎動物の生殖機能の制御において中心的な役割を担っていると言える。その後の研究により、複数分子種の GnRH またはその受容体をもつ動物種の存在が明らかになり、GnRH は多様な生理的役割を担っていると考えられている。しかし一方で、GnRH またはその受容体が一分子種しか同定されない動物種も依然として多く、単一動物種における GnRH とその受容体の遺伝子の多重性が、ある動物種にのみ特異的であるのか、あるいは脊椎動物全般で普遍的であるのかは未解決であった。更に、遺伝子の多重性が各動物種において GnRH の生理作用にどのような影響を及ぼしているかに関しては全く未解明であった。GnRH とその受容体の分子進化の解明は、GnRH の生理的役割の普遍性と種特異性を理解する上で極めて重要な課題である。しかしながら、GnRH に関する研究は特定の動物種に限られたものが多く、比較生物学的な観点で様々な動物種を対象とする研究は限られたものであった。

本論文は、こうした状況を背景に「単一動物種における GnRH とその受容体の遺伝子数」及び「GnRH とその受容体の遺伝子の多重性の意義」を主たる論点としたものであり、以下の二章から構成される。まず第一章では、GnRH 情報伝達系の分子進化の解明を行った。脊椎動物の様々な動物種における GnRH とその受容体の遺伝子の同定により、GnRH 情報伝達系の分子多様性を明らかにした。ついで第二章では、GnRH 情報伝達系の分子多様性がもつ意義の解明を行った。ヒョウモントカゲモドキの脳下垂体前葉では GnRH 受容体が一分子種のみ発現するのに対し、生殖腺では複数分子種が発現することが明らかになったことから、便宜上この動物種を基準とし、脊椎動物の生殖腺と脳下垂体における GnRH 系を比較解析した。それにより受容体分子種間での相互作用の存在や GnRH とその受容体の組合せによる細胞応答の制御機構の存在を明らかにした。

第一章：GnRH とその受容体の遺伝子の分子進化

ゲノムデータベースの利用が可能な動物種を含め、脊索動物門の各動物綱において GnRH とその受容体の遺伝子の同定を行った。その結果、各動物種のもつ GnRH やその受容体の遺伝子数が動物綱間で、ときには同一動物綱内で著しく異なるということが明らかになった(表1)。脊索動物門の他にも、棘皮動物門や節足動物門、軟体動物門、線形動物門からも GnRH またはその受容体のホモログが同定されたが、脊索動物のものとの共通の祖先をもつ相同関係にあるかについては、更なる解析が必要である。

表 1. GnRH とその受容体の分類と各動物綱における遺伝子数

(A) GnRH 遺伝子						(B) GnRH受容体遺伝子								
		I型	II型	III型	総数			I型	IV型	II型	III型	総数		
脊索動物門	哺乳綱	1	0-1 $\phi$	0	1-2		脊索動物門	哺乳綱	1	0	0-1 $\phi$	0	1-2	※
	鳥綱	1	1	0	2	※	鳥綱	0	1	0 $\phi$	1	2	※	
	爬虫綱	0-1	1	0	1-2	※	爬虫綱	0	1	1	1	3	※	
	両生綱	1	1	0	2	※	両生綱	0	1	1	1	3	※	
	条鰭綱	0-1	1	0-1	2-3	※	条鰭綱	0	1-2	0	1-3 $\phi$	2-5	※	
	軟骨魚綱	0 $\phi$	1	0 $\phi$	1	※	軟骨魚綱	1	1	?	?	2?	※	
	頭甲綱	0	2	0	2	※	頭甲綱	2		1		3	※	
	ホヤ綱	2		2			頭索綱	4			4	※		
						ホヤ綱	4 $\phi$			4	※			
						棘皮動物門	ウニ綱	3			3	※		

シンテニー関係と分子系統樹を基にサブタイプを分類。

※, 本研究による。 $\phi$ , 偽遺伝子を除く。

「総数」は偽遺伝子を除いた値。動物の系統分類は Benton (2004) と Nelson (2006) による。

GnRH とその受容体の遺伝子の多重性が脊索動物門で普遍的に見られる事象であることが明らかになったが、同時に鳥綱や哺乳綱の多くの動物種で GnRH 情報伝達系の分子多様性が失われているということも明らかになった。すなわち鳥綱や哺乳綱では各動物種で独立に I 型 GnRH または II 型受容体の遺伝子に偽遺伝子化が生じていた。他の研究者の報告を併せると、哺乳綱では 35 種中 23 種で I 型 GnRH または II 型受容体の遺伝子が偽遺伝子化しており、そのうち少なくとも 13 種では両者が偽遺伝子化していることがわかった。一方、哺乳綱には更に I 型 GnRH と II 型受容体が存在するが、両者で偽遺伝子化は見られなかった。これらのことは、哺乳綱では I 型 GnRH の生理的役割が、II 型 GnRH あるいは他の生理活性物質により代償されている可能性や、不必要なものとなっている可能性を示唆するものである。I 型 GnRH の保持に関しては、生殖腺刺激ホルモンの放出があらゆる脊椎動物の種の保存に必須のものであり、II 型 GnRH ニューロンが視床下部あるいは視索前野に位置し視床下部 - 脳下垂体 - 生殖腺軸の構成要素であることが大きく影響しているものと考えられる。

## 第二章：GnRH 情報伝達系の分子多様性の意義

GnRH 受容体 mRNA の発現解析の結果、組織分布は動物種間で一定ではないものの、生殖腺における発現が、脳下垂体という独立した器官をもたないホヤ綱を含む脊索動物門の各動物綱で普遍的に見られる事象であることが明らかになった。棘皮動物門の動物種においても生殖腺で GnRH 受容体ホモログが発現していた。このことは、GnRH が脳下垂体の出現以前から生殖腺において何らかの生理的役割を担い、かつその役割が脳下垂体の出現以後も進化的に意義ある形で保持されてきたことを示唆するものである。また条鰭綱や両生綱、爬虫綱では、脳下垂体で発現が検出されない受容体分子種が存在しており、生殖腺ではそれらが発現していることが明らかになった。またヒョウモントカゲモドキやミドリフグでは受容体遺伝子の選択的スプライシングが検出され、遺伝子の多重性に加え多様な発現制御により GnRH 情報伝達系の分子多様性が更に増加することが示唆された。

次に、偽遺伝子化が見られた鳥綱や哺乳綱と同じ有羊膜類に属しながら GnRH とその受容体の遺伝子で多重性を保持している爬虫綱ヒョウモントカゲモドキにおいて、受容体の発現動態を詳細に解析した。GnRH 受容体の機能解析として、一般的にはイノシトール 1,4,5-三リン酸 ( $IP_3$ ) の産生が指標とされてきたが、ヒョウモントカゲモドキ 型受容体(R1)では  $IP_3$  産生が検出されなかった。このため、多様な細胞刺激によって発現が変動する *c-fos* 遺伝子に着目し、*c-fos* mRNA 発現量を指標とする受容体の機能解析系を新規に開発した。この解析系により、ヒョウモントカゲモドキ GnRH 受容体三種全てが実際に GnRH の受容体であり、かつ互いに異なる薬理学的性質をもつことが示された。

ヒョウモントカゲモドキ GnRH 受容体 mRNA は、脳下垂体前葉では産卵期及び非産卵期を通して 型受容体(R1)のみ検出されたのに対し、生殖腺では三種全てが検出された。この動物種では 型受容体(R1)を介して生殖腺刺激ホルモンの放出が促進されているものと考えられる。定量 RT-PCR の結果、脳下垂体や生殖腺において受容体の発現量が季節変動することが明らかになった。更に卵巣では、卵胞の発育段階や季節変化に応じて受容体の発現量が変動した。*in situ* hybridization の結果、顆粒膜細胞において三種の共発現が示唆された。そして 型受容体(R2)の  $IP_3$  産生能が 型受容体(R1)あるいは 型受容体パリアントとの共発現により阻害されることや、 型受容体(R3)と 型受容体(R1)の共発現により *c-fos* mRNA 発現が増強されることが明らかになった。これらのことは、受容体情報伝達系間でのクロストーク機構の存在や、GnRH とその受容体の組合せにより多様な細胞応答が誘起されるということを示唆するものである。GnRH とその受容体の遺伝子の多重性は、リガンドと受容体または受容体サブタイプ間の組合せの多様性を産み出し、複雑な細胞応答の実現に寄与しているものと考えられる。

連綿と続く生物進化の過程で、生命現象を司る基本的機構は生物種を問わず広く保存されてきたと考えられている。しかし、観察された事象がその生物種に特異的であるか、あるいは他の生物種においても普遍的であるかを判別するためには、この「前提」を健全に疑って比較生物学的な観点で網羅的に調べる必要があると言える。実際、GnRH 情報伝達系の分子的基盤である GnRH とその受容体の遺伝子数が動物種間で大きく異なることが明らかになったため、複数の動物種を対象とした。そして受容体の組織分布は動物種間で異なるものの、生殖腺における受容体の発現が脊索動物門で普遍的に見られる事象であることが明らかになった。また有羊膜類の進化の過程で GnRH 情報伝達系の分子多様性が失われつつあるものの、GnRH とその受容体の遺伝子の多重性が脊索動物門で普遍的に見られる事象であることが明らかになった。そしてヒョウモントカゲモドキの顆粒膜細胞での複数の受容体分子種の共発現が明らかになり、GnRH とその受容体の組合せにより細胞応答が制御されることが直接示された。

本論文の結果から、更に新たな論点が浮かび上がってきた。すなわち「脳下垂体外における GnRH の生理的役割の意義」である。テンジクネズミやカイウサギでは、型 GnRH と 型受容体の両遺伝子が偽遺伝子化しており、型 GnRH の発現が脳に、型受容体の発現が脳下垂体に限定されていた。これらの動物種では GnRH の生理的役割が生殖腺刺激ホルモンの放出に特殊化していることが示唆された。一方、ヒョウモントカゲモドキでは、季節や発育段階に応じて受容体の発現が大きく変動するとともに、複数の受容体分子種が共発現しており、受容体情報伝達系間でのクロストーク機構の存在が示唆された。またゼブラフィッシュでは、胚発生時の GnRH 発現の抑制が脳形成不全を引き起こすという報告がある。これらのことから、GnRH の生理的役割は動物種ごとに大きく異なるものと考えられる。GnRH の生理作用の普遍性と種特異性に関して、特定の動物種での結果のみから結論付けることは不適當であり、更なる比較生物学的解析が肝要であると言える。GnRH は、脳下垂体を介して間接的に生殖腺に作用するとともに、生殖腺での受容体を介して直接的にも作用し得ることから、各動物種の生殖戦略に大きく影響を及ぼしてきたことが考えられる。GnRH の脳下垂体外における生理的役割、とりわけ生殖腺における生理的役割の解明は、脳下垂体の出現以前から存在する GnRH 情報伝達系の進化と意義の全容の解明に繋がるものと期待される。