

論文審査の結果の要旨

氏名 神田 真司

本論文は4章からなる。第1章では、脊椎動物において生殖機能を中枢制御する機構としての視床下部-脳下垂体-生殖腺 (HPG)軸における性ステロイドフィードバック作用に関して、本学位論文で実験動物として用いるメダカにおいてそれがどのように機能しているかを解析している。この章ではゲノムデータベースを用いたシンテニー解析により、硬骨魚類の生殖腺刺激ホルモン遺伝子のうち、LH β 遺伝子が四足動物の LH β 遺伝子と異なる遺伝子座を持ち、ゲノム構造に大きな違いがあることが示唆された。このことから、硬骨魚類 LH β は四足動物とは異なる発現制御を受けていることが予想され、実際、メダカでは性ステロイドの低い状態では FSH の分泌により生殖腺の成長が促されて成熟が進み、卵巣の性ステロイド分泌が盛んになるにつれて FSH 分泌は減少、正のフィードバックによって LH 分泌が促進されることによって LH サージを引き起こすという、哺乳類等とは異なるメカニズムが示唆された。また、メダカは正負双方のフィードバックのメカニズムを下垂体レベルで解析できる極めて有用な実験動物であることも明らかとなった。

第2章では、GnRH ニューロンを制御する最も重要なニューロンとして現在

注目を浴びるようになったキスペプチンニューロン (遺伝子は *kiss1*) について非哺乳類で初めて配列を発見し、その遺伝子発現の特徴について解析している。発見した遺伝子の配列を元に *in situ hybridization* (ISH) 法を用いて脳内の *kiss1* 遺伝子発現ニューロンの分布を調べると、視床下部の神経核 NVT 他 2カ所に *kiss1* 発現ニューロンが見られた。しかし、このうち NVT の *kiss1* 発現ニューロンのみに顕著な性差 (雄>>雌) が存在し、卵巣由来のエストロゲンによる遺伝子発現の促進を受けることが明らかとなった。また、このエストロゲン感受性は NVT の *kiss1* 発現ニューロンに同時に発現しているエストロゲン受容体 α を介することも明らかとなった。

第3章では、*kiss1* 遺伝子のパラログ遺伝子として今回の研究で発見された *kiss2* についても ISH 法を用いて、ステロイド感受性、生殖・非生殖状態における発現変動の解析を行い、*kiss2* ニューロンが視床下部の神経核 NRL に局在すること、NVT の *kiss1* ニューロンとは異なり、ステロイド感受性、生殖・非生殖状態における発現変動を一切

示さないことが明らかとなった。さらに、二重 ISH 法を用いて *kiss1*、*kiss2* ニューロンがエストロゲン受容体 α を共発現する可能性を検証したところ、NVT の *kiss1* ニューロンのみがエストロゲン受容体 α を発現していることが明らかになった。これは、卵巣除去実験により証明された NVT の *kiss1* 遺伝子発現のステロイド感受性と整合し、メダカキスペプチ

ンニューロンの中で、NVT *kiss1* ニューロンのみがポジティブフィードバックに関与し、NRL *kiss2* ニューロンは関与しないことが強く示唆された。

第 4 章では、ステロイドフィードバックに関与することが明らかになった Kiss1 ニューロンの免疫組織化学を行った。NVT に存在する Kiss1 ニューロンの GnRH1、2、3 ニューロンへの投射を検証したところ、生殖機能を制御する GnRH1 ニューロンのみに投射が確認され、神経修飾作用を司る GnRH2、3 ニューロンへは全く投射が認められなかった。次にキスペプチン受容体を 2 種類クローニングし、脊椎動物には *kissr1*、2、3、4 が存在することを分子系統的な解析から提唱した。このうち、*kissr2*、4 がメダカ脳には存在し、これらは Kiss1 免疫陽性線維投射と同じく GnRH1 ニューロン近傍にのみ発現が見られた。2 重標識 ISH で解析したところ、キスペプチンが局所介在ニューロンを介して GnRH ニューロンを制御している可能性が示唆された。

このように、メダカの実験動物としての利点を最大限に活用することにより、脊椎動物に普遍的に備わっている、キスペプチンニューロンを中心とする生殖の中枢制御機構の解明に大きく一歩踏み出すことができた。これらの論文の各章で示された研究成果は脊椎動物における生殖の中枢調節機構を理解す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、本論文第 1 章は大久保範聡、岡良隆との、第 2 章は赤染康久、松永拓也、山本直之、山田俊二、東村博子、前多敬一郎、岡良隆との、第 3 章は三谷優太、赤染康久、善方文太郎、岡良隆との、第 4 章は赤染康久、大久保範聡、岡村裕昭、岡良隆との共同研究であるが、すべての研究は論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。