

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 丹藤 由希子

---

脊椎動物の重要な内分泌機構の一つに視床下部一下垂体系がある。これは中枢神経からの情報と体の各所の機能を結ぶ脊椎動物に固有の内分泌経路である。本論文は、この視床下部一下垂体系の進化の側面から研究し、この系を担う内分泌器官の原型および根本的な役割を明らかにすることから、脊椎動物における内分泌機能の理解を深めることを目的とする。そのために、脊椎動物と近縁なナメクジウオ（脊索動物門頭索動物亜門、*Branchiostoma belcheri*）を用い、内分泌物質の探索とそれらの存在部位を分子生物学的に解析し、さらには比較ゲノム解析を行い、内分泌系の進化について新たな知見を得た。

論文は7章からなり、第1章の序では本研究に関する過去の研究をレビューし、本研究の着想に至った経緯について述べている。第2-6章は各論である。第7章は総合考察で、視床下部一下垂体系の進化について、豊富な文献を引用して仮説の検証から立証へと論を進めている。

第2章では、ナメクジウオにおける視床下部一下垂体系に関与する遺伝子の有無を網羅的に解析した。分泌顆粒の存在と形態的特徴から下垂体と相同な器官であるとされてきたハチェック小窩を調べた。レーザーマイクロダイセクション法および超微量質量分析解析法を用い、ハチェック小窩で発現する遺伝子およびタンパク質断片を直接探索した。前者の方法ではハチェック小窩だけをレーザー切除して集め、遺伝子ライブラリーを作成し、網羅的遺伝子解析を行った。次に、LC-MS/MS法によるハチェック小窩のアミノ酸配列解析を行った。いずれの実験からも下垂体ホルモン遺伝子の転写産物ないしは下垂体ホルモンは得られなかったが、分泌に関係する遺伝子が得られており、ハチェック小窩は下垂体の祖先器官とは言えないが、分泌に関する器官であることが示された。

第3章では、動物界に広く存在する糖タンパク質ホルモンの1種で、下垂体でも合成・分泌されている **Thyrostimulin** の相同遺伝子について、ナメクジウオにおけるこの糖タンパク質ホルモンの構造を解析した。脊椎動物の下垂体糖タンパク質ホルモンは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のヘテロダイマーであり、**Thyrostimulin** はそれぞれに相当する **GPA2** と **GPB5** の2つのサブユニットからなる。ナメクジウオから **AmpGPA2** と **AmpGPB5** の遺伝子を単離し、脊椎動物との比較および立体構造の構築により重要な必須アミノ酸が保存されていることを示した。次に、カイコで発現させた両サブユニットを糖鎖切断処理し、糖の付加を確認した。さらに、化学的架橋処理によってヘテロダイマーの形成を確認し、ナメクジウオでは **Thyrostimulin** が唯一の下垂体ホルモンに相当する機能タンパクであることを明らかにした。

第4章では、下垂体糖タンパク質ホルモンの系統関係を明らかにした。**AmpGPA2** と **AmpGPB5** のイントロン-エキソン構造は、下垂体糖タンパク質ホルモン遺伝子と同様であり、ゲノム上の両サブユニット遺伝子座は近接していた。遺伝子の並び順を比較するシ

ンテニー解析では、下垂体糖タンパク質ホルモン遺伝子は無脊椎動物から脊椎動物への進化に至る2回のゲノム重複で分化したこと、 $\alpha$ 鎖の一部は重複後に欠失したことが明らかとなった。

第5章では、*AmpGPA2*と*AmpGPB5*の発現を*in situ*ハイブリダイゼーション (ISH)法で調べた。神経索前方の頭部に相当する部分の神経細胞、鰓、生殖腺に発現がみられ、ハチェック小窩には発現がなかった。さらに、蛍光二重染色法で両サブユニットが同じ細胞で合成されることを明らかとし、ナメクジウオのThyrostimulinは下垂体糖タンパク質ホルモンと同様に合成・分泌される可能性を示した。

第6章では、視床下部一下垂体系のホルモンと相同なナメクジウオのホルモン遺伝子として、バソトシン、GnRH受容体、エストロゲン受容体の遺伝子発現をISHで明らかにした。いずれも神経索前部での発現が見られ、さらに総合すると、異なる局在部位が神経索に存在することがわかった。

第7章では、以上の各章での結果と考察から、ナメクジウオの神経索は神経内分泌機構の中枢であり、視床下部一下垂体系は神経索中の特異的な部位での連携であることが示唆された。そして、この系は脊椎動物に進化して獲得されたと考えられた。最後に下垂体の祖先器官は存在しないが、その内分泌機構は神経内分泌機構として祖先動物に存在していたと結論した。

本論文は脊椎動物の内分泌系の進化に新たな知見を与えた研究であり、水圏無脊椎動物および魚類における内分泌系の本質を理解する上で大きな意義を持つ。よって、審査委員会は、申請者丹藤由希子の本論文が、博士(農学)の学位授与に価するものと判断する。