

## 審査の結果の要旨

氏名 細野 耕平

コルチコトロピン放出ホルモン (CRH) ファミリーとよばれる一群の神経ペプチドは、ストレス応答を中枢レベルで制御する主因子として広く知られており、脊椎動物の中でよく保存されている。しかし、魚類での CRH ファミリー研究は大幅に遅れており、魚類がどのような CRH ファミリー分子をもち、それらの分子がどのような制御を受け、どのような機能をもっているのかを体系的に解析した研究はこれまでなかった。そこで本研究では、メダカをモデル魚として用いて、これらの疑問に回答を与えることを目指した。

第1章ではまず、メダカがもつ全ての CRH ファミリー遺伝子と CRH 受容体遺伝子のクローニングを試みた。その結果、齧歯類で報告されている CRH ファミリー遺伝子 (*Crh*, *Ucn1*, *Ucn2*, *Ucn3*) とその受容体遺伝子 (*Crhr1* と *Crhr2*) の全てのオースログをクローニングすることができた。メダカの脳におけるそれらの遺伝子の発現分布を解析したところ、興味深いことに、*crh* の発現に、これまでに報告のない極めて大きな性差が見出された。視索前野腹側部の神経核 PMp においてはほぼオス特異的に、逆に、視索前野背側部の神経核 PMm/PMg においてはメス特異的に発現していたのである。それぞれの神経核の役割を考慮すると、これらの *crh* 発現の性差が、内分泌系や性行動におけるストレス応答に性差をもたらしている可能性が考えられた。

予想外なことに、上記のクローニング過程で、CRH ファミリーに属する真骨魚類特有の新規遺伝子が見出された。そこで第2章では、その新規 CRH ファミリー遺伝子(テレオコルチン (*tcn*) と命名) のキャラクタライゼーションを行った。種々の配列解析の結果、*tcn* の起源は真骨魚類と四足動物の分岐前まで遡るが、両者の分岐後すぐに四足動物の祖先において *tcn* が失われたため、現在では真骨魚類のみに存在する遺伝子となっていることが示唆された。発現解析および生化学的な解析により、*tcn* 発現ニューロンの大部分は *crh* も共発現していること、Tcn は Crh と同等の受容体活性化能をもつことも明らかとなった。これらの結果から、*tcn* は機能的な新規 CRH ファミリーメンバーであり、*crh* とある程度の機能を共有していると考えられた。

第3章では、第1章で見出された PMp と PMm/PMg での *crh* 発現の顕著な性差がどのようなメカニズムによってもたらされているのかを解析した。その結果、PMp におけるほぼオス特異的な *crh* 発現は精巣由来のアンドロゲンによる発現促進作用によって、PMm/PMg におけるメス特異的な *crh* 発現は卵巣由来のエストロゲンによる発現促進作用によってもたらされていることが明らかとなった。また、PMp と PMm/PMg の *crh* 発現ニューロンはエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体を発現しており、エストロゲンやアンドロゲンは *crh* の転写を直接的に制御し得ることが分かった。生殖腺から放出された性ステロイドが PMp と PMm/PMg に届き、そこで発現している性ステロイド受容体と結合して *crh* の転写を直接制御することで、それらの神経核における *crh* の発現に性差がもたらされていると推察された。

第4章では、PMm/PMg における *crh* のメス特異的発現に着目した。PMm/PMg は性行動への関与が示唆されていることから、そこでの *crh* のメス特異的な発現は、メスの性行動と何らかの関わりがあるのではないかと考え、ゲノム編集により *crh* ノックアウトメダカを作出し、性行動の解析を行った。その結果、*crh* ノックアウトのメスでは、オスの求愛を受けてから産卵に至るまでの時間が長くなることが明らかとなった。受容体遺伝子のノックアウトメダカも作出し、性行動を解析したところ、*crhr2* のノックアウトのメスでも同様の表現型が得られた。これらの結果から、メダカの中樞神経系にはメス特異的な Crh-Crhr2 シグナルカスケードが存在し、それがオスの求愛を受け入れるプロセスを促進していることが示唆された。

以上の研究によって、魚類の CRH ファミリーの分子構成が明らかになるとともに、それらの制御機構や生理機能、そしてその性差の一端が明らかとなった。また、魚類のメスにおけるオスの求愛受け入れプロセスの神経基盤に関する新たな知見を得ることができた。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。