

論文審査の結果の要旨

氏名 加用大地

脊椎動物の配偶子形成には、脳下垂体から放出されるゴナドトロピン（濾胞刺激ホルモン（FSH）及び黄体形成ホルモン（LH））が重要な機能を果たしている。ゴナドトロピンは、メス個体においては、卵巣の濾胞発育（FSH）や排卵（LH）を促進するが、発育した濾胞から血中に放出される性ステロイドホルモン、エストロゲンによってその産生量がフィードバック調節を受ける。一方、哺乳類においてのみ、後期濾胞発育で LH が FSH に代わって機能する、という大きな違いもあり、哺乳類以外の脊椎動物にも適用できる濾胞発育制御の普遍的なフィードバック調節を理解するには、FSH に対するフィードバック制御機構を知ることが不可欠である。

本研究では、繁殖状態の実験操作が容易で、ゲノム編集技術や各種の生理学的実験手法が適用可能な真骨魚類メダカを活用し、濾胞発育を調節するエストロゲンフィードバックにおける FSH 制御機構の解析を行った。メダカの FSH mRNA (*fshb*) 発現は、エストロゲンによって負のフィードバック制御を受けることから、この制御にはエストロゲン受容体（ER；メダカは3種類の ER サブタイプ（Esr1、Esr2a、Esr2b）をもつ）が関与すると考えられる。そこで第1章では、どの ER が FSH 制御に関与するのかについて解析した。

CRISPR Cas9 システムにより各 ER のノックアウト (KO) メダカを作製し、妊性を確認したところ、*esr2a*^{-/-}メスが不妊であった。続いて脳下垂体 *fshb* 発現量を各 ERKO 個体で比較した結果、*esr2a*^{-/-}メスで発現量が有意に増加した。これらの結果から、Esr2a サブタイプがエストロゲンによる *fshb* 発現抑制に関わることを示唆されたので、*esr2a*^{-/-}メス個体の不妊の原因を検証した。その結果、*esr2a*^{-/-}メスは正常な濾胞と排卵後の卵を卵巣内に保持しているが、輸卵管形成不全により排卵した卵を体外に出せないのが不妊の原因とわかった。

エストロゲンフィードバックをさらに解析するにあたり、血中エストロゲン濃度の知見は必須であるが、メダカは小型で採血が困難なため、これに関する知見が少なかった。第 2 章では、まずメダカの生理的な血中エストロゲン（主要なエストロゲンである 17 β -Estradiol (E2)) 濃度を測定し、卵巣除去手術 (OVX) によって内因性 E2 が除去される時間経過と、生理的な血中 E2 濃度を再現するのに適した E2 の投与方法を検討した。メダカの生理的な血中 E2 濃度は、メスでは 4-13ng/ml、オスでは 1ng/ml 程度であった。また、メスにおける内因性 E2 は OVX 手術後 24 時間以上経過するとオスと同程度まで減少した。続いて、血中 E2 濃度がメスに比べて十分低いことが示されたオスメダカに E2 投与を行い、3 種類の E2 投与方法における血中 E2 濃度変化を比較した結果、人工飼料に E2 を配合して給餌投与する方法において、一過的な血中 E2 濃度の上昇と 24

時間以内での減少が起きており、日内変動しているメス血中 E2 濃度の変化を実験的に再現するのに優れた手法であることがわかった。

第 3 章では、E2 による FSH 産生抑制に Esr2a サブタイプが必要であることを検証するため、2 章で検討した E2 の給餌投与方法を *esr2a^{+/-}*、*esr2a^{-/-}* メス個体に適用した。その結果、*esr2a^{+/-}* メスでは OVX+E2 処理により *fshb* の発現が有意に減少したが、*esr2a^{-/-}* メスでは有意な減少が見られなかった。この結果より、第 1 章で示唆された通り、エストロゲンによる FSH の負のフィードバック制御に Esr2a サブタイプが寄与していることが示された。次に、エストロゲンの作用点について解析を行った。*fshb* の負のフィードバック制御に視床下部性の入力が必要かどうか検証するため、脳下垂体を単離培養し視床下部からの入力を遮断した状態で E2 を作用させた。その結果、E2 含有培地上で 20 時間脳下垂体を単独培養するだけで *fshb* 発現が有意に減少した。さらに、同一条件で *esr2a^{-/-}* メス個体の脳下垂体を単独培養すると、E2 依存的な発現抑制がほぼ消失したことから、Esr2a を介する FSH の負のフィードバックは、卵巢から脳下垂体への短い経路を介した直接制御である可能性が示された。

この学位論文の各章で示された研究成果はエストロゲンによる濾胞刺激ホルモン制御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～第3章は、岡良隆らとの共同研究であるが、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。

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

氏名 加用 大地

成績 合格

本委員会は、論文提出者に対し令和2年1月30日、学位論文の内容及び関連事項について、口頭試験を行った。

その結果、論文提出者は動物学特に内分泌学について博士（理学）の学位を受けるにふさわしい十分な学識をもつものと認め、審査委員全員により合格と判定した。