

論文の内容の要旨

論文題目 : **Morphological and genetic studies on neuroendocrine regulation of reproduction in teleosts**

(真骨魚類における生殖の中樞制御機構に関する形態学的・遺伝学的研究)

氏名 高橋 晶子

序論

種を通じて保存されている制御機構は、生物にとって非常に重要であることが多い。しかし、制御機構の保存性と制御に関わる因子の保存性は必ずしも一致しない。形態や各因子の機能が異なっても制御機構は保存されている場合がある。脊椎動物では、視床下部-脳下垂体-生殖腺 (HPG)軸による調節が生殖において主要な制御機構であると考えられてきた。HPG 軸に関する研究は哺乳類において精力的になされており、視床下部に存在するゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)ニューロンは、軸索終末から下垂体門脈に GnRH ペプチドを放出し、脳下垂体の黄体形成ホルモン(LH)・濾胞刺激ホルモン(FSH)の分泌を直接制御する。また、HPG 軸制御において生殖腺からのエストロジェンフィードバックは非常に重要であるが、近年発見されたキスペプチンニューロンがエストロジェン受容体である ER α を介し GnRH を直接制御することが示唆されている。これらの因子は無顎類で既に存在しており、脊椎動物を通じて重要な機能を持つことが示唆されるが、非哺乳類における役割は不明である。複数の非哺乳類での GnRH ペプチドの末梢投与による血中 LH、FSH の上昇、mRNA の上昇の報告はあるものの、GnRH、LH、FSH の役割の詳細はわかっていない。キスペプチンに至っては、真骨魚類における投与実験で血中 LH が上昇するという報告と変化しないとする報告が混在している。また、鳥類ではキスペプチン遺伝子が失われていることなどから、キスペプチンが非哺乳類において生殖機能調節に関与するのかどうかは全く不明である。

本研究では、哺乳類から離れた系統に位置する真骨魚類を用い、HPG 軸の制御に関わる GnRH、LH、FSH およびキスペプチンについて、それらの機能に着目して調べた。中でも、最新の遺伝子改変技術が応用可能で、生殖に関する知見が蓄積しているメダカを実験動物として用いることとした。本研究では、近年急速に用いられるようになったゲノム編集技術を利用し、生殖関連ペプチドのノックアウト (KO) 個体の作製を初めて成功させた。

1章. GnRH ニューロンの形態解析

まず、向下垂体性の GnRH ニューロンを特定するために GnRH を enhanced green fluorescent protein (EGFP) で標識したトランスジェニックメダカを作成し、共焦点顕微鏡により詳細な形態解析を行った。*gnrh* 遺伝子には *gnrh1*、*gnrh2*、*gnrh3* の 3 種のパラログ遺伝子が知られ、*gnrh1* は視索前野に、*gnrh2* は中脳に、*gnrh3* は終神経において発現しているが、GnRH1、3 発現ニューロンの細胞体は脳の前後軸に沿って連続的に分布しており、機能的にも重複する可能性が考えられたため、各群の神経投射を明らかにすることにした。GnRH1~3 は、分子の相同性が極めて高いため (70%)、抗体を用いた免疫組織化学では区別できない。そこで、各 GnRH 産生ニューロンを区別するため、*gnrh1:EGFP* および *gnrh3:EGFP* トランスジェニックメダカを作成した (*gnrh2* についての解析は割愛)。EGFP を発現する GnRH1/3 ニューロンの形態解析を行い、下垂体に投射するのは腹外側視索前野の GnRH1 ニューロンであることを示した(図 1)。この結果から、HPG 軸における GnRH の機能を解析する上で GnRH1 に着目した。

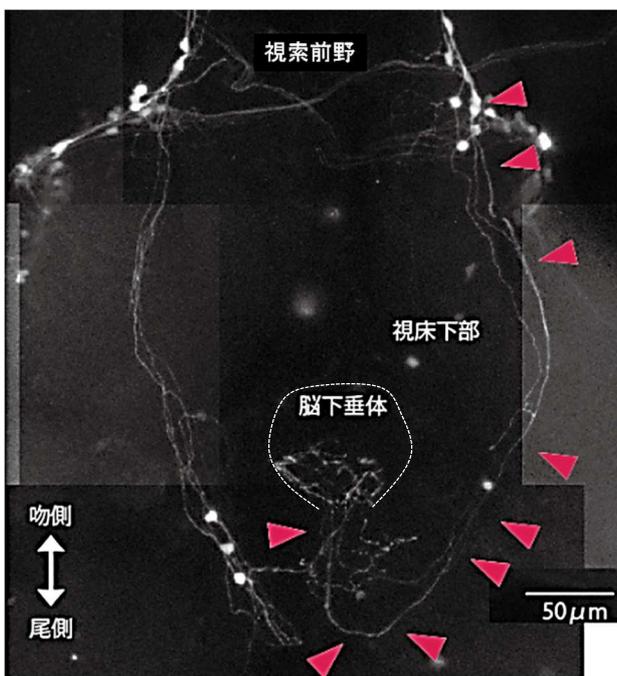


図 1. GnRH1 および GnRH3 ニューロンの分布と投射。
孵化後 10 日の *gnrh1:EGFP* の抗 EGFP 免疫組織化学像。
鋸は視索前野の EGFP 発現ニューロンから脳下垂体に投射する軸索を示す。

2章. GnRH1, LH, および FSH の HPG 軸における機能解析

LH と FSH は二量体からなる糖鎖タンパク質であり、 α サブユニットである糖タンパク質 α を共通してもつが、LH β または FSH β がそれぞれの特異的な β サブユニットとして機能する。メダカでの HPG 軸での GnRH、LH、および FSH の機能を調べるため、前章で向下垂体性のニューロンで発現している *gnrh1*、および LH または FSH の β サブユニットをコードする *lhb*、*fshb* の KO メダカを作成し、それらの個体の表現型解析を行った。*fshb* の KO メダカでは、卵巣の卵胞発育が見られなくなり、*lhb* の KO メダカでは卵胞が排卵直前まで成熟しているが、排卵が見られなくなっていた。一方、*gnrh1* の KO メダカでも *lhb* での結果と同様の結果が見られ、さらに *fshb* の発現量は野生型と比べて変化がないものの、*lhb* の発現量が減少していることがわかった。さらに *lhb* および *gnrh1* の KO メダカのメスにおける排卵不全はメダカリコンビナント LH の投与によってレスキューできた。したがって、GnRH1、LH は排卵誘起に、FSH は卵胞発育に必須であり、また、メダカでは GnRH による制御を必須とするのは LH のサージであり、

FSHはGnRHがなくても十分に分泌されていると考えられる。一方オスでは、GnRH、LH、FSHいずれのKO系統においても生殖可能であることがわかった。

3章. メダカのHPG軸におけるキスペプチン機能の解析と新規機能の探索

哺乳類同様、真骨魚類のキスペプチンニューロンにはER α が発現しており、エストロジェンの作用によりキスペプチンの発現が変動し、また、視索前野にキスペプチンニューロンの投射が見られる。しかし、哺乳類とは異なり、真骨魚類でGnRHニューロンにキスペプチン受容体、*gpr54-1, 2*がいずれも発現しておらず、キスペプチンに対するゴナドトロピンの発現・放出動態についても相反する報告が混在している。そこで、非哺乳類でキスペプチンによるHPG軸制御が存在するのか明確にするために、メダカを用いキスペプチン関連遺伝子のKOメダカを作成しこれらの表現型解析を行った。メダカのキスペプチンをコードする遺伝子は*kiss1*と*kiss2*の二種類が存在する。リガンド、受容体それぞれについてのKOメダカあるいはリガンドのダブルKOメダカのいずれにおいても正常な*lhb*, *fshb*発現、生殖腺の発達、生殖行動、産卵がみられ、HPG軸生殖制御にキスペプチン神経系が必須ではないことが示された。鳥類では*kisspeptin*遺伝子が失われていることなどからも脊椎動物のHPG軸制御でキスペプチンによらない祖先型の制御が存在していたことが考えられ、キスペプチンによるHPG軸制御は哺乳類特異的な制御であることが示唆される。また、今回作成したKOメダカにおける各種遺伝子解析の結果、*kiss1/kiss2/gpr54-2*のKOメダカで*tshb2*の発現が増加することが見られており、キスペプチンの新規機能の可能性が示唆されている。

考察

1. 脊椎動物間でHPG軸制御に関わる因子には機能的な多様性が存在する

メダカでも哺乳類同様排卵にGnRHによるLHのサージ状分泌が必要であることが示され、この制御は脊椎動物で共通して保存された制御と考えられる。一方で、哺乳類ではGnRHをKOするとLHのみでなくFSHの発現量と放出量が著しく低下するが、メダカでは、*gnrh1*KOによりLHの発現量は有意に減少する一方、FSHの発現量は変化しなかった。つまり、メダカではFSHはGnRHによらない制御により産生放出されており、哺乳類のようにGnRHがゴナドトロピンの制御を一手に担うような制御ではないこと、さらに哺乳類のようなキスペプチンニューロンによるHPG軸制御は存在していないと考えられる。このような違いが、哺乳類、真骨魚類という異なる系統においてFSH、LHの分泌動態の違いを生み、たとえば多産/少産などの生殖における戦略の違いに反映されている可能性がある。

2. キスペプチンによるHPG軸制御が哺乳類で生じた制御である可能性とキスペプチンの新規機能の可能性

哺乳類ではLHがパルス状に分泌されることが生殖腺の発達に非常に重要であり、これはキスペプチンニューロンにより制御されることが強く示唆されている。メダカではキスペプチンニューロンによるHPG軸調節は存在せず(3章)、また、非哺乳類では哺乳類のようなLHパルスの存在も明確に示されていない。これらのことから祖先型の脊椎動物のHPG軸ではパルス状分泌という分泌動態はなかったのではないかと推測される。また、本研究では、哺乳類において排卵の誘起に一過的に多量にLHが放出されるLHサージが必須であるが、メダカにおいてもGnRHニューロンを介したLH放出が排卵に必須であることを示した。LHとFSHが同じ細胞に発現している哺乳類では、いずれもGnRHの刺激を受けて放出されるが、LHのパルスとサージという分泌形態が機能的に分化し、真骨魚類では異なる細胞に発現するLHとFSHのそれぞれの細胞での独立した分泌制御により機能的に分化したことが考えられる。

魚類のキスペプチン神経系は、パルスジェネレーターとしての生殖制御とは異なる機能を担っていることが考えられる。*kiss1/2/gpr54-2* KOで、*tshb2*の発現量の増加が見られる事や、キスペプチンニュー

ロンの軸索投射、受容体発現領域などについてもわかってきており、真骨魚類ではキスペプチンがホメオスタシスや本能行動の調節に関与する可能性が考えられる。今回、遺伝子発現には変化の見られなかった各種神経系も、放出調節を受けることにより、キスペプチン神経系に制御されている可能性がある。これら各種 KO 系統を用いた更なる解析により、鳥類を除く脊椎動物で広く保存されたキスペプチン神経系の機能が明らかになると期待される。

本論文では、脊椎動物には GnRH による LH 放出促進という共通点がある一方、LH/FSH それぞれの役割に違いがあることと、非哺乳類でのキスペプチンによらないエストロジェンフィードバック制御の存在の可能性を示した。今後の脊椎動物における HPG 軸の進化およびキスペプチン機能についての研究に繋がるものと考えられる(図 2)。

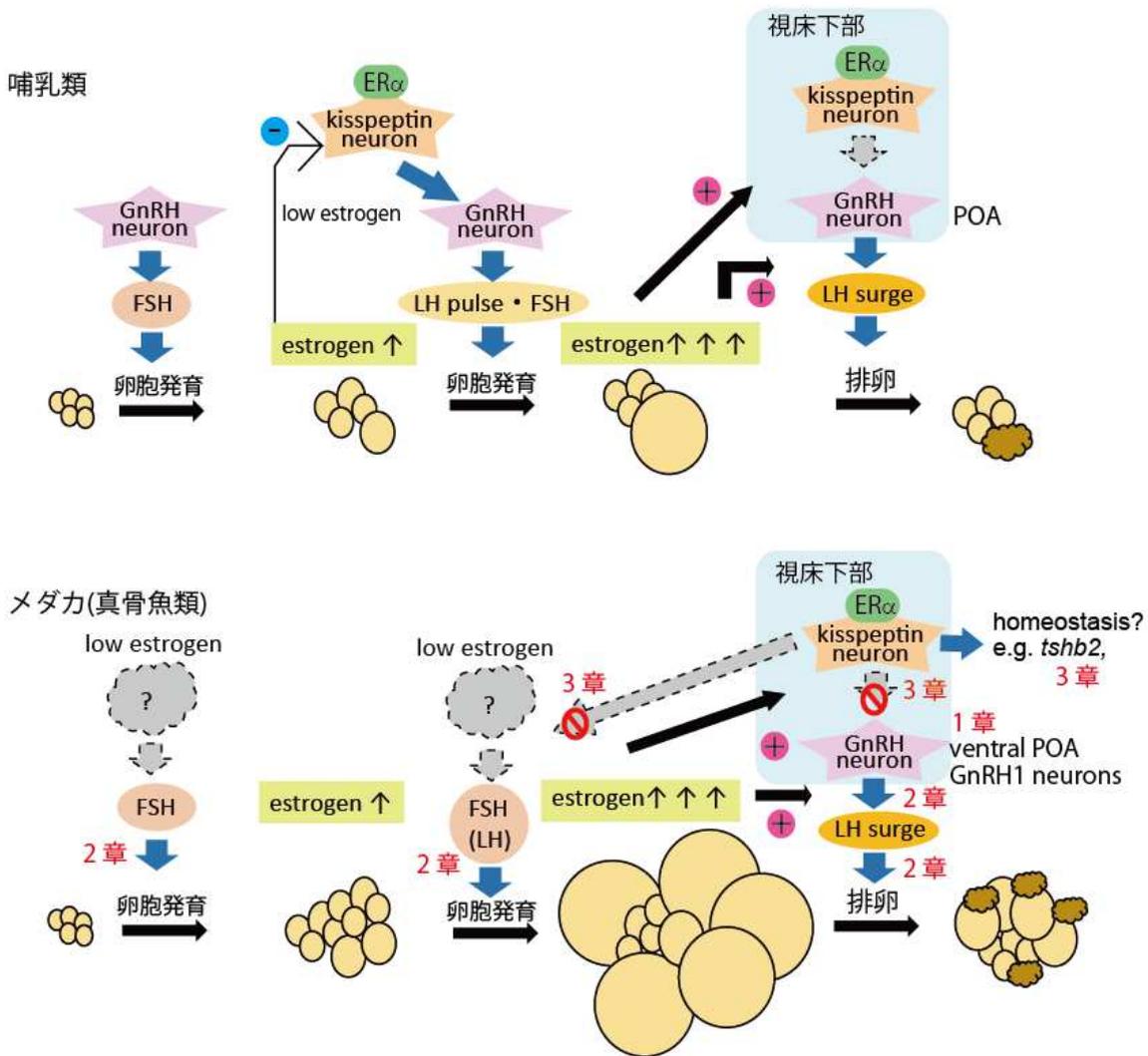


図 2. 本研究の結論。各章との対応を赤字で示す