

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 末 富 祐 太

論 文 題 目

Establishment and analysis of *in vitro* model for hypothalamic neurons controlling reproduction in domestic ruminants

(反芻家畜の繁殖機能を制御する視床下部ニューロンの*in vitro*実験系の樹立と解析)

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	大 蔵	聡
委 員	名古屋大学教授	東 村	博 子
委 員	名古屋大学教授	北 島	健
委 員	名古屋大学准教授	上 野 山	賀 久
委 員	名古屋大学講師	井 上	直 子

世界人口の爆発的増加に伴い、動物性タンパク質食料の需要が増加し、地球規模での家畜の生産性向上が求められている。現在、ウシの生産現場では、人工授精後の受胎率の低下が問題となっている。ウシの受胎率を向上させ、畜産物の生産を効率化するためには、ウシの繁殖制御メカニズムを解明し、その知見を新規な家畜繁殖制御技術の開発などに応用することが必要不可欠である。ウシなどの反芻家畜を含む哺乳類の繁殖機能は、視床下部-下垂体-性腺軸により巧妙に制御されている。視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、下垂体からの性腺刺激ホルモン (GTH) の分泌を刺激する。雌性動物の卵巣における卵胞発育とそれに伴うエストロジェンの合成と分泌は、GnRH/GTH のパルス状分泌により制御されている。これまでに、キスペプチン、ニューロキニン B (NKB) およびダイノルフィン A (Dyn) の三つの神経ペプチドを共発現するニューロン群が視床下部弓状核において同定された。このニューロン群は「KNDyニューロン」とよばれ、げっ歯類やヒツジ、ヤギを用いた研究から、哺乳類の繁殖機能制御機構における上位の調節因子としての役割が明らかにされつつある。特に、KNDyニューロンは GnRH パルス発生中枢として機能することが示唆されているが、いまだに議論も多い。GnRH/GTH のパルス状分泌の調節には多くの因子が関与することから、末富祐太は GnRH パルス発生メカニズムの解明には、単純かつ均一な *in vitro* 実験系を用いた細胞レベルでの機能解析が必要不可欠であると着想するに至った。そこで本研究では、ウシのモデル動物としてシバヤギを用い、視床下部 KNDyニューロン由来の不死化神経細胞株を用いた *in vitro* 実験系を樹立し、この *in vitro* モデルを活用して得られる基礎的知見により、ウシの受胎率向上に資することをめざした。

第一に、ヤギ視床下部弓状核 KNDyニューロンに含まれる NKB に着目し、NKB 遺伝子 (*TAC3*) の転写制御機構について分子生物学的に解析した (第2章)。3週齢の雄シバヤギの視床下部組織からトータル RNA を抽出し、5'/3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を用いて、ヤギ *TAC3* の全長 mRNA 配列を取得した。また、成熟雌シバヤギの血液由来ゲノム DNA を用いたゲノムウォーキング法により、ヤギ *TAC3* の 5'上流域配列を取得した。取得した各配列をシーケンス解析により同定し、ウシ *TAC3* およびヒト *TAC3* と比較した。ヤギ *TAC3* mRNA 配列は全長で 820塩基であり、ウシ *TAC3* mRNA 配列と極めて高い相同性 (92%) を有していた。また、NKB のアミノ酸配列はヤギ、ウシおよびヒトで完全に一致することを明らかにした。さらに、ゲノムウォーキング法により、ヤギ *TAC3* の 5'上流域配列を翻訳開始点から上流に 3400 bp 同定した、得られたヤギ *TAC3* の 5'上流域配列とウシ *TAC3* の 5'上流域配列の相同性は 89%であった。つぎに、ヤギ *TAC3* の 5'上流域における転写活性をルシフェラーゼアッセイにより評価した。長さの異なるヤギ *TAC3* 上流域をルシフェラーゼ発現プラスミドに挿入し、5種類のレポーターベクターを作製した。これらを

マウス視床下部神経細胞由来細胞株 N7 およびヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SK-N-AS にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定して *TAC3* 転写活性を評価した。両細胞株において、推定転写開始点の上流 197 塩基から下流 166 塩基を含むレポーターベクターが最大のルシフェラーゼ活性を示し、この領域にコアプロモーターが存在すること、また、転写開始点上流 336 塩基よりさらに 5' 上流域には *TAC3* の転写抑制に関わる領域が存在することを見出した。これらの結果より、ヤギとウシに共通した *TAC3* 転写調節メカニズムが存在する可能性を示した。

第二に、GnRH パルス発生機構を細胞レベルで解析するために、ヤギ KNDy ニューロン由来の不死化細胞株の樹立を行った（第 3 章）。雌シバヤギ胎仔弓状核由来の初代培養細胞に、レンチウイルスを用いて癌原遺伝子 SV40 large T 抗原 (*T-Ag*) を導入して細胞を不死化した。*T-Ag* が導入された細胞を用いて細胞クローニングを行い、得られた細胞クローンにおける神経細胞マーカーおよびグリア細胞マーカーの遺伝子発現解析により 36 個の神経由来細胞クローンを得た。つぎに、KNDy ニューロンで発現する神経ペプチドおよび関連受容体などの 7 種の遺伝子発現を解析し、GA28 をヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株として樹立した。この GA28 細胞株を用いてキスペプチン、NKB および Dyn の蛍光免疫細胞化学を行い、すべての神経ペプチドが GA28 において発現することを明らかにした。さらに、リアルタイム PCR 法を用いて、エストロゲン添加処理が GA28 における *KISS1* 発現を抑制することを明らかにした。GA28 細胞株を用いて、第 2 章と同様の方法でヤギ *TAC3* 転写活性を評価したところ、第 2 章で明らかにしたコアプロモーターおよび転写抑制領域の存在を確認した。これらの結果より、樹立したヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株を用いてヤギ *TAC3* の転写調節メカニズムを明らかにし、GnRH パルス発生機構を解明するための *in vitro* 実験系として GA28 細胞株が活用できることを示した。

以上のように、末富祐太は、ヤギ視床下部弓状核に由来する KNDy ニューロン不死化細胞株 (GA28) を樹立した。さらに、GA28 における神経ペプチド発現やエストロゲンへの応答性を示し、GnRH パルス発生機構における KNDy ニューロンの役割を細胞レベルで解析するためのツールとして GA28 が有用であることを明らかにした。本論文のこれらの知見は、畜産学・獣医学、家畜繁殖学、神経内分泌学などの研究領域に大きく貢献し、家畜の生産性向上に寄与する成果として高く評価できる。よって、本審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があるものと認め、論文審査に合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	末富 祐太
試験担当者	主査 大蔵 聡 東村博子 北島 健 上野山賀久 井上直子			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年 2月13日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				