

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 Mechanism controlling expression of kisspeptin, a master regulator of reproduction (生殖を第一義的に制御するキスペプチンの発現制御メカニズム)

氏名 後藤 哲平

## 論文内容の要旨

近年、日本に限らず世界における畜産現場において、ウシの初回受胎率の低下が大きな問題となっている。なかでも、3回以上人工授精を行っても妊娠できないリピートブリーダーの存在が、畜産農家に大きな経済的損失を与えている。リピートブリーダーの発症要因は明らかにされていないが、卵巣や子宮には異常がないことから、その主な原因は繁殖機能をコントロールする中枢制御メカニズムの破綻であると考えられる。そこで、私は繁殖機能をコントロールする中枢の制御メカニズムを解明することが家畜の繁殖障害の診断や治療法の開発に役立ち、リピートブリーダーをはじめとした家畜の繁殖障害の解消につながると考えた。

げっ歯類や家畜など、ほ乳類の繁殖機能は *Kiss1* 遺伝子にコードされるキスペプチンを最上位とする中枢の制御メカニズムによって制御される。キスペプチンニューロンは、ほ乳類において視床下部の弓状核 (ARC) と前腹側室周囲核 (AVPV)/視索前野 (POA) に発現し、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌を介して、ゴナドトロピン分泌を制御することがあきらかにされている。これまでの研究から、AVPV/POA のキスペプチンニューロンは雌の排卵を誘起する GnRH サージジェネレーターであり、ARC のキスペプチンニューロンは雌の卵胞発育と雄の精子形成を司る GnRH パルスジェネレーターであると考えられているが、これらの詳細な制御メカニズムは不明である。

本研究では、遺伝子改変マウスモデルを用いて、キスペプチンによる繁殖機能の中枢の制御メカニズムを明らかにすることを目的とし、雌雄の配偶子形成を司る ARC キスペプチンニューロンにおける *Kiss1* 遺伝子発現の分子メカニズムを検討した。

第二章では、*Kiss1* ノックアウト (KO) マウスを作製し、*Kiss1* 遺伝子を欠損した配偶子が受精能を有するかを検討した。*Kiss1* KO マウスは、雌雄ともに性成熟を示さず、不妊を呈した。雌では常法のゴナドトロピンによる過剰排卵誘起により卵子が採取可

能であり、雄ではテストステロン処置により精子が採取可能であった。また、これらの卵子および精子を用いて HTF 培地で媒精を行い、前核期胚を体外培養した結果、前核形成率、2細胞および胚盤胞への発生率はいずれも、野生型マウスの卵子、精子と同等であった。つまり、過剰排卵誘起により採取した *Kiss1* KO マウス由来卵子およびテストステロン処置した *Kiss1* KO マウス由来精子は正常な受精能ならびに発生能を示した。以上より、中枢のキスペプチンとそれに駆動されるゴナドトロピンおよび、ステロイドホルモンが配偶子形成に第一義的に重要であることを明らかにした。

第三章では、雌雄の配偶子形成を制御する ARC のキスペプチンニューロンにおける *Kiss1* 発現の分子メカニズムの解明を目的とした。*Kiss1* 遺伝子座に GFP をレポーターとして挿入した長さの異なる 3 種類のコンストラクト (long, medium-length, short) を作製し、前核注入法により 3 種類の遺伝子改変 (Tg) マウスを作出し、*in vivo* レポーターアッセイに供した。二重免疫組織化学により、脳内のキスペプチンおよび GFP の共発現を検討した。その結果、*Kiss1* 遺伝子の周辺領域 39 kb (-22316 から+16497 bp, 転写開始点を+1 とする) を含むコンストラクト (long)、および同コンストラクトから上流 10kb, 下流 4 kb を欠損した 25 kb (-12890 から+11949 bp) のコンストラクト (medium-length) を導入した Tg マウスにおいて、AVPV および ARC のほとんどすべてのキスペプチンニューロンに GFP が共発現していた。一方、25 kb のコンストラクトの上流域約 11 kb を欠損したコンストラクト (short, -2165 から+11061 bp) を導入した Tg マウスでは、AVPV のキスペプチンニューロンでは GFP の共発現が認められたが、ARC のキスペプチンニューロンでは GFP 発現が全く認められなかった。このことから、*Kiss1* 遺伝子の転写開始点上流 12.9 kb から 2.2 kb の領域が ARC の *Kiss1* 発現を制御するエンハンサー領域であることを明らかにした。続いて、このエンハンサー領域がプロモーター領域と立体構造を形成していることを明らかにするために、Chromatin conformation capture アッセイおよび Chromatin Immunoprecipitation アッセイを行った。その結果、エストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) がエンハンサー領域に結合し、*Kiss1* プロモーター領域と立体構造を形成することが確認された。以上の結果から、ARC のキスペプチンニューロンにおいて、*Kiss1* 遺伝子上流に存在するエンハンサー領域が ER $\alpha$  を介してプロモーター領域と立体構造を形成することにより、ARC 特異的に *Kiss1* 発現が誘起されることが示唆された。

本研究は、ARC のキスペプチンニューロンにおいて、ARC 特異的なエンハンサーによって *Kiss1* 遺伝子発現が誘導され、ARC キスペプチンとそれに駆動される下流のホルモンが雌雄の配偶子形成を第一義的に制御していることを明らかにした。ARC のキスペプチンニューロンは GnRH パルスジェネレーターとして雌雄の配偶子形成に第一義的に機能していることから、本研究で明らかにした ARC のキスペプチン発現の分子メカニズムに関する知見は、卵胞発育や精子形成の誘導剤の開発に役立つことが期待でき、リピートブリーダーをはじめとした家畜の繁殖障害の診断や治療法の開発につながる。また、*Kiss1* 遺伝子はモデル動物のマウスだけでなく、家畜のウシ、ブタなどにおいて共通して発現することから、ARC エンハンサーの遺伝子多型による遺伝子

診断が家畜の繁殖率向上に役立つことも期待できる。