

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 長江 麻佑子

論 文 題 目

The mechanism underlying gonadotropin-releasing hormone pulse generation in rats

(ラットにおける性腺刺激ホルモン放出ホルモンパルス発生を制御するメカニズム)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学准教授 上野山 賀久

委 員 名古屋大学教授 東村 博子

委 員 名古屋大学准教授 井上 直子

委 員 名古屋大学教授 大蔵 聡

委 員 名古屋大学教授 吉村 崇

委 員 名古屋大学教授 隅山 健太

委 員 生理学研究所准教授 平林 真澄

論文審査の結果の要旨

長江麻佑子の提出論文「The mechanism underlying gonadotropin-releasing hormone pulse generation in rats (ラットにおける性腺刺激ホルモン放出ホルモンパルス発生を制御するメカニズム)」は、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH) パルス発生機構の本体とその制御メカニズムの解明を目的とした研究成果をまとめたものである。長江麻佑子は、遺伝子改変ラットを用いて黄体形成ホルモン (LH) 分泌などの生殖機能の指標を解析し、弓状核キスペプチンニューロンが GnRH パルス発生機構の本体であることを明らかにした。さらに、5%の弓状核キスペプチンニューロンが存在すれば、GnRH パルスが維持でき、妊孕性も保たれることを明らかにした。以下にその要旨を記載する。

本論文は、全5章で構成される。第1章では、本研究の意義として、性腺刺激ホルモン分泌を司る GnRH パルス発生機構の本体とその制御メカニズムの解明が、乳牛などの家畜の繁殖成績低下の原因を解明し、繁殖成績を向上させる新たな技術開発を行うための基礎的知見となることを述べた。さらに、視床下部に局在する2群のキスペプチンニューロンのうち、弓状核に局在するキスペプチン/ニューロキニンB/ダイノルフィンAを共発現する KNDy ニューロンが、GnRH パルス発生機構の本体である可能性を述べた。

第2章では、既存の全身性にキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) をノックアウト (KO) したラットを用いた KNDy ニューロンレスキュー実験と、新たに作製した *Kiss1*-floxed ラットを用いた領域特異的な *Kiss1* KO により、KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターであることを証明した。すなわち、不妊を呈する全身性 *Kiss1* KO 雌ラットの弓状核に *Kiss1* を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを局所投与することにより、弓状核ニューロキニンB遺伝子 (*Tac3*) 発現細胞に *Kiss1* 発現を回復させた KNDy ニューロンレスキューラットを作製し、GnRH パルスの指標として LH 分泌動態を解析した。3%以上の KNDy ニューロンをレスキューすると、レスキューの割合に応じて LH パルスが回復した。一方で、*Tac3* 発現細胞以外の多数の細胞において *Kiss1* 発現を回復しても、LH パルスは回復しなかった。さらに、*Kiss1* 遺伝子の第2、3エクソンを loxP 配列で挟んだ *Kiss1*-floxed 雌ラットの弓状核へ Cre 組換え酵素を発現する AAV ベクターを局所投与することにより弓状核特異的 *Kiss1* KO ラットを作製し、LH 分泌動態を解析した。その結果、90%以上の弓状核 *Kiss1* 発現を KO すると、LH パルスは著しく抑制されることを明らかにした。以上の結果より、KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターの本体であることを証明した。

KNDy ニューロンが GnRH パルスを発生するメカニズムとして、促進性のニューロキニンBと抑制性のダイノルフィンAの自己分泌・傍分泌により KNDy ニューロン自身の活動を制御しているとの説が有力である。第3章では、ラットの KNDy

論文審査の結果の要旨

ニューロンの多くにダイノルフィン A 受容体すなわち κ -オピオイド受容体 (KOR) 遺伝子 (*Oprk1*) が発現するものの、全ての KNDy ニューロンに *Oprk1* が発現しないことに注目し、KNDy ニューロンにおけるダイノルフィン A-KOR シグナリングの生理的役割を明らかにすることを目的とした。*Oprk1* 発現細胞特異的に *Kiss1* を KO したラット (*Oprk1*-KpKO ラット) を作製し、生殖機能を解析した。加えて、*Kiss1* 発現細胞特異的 *Kiss1* KO ラット (*Kiss1*-KpKO ラット) を新たに作製し、生殖機能を解析し、*Oprk1*-KpKO ラットの表現型と比較した。*Oprk1*-KpKO 雌ラットおよび対照群の Cre(-)/*Kiss1*-floxed 雌ラットは、いずれも 30~38 日齢の間に性成熟の指標である膣開口を示し、両群間の性成熟日齢に有意な差を認めなかった。対照群の Cre(-)/*Kiss1*-floxed 雌ラットが 4 日周期の性周期を示したのに対し、*Oprk1*-KpKO 雌ラットのほとんどが 5 日周期の性周期を示した。さらに、*Oprk1*-KpKO 雌ラットは、野生型雄ラットとの交配により、妊娠、出産したが、産仔数は対照群と比較して少なかった。卵巣除去 *Oprk1*-KpKO ラットは、弓状核に対照群の約 5%の *Kiss1* 発現細胞を認め、明瞭な LH パルスを示したが、生理的な濃度のエストロジェンを代償投与すると LH パルスが抑制された。一方、弓状核における *Kiss1* を完全に消失した *Kiss1*-KpKO 雌ラットは、少なくとも 56 日齢まで性成熟の指標となる膣開口を示さず、卵巣は小さく萎縮し、卵巣除去条件下において LH パルスを完全に欠損した。以上より、KNDy ニューロンの約 95%が *Oprk1* を発現し、*Oprk1* を発現しない約 5%の KNDy ニューロンが直接ダイノルフィン A-KOR シグナリングを受け取らずとも、キスペプチンを分泌し、GnRH パルス、卵胞発育ひいては妊孕性を維持できることを示唆した。一方、生理的なステロイド環境下では残り 95%の *Oprk1* を発現する KNDy ニューロンが GnRH/LH パルスの発生に必要であることも示唆した。

本研究で用いた *Kiss1*-floxed ラットおよび *Kiss1*-Cre ラットは、ラット胚性幹細胞を用いたジーンターゲティングにより作製し、その作製に複数年を要した。そこで、トランスフォーマティブ化学生命融合研究大学院プログラム (GTR) の融合研究として、生理学研究所において、ラット受精卵を用いてノックインラットを効率的かつ迅速に作製するため、複数の方法を比較・検討した。第 4 章では、はじめに、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションおよび AAV による CRISPR-Cas9 システムとターゲティングベクターの導入方法を種々検討した。その結果、ラット受精卵に Cas9-ガイド RNA 複合体をエレクトロポレーションにて導入し、その後、ターゲティングベクターを発現する AAV を感染させる方法でもっとも効率良く、ノックインラットを作製できることを示した。さらに、この方法により、第 3 章で用いた *Oprk1*-Cre ラットをわずか 4 ヶ月で作製した。

第 5 章では、第 2 章および第 3 章で得られた結果から、哺乳類の生殖機能を司る

論文審査の結果の要旨

GnRH パルス発生の制御メカニズムについて考察した。すなわち、視床下部弓状核に局在する KNDy ニューロンが GnRH パルスジェネレーターの本体内であり、促進性のニューロキニン B と抑制性のダイノルフィン A の自己分泌・傍分泌のほかに、先行研究により示唆されたギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達により、同期した神経活動を形成する可能性を示唆した。さらに、KNDy ニューロンの数には冗長性があり、約 5% の KNDy ニューロンがあれば、GnRH パルスが維持され、繁殖可能であるという事実をもとに、低栄養などによる家畜の繁殖障害の克服にはすべての KNDy ニューロンの賦活化は必要なく、一部の KNDy ニューロンの機能回復によって繁殖成績を向上できる可能性を示唆するとともに、本研究結果が家畜の繁殖促進技術のシーズとなることを考察した。また、本研究で新たに作製した遺伝子改変ラットを用いた繁殖中枢メカニズム研究の展望についても言及した。

以上のように、長江麻佑子は、生殖機能を司る GnRH パルス発生機構の本体内が KNDy ニューロンであることを証明し、約 5% の KNDy ニューロンの機能を回復すれば、繁殖可能となることを明らかにした。また、これらの研究に用いた遺伝子改変ラットの効率的な作製方法を確認した。これらの知見は、学術上の価値に加え、生命農学における重要課題である畜産物の生産性向上に資する点からも極めて高い価値があると認められる。したがって、本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を有すると認め、論文審査に合格と判定した。