

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 堀 畑 慶

論 文 題 目

The molecular mechanism underlying regulation of kisspeptin gene (*Kiss1*) expression that regulates reproduction in mammals

(哺乳類の生殖を制御するキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) 発現制御分子メカニズム)

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	東村博子
委員	名古屋大学教授	大蔵 聡
委員	名古屋大学准教授	上野山 賀久
委員	名古屋大学准教授	松山 秀一
委員	名古屋大学講師	井上 直子
委員	名古屋大学アジアサテライトキャンパス学院 特任助教	森田 康広

堀畑慶の提出論文「The molecular mechanism underlying regulation of kisspeptin gene (*Kiss1*) expression that regulates reproduction in mammals (哺乳類の生殖を制御するキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) 発現制御分子メカニズム)」は、哺乳類の生殖機能を最上位で制御する *Kiss1* 遺伝子発現制御メカニズムに関する研究をまとめたものである。堀畑は、細胞内分子メカニズムを解析するためのツールとなるラットキスペプチンニューロン不死化細胞株の作出、ならびに、新たな *Kiss1* 発現制御因子の探索および解析を行った。本論文は全4章で構成される。

第1章では、ウシの受胎率の低下が世界的に深刻な問題であり、哺乳類の生殖を制御する脳内メカニズムの解明が、家畜の受胎率向上に資する新たな繁殖技術の開発に貢献することを述べた。堀畑は特に、哺乳類の生殖を最上位で制御するキスペプチンニューロンに着目し、そのモデル株の樹立と、*Kiss1* 発現制御メカニズムの解明を目指す意義を述べた。

第2章では、細胞内の分子メカニズムを解明するための *in vitro* 解析に有用な、ラット弓状核および前腹側室周囲核 (AVPV) キスペプチンニューロンの不死化細胞株の樹立を試みた。成熟雌ラットの弓状核および AVPV それぞれの組織片から得た細胞を単離培養し、不死化処理を行った結果、弓状核から 89 クローン、AVPV から 86 クローンを得た。得られた細胞クローンにおける *Kiss1*、 $ER\alpha$ 遺伝子 (*Esr1*)、ニューロキニン B 遺伝子 (*Tac3*)、ニューロキニン 3 受容体遺伝子 (*Tacr3*)、ダイノルフィン A 遺伝子 (*Pdyn*) 発現を定量的 RT-PCR 法により検討し、弓状核および AVPV キスペプチンニューロン候補株を選抜した。弓状核由来 89 クローンのうち、弓状核キスペプチンニューロンに発現が高いと報告されている *Kiss1*、*Esr1*、*Tac3*、*Tacr3*、*Pdyn* 発現が認められた 7 クローンを得た。AVPV 由来 86 クローンのうち、*Kiss1* および *Esr1* 発現を示し、AVPV キスペプチンニューロンにおいては発現が低いと報告されている *Tac3*、*Tacr3*、*Pdyn* 発現が認められなかった、もしくはその発現が著しく低かった 7 クローンを得た。これらの弓状核および AVPV キスペプチンニューロン候補株のエストロジェンに対する反応性を検討するため、候補株に異なる濃度の 17β -エストラジオール (E2) を添加し、*Kiss1* 発現量を定量的 RT-PCR 法により測定した。その結果、E2 添加により *Kiss1* 発現が有意に減少 (弓状核) または上昇 (AVPV) する候補株は認められず、エストロジェンへの反応性を有する株の確立には至らなかった。本研究により、ラット弓状核および AVPV 由来のキスペプチンニューロン候補株を複数得られたことから、これらの候補株が *Kiss1* 発現制御の細胞内分子メカニズムの解明のための有効なツールとして寄与できると期待される。一方で、今回検討した弓状核および AVPV キスペプチンニューロン候補株においては、E2 処理による *Kiss1* 発現への有意な効果が認められなかったことから、E2 による *Kiss1* 発現制御の細胞内分子メカニズムの解明に適したモデル株を樹立するためには、さらなる検討が必要であることが示唆された。

第3章では、*Kiss1* 発現制御の分子メカニズムの解明を目指し、新たな *Kiss1* 発現制御因子の探索および検討を行った。*Kiss1* 発現は、*Kiss1* プロモーター領域のヒストンアセチル化および脱アセチル化により制御されるとの報告があるが、関与するヒストン修飾関連因子は不明である。雌ラットキスペプチンニューロンの RNA-seq データにて、高発現が認められた retinoblastoma binding protein 7 (RBBP7) に注目し、*Kiss1* 発現制御への関与を検討した。*In situ* hybridization (ISH) 法により、視床下部における *Rbbp7* 発現の局在を検討した結果、キスペプチンニューロンが局在する弓状核ならびに AVPV を含む複数の神経核において *Rbbp7* 発現が認められた。次に、キスペプチンニューロンに *Rbbp7* が発現しているか否かを double ISH 法により検討した結果、雌ラット弓状核および AVPV の *Kiss1* 発現細胞において、*Rbbp7* 発現が両方の神経核ともに 85%以上の高い共存率で認められた。そこで、キスペプチンニューロンにおける RBBP7 の役割を検討するために、マウス弓状核キスペプチンニューロンモデル細胞株 (mHypoA-55) において、*Rbbp7* を siRNA によりノックダウンした結果、E2 の有無に関わらず *Kiss1* 発現が有意に減少した。以上から、齧歯類において、RBBP7 は E2 非依存的に *Kiss1* 発現を維持するために必要な因子であることが示唆された。

第4章では、第2章および第3章で得られた結果から、RBBP7 による *Kiss1* 発現制御メカニズムについて考察した。すなわち、「哺乳類の弓状核および AVPV キスペプチンニューロン内の *Kiss1* 発現制御メカニズムにおいて、RBBP7 は *Kiss1* 転写抑制因子の発現をヒストン脱アセチル化により抑制することで、*Kiss1* プロモーター領域への転写因子類の結合の場を提供し、*Kiss1* 発現誘起を可能にする役割を有する」という可能性を述べた。最後に、家畜の繁殖能力向上を目指した技術開発における、本研究成果の位置付け、ならびに今後の研究における応用のために必要な課題についても言及した。

以上のように、堀畑は、ラット弓状核および AVPV キスペプチンニューロン候補株を作出した。さらに、ヒストン修飾関連因子 RBBP7 が *Kiss1* 発現を促進的に制御することを初めて明らかにした。これらの知見は、学術的価値に加え、家畜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。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。