

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目

メダカの副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの転写制御におけるヒートショックタンパク質の役割に関する研究

熊本大学大学院自然科学研究科 理学専攻 生命科学講座

(主任指導 北野 健 教授)

論文提出者 内村 友哉

主論文要旨

近年、メダカ (*Oryzias latipes*) において、高水温で遺伝的雌個体を飼育することでコルチゾルの分泌量が上昇し、このホルモンにより遺伝的雌個体の雄化が引き起こされることが示唆されている。コルチゾルとは、副腎皮質で生産される糖質コルチコイドであり、主に視床下部より分泌される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン

(corticotropin-releasing hormone; 以下, CRH) により、副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone; 以下, ACTH) の下垂体からの分泌が制御され、この ACTH がコルチゾルの分泌量を制御している。しかしながら、高水温条件下において、CRH の発現および分泌の制御機構はほとんど分かっていない。そこで本論文では、高水温条件下におけるコルチゾル誘導機構の解明を目的とし、その第一歩として高水温条件下における *crh* 遺伝子の発現制御機構を解析した。学位論文は第 1 章から第 5 章から成る。

第 2 章では、DNA マイクロアレイ解析を行い、高水温条件下で飼育したメダカ胚の視床下部領域における遺伝子発現パターンを解析した。その結果、*hsp70.1* および *hsp30* 遺伝子などのヒートショックタンパク質 (*hsp*) 遺伝子の発現増加が検出され、この結果は定量的リアルタイム PCR により確認された。HSP は物理的、環境的ストレス下において分子シャペロンとして機能し、タンパク質の高次構造の恒常性を保っている。また、HSP は非常に種間変異の少なく、進化の過程でよく保存されてきたタンパク質でもある。マウスにおいて、*hsp70* 遺伝子を全身で強制発現することで、糖質コルチコイドの一種であるコルチコステロンの産生が亢進されることが分かっている。このことから、HSP は CRH の転写制御に関与している可能性が考えられた。

第 3 章では、ラットの視床下部由来培養細胞である 4B 細胞を用いて、*crh* 遺伝子発現に対する HSP の影響について、定量的リアルタイム PCR により解析した。その結果、高水温処理によって誘導された *crh* 遺伝子の発現は、HSP 発現阻害剤処理により有意に抑制された。さらに、*hsp70.1* または *hsp30* 遺伝子の過剰発現は、*crh* 遺伝子発現を有

意に誘導することが分かった。これらのことから、4B 細胞において、HSP は *crh* 遺伝子の発現を誘導していることが明らかとなった。

第4章では、視床下部領域特異的に *hsp70.1* 遺伝子を過剰発現するトランスジェニック (Tg) メダカを作製し、メダカ生体内における HSP が及ぼす *crh* 遺伝子発現への影響を解析した。コルチゾルはグルココルチコイドレセプター (GR) と複合体を形成し、コルチゾル - GR 複合体は *crh* 遺伝子のプロモーターに存在する negative glucocorticoid-responsive element (nGRE) に結合することによって負の発現制御を示すことが知られている。そこで、コルチゾルをはじめとした種々のフィードバックを排除した上で *crh* 遺伝子発現への影響を解析するために、Tg メダカ脳を用いた器官培養実験を行った。孵化後 0 日目の稚魚において *crh* 遺伝子の発現およびコルチゾル量を測定したところ、Tg メダカは non-Tg 個体と比較して、*crh* 遺伝子の発現増加およびコルチゾル量の上昇が確認された。これらの結果から、HSP70.1 は視床下部において *crh* 遺伝子の発現を誘導することにより、コルチゾル量の上昇を引き起こすことが示唆された。第5章では、総合的考察を行っている。