

氏 名 内村 友哉

主論文審査の要旨

近年、メダカを含む魚類においては、高温ストレスにより副腎(頭腎)から分泌されるコルチゾルの量が上昇し、このホルモンにより遺伝的雌個体が雄化することが明らかとなっている。しかしながら、高温によるコルチゾル誘導機構はほとんど分かっていない。そこで本論文では、脳の視床下部においてコルチゾル量を制御する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)に着目し、この *crh* 遺伝子のメダカにおける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1章では、研究の背景について記述し、メダカにおける高温ストレスによる雄化機構、脊椎動物における CRH の発現パターン及び役割等について述べている。

第2章では、メダカ *crh* 遺伝子の発現を制御する新規因子を同定するため、メダカ胚の視床下部を用いて DNA マイクロアレイ解析を実施している。その結果、ヒートショックタンパク質 (*hsp*) 遺伝子である *hsp70.1* 及び *hsp30* 遺伝子等の発現が急上昇することを見出し、この結果を定量的リアルタイム PCR により確認している。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、生物進化の過程でよく保存されたタンパク質である。この HSP がホルモンの発現制御に関与していることは全く知られていないため、このタンパク質に着目して研究を継続している。

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 の影響について解析している。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る一方、*hsp70.1* 及び *hsp30* 遺伝子の過剰発現により有意に誘導されることが分かり、4B 細胞において HSP は *crh* 遺伝子の発現制御に深く関与していることを明らかにしている。

第4章では、視床下部特異的に *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 *crh* 遺伝子発現に対する HSP の影響について解析している。生体内では恒常性維持のため、最終的に生成されるコルチゾルが血中を介して脳の CRH 産生細胞に働きかけ、*crh* 遺伝子の発現を直接抑制するネガティブフィードバック機構が存在している。そこで、この機構を排除した発現制御機構を調べるため、メダカ胚の脳だけを単離して培養する器官培養システムを確立し、このシステムを利用して *crh* 遺伝子の発現パターンを解析している。その結果、Tg メダカは野生型個体と比較して、*crh* 遺伝子の発現が有意に増加することが分かり、またコルチゾル量も同様の結果となることを明らかにしている。このように、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を初めて証明している。

第5章では、総合的考察を行っている。

今回の発見は、魚類における高温によるコルチゾル誘導機構を明らかにしただけでなく、多くの生物が保持しているストレス応答機構の一端を解明できたと考えられる。よって本審査委員会は、本論文が博士学位授与に値する内容を有するものと判断した。これらの成果の一部は、1編の査読付き国際誌に公表されており、生命科学講座における学位授与基準

を満たしている。

最終試験の結果の要旨

本審査委員会は、論文提出者に対して当該論文の内容及び関連分野全般について諮問を行った。その結果、論文提出者は、当該分野及び周辺領域について十分な知識と総合的理解力を有していると判断された。また、国際会議での発表やプロジェクトゼミナールでの英語での口頭発表などから、英語でのコミュニケーション能力も備えていると判断された。以上の結果に基づき、審査委員会は最終試験を合格とした。

本論文内容の一部は未公表であり、これから公表すること、および一部は既に国際誌に公表されており、出版社の方針で二重公表が禁止されていることから、インターネット要約公表はやむを得ないと判断した。また、剽窃チェックソフトにより剽窃がないことを確認した。

審査委員	理学専攻生物科学コース	教授	北野 健
審査委員	理学専攻生物科学コース	教授	高宗 和史
審査委員	理学専攻生物科学コース	教授	谷 時雄