

氏名	徐 枝芳
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 858 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	前腹側室周囲核における概日転写因子 DBP による <i>Kiss1</i> 発現の制御 (Circadian transcriptional factor DBP regulates expression of <i>Kiss1</i> in the anteroventral periventricular nucleus)
論文審査委員	委員長 教授 坂井 貴文 委員 教授 小林 哲也 委員 教授 西垣 功一 委員 准教授 足立 明人 委員 准教授 塚原 伸治

## 論文の内容の要旨

One of the critical sexual differentiations in rodents reflects the presence of estrogen-inducing positive feedback in females. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)/luteinizing hormone (LH) surge event is precisely timed to occur in a narrow 2-4 h window before the darkness onset of proestrus which is gated by the biological clock in some rodent species. *Kiss1* in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and its product, metastin/kisspeptin, also show a circadian pattern with a peak in the evening, which shows a strong phase relationship with the time of the GnRH/ LH surge. Thus, we hypothesized that *Kiss1*-positive neurons in the AVPV exhibit an intrinsic circadian system.

In present study, we found that a circadian transcriptional factor, albumin D-site binding protein (*Dbp*), was able to trigger *mKiss1* transcription via the D-box, and this effect was combined with those of estrogen receptor  $\alpha$  (*ER $\alpha$* ) and its ligand, estrogen. However, other clock and clock-related genes, *i.e.*, *Clock*, *Bmal1*, and *Rev-Erba* did not effect on *mKiss1* promoter activity.

A histological study demonstrated that most neurons exhibiting purple *Dbp* cytoplasmic staining co-expressed red-stained *ER $\alpha$*  (69.5 $\pm$ 2.0%), which also exists in *Kiss1*-positive neurons (93.9 $\pm$ 1.9%) in the AVPV. Expression of *ER $\alpha$*  was not rhythmic in this region, but mRNA of *Dbp* accumulated with a robust diurnal rhythm in proestrus, but not on the first day of diestrus. It is noteworthy that expression of *Dbp* on ZT9 of proestrus is significantly higher than on that in diestrus. Nevertheless, there was no expression of *Per2* in the AVPV.

Thus, these results suggest that *Dbp* and estrogen regulate the expression of *Kiss1* in the AVPV, thereby mediating the GnRH/LH surge.

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、論文発表会を平成24年2月8日に開催し、論文内容発表と質疑応答を行い、論文内容を審査した。以下に研究概要と審査結果を要約する。

キスペプチンはオーファンGタンパク質共役型受容体（GPR54）の内因性リガンドとして発見された。発見当初、このペプチドは腫瘍転移（metastasis）抑制作用があることから、ガン転移抑制作用が注目されていた。しかしながら、その後、キスペプチン、及びその受容体（GPR54）が生殖腺制御に関与することが明らかとなった。生殖腺は、視床下部—下垂体—性腺（HPG）軸により制御され、キスペプチン陽性細胞は性腺からのエストロゲン（ $E_2$ ）を受容し、下垂体からLHやFSHの分泌を惹起する性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の放出を制御し、介在神経として機能する。キスペプチン陽性細胞は、主に弓状核（ARC）と前腹側室周囲核（AVPV）に存在し、ARCとAVPVのキスペプチンをコードする *Kiss1* 遺伝子の発現は  $E_2$  投与によりそれぞれ減少、及び増大する。GnRH/LH サージは  $E_2$  により正の制御を受けるため、AVPVのキスペプチン陽性細胞がGnRH/LH サージの制御に関与すると考えられている。このGnRH/LH サージは  $E_2$  慢性投与下でも夕刻の2-3時間の限られた時間枠で生じ、その時刻制御に生物時計の関与が明らかとなっている。しかしながら、*Kiss1* 発現の時刻制御は不明な点が多く残されている。本論文ではAVPVの *Kiss1* 発現の時刻制御機構を解明するために、*in vitro* 実験、*in vivo* 実験の両面から検討を行っている。本論文によって、詳細に論じられている主要な課題と成果は以下の通りである。

まず、申請者はキスペプチンをコードする *Kiss-1* 遺伝子のプロモーター解析をするために、*Kiss1* 転写開始点より上流5.3Kbを単離し、レポーターベクターを作製した。このベクターを用いて、 $E_2$  及びその受容体（ $ER\alpha$ ）の作用を検討した結果、プロモーター活性の増大を確認するとともに、至適な濃度を決定した。次に時計遺伝子による *Kiss1* 発現の制御を検討した。概日リズム分子制御機構は3つの転写調節ループからなり、bHLH型転写因子の *Bmal1* と *Clock*、The retinoidrelated orphan receptor型転写因子の *ROR\alpha*、及びbZip型転写因子の *Dbp* が主要な転写因子として機能している。これら転写因子による *Kiss1* 遺伝子の発現制御を検討した結果、*Dbp* だけが有意に転写を促進した。さらに、*Dbp* は  $E_2/ER\alpha$  の転写活性と相加作用を示し、*Kiss1* 遺伝子発現を有意に上昇させた。*Dbp* の結合するコンセンサス配列であるD-boxは単離したプロモーター上に一カ所（-3.8 Kb）存在し、デリーション及びD-boxに変異を入れたベクターを作製し、*Dbp*、及び  $E_2/ER\alpha$  の転写活性を検討した結果、この-3.8 KbにあるD-boxが *Kiss1* 遺伝子のシスエレメントとして機能していることを明らかとした。

次に、*in vitro* 実験によって、*Kiss1* 遺伝子の発現制御が示唆された *Dbp* の発現を *in vivo* で検討した。性成熟した雌ラットを明暗条件（L:D 12:12 08:00点灯）の光条件下で飼育し、スメア法を用いて4日間の性周期が最低2サイクル確認できた個体の発情間期、及び発情前期の05:00（ZT21）、及び17:00（ZT9）に脳を採集し、AVPV領域における *Dbp* 発現を検討した。発情間期では *Dbp* の陽性細胞数は有意でないもののZT21で低く、ZT9で高い値を示した。一方、発情前期のZT21では発情間期の同時刻とほぼ同じ値を示したものの、*Kiss1* 発現が促進、及びGnRH/LH サージが惹起するZT9では測定したすべての時間と比較し有意に上昇した。また、*Dbp* 発現が *Kiss1* 発現と共発現していることを確認するために、*Dbp* 発現と  $ER\alpha$ 、及び *Kiss1* 発現と  $ER\alpha$  の *in situ*-免疫染色の二重染色を用いて検討した。その結果、約70%の *Dbp* 発現細胞が  $ER\alpha$  と共発現し、一方、*Kiss1* 発現細胞の約94%が  $ER\alpha$  と共発現することが明らかとなった。このことから、

間接的ではあるが *Dbp* はキスペプチン細胞に局在する可能性が示唆され、*Kiss1* 発現の制御を行っていると考えられた。これらの結果を基に AVPV 領域の *Kiss1* 発現の時刻制御に時計遺伝子の一つ *Dbp* が重要な役割を果たしているとは結論した。

以上、本論文では、GnRH/LH サージを惹起する *Kiss1* 遺伝子の発現時刻の制御に関して検討した結果、時計遺伝子の *Dbp* が重要な役割を果たしていることを明らかにした。これまで、GnRH/LH サージの時刻制御は哺乳類生物時計の中枢振動体である視交叉上核が直接的に制御していると考えられていた。すなわち、視交叉上核のアルギニンバソプレッシン (AVP) 陽性細胞が AVPV のキスペプチン細胞に直接的な神経投射が確認され、さらに AVP 投与により GnRH/LH サージが惹起された。しかしながら、報告されたデータを精査した結果、AVPV に末梢振動体が存在する可能性を見出し、時計遺伝子 *Dbp* が *Kiss1* 発現制御していることを示した点に本研究の新規性が見られる。そのため、本論文は生殖制御の研究に新たな方向性を示したと言える。なお、上記の内容は既に査読付きの国際学術専門誌に発表されている。これらの成果から、本審査委員会は、本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値すると判断し、学位論文を「合格」と判定した。