

氏名（本籍）	岩倉 聖（長野県）		
学位の種類	博士（神経科学）		
学位記番号	博甲第 6756 号		
学位授与年月	平成 26 年 2 月 28 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Proteomic search and functional analysis of sexually dimorphic proteins in the anteroventral periventricular nucleus (前腹側脳室周囲核における性差発現タンパク質の探索と機能解析)		
主査	筑波大学教授	理学博士	久野節二
副査	筑波大学教授（連携大学院）	理学博士	佐藤主税
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	松田 学
副査	筑波大学助教	博士（神経科学）	水挽貴至

論文の内容の要旨

(目的)

げっ歯類やヒトを含むほ乳類では、周生期のテストステロン分泌が脳に性差をもたらし、思春期以降、ゴナドトロピン分泌や性行動に性差が現れる。ほ乳類脳の性分化は不可逆的で、成熟動物のテストステロン暴露では脳の性転換は起きない。遺伝的雄でも、生直後の精巣除去による精巣テストステロン分泌欠如で脳は雌型に分化する。一方、遺伝的雄では、周生期テストステロン投与で脳は雄型になる。視索前野と視床下部には、雌雄で神経構築学的に異なる神経核（性的二型核）が複数存在する。前腹側脳室周囲核（AVPV）の体積は、雄より雌が大きく、ニューロン数も多い。雄の AVPV には、雌の 3~4 倍ものドーパミン作動性ニューロンと 10~20 倍のキスペプチン作動性ニューロンが存在する。雌では AVPV 破壊で無排卵となり、性周期が消失することから、この核がゴナドトロピン分泌パターンを形成し、生殖機能に重要な役割を果たすと考えられている。一方、視索前野性的二型核（SDN-POA）は、体積が雌より雄で大きく、ニューロン数も多い。SDN-POA の機能は、性的指向性や性行動への関与が示唆されるものの、明確ではない。AVPV の性差形成機序として、神経細胞移動や神経細胞死が関わる可能性が高いが、DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析においても、AVPV の性差形成についての詳細な分子メカニズムは未解明である。本研究では、AVPV の性差形成に関わる分子の探索のため、発現の雌雄差が性差形成時期（生後 1 日、PD1）では認められるが、性差形成終了時期（生後 6 日、PD6）には消失するタンパク質をプロテオミクス解析法で同定し、性差を示すタンパク質をコードする遺伝子の欠損マウスを用いて、当該タンパ

ク質の AVPV 形成における機能的役割の解明を試みた。

(対象と方法)

顕微鏡下に採取した PD1 と PD6 のラット AVPV からタンパク質を抽出し、超高感度の蛍光色素 CyDye DIGE Fluor saturation Dyes で標識後、2 次元電気泳動によるプロテオミクス解析を行い、PD1 の雌雄間で発現量の異なるタンパク質スポットを選定した。次に、Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry 質量分析で、各スポットのタンパク質を同定した。同定されたタンパク質について、AVPV での mRNA 発現量を Real-time RT-PCR 法で計測して、PD1 および PD6 の雌雄間で比較した。アンドロゲン作用の解析には、妊娠ラットに妊娠 14~18 日の間、テストステロンを投与し、PD1 での AVPV CRMP4 mRNA 発現を対照群（溶媒投与）と比較した。AVPV 形成における CRMP4 の関与については、CRMP4 ノックアウト（CRMP4-KO）マウスを野生型と比較して、免疫組織化学と形態計測により解析した。

(結果)

約 1000 スポットのうち、発現量に雌雄差を示す 9 スポットの質量分析を試み、6 スポットについてタンパク質を同定した。そのうち、雌で低発現のものは、collapsin response mediator protein-4 (CRMP4)、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K および α -internexin であった。雌で高発現のものは、 γ -actin、stress-70 protein、mitochondrial precursor および purine nucleoside phosphorylase であった。この発現量の雌雄差は、PD6 では消失した。mRNA 発現については、PD1 では heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K、 γ actin、stress-70 protein、mitochondrial precursor および purine nucleoside phosphorylase に雌雄差はないが、CRMP4 と α -internexin は、雌で有意に低発現量を示し、この雌雄差は PD6 で消失した。CRMP4 は神経細胞移動や神経細胞死への関与が示唆されているため、本研究ではこの分子に着目した。一方、SDN-POA における PD1 および PD6 での CRMP4 および mRNA の発現量には、雌雄差は見られなかった。従って、PD1 での CRMP4 発現量の雌雄差は、性差形成時期の AVPV に特徴的事象と思われた。

アンドロゲン作用の解析では、テストステロン投与が雌においてのみ、PD1 の CRMP4 mRNA 発現量を対照群と同レベルまで上昇させることが示され、胎仔期のテストステロンによる CRMP4 mRNA 発現促進効果が示唆された。

AVPV 形成における CRMP4 の関与の解析では、野生型と CRMP4-KO マウスの比較の結果、体積およびニューロン数の性差には変化はなかった。免疫組織化学では、成熟マウス（8 週齢）で、キスペプチン作動性ニューロンは野生型と CRMP4-KO マウスの両者において雌が有意に多く、CRMP4 の遺伝子欠損による影響は認められなかった。チロシン水酸化酵素（TH、ドーパミン作動性ニューロンマーカー）免疫陽性ニューロンについては、雄の野生型と CRMP4-KO マウスには変化が見られなかったが、雌では野生型に比べて CRMP4-KO マウスにおいてより多くの陽性ニューロンが存在した。胎生期では、TH 免疫陽性ニューロン数について両マウス間および雌雄間に有意差は認められなかったが、PD1 では雌の CRMP4-KO マウスで、雄の CRMP4-KO や雌雄の野生型マウスに比べ、多くの TH 免疫陽性ニューロンが観察された。

(考察)

本研究は、CRMP4 とその mRNA の発現が AVPV の性差形成期に雌雄差を示すこと、および雄

より雌でこれらの分子が低発現を示すことを明らかにした。また、妊娠ラットへのアンドロゲン投与が雌の CRMP4 mRNA 発現量を雄レベルまで上昇させることを示した。CRMP4-KO マウスでは、新生仔期および成熟期で、TH 免疫陽性ニューロンが雄より雌で多いことが判った。以上の結果は、CRMP4 が雌 AVPV においてドーパミン作動性ニューロン数の調節に関わることを示唆している。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、視床下部の性的二型核形成の分子的機序について、タンパク質およびその遺伝子発現を指標に、性ホルモン投与や遺伝子改変動物を対象に生化学的並びに定量形態学的手法を用いて解明を試みた意欲的な研究である。特定の性的二型核の形成時期に限定して発現変動するタンパク質を同定し、その発現の性差に対する内分泌的機序の一端と特定のニューロンの生後発達の性差について新事実を明らかにしている。分子的機序の核心をつく結果は得られてはいないが、性的二型核形成に関わりを有する機能分子の存在を示唆したことは、当該分野の研究に貢献するという点から評価できる。

平成 25 年 8 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと学位請求論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員から論文の記述について修正が求められ、平成 25 年 11 月 29 日に改めて論文が提出された。再提出された論文について審査した結果、平成 25 年 12 月 20 日付けで合格と判定された。

よって、著者は博士（神経科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。