

学位論文題名

INDUCTION OF VITELLOGENIN SYNTHESIS IN THE PRIMARY HEPATOCYTE
CULTURE IN THE RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)
AND THE JAPANESE EEL (*Anguilla japonica*)

(ニジマスおよびウナギの初代肝細胞培養
におけるビテロゲニンの合成に関する研究)

学位論文内容の要旨

脊椎卵生動物におけるビテロゲニン(Vg)は、卵黄形成期にエストロゲン(E₂)の刺激によって肝臓で合成され、血中に分泌される高分子蛋白である。この蛋白は脂質、糖、磷などを含む卵黄蛋白前駆物質であり、卵に取り込まれ、卵黄蛋白の構成成分として蓄積される。

ニジマスとウナギは、それぞれ冷水性および温水性魚種として養殖上重要な位置を占めている。ニジマスにおける卵黄形成機構については、生理学および生化学的に詳しく研究されているが、ウナギの卵黄形成機構についてはまだ未知の点が多い。

多くの魚種のVgは分離、精製され、その特性が明らかにされつつある。また、E₂によるVgの実験的誘導に関する研究も種々行われてきた。しかし、ほとんどの研究が生体内(*in vivo*)で行われ、生体外(*in vitro*)で直接Vgの合成機構を調べた研究は少ない。また鳥類、爬虫類および両生類ではE₂以外に甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、脳下垂体ホルモンなどがVgの合成に関与していることが示唆されているが、魚類においてはこれらのホルモンのVg合成誘導に関する研究はまだない。

本研究ではコラゲナーゼ還流法により分離した肝細胞の培養系を確立するとともに、この培養系を用いてVgの合成におけるE₂および脳下垂体ホルモンなどの役割について検討した。

実験材料として、ニジマスは池中養殖された体重200~300gの雄を、ウナギは養殖された約200gの未成熟の個体を用いた。肝細胞の培養は、肝門脈を通じてコラゲナーゼを還流し、分離された細胞をニジマスでは15℃で、ウナギでは23℃で、血清を含まないL-15培地を用いて行った。ホルモンを含む培地は毎日交換した。

その結果、ニジマスの培養肝細胞から合成分泌された蛋白質の SDS - 電気泳動のパターンは血清蛋白の泳動パターンと類似していた。また、 E_2 ($10^{-6}M$) 添加により、Vg 相当画分に蛋白の合成が確認された。この蛋白は、精製された Vg に対する抗血清を用いたイムノブロット法および免疫電気泳動によって、Vg であることが確認された。肝細胞培養系で合成された Vg の主要なサブユニットの分子量は SDS - 電気泳動によって 175,000 であることが分かった。Vg 量を酵素免疫測定法により定量した結果、Vg は E_2 添加後 1 日目から現れ、5 日間の培養期間中経時的に増加した。Vg の合成率は添加した E_2 量によって変化したが、 $10^{-6}M$ で最高に達し、 $10^{-5}M$ ではむしろ低下した。また、トリヨードサイロニン (T_3) が Vg の合成に影響するか否かを調べた結果、 T_3 の添加効果は認められなかった。

次にウナギを用いた実験を行った。ウナギ Vg の精製は $MgCl_2$ -EDTA 沈澱法と Sepharose 6 B column を用いて行った。精製 Vg はディスク電気泳動によって単一のバンドとして現れた。この蛋白は E_2 投与ウナギの血清 Vg と同じ移動度を示し、免疫電気泳動の結果から、精製された Vg の抗血清に対して 1 本の沈降線が認められた。これらのことから本法により精製された Vg は純粋であることが分かった。精製したウナギ Vg は SDS - 電気泳動によって約 200,000 と 110,000 の 2 つのサブユニットに分かれた。

ウナギの Vg 合成における脳下垂体摘除 (HYPOX) の影響について調べた。手術後 9 日目に E_2 (1 mg/kg BW) を腹腔内注射し、7 日後に Vg 合成の有無を調べた結果、対照群と偽手術群では E_2 によって Vg の合成が誘導されたが、HYPOX 群では Vg の合成は起きなかった。また、HYPOX によって血中 Ca, Na および蛋白質濃度が減少した。この減少は E_2 投与によっても回復しなかった。これらの結果から、ウナギの Vg 合成には脳下垂体系のホルモンの関与が強く示唆された。そこで次に肝細胞培養系を用いて脳下垂体ホルモンの Vg 合成に及ぼす影響について調べた。

その結果、 E_2 添加したウナギ肝細胞培養では培地に極わずかの Vg の分泌が認められたが、6 日間の培養期間中 Vg 量には変化が見られなかった。しかし E_2 に牛成長ホルモン (GH) あるいは羊プロラクチン (PRL) を添加すると多量の Vg 合成が誘導された。

次に E_2 を投与したウナギの肝細胞を用いて Vg 合成について調べた結果、Vg は培養 1 日目から出現したが、 E_2 、GH または PRL 単独添加培地では、培養時間の経過とともに E_2 の合成活性は減少した。しかし E_2 および GH あるいは PRL を一緒に添加することにより、多量の Vg の合成分泌が認められ、経時的に増加した。これらの結果から、肝細胞培養での Vg 合成には *in vivo* における E_2 によるプライミングに関係なく、GH または PRL の存在が必要であるこ

とが分かった。

さらに、Vgの合成におけるE₂およびGH、PRLの添加量に対する影響について調べた。E₂を10⁻⁶Mで一定にし、GHを10~100 ng/ml、PRLを10~1000 ng/mlの濃度で変え、Vgの合成を調べたところ、PRLが1000 ng/mlのとき、GHが10~1000 ng/mlの範囲で高いVgの合成が見られたが、特にGHの濃度が50 ng/mlのときVg合成が最大であった。PRLの濃度を1000 ng/mlから100 ng/mlに低下すると、GHの濃度が10~100 ng/mlでのVg合成は著しく減少した。

Vgの合成における内因性ホルモンなどの影響について調べるため、ホルモンを含まない培地で8日間前処理した。その後、E₂とGHまたはPRLを含んだ培地でさらに培養を続けた。このような条件においても、E₂だけではVgは合成されなかったが、E₂とGHあるいはPRLと一緒に添加することによりVgは新たに合成された。

E₂に6日間暴露した培養肝細胞を用いてVg合成におけるE₂、GH、PRLなどの影響について調べた。E₂に暴露した肝細胞においても、E₂、GH、PRL単独ではVg合成を誘導することは出来ず、Vgの合成にはE₂とGH、E₂とPRLの組み合わせが必要であった。しかし、この場合E₂に暴露された肝細胞の培養ではE₂とGHあるいはE₂とPRLにより合成されたVgの量は、E₂に暴露されていない肝細胞における合成量よりも多かった。

最後に、E₂、GHおよびPRLの3種を添加して6日間培養後、その培地からそれらのホルモンを除いたときのVg合成についても調べた。6日後にE₂だけの培地と入れ替えても、その後の3日間の培養では、E₂、GHおよびPRLの入った培地で培養した場合に比べVg合成の低下は見られなかった。

以上のように、ニジマスとウナギの肝細胞培養系を用いてVgの合成機構を調べた結果、2種間ではその機構が異なることが分かった。即ち、ニジマスにおいては、E₂だけでVgの合成が誘導されるが、ウナギではE₂だけでは合成されにくく、GHあるいはPRLとの共同作用でVgが合成誘導された。このことから特にウナギでは、Vg合成における脳下垂体ホルモンの関与が明らかになった。また、本研究で検討されたホルモン以外の要因、例えば雄性ホルモンのVg合成における関与についても今後調べる必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 麦 谷 泰 雄
副 査 教 授 山 崎 文 雄
副 査 助 教 授 原 彰 彦

脊椎卵生動物におけるビデロゲニン(Vg)は、卵黄形成期にエストロゲン (E_2) の刺激によって肝臓で合成され、血中に分泌される高分子蛋白質である。この蛋白質は脂質、糖、燐などを含み卵黄蛋白質前駆物質であり、卵に取り込まれ、卵黄蛋白質として蓄積される。

魚類の卵黄形成機構に関する研究は、従来 *in vivo* における研究が主であった。しかしこの手法では、Vg が合成される詳細な機構、特に関連ホルモン相互間の作用様式を明らかにすることは困難であった。本研究は、コラゲナーゼ還流法により分離した肝細胞の培養系を確立し、これを用いて、 E_2 による Vg の合成過程並びに合成能に及ぼす脳下垂体ホルモンと甲状腺ホルモンの相互作用を明らかにすることを目的として行われた。用いた魚種は、冷水性および温水性の重要養殖魚であるニジマスとウナギであるが、評価される主な成果は以下の通りである。

肝細胞の培養は、肝門脈を通じてコラゲナーゼを還流し、分離した細胞をニジマスでは15°Cで、ウナギでは23°Cで、L-15無血清培地を用いて行った。ニジマスでは E_2 の添加により、新しい蛋白質が合成分泌されたが、この蛋白質は、イムノブロット法および免疫電気泳動により、Vg であることが確認された。このように、魚類においても、肝細胞培養系を用いて Vg の合成を誘導することが可能であることを示し、この蛋白質の主要サブユニットは、SDS-電気泳動法により、分子量が175,000であることを明らかにした。酵素免疫測定法により Vg を定量した結果、Vg は E_2 添加1日目から現れ、5日間の培養期間を通じて増加した。また Vg の合成能は、 E_2 が 10^{-6} Mで最大になるが、甲状腺ホルモンの添加によっても合成促進効果がないことを示し、魚類と他の脊椎卵生動物の Vg 合成機構が必ずしも同一でないことを明らかにした。

次にウナギを用いての実験であるが、脳下垂体を摘除することにより、 E_2 を投与しても Vg の合成は起きないことを見出し、脳下垂体ホルモンが、 E_2 の合成に必須であることを示唆し、肝細胞培養系を用いてこのことを詳細に調べた。まず、 E_2 添加した培地には、ごくわずかの Vg の分泌が認められたが、6日間の培養期間中、Vg 量は増加しなかった。しかしこれに牛成長ホルモン (GH) あるいは羊プロラクチン (PRL) を同時に添加すると、多量の Vg が合成・分泌されることを明らかにした。なおこの分泌蛋白質が Vg であることは、免疫電気泳動法に

より確認しており、精製したウナギの Vg は、分子量が約200,000と110,000の2つのサブユニットから成ることを明らかにした。

E₂を投与したウナギから分離した肝細胞を用いて、Vgの合成を調べた。Vgは、培養1日目から出現したが、E₂、GHまたはPRL単独添加の培地では経時的にVgの合成活性は減少した。しかしE₂およびGHあるいはPRLと一緒に添加することにより、多量のVgの合成・分泌が認められ、*in vivo*におけるE₂によるプライミングに関係なく、E₂によるVgの合成には、GHまたはPRLの存在が必要であることを明らかにした。また同時に、Vgの合成能はGHおよびPRLの濃度がそれぞれ50 ng/mlと1 μg/mlの条件下で最大に成ることを示した (E₂: 10⁻⁶M)。

E₂に6日間暴露した培養肝細胞の場合でも、E₂、GH、PRL単独ではVgの合成を誘導することはほとんどできず、Vgの合成にはE₂とGH、E₂とPRLの組合せが必要であることを示した。しかしこの場合、E₂にあらかじめ暴露された細胞では、E₂とGHあるいはE₂とPRLにより合成されたVgの量は、E₂に暴露されていない肝細胞における合成量より多かった。

最後に、E₂、GHおよびPRLを添加して6日間培養し、その後培地からこれらのホルモンを除いた時のVg合成能について調べている。6日後にE₂無添加またはE₂だけの培地と入れ替えても、その後の3日間の培養では、E₂、GHおよびPRLの入った培地で培養した場合に比べて、Vg合成能の低下は認められなかった。

以上の結果は、魚種によりVgの合成様式が異なることを示し、ニジマスではE₂だけでVgの合成が誘導されるが、ウナギでは脳下垂体ホルモン (GHおよびPRL) がVgの合成に直接関与していることを明らかにしたものであり、魚類の卵黄形成機構に関する研究分野に顕著な貢献をするものと高く評価される。よって審査員一同は、本論文が博士 (水産学) 学位論文として相当の業績であると認定した。