

学 位 論 文 題 名

Studies on estrogen receptor system
in the Japanese eel, *Anguilla japonica*
(ニホンウナギのエストロジェンレセプターに関する研究)

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ（*Anguilla japonica*）は、日本の水産業において重要な養殖対象魚種であるが、現在その種苗は天然で捕獲されるシラスに完全に依存しているため、人工種苗生産技術の確立が待ち望まれている。これまでに性成熟したウナギが天然で捕獲された例は無く、また飼育下ではウナギは性成熟を起こさないことから、ホルモン投与により人工的に催熟する試みがなされているが、安定した成果は得られていない。ウナギの人為催熟技術を確立し、安定した種苗生産を行うためには、ウナギの性成熟の生理機構を基礎的な視点から正確に把握する必要がある。

他の脊椎動物と同様に硬骨魚類の生殖腺の発達、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン: GTH）の作用により、生殖腺で生成される性ステロイドホルモンによって制御されている。特に雌においては、エストロジェン（エストラジオール・ 17β : E_2 ）が卵母細胞の成長に重要な役割を担っている。 E_2 は肝臓に作用して、卵黄前駆タンパク質であるビテロジェニン（VTG）の合成、分泌を促す。肝細胞から分泌された VTG は、血流を介して成長期の卵母細胞に特異的に取り込まれ、卵黄タンパク質として蓄積される。この VTG 合成における E_2 の作用機構として、 E_2 が肝細胞核内に存在する特異的なエストロジェンレセプター（ER）に結合した後、 E_2 ・ER 複合体は VTG 遺伝子上の特異的な配列を認識して結合し、VTG 遺伝子の発現を誘導することが知られている。従って、卵黄形成機構における E_2 作用の解析には、ER に関する詳細な研究が必要とされる。

本研究では、ニホンウナギ雌の成熟過程における E_2 の作用機構を明らかにする目的で、ラジオレセプターアッセイを用いて肝臓の ER の諸性質を検討するとともに、催熟過程に伴う肝臓 ER 量の変化を測定した。さらに、ウナギ ER cDNA のクローニングを行い、ウナギ ER の一次構造を明らかにした。また、このクローン化した ER cDNA をプローブに用いて、 E_2 および催熟処理に伴う肝臓 ER mRNA の発現量の変化を調べた。併せて、他の組織における ER mRNA の発現、特に精巢における発現について検討した。

ニホンウナギ肝臓の細胞質および核に E_2 の特異的な結合がみられ、ER の存在が示された。それらは高親和性（ K_d : 細胞質 = 0.97 nM; 核 = 0.85 nM）で一種類の結合部位をもち、さらにエストロゲン特異性を有することが確認された。これらの ER の性質は、血清中にみられた E_2 結合タンパク質のそれと大きく異なっており、このことから肝細胞中に検出された ER の真びょう性が確かめられた。次に、サケ脳下垂体投与による養殖ウナギ雌の人為催熟過程に伴う肝臓 ER 量ならびに血中 E_2 および VTG 量の変化を調べ、それらの関連性を検討した。その結果、血中 E_2 量は油球期から卵黄形成中期まで低値を維持したが、核移動期に入ると急増した。一方、VTG 量は卵黄形成初期から中期にかけて漸増した後、核移動期にさらに著増をみせた。肝細胞質 ER（cER）量は卵黄形成初期にわずかに増加した後、卵黄形成中期および核移動期には油球期に比して 5 倍もの有意な増加を示した。これと対照的に、核 ER（nER）量は催熟期間を通して有意な変化をみせなかった。成熟の進行に伴う cER の増加は、肝細胞の E_2 に対する反応性の増大を表わしており、このことは血中 VTG 量の増加にも反映していると考えられた。また、nER 量に変化がみられなかったことは、人為催熟上の問題点を示していると推察され、血中 E_2 量の変化と併せて今後検討すべき課題として残された。

ER cDNA のクローニングにあたって、先ず他の動物種で明らかにされている ER の保存配列を基にプライマーを合成し、卵黄形成後期の下りウナギの肝臓由来の cDNA を鋳型に PCR を行うことによって、ER cDNA の断片が得られた。この ER cDNA 断片をプローブに用いて、成熟下りウナギ肝臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、タンパク質翻訳領域の全体を含む ER cDNA が得られ、その塩基配列を決定した。ウナギ ER は 573 個のアミノ酸か

らなり、分子量は 63,417 と算出された。またウナギ ER のアミノ酸配列は、他種との比較において、DNA 結合部位とリガンド結合部位の 2 つの機能的に重要な領域で、それぞれ相同率が 80% および 55% と高い相同性を示したが、他の領域では顕著な相同性（10・20%）は認められなかった。これらの結果から、ER の最も基本的な機能（標的配列およびリガンドの認識ならびに結合）は進化の過程において保存されている一方で、転写活性化能などの他の機能には、種特異的な機構が存在する可能性が示された。ウナギ ER cDNA を動物細胞発現ベクターに組み込み、COS 細胞に導入して ER を一過的に発現させた後、細胞抽出液を調製してラジオレセプターアッセイを行った。その結果、高親和性（Kd: 0.5 nM）でエストロゲン特異性を示す ER が検出された。このことから、今回得られた cDNA は機能的なウナギ ER をコードしていることが確認された。

ウナギ ER cDNA をプローブに用いたノーザンブロットにより、 E_2 投与および未投与の養殖ウナギ雌雄の肝臓における ER mRNA の発現を調べた。その結果、 E_2 未投与の雄肝臓では全く反応がみられなかったが、雌では 3.8 kb と 1.2 kb の 2 本の特異的なバンドが検出された。さらに E_2 投与魚では、雌雄ともにこれらに加えて 5.6 kb のバンドが検出され、かつ 5.6 kb のバンドは最も強い反応性を示した。次に、人為催熟処理に伴う養殖ウナギ雌肝臓での ER mRNA の発現量の変化をノーザンブロットにより解析した。その結果、油球期では 3.8 kb と 1.2 kb の 2 つのバンドのみが認められたが、卵黄形成初期には加えて 5.6 kb のバンドが検出された。さらに、5.6 kb の反応性は成熟の進行とともに増大したが、他の 2 つの反応性には変化がみられなかった。これらの結果から、ウナギの肝臓では少なくとも 3 種類の ER mRNA が発現していることが示されたが、各々が機能的な ER mRNA として働いているか否かは、今後明らかにすべき問題として残された。しかしながら、5.6 kb の ER mRNA の発現量は E_2 投与および卵黄形成の進行に伴って増加したことから、主に 5.6 kb の mRNA が VTG 合成などの E_2 作用に機能的に関わっていることが示唆された。さらに、 E_2 投与魚の肝臓以外の各組織における ER mRNA の発現を調べたところ、精巣にのみ 3.8 kb の ER mRNA が検出された。また、ER mRNA は未処理およびヒト胎盤性ゴナドトロピン（HCG）投与魚の精巣においても発現していた。未処理魚の ER mRNA の発現量は、 E_2 投与魚のそれより高かったことから、精巣における ER mRNA の

発現は、肝臓においてとは異なり、 E_2 により負の制御を受ける可能性が示された。さらに、精巢の ER mRNA の発現量は HCG 投与後 3 日目には増加しており、その後 6 日目には減少がみられ 9 日目はさらに減少していた。これらの結果から、ER が精原細胞の増殖に関与していることが示唆されたが、精子形成に及ぼす E_2 の作用は不明であり、今後検討すべき課題として残された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 内 皓 平

副 査 教 授 原 彰 彦

副 査 助 教 授 上 田 宏

学 位 論 文 題 名

Studies on estrogen receptor system in the Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギのエストロジェンレセプターに関する研究)

ニホンウナギの養殖においては、人工種苗生産技術が確立されておらず、また親魚を得るための人為催熟についても安定した成果は得られていない。ウナギの人為催熟技術を確立し、安定した種苗生産を行うためには、ウナギの性成熟の生理機構を基礎的な視点から正確に把握する必要がある。そこで本研究では、ニホンウナギ雌の成熟過程におけるエストラジオール- 17β (E_2) の作用機構を明らかにする目的で、肝臓のエストロジェンレセプター (ER) について生化学および分子生物学の手法を用いて種々の解析をおこなった。また、雌の人為催熟過程に伴う肝臓 ER の変化について調べた。

ニホンウナギ肝臓の細胞質および核において、高親和性で一種類の結合部位をもち、さらにエストロジェン特異性を有する ER の存在が確認された。次に、サケ脳下垂体投与による養殖ウナギ雌の人為催熟過程に伴う肝臓 ER 量ならびに血中 E_2 および ビテロジェニン (VTG) 量の変化を調べ、それらの関連性を検討した。その結果、血中 E_2 量は油球期から卵黄形成中期まで低値を維持したが、核移動期に入ると急増した。一方、VTG 量は卵黄形成初期から中期にかけて漸増した後、核移動期にさらに著増をみせた。肝細胞質 ER (cER) 量は卵黄形成初期にわずかに増加した後、卵黄形成中期および核移動期には油球期に比して 5 倍もの有意な増加を示した。これと対照的に、核 ER (nER) 量は催熟期間を通して有意な変化をみせなかった。成熟の進行に伴う cER の増加は、肝細胞の E_2 に対する反応性の増大を表わしており、このことは血中 VTG 量の増加にも反映していると考えられた。また、nER 量に変化がみられなかったことは、人為催熟上の問題点であると考えられた。

ER cDNA のクローニングを試みた結果、タンパク質翻訳領域の全体を含む ER cDNA が得られた。ウナギ ER は 573 個のアミノ酸からなり、分子量は 63,417 と算出された。またウナギ ER のアミノ酸配列は、他種との比較において、DNA 結合部位とリガンド結合部位の 2 つの機能的に重要な領域で、それぞ

れ相同率が 80% および 55% と高い相同性を示したが、他の領域では顕著な相同性 (10 - 20%) は認められなかった。これらの結果から、ER の最も基本的な機能 (標的配列およびリガンドの認識ならびに結合) は進化の過程において保存されている一方で、転写活性化能などの他の機能には、種特異的な機構が存在する可能性が示された。ウナギ ER cDNA を動物細胞発現ベクターに組み込み、COS 細胞に導入して ER を一過的に発現させた後、細胞抽出液を調製してラジオレセプターアッセイを行った。その結果、高親和性 (Kd: 0.5 nM) でエストロジェン特異性を示す ER が検出された。このことから、今回得られた cDNA は機能的なウナギ ER をコードしていることが確認された。

ウナギ ER cDNA をプローブに用いたノーザンブロットにより、 E_2 投与および未投与の養殖ウナギ雌雄の肝臓における ER mRNA の発現を調べた。その結果、 E_2 未投与の雄肝臓では全く反応がみられなかったが、雌では 3.8 kb と 1.2 kb の 2 本の特異的なバンドが検出された。さらに E_2 投与魚では、雌雄ともにこれらに加えて 5.6 kb のバンドが検出され、かつ 5.6 kb のバンドは最も強い反応性を示した。次に、人為催熟処理に伴う養殖ウナギ雌肝臓での ER mRNA の発現量の変化をノーザンブロットにより解析した。その結果、油球期では 3.8 kb と 1.2 kb の 2 つのバンドのみが認められたが、卵黄形成初期には加えて 5.6 kb のバンドが検出された。さらに、5.6 kb の反応性は成熟の進行とともに増大したが、他の 2 つの反応性には変化がみられなかった。これらの結果から、ウナギの肝臓では少なくとも 3 種類の ER mRNA が発現していることが示された。しかしながら、5.6 kb の ER mRNA の発現量は E_2 投与および卵黄形成の進行に伴って増加したことから、主に 5.6 kb の mRNA が VTG 合成などの E_2 作用に機能的に関わっていることが示唆された。さらに、 E_2 投与魚の肝臓以外の各組織における ER mRNA の発現を調べたところ、精巣にのみ 3.8 kb の ER mRNA が検出された。また、ER mRNA は未処理およびヒト胎盤性ゴナドトロピン (HCG) 投与魚の精巣においても発現していた。さらに、精巣の ER mRNA の発現量は HCG 投与後 3 日目には増加しており、その後 6 日目には減少がみられ 9 日目はさらに減少していた。これらの結果から、ER が精原細胞の増殖に何らかの関与をしていることが示唆された。

以上のニホンウナギ ER の解析により得られた結果は、ニホンウナギの生殖生理機構を知る上で重要な示唆を与えるに留まらず、ウナギの人為催熟技術ひいては完全養殖法確立のための基礎的資料を提供したものとして高く評価され、本論文が博士 (水産学) の学位請求論文として相当の業績であると認定した。