

Molecular biological studies on gonadotropin in the
Japanese eel, *Anguilla japonica*

（ニホンウナギの生殖腺刺激ホルモンに関する分子生物学的研究）

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ウナギに完全に依存している。しかし、シラスウナギの漁獲量は年変動が激しく、また近年の漁獲量は年々減少しており、その安定供給が難しくなっている。そのため、人工種苗生産技術の確立によるシラスウナギの安定供給が待ち望まれている。人工種苗生産のためには、まず安定した成熟親魚の確保が必要であるが、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い。また、飼育下のウナギでは性成熟が進行しないため、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ことが必要である。

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 (GTH) の作用により制御されている。特に雌においては、GTH は卵濾胞細胞に作用し、卵黄形成期にはエストラジオール-17 β (E₂) の産生を、卵成熟期には卵成熟誘起ステロイドの産生を介して卵母細胞の成長および成熟を促している。飼育環境下のニホンウナギでは、GTH の産生および分泌が殆ど無いために、上述のような卵黄形成および卵成熟が進行しない。そのため、GTH を多量に含有するサケ脳下垂体を連続投与することにより催熟している。

しかしこの方法では、卵黄形成は比較的容易に進行するが、卵成熟は非常に進行し難く、また、個体間の差も大きい。これらの問題を解決するためには、人為催熟中の脳下垂体での GTH の合成および分泌動態を把握し、ウナギ自身の GTH を最大限に利用することが非常に有効であると考えられる。そこで本研究は、ニホンウナギ雌の成熟過程における GTH の合成変化を遺伝子レベルで詳細に調べることを目的として行われた。

まず、ニホンウナギ glycoprotein hormone α および GTH II β サブユニット cDNA の単離および塩基配列の決定を行った。脳下垂体由来の cDNA を鋳型に、既知のヨーロッパウナギの両サブユニット cDNA から選択した配列をプライマーに用いた polymerase chain reaction (PCR) によってそれぞれ特異的な cDNA の増幅が見られた。得られた二つの cDNA の塩基配列を決定した結果、全 open reading frame を含む 351 base pair (bp) のニホンウナギ glycoprotein hormone α cDNA および 433 bp の GTH II β cDNA であることが確認された。これら両サブユニット cDNA は、遺伝子およびアミノ酸配列の両方において他の硬骨魚類との相同性がそれぞれ約 60 - 90 % と非常に高かった。また、システイン残基や糖鎖の結合部位など立体構造の保持に重要なアミノ酸配列は、その数および位置が全て多魚種と相同であった。これらの構造的な解析の結果は、二つの cDNA がそれぞれニホンウナギ glycoprotein hormone α および GTH II β をコードしていることを示している。

次に、それぞれのサブユニット cDNA をプローブに用いたノーザンプロット解析により、サケ脳下垂体の連続投与によるニホンウナギ雌の人為催熟に伴う両サブユニット mRNA の発現変化を調べた。glycoprotein hormone α mRNA の発現は、卵母細胞の成長に伴いほぼ直線的に増加し、核移動期で最大値を示した。一方、GTH II β mRNA の発現は、卵黄形成中期までは全く検出されず、卵黄形成後期に初めて検出され、核移動期にさらに増加した。これらの結果は、ニホンウナギ GTH II の合成は、卵黄形成後期以降に初めて増加することを示している。しかしながら、ノーザンプロットによる今回の解析では、全ての成

熱段階で両サブユニット mRNA の発現が確認された訳ではなく、個体レベルでの正確な把握には至らなかった。これは、ノーザンブロットの検出感度が低いことに加えて、脳下垂体から得られるサンプルとしての RNA の量が少ない事が大きな原因となっている。そのため、詳細に両サブユニット遺伝子の発現を解析するためには、より高感度の測定系の必要性が示唆された。

上述の結果を考慮して、reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いた高感度の遺伝子発現測定系の確立を行った。PCR は特定の微量な遺伝子を無限に増幅できる方法であるが、その過程で生じる僅かな誤差が最終産物量に大きく反映するため、反応毎にその補正を行う必要がある。

β -actin は、細胞内骨格の主要素であり、生体内での発現量はほぼ一定に保たれていることが知られている。今回の測定系では、 β -actin mRNA をそれぞれのサブユニット mRNA と同時に増幅することによって各反応毎に生ずる誤差を解消した。目的の GTH サブユニットと β -actin 遺伝子の同時増幅において、両遺伝子の増幅効率と同じであり、特に 18 - 24 PCR サイクルにおいて両遺伝子の増幅が最も良好であった。そこで、21 PCR サイクルでの両遺伝子の増幅産物量を調べ、目的とするニホンウナギ glycoprotein hormone α および GTH II β 遺伝子発現量を、対照である β -actin 遺伝子発現量で割ることにより、目的遺伝子の発現値を算出した。その結果、今回確立したニホンウナギ glycoprotein hormone α および GTH II β 遺伝子発現測定系は、250 ng という微量な RNA サンプルからの解析を可能にした。また、本測定系の精度を調べるため、アッセイ内変動係数およびアッセイ間変動係数を算出した結果、それぞれ約 15 および 25% と非常に低値であった。これらの結果は、今回確立した遺伝子発現測定系が、非常に高感度であるだけでなく、正確さも兼ね備えていることを示しており、本測定系がニホンウナギ glycoprotein hormone α および GTH II β 遺伝子発現の解析に有効であることを証明している。

RT-PCR 遺伝子発現測定系を用いて、ニホンウナギ雌の人為催熟に伴う両サブユニット mRNA の発現変化を詳細に調べた。glycoprotein hormone α mRNA

の発現は、卵黄形成中期まで緩やかに増加し、その後やや急激に増加した。

一方、GTH II β mRNA の発現は、ホルモン未投与の未熟な個体においても低値ながら検出され、卵黄形成中期には約 30 倍に急増した。GTH II β mRNA は、その後も増加を続け、核移動期に最高値を示した。これらの結果は、GTH II β の合成が、人為催熟開始から間もなく誘導されることを示している。また、これら GTH サブユニット mRNA の発現変化は、血中の性ステロイド、特に E₂ および testosterone (T) の動態とよく一致していた。これは、投与されたサケ GTH の刺激によって卵濾胞細胞で産生された E₂ および T の脳下垂体へのフィードバック作用による結果であることを示唆している。このように、人為催熟による卵母細胞の成長に伴って、ニホンウナギ GTH II の合成が促進することが本研究によって初めて詳細に調べられた。しかし、合成されたウナギ GTH II の分泌および性成熟への関与については全く不明であり、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 山 崎 文 雄

副 査 助 教 授 上 田 宏

学 位 論 文 題 名

Molecular biological studies on gonadotropin in the Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギの生殖腺刺激ホルモンに関する分子生物学的研究)

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ウナギに完全に依存しており、人工種苗生産技術の確立によるシラスウナギの安定供給が待ち望まれている。そのためには、まず成熟親魚を安定して供給する必要がある。

硬骨魚類の生殖腺の発達、他の脊椎動物と同様に脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GTH) の作用により制御されている。特に雌においては、GTH は卵濾胞細胞に作用し、卵黄形成期にはエストラジオール-17 β (E₂) の産生を、卵成熟期には卵成熟誘起ステロイドの産生を介して卵母細胞の成長および成熟を促している。飼育環境下のニホンウナギでは、GTH の産生および分泌が殆ど無いために、上述のような卵黄形成および卵成熟が進行しない。そのため、GTH を多量に含有するサケ脳下垂体を連続投与することにより催熟している。しかしこの方法では、卵黄形成は比較的容易に進行するが、卵成熟は非常に進行し難く、また、個体間の差も大きい。これらの問題を解決するためには、人為催熟中の脳下垂体での GTH の合成および分泌動態を把握し、ウナギ自身の GTH を最大限に利用することが非常に有効であると考えられる。そこで本研究は、ニホンウナギ雌の成熟過程における GTH の合成変化を遺伝子レベルで詳細に調べることを目的として行われた。

まず、ニホンウナギ糖タンパクホルモン α および GTH II β サブユニット cDNA の単離および塩基配列の決定を行った。脳下垂体由来の cDNA を鋳型に、既知のヨーロッパウナギの両サブユニット cDNA から選択した配列をプライマーに用いた polymerase chain reaction (PCR) によってそれぞれ特異的な cDNA の増幅が見られた。得られた二つの cDNA の塩基配列を決定した結果、全 open reading frame を含む 364 base pair (bp) のニホンウナギ糖タンパクホルモン α cDNA および 433 bp の GTH II β cDNA であることが確認された。これら両サブユニット

cDNA は、遺伝子およびアミノ酸配列の両方において他の硬骨魚類との相同性がそれぞれ約 60-90 % と非常に高かった。また、システイン残基や糖鎖の結合部位など立体構造の保持に重要なアミノ酸配列は、その数および位置が全て多魚種と相同であった。これらの構造的な解析の結果は、二つの cDNA がそれぞれニホンウナギ糖タンパクホルモン α および GTH II β をコードしていることを示している。

次に、reverse transcription · polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いた高感度の遺伝子発現測定系の確立を行った。今回の測定系では、 β -actin mRNA をそれぞれのサブユニット mRNA と同時に増幅することによって PCR の各反応毎に生ずる誤差を解消した。目的の GTH サブユニットと β -actin 遺伝子の同時増幅において、両遺伝子の増幅効率は同じであり、特に 18-24 PCR サイクルにおいて両遺伝子の増幅が最も良好であった。そこで、21 PCR サイクルでの両遺伝子の増幅産物量を調べ、目的とするニホンウナギ糖タンパクホルモン α および GTH II β 遺伝子発現量を、対照である β -actin 遺伝子発現量で割ることにより、目的遺伝子の発現値を算出した。その結果、今回確立したニホンウナギ糖タンパクホルモン α および GTH II β 遺伝子発現測定系は、250 ng という微量な RNA サンプルからの解析を可能にした。また、本測定系の精度を調べるため、アッセイ内およびアッセイ間変動係数を算出した結果、それぞれ約 15 および 25% と非常に低値であった。これらの結果は、今回確立した遺伝子発現測定系が、非常に高感度であるだけでなく、正確さも兼ね備えていることを示しており、本測定系がニホンウナギ糖タンパクホルモン α および GTH II β 遺伝子発現の解析に有効であることを証明している。

上述のようにして確立された RT-PCR 遺伝子発現測定系を用いて、ニホンウナギ雌の人為催熟に伴う両サブユニット mRNA の発現変化を詳細に調べた。糖タンパクホルモン α mRNA の発現は、卵黄形成中期まで緩やかに増加し、その後やや急激に増加した。一方、GTH II β mRNA の発現は、ホルモン未投与の未熟な個体においても低値ながら検出され、卵黄形成中期には約 30 倍に急増した。GTH II β mRNA は、その後も増加を続け、核移動期に最高値を示した。これらの結果は、GTH II β の合成が、人為催熟開始から間もなく誘導されることを示している。また、これら GTH サブユニット mRNA の発現変化は、血中の性ステロイド、特に E₂ およびテストステロン (T) の動態と一致していた。これは、投与されたサケ GTH の刺激によって卵濾胞細胞で産生された E₂ および T の脳下垂体へのフィードバック作用による結果であることを示唆している。

上述のように、本研究では、人為催熟による卵母細胞の成長に伴って、ニホンウナギ自身の GTH II の合成が増加することを初めて詳細に解析した。これらの結果は、現在多くの問題を抱えるニホンウナギ雌の人為催熟法を改良するための極めて重要な知見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。