

学 位 論 文 題 名

Studies on the steroidogenic enzyme system for the ovarian
estrogen biosynthesis of Japanese eel, *Anguilla Japonica*

（ニホンウナギの卵巣のエストロゲン合成に關与する
ステロイド合成酵素系に關する研究）

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は水産養殖業において重要な対象魚であるが、その種苗は完全に天然のシラスウナギの漁獲のみに依存しているため、種苗生産技術の確立が待ち望まれている。降海時の下りウナギの卵巣卵の多くは、卵黄形成初期にまで発達しているが、これ以上に成熟段階の進んだ卵巣卵を持つニホンウナギは天然では採捕されていない。このため、ウナギの成熟卵、および孵化稚魚を得るために、古くから下りウナギへのサケ脳下垂体懸濁物 (SPH) 等のホルモン投与が試みられてきたが、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認するためには、卵濾胞の発達を制御する内分泌機構を正確に把握することが必要である。また、これまでの過去の人為催熟の試みには、ほとんどの場合下りウナギが使用されてきたが、近年のその入手困難さもあり、最近では養殖ウナギあるいはエストラジオール- 17β (E_2) 投与により人為的に雌化された養殖ウナギ（雌化ウナギ）も使用されている。しかし、人為催熟に対する卵巣発達の促進効果はこれら3種のウナギで異なっており、また、その理由も明らかではない。

一般に、卵母細胞の成長および最終成熟は卵濾胞組織で合成されるステロイドホルモンの働きに制御されているが、ウナギでも、 E_2 が卵黄形成に、 $17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) が卵母細胞の最終成熟に關与していると考えられている。これらステロイドホルモンの産生量の変化

は様々なステロイド合成酵素の活性の変化に依存している。ステロイド合成酵素の活性変化はその遺伝子の発現によって調節されていると考えられている。その中でも、アロマターゼ (P450arom) は E_2 産生を直接制御する律速酵素であり、それ故、その遺伝子の発現変化を解明することは卵黄形成の内分泌制御を理解する上で極めて重要である。本研究は、ニホンウナギ雌の成熟過程におけるステロイドホルモンの産生能の変化を、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。

最初に、下りウナギ、養殖ウナギ、および雌化ウナギの人為催熟前の卵巢の発達段階と、処理による卵巢の発達過程の関係を調べた。処理前の卵巢は、下りウナギが最も発達しており、生殖腺体指数 (GSI) の平均は 2.5%、最大卵群の卵径は $214\text{--}329\mu\text{m}$ の範囲で、平均は $266\mu\text{m}$ であった。次いで、雌化ウナギの GSI は 1.2%、卵径は $169\text{--}255\mu\text{m}$ の範囲で、平均は $217\mu\text{m}$ であった。養殖ウナギの GSI は 1.1%、卵径は $149\text{--}215\mu\text{m}$ の範囲で、平均は $177\mu\text{m}$ で、最も未発達であったが、他の群に比べて個体間の幅が大きかった。SPH ($20\mu\text{g/g}$ -体重) 処理により、下りウナギでは平均 10.2 週で 100% の個体の卵母細胞が核移動期に達したのに対し、雌化ウナギでは平均 16.6 週で 71% が、養殖ウナギでは平均 18.6 週でわずか 29% であった。以上から、SPH 処理による卵巢の発達は、処理前の卵巢中の最大卵群の発達段階に依存していることが示唆された。また、処理前の卵径が少なくとも $199\mu\text{m}$ あれば SPH 処理により卵母細胞を最終成熟期にまで発達促進させ得ることが明らかとなった。

次に、油球期から核移動期までの全ての発達段階の卵濾胞が採取できる養殖ウナギを用いて、卵巢成熟に伴う血中ステロイドホルモン量の変動、および卵濾胞の発達に伴うステロイド合成能の変化を調べた。血中 E_2 量は卵黄形成中低値を示し、卵黄形成の終了後に急増した。血中テストステロン

(T) 量は、卵黄形成中血中 E_2 量よりも高値を示し、卵黄形成終了後にさらに上昇した。血中 DHP は催熟の全期間を通して全く検出されなかった。一方、催熟の期間を通して様々な発達段階の卵濾胞を用いた生体外実験では、

ステロイド基質を含まない対照群での E_2 、T、および DHP の産生量は極めて少なかった。プレグネノロン (Preg)、 17α -ヒドロキシプロゲステロン (17α -OHP)、または T からの E_2 合成能は卵黄形成中の卵濾胞では極めて少なかったが、続く核移動期 (最終成熟期) では増加した。Preg、または 17α -OHP からの T 合成能は卵黄形成の進行に伴い徐々に上昇し、続く核移動期ではさらに高まるか、または若干減少した。Preg、または 17α -OHP からの DHP 合成能は卵黄形成の進行に伴い急上昇し、核移動期ではさらに上昇するか、または減少した。以上の結果から以下のことが明らかになった。血中 E_2 量の変化と P450arom (T を E_2 に転換する酵素) 活性との間には良好な相関関係が認められた。卵濾胞の E_2 産生は T 産生能力よりも P450arom 活性に大きく依存している。一方、T 産生は明らかに SPH の刺激による Preg 産生に大きく依存しており、また同時に、Preg からの T 合成を制御するステロイド合成酵素の活性化に依存している。また、卵濾胞が強い 20β -HSD (17α -OHP を DHP に転換する酵素) 活性を持っているにもかかわらず血中に DHP が検出されないのは、おそらく DHP 合成を制御する最も重要な制限要因は 20β -HSD の活性化ではなく 17α -OHP の産生である。さらには、卵黄形成終了後の血中 E_2 量の急上昇、つまりこの時期の卵濾胞での P450arom 活性の上昇が、DHP 産生、ならびにそれに続く自発的な最終成熟および排卵を阻害していることが示唆された。

最後に、ウナギ P450arom cDNA のクローニングを行い、ウナギ P450arom の一次構造を明らかにした。また、このクローン化した P450arom をプローブに用いて、卵巣成熟に伴う卵巣の P450arom mRNA の発現量の変化を調べた。併せて、他の組織における P450arom mRNA の発現について検討した。P450arom cDNA のクローニングにあたって、まず他の動物種で明らかにされている P450arom の保存配列を基にプライマーを合成し、核移動期のウナギの卵巣由来の cDNA を鋳型に PCR 反応を行い、P450arom cDNA 断片を得た。次に、これをプローブに用い、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 P450arom cDNA が

得られ、その塩基配列を決定した。ウナギ P450arom はアミノ酸にして 511 残基からなる蛋白質をコードしていた。そのアミノ酸配列は、ニジマスおよび channel catfish の P450arom とそれぞれ 65 および 59% の相同性を示し、哺乳類（ヒト、マウス、ラット）およびニワトリと 50-54% の相同性を示した。中でも、P450arom の機能に関与すると考えられている領域では特に高い相同性を示し、全動物種を通して非常に高度に保存されている領域の存在が認められた。これらのことから、今回得られた cDNA がウナギ P450arom をコードしていると結論された。次に、得られた P450arom cDNA をプローブとしてノーザンブロットを行った結果、卵黄形成初期の卵巣では反応はほとんど認められなかったが、核移動期に達した卵巣では約 2.1 kb の特異的なバンドが認められた。卵巣の発達に伴う P450arom 遺伝子の発現変化は卵濾胞の P450arom 活性の変化をほぼ反映していた。このことから、卵濾胞の P450arom 活性はその遺伝子の発現レベルから調節されていることが示唆された。他の組織では、催熟中のウナギの脳内でのみ卵巣同様約 2.1 kb の特異的なバンドが認められた。この発現がウナギの回遊、および生殖行動に関与していることも考えられ、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	教 授	原 彰 彦
副 査	助教授	上 田 宏
副 査	助教授	足 立 伸 次

学 位 論 文 題 名

Studies on the steroidogenic enzyme system for the ovarian estrogen biosynthesis of Japanese eel, *Anguilla Japonica*

(ニホンウナギの卵巢のエストロゲン合成に關与する
ステロイド合成酵素系に關する研究)

ニホンウナギは水産養殖業において重要な対象魚であるが、その種苗は完全に天然のシラスウナギの漁獲のみに依存しているため、種苗生産技術の確立が待ち望まれている。このため、古くから下りウナギへのサケ脳下垂体懸濁物 (SPH) 等のホルモン投与による人為催熟が試みられてきたが、安定した成果は得られていない。ウナギの人為催熟技術確立するためには、卵濾胞の発達を制御する内分泌機構を正確に把握することが必要である。一般に、卵母細胞の成長および最終成熟は卵濾胞組織で合成されるステロイドホルモンの働きに制御されているが、ウナギでも、エストラジオール- 17β (E_2) が卵黄形成に、 $17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) が卵母細胞の最終成熟に關与していると考えられている。これらステロイドホルモンの産生量の変化は様々なステロイド合成酵素の活性の変化に依存している。本研究は、ニホンウナギ雌の成熟過程におけるステロイドホルモンの産生能の変化を、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。

最初に、下りウナギ、養殖ウナギ、および雌化ウナギの人為催熟前の卵巢の発達段階と、処理による卵巢の発達過程の關係を調べた。処理前の卵巢は、下りウナギ、雌化ウナギ、次いで養殖ウナギの順で発達していた。SPH (20 μ g/g-体重) 処理により、下りウナギでは平均 10.5 週で 100% の個体の卵母細胞が核移動期に達したのに対し、雌化ウナギでは平均 16.8 週で 72.3% が、養殖ウナギでは平均 18.6 週でわずか 26.3% であった。以上から、SPH 処理による卵巢の発達は、処理前の卵巢中の最大卵群の発達段階に依存していることが示唆された。また、処理前の卵径が少なくとも 199 μ m あれば SPH 処理により卵母細胞を最終成熟期にまで発達促進させ得ることが明らかとなった。

次に、油球期から核移動期までの全ての発達段階の卵濾胞が採取できる養殖ウナギを用いて、卵巢成熟に伴う血中ステロイドホルモン量の変化、および卵

濾胞の発達に伴うステロイド合成能の変化を調べた。血中 E_2 量は卵黄形成中低値を示し、卵黄形成の終了後に急増した。血中テストステロン (T) 量は、卵黄形成中血中 E_2 量よりも高値を示し、卵黄形成終了後にさらに上昇した。血中 DHP は催熟の全期間を通して全く検出されなかった。

一方、催熟の期間を通して様々な発達段階の卵濾胞を用いた生体外実験では、ステロイド基質を含まない対照群での E_2 、T、および DHP の産生量は極めて少なかった。プレグネノロン (Preg)、 17α -ヒドロキシプロゲステロン (17α -OHP)、または T からの E_2 合成能は卵黄形成中の卵濾胞では極めて少なかったが、続く核移動期 (最終成熟期) では増加した。Preg、または 17α -OHP からの T 合成能は卵黄形成の進行に伴い徐々に上昇し、続く核移動期ではさらに高まるか、または若干減少した。Preg、または 17α -OHP からの DHP 合成能は卵黄形成の進行に伴い急上昇し、核移動期ではさらに上昇するか、または減少した。以上の結果から以下のことが明らかになった。血中 E_2 量の変化と P450 arom (T を E_2 に転換する酵素) 活性との間には良好な相関関係が認められた。卵濾胞の E_2 産生は T 産生能力よりも P450 arom 活性に大きく依存している。一方、T 産生は明らかに SPH の刺激による Preg 産生に大きく依存している。また、卵濾胞が強い 20β -HSD (17α -OHP を DHP に転換する酵素) 活性を持っているにも関わらず血中に DHP が検出されないのは、おそらく 17α -OHP が産生されないことに起因すると考えられた。

最後に、ウナギ P450 arom cDNA のクローニングを行い、ウナギ P450 arom の一次構造を明らかにした。まず P450 arom の保存配列を基にプライマーを合成し、核移動期のウナギの卵巣由来の cDNA を鋳型に PCR 反応を行い、P450 arom cDNA 断片を得た。次に、これをプローブに用い、cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、蛋白質翻訳領域の全体を含む P450 arom cDNA が得られ、その塩基配列を決定した。ウナギ P450 arom はアミノ酸にして 511 残基からなる蛋白質をコードしていた。そのアミノ酸配列は、ニジマスおよび channel catfish の P450 arom とそれぞれ 65 および 59% の相同性を示し、哺乳類 (ヒト、マウス、ラット) およびニワトリと 50-54% の相同性を示した。中でも、P450 arom の機能に関与すると考えられている領域では特に高い相同性を示し、全動物種を通して非常に高度に保存されている領域の存在が認められた。これらのことから、今回得られた cDNA がウナギ P450 arom をコードしていると結論された。

次に、得られた P450 arom cDNA をプローブとしてノーザンブロットを行った結果、卵黄形成初期の卵巣では反応はほとんど認められなかったが、核移動期に達した卵巣では約 2.1 kb の特異的なバンドが認められた。卵巣の発達に伴う P450 arom 遺伝子の発現変化は卵濾胞の P450 arom 活性の変化をほぼ反映していた。このことから、卵濾胞の P450 arom 活性はその遺伝子の発現レベルから調節されていることが示唆された。

上述のように、本研究では、人為催熟によって性成熟の誘導が可能なウナギの基準を示した。また、催熟後は、核移動期における血中 E_2 量の急増が、ウナギの自然な最終成熟を阻害している可能性あるという問題点を明らかにし、さらに、この E_2 産生は、卵濾胞のアロマターゼの mRNA の転写レベルから制御されていることを明らかにした。これらの結果は、ウナギの人為催熟の問題点を、内分泌的な側面から明らかにし、今後、催熟法を改良するうえで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。