

学位論文題名

Eel (*Anguilla japonica*) Testicular 11β -Hydroxylase and 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase : cDNA Cloning, Enzyme Activities and Expression

日本ウナギ (*Anguilla Japonica*) 精巣の 11β -水酸化酵素と 11β -ステロイド水酸基脱水素酵素 : cDNAクローニング、酵素活性、及び発現

学位論文内容の要旨

11 -ケトテストステロンは魚類の主要な雄性ホルモンであり、ウナギでは精子形成誘起ホルモンとして精子の生産に関与し、また他の魚類では第二性徴の発現に重要な役割を果たすことが知られている。 11 -ケトテストステロンは脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンが精巣の体細胞に作用することにより生成されるが、その際前駆体（テストステロン）を 11 -ケトテストステロンに転換させる 11β -水酸化酵素（P450(11β ））と 11β -ステロイド水酸基脱水素酵素（ 11β -HSD）が重要な役割を果たすと考えられる。しかし、これまで魚類においてこれら2種のステロイドホルモン代謝酵素の遺伝子、酵素活性、精巣における発現の研究はまったくなされていない。また、これら酵素の遺伝子クローニングに関する研究は哺乳類の副腎を用いてわずかになされているが、生殖腺における発現を解析した研究は脊椎動物全体を通してこれまでまったくなされていない。

日本産養殖ウナギの精巣は精原細胞、未発達な体細胞（セルトリ細胞、ライディッヒ細胞）からなる。しかし、このような未成熟個体にヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン(HCG)を一回投与すると精巣での 11 -ケトテストステロンの合成が高まり、このホルモンの働きで精子形成が開始され、その後約3週間で精子が出現し、精巣は成熟する。したがって、ウナギ精巣は精子形成のホルモン制御機構を解析する格好な実験系である。本研究では、ウナギの精子形成誘起ホルモンである 11 -ケトテストステロンの生成機構を分子レベルで明らかにする目的で、ウナギ精巣からP450(11β)と 11β -HSDのcDNAをクローニングし、それら2種の酵素の

活性、及びHCG投与前後の精巣と頭腎における両酵素遺伝子の発現を解析した。得られた結果は、以下の通りである。

1) ウナギの精巣からクローニングされたP450(11 β)cDNAは、511個のアミノ酸からなる推定分子量58kDaの蛋白質をコードする。その予想されるアミノ酸配列をこれまでに報告された哺乳類やカエルの副腎からクローニングされたP450(11 β)と比較すると、38-48%のホモロジーを示した。

2) ウナギP450(11 β)cDNAを発現させた哺乳類の培養細胞(COS-1細胞)では、基質として加えたアンドロステジオンを11 β -ヒドロキシアンドロステジオンに、デオキシコーチコステロンをコーチコステロンに、またデオキシコーチゾルをコーチゾルに転換した。これらの結果から、得られたcDNAがP450(11 β)をコードすることが確認されるとともに、ウナギP450(11 β)は性ステロイドやコーチコステロイドに対する基質特異性を示さないことが明らかになった。また、ウナギP450(11 β)cDNAを発現させたCOS-1細胞でデオキシコーチコステロンを基質としてもアルドステロンは合成されなかったことから、魚類でアルドステロンが検出されないのは、P450(11 β)にアルドステロン合成活性が欠けているためであると推察される。

3) ウナギ精巣からクローニングされたP450(11 β)cDNAをプローブとしてウナギの精巣及び頭腎組織で行ったノーザンブロット解析の結果から、HCG処理前のウナギから得られた精巣にはP450(11 β)遺伝子の発現は認められないが、間腎組織には強い発現(1.8kb)がみられることが明らかになった。一方、HCGを一回投与一日後の精巣で強い発現(1.8kb)が認められ、3日後に最大となった。ホルモン投与6-9日後の精巣におけるP450(11 β)遺伝子の発現は減少したが、その後12-18日にかけて再びやや上昇した。

4) カエルのP450(11 β)に対する抗体(大阪大学医学部・岡本光弘博士より提供された)をプローブとしてウナギの精巣と頭腎組織について免疫組織化学を行った。この抗体ではHCG投与後の精巣のライディッヒ細胞が強く反応した。一方、頭腎組織ではHCG投与の有無に関係なく常に強い反応を示した。これらの結果より、精巣におけるP450(11 β)合成部位は体細胞のライディッヒ細胞であると結論される。また、精巣と頭腎におけるP450(11 β)のホルモン制御機構は異なると考えられる。

5) ウナギの精巢からクローニングされた 11β -HSDcDNAは、436個のアミノ酸からなる推定分子量約48kDaの蛋白質をコードする。その予想されるアミノ酸配列をこれまでに報告された哺乳類の副腎からクローニングされた 11β -HSDと比較すると、哺乳類2型 11β -HSDともっともよく類似しており、ホモロジーは約50%であった。

6) ウナギ 11β -HSDcDNAを発現させたCOS-1細胞では、基質として加えたコーチコステロンを11-デヒドロコーチコステロンに、またコーチゾルをコーチゾンに転換した。これらの結果から、得られたcDNAはウナギ 11β -HSDをコードすることが確認された。

7) ウナギ精巢からクローニングされた 11β -HSDcDNAをプローブとしてウナギ精巢で行ったノーザンブロット解析の結果から、精巢における 11β -HSD遺伝子の発現は、HCG投与前にはみられないが、ホルモン投与一日後にはすでに認められ(2.7kb)、その後3日後までに最高となり、以後(6-18日)徐々に減少することが明らかになった。

本研究により、日本産養殖ウナギの精巢から魚類でははじめてP450(11β)と 11β -HSDのcDNAがクローニングされ、これら酵素のアミノ酸配列や酵素活性の特性が明らかになった。さらに、これらcDNAをプローブとしてウナギ精巢で行ったノーザンブロット解析により、ウナギの精巢でHCGにより11-ケトテストステロンが急激に合成される際に、P450(11β)と 11β -HSD遺伝子の転写活性が急激に高まることがはじめて示され、HCGによる両酵素の活性促進は転写レベルで調節されていることが明らかにされた。今後、この転写調節がどのような仕組みで行われているかを調べるとともに、コレステロールから前駆体のテストステロンが合成させる過程で作用する4種のステロイド代謝酵素についても遺伝子レベルでの解析を行う必要がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
主査	教授	山崎	文雄
主査	教授	麦谷	泰雄
主査	教授	長濱	嘉孝
副査	助教授	足立	伸次

学位論文題名

Eel (*Anguilla japonica*) Testicular 11β -Hydroxylase and 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase : cDNA Cloning, Enzyme Activities and Expression

日本ウナギ (*Anguilla Japonica*) 精巣の 11β -水酸化酵素と 11β -ステロイド水酸基脱水素酵素 : cDNAクローニング、酵素活性、及び発現

11 -ケトテストステロンは魚類の主要な雄性ホルモンであり、ウナギでは精子形成誘起ホルモンとして精子の生産に関与し、また他の魚類では第二性徴の発現に重要な役割を果たすことが知られている。 11 -ケトテストステロンは脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンが精巣の体細胞に作用することにより生成されるが、その際前駆体 (テストステロン) を 11 -ケトテストステロンに転換させる 11β -水酸化酵素 (P450(11β)) と 11β -ステロイド水酸基脱水素酵素 (11β -HSD) が重要な役割を果たすと考えられる。しかし、これまで魚類においてこれら2種のステロイドホルモン代謝酵素の遺伝子、酵素活性、精巣における発現の研究はまったくなされていない。

日本産養殖ウナギの精巣は精原細胞、未発達な体細胞 (セルトリ細胞、ライディッヒ細胞) からなる。しかし、このような未成熟個体にヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (HCG) を一回投与すると精巣での 11 -ケトテストステロンの合成が高まり、このホルモンの働きで精子形成が開始され、その後約3週間で精子が出現し、精巣は成熟する。本研究では、ウナギの精子形成誘起ホルモンである 11 -ケトテストステロンの生成機構を分子レベルで明らかにする目的で、ウナギ精巣からP450(11β) と 11β -HSDのcDNAをクローニングし、それら2種の酵素の活性、及びHCG投与前後の精巣と頭腎における両酵素遺伝子の発現を解析した。得られた結果は、以下の通りである。

1) クローニングされたP450(11β)cDNAは、511個のアミノ酸からなる推定分子

量58kDaの蛋白質をコードする。予想されるアミノ酸配列をこれまでに報告された哺乳類やカエルの副腎からクローニングされたP450(11 β)と比較すると、38-48%のホモロジーを示した。

2) ウナギP450(11 β)cDNAを哺乳類の培養細胞 (COS-1細胞) で発現させた結果、得られたcDNAがP450(11 β)をコードすることが確認されるとともに、性ステロイドやコーチコステロイドに対する基質特異性を示さないことが明らかになった。また、デオキシコーチコステロンを基質としてもアルドステロンは合成されなかったことから、魚類でアルドステロンが検出されないのは、P450(11 β)にアルドステロン合成活性が欠けているためであると推察された。

3) ウナギP450(11 β)cDNAをプローブとしてウナギの精巣及び頭腎組織で行ったノーザンブロット解析の結果から、HCG処理前のウナギから得られた精巣にはその発現は認められないが、間腎組織には強い発現(1.8kb)がみられることが明らかになった。一方、HCGを一回投与一日後の精巣で強い発現 (1.8kb) が認められ、3日後に最大となった。ホルモン投与6-9日後の精巣における発現は減少したが、その後12-18日にかけて再びやや上昇した。

4) カエルのP450(11 β)に対する抗体を用いてウナギの精巣と頭腎組織について免疫組織化学を行った。この抗体ではHCG投与後の精巣のライディッヒ細胞が強く反応した。一方、頭腎組織ではHCG投与の有無に関係なく常に強い反応を示した。これらの結果より、精巣におけるP450(11 β)合成部位は体細胞のライディッヒ細胞であると結論された。また、精巣と頭腎におけるP450(11 β)のホルモン制御機構は異なると考えられた。

5) クローニングされた11 β -HSDcDNAは、436個のアミノ酸からなる推定分子量約48kDaの蛋白質をコードする。その予想されるアミノ酸配列をこれまでに報告された哺乳類の副腎からクローニングされた11 β -HSDと比較すると、哺乳類2型11 β -HSDともっともよく類似しており、ホモロジーは約50%であった。

6) ウナギ11 β -HSDcDNAをCOS-1細胞で発現させた結果、得られたcDNAはウナギ11 β -HSDをコードすることが確認された。

7) ウナギ11 β -HSDcDNAをプローブとしてウナギ精巣で行ったノーザンブロット解析の結果、精巣におけるその発現は、HCG投与前にはみられないが、ホルモン投与一日後にはすでに認められ(2.7kb)、その後3日後までに最高となり、以後(6-18日) 徐々に減少することが明らかになった。

上述のように、本研究では、日本産養殖ウナギの精巣から魚類でははじめてP450(11 β)と11 β -HSDのcDNAのクローニングを行ない、これら酵素のアミノ酸配列や酵素活性の特性、ならびに、HCGによるP450(11 β)と11 β -HSD遺伝子の発現促進は転写レベルで調節されていることを明らかにした。これらの結果は、魚類の成熟および産卵を人為的に統御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。