

学 位 論 文 題 名

Molecular physiological studies on vitellogenin
in Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギのビテロゲニンに関する分子生理学的研究)

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は飼育環境下では成熟しないことから、現在、サケ脳下垂体などのホルモン投与により、人為的に催熟する試みがなされている。しかし、必ずしも安定した成果は得られていない。従って、本種の最適な人為催熟法を確立し、安定した人工種苗を得るためには、生殖腺発達の制御機構に関する基礎的知見を集積することが必要である。

一般に、硬骨魚類を含む卵生脊椎動物において、成熟途上の雌の肝臓では、エストロゲン、主にエストラジオール- 17β (E_2) の作用の下、卵黄タンパク前駆物質であるビテロゲニン (VTG) が盛んに合成・分泌される。分泌された VTG は血流を介して卵母細胞に特異的に取り込まれ、分子解裂し、卵黄タンパク質であるリポビテリン (LV) およびホスビチン (PV) として蓄積される。これら卵黄タンパク質は、胚発生に極めて重要な栄養分となる。従って、人為催熟により安定的に孵化仔魚が得られないニホンウナギでは、卵黄タンパク質についての基礎的知見を得ることは極めて重要である。

そこで本研究では、ニホンウナギ雌の成熟過程における VTG および卵黄タンパク質の性状や動態をタンパク並びに遺伝子レベルで詳細に調べることを目的として、1) VTG の合成の場である肝臓の成熟に伴う形態学的観察、並びに血中 VTG 量の変化、2) VTG cDNA のクローニングおよびこの VTG cDNA をプローブとして用いた E_2 およびサケ脳下垂体投与に伴う肝臓 VTG mRNA の発現量の

解析、3) 卵母細胞の成長に伴う卵黄タンパク質の生化学的変化について調べた。

先ず、成熟に伴う VTG の動態を調べるため、肝臓を組織学的に観察し、抗ニホンウナギ LV 血清 (a-LV) を用いた免疫組織化学による VTG 産生細胞の観察を行った。その結果、成熟に伴い肝細胞中に脂肪滴が増加し、核移動期には肝細胞の大部分を占めた。一方、VTG 産生細胞は成熟に伴い増加し続けた。また、SDS-PAGE を用いて血中 VTG の電気泳動的変化を調べたところ、血中 VTG は、a-LV を用いたウェスタンブロット解析により、分子量約 200 kDa の 1 本のバンドとして検出され、成熟に伴いその反応性は増大した。次に、ELISA および一次元免疫拡散法を用いて、より詳細に成熟に伴う血中 VTG 量の変化を調べた。その結果、血中 VTG 量は、催熟前の個体においては測定系の検出感度以下であったが、投与を開始し、第 1 次卵黄球期に達した個体では増加した。しかし、さらに成熟が進み、第 2 次および第 3 次卵黄球期に達した個体においては、やや減少する傾向がみられた。核移動期に達すると、血中 VTG 量が再び増加する個体も観察された。この変化は、これまでに報告されているニホンウナギの成熟に伴う血中 E2 量の変化とはほぼ相関していた。以上の結果より、ニホンウナギの成熟に伴う血中 VTG 量の変化は他の魚種のそれと異なっており、人為催熟されたウナギ特有の現象、すなわち人為催熟による結果の 1 つであると推測された。また、最終成熟期において、肝細胞中の脂肪滴の異常な増加が見られたことも、ウナギの人為催熟の問題点の 1 つであると推測された。

ニホンウナギ VTG の 1 次構造解析を行うため、先ず、精製 VTG および LV の部分アミノ酸配列の分析を行った。その結果、精製 VTG および LV から数種の部分アミノ酸配列が得られ、それらは、これまでに報告されている硬骨魚類の VTG のアミノ酸配列と高い相同性を示した。また、肝臓由来の cDNA ライブラリーを作製し、a-LV を用いた抗体スクリーニングを行った結果、1644 bp の大きさを持つ cDNA 断片が得られ、その塩基配列を決定した。この cDNA 断片は、アミノ酸配列においてこれまでに報告されている硬骨魚類の VTG のアミノ酸配列

と高い相同性を示し、上述のニホンウナギ VTG および LV の部分アミノ酸配列と一致する部位が存在した。また、この cDNA 断片をプローブとして用いて、ノーザンブロット解析を行ったところ、E2 投与魚およびサケ脳下垂体投与により成熟が進行した個体において、約 5.8 kb の特異的バンドが認められ、投与前の未熟魚では認められなかった。このことから、今回得られた cDNA 断片はニホンウナギ VTG をコードしていることが示された。さらに、得られた VTG cDNA をプローブに用いたノーザンブロット解析により、サケ脳下垂体および E2 の連続投与に伴うニホンウナギ雌の肝臓での VTG mRNA の発現変化を比較した。サケ脳下垂体投与後、第 1 次卵黄球期に達した個体において、VTG mRNA は投与前の 1~10 倍のレベルにまで増加し、その後、第 2 次卵黄球期までそのレベルを維持した。しかし、第 3 次卵黄球期に達するとそのレベルは急増し (40~80 倍)、その後、やや減少する傾向が認められた。一方、E2 投与に伴う VTG mRNA の発現変化を調べた結果、VTG mRNA は、投与後 2 週目には、投与前の約 3.2 倍のレベルにまで増加した。しかし、4 週目には、その発現量は投与前のレベルにまで減少した。その後 6 週目には、再び発現量は増加し (約 4 倍)、8 週目までそのレベルを維持した。E2 投与に伴う血中 VTG 量は、6 週目まで直線的に増加し続けたが、8 週目には減少した。また、E2 投与により卵巣は発達しなかった。以上の結果から、サケ脳下垂体投与に伴う肝臓での VTG mRNA の発現変化は、血中 VTG 量の変化とほぼ相関していることが明らかになった。一方、E2 投与により誘導される VTG mRNA の発現変化と血中 VTG 量の変化には、相関関係はみられなかった。また、サケ脳下垂体投与により誘導された VTG mRNA の発現量が、E2 投与による発現量よりも多いことや、E2 投与により誘導された血中 VTG のほとんどが 卵母細胞に取り込まれなかったことから、サケ脳下垂体に含まれる様々な物質が VTG 合成や VTG の卵母細胞への取り込みに必要であることが推測された。

最後に、VTG が、卵母細胞に取り込まれた後、解裂して卵黄タンパク質として蓄積していく過程を形態学および生化学的手法により調べた。また、近年、数

種の魚種で卵中に存在することが明らかにされている甲状腺ホルモン (throxine: T₄, triiodothyronine: T₃) と VTG および LV との結合性についても調べた。その結果、a-LV を用いたウエスタンブロット解析において検出された約 110 および 80 kDa のバンドは、卵母細胞の成長に伴いの反応性が増大した。さらに、卵母細胞が成長し、卵母細胞の周辺から次第に透明になる核移動期に達すると、約 110 および 40 kDa のバンドの反応性が急減し、変わって約 30 kDa のバンドが出現した。一方、VTG および LV と甲状腺ホルモンとの結合性を調べた結果、VTG および LV は T₄ と特異的に結合した。以上のことから、血中で分子量約 200 kDa の 2 量体として存在するニホンウナギの VTG は、T₄ と結合して卵母細胞に取り込まれ、分子解裂して、サブユニットの分子量が約 110 および 80 kDa の LV となり、T₄ と結合して蓄積し、核移動期に達すると、LV の低分子化が起こると考えられた。また、この低分子化は、卵母細胞の透明化および吸水による卵径の増大と密接に関わっていることが示唆された。

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

Molecular physiological studies on vitellogenin in Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギのビテロゲニンに関する分子生理学的研究)

一般に、硬骨魚類を含む卵生脊椎動物において、成熟途上の雌の肝臓では、エストロゲン、主にエストラジオール- 17β (E_2) の作用の下、卵黄タンパク前駆物質であるビテロゲニン (VTG) が盛んに合成・分泌される。分泌された VTG は血流を介して卵母細胞に特異的に取り込まれ、分子解裂し、卵黄タンパク質であるリポビテリン (LV) およびホスビチン (PV) として蓄積される。ニホンウナギの雌において、この一連の過程は、サケ脳下垂体の連続投与により成熟を進行させている。しかし、この方法で得られた孵化した孵化仔魚の生存期間は未だ 3 週間を越えていない。これは初期餌料などの問題のほかに、孵化仔魚の栄養源となる卵黄タンパク質に問題があると考えられる。従って、人為催熟により安定的に孵化仔魚が得られないニホンウナギでは、卵黄タンパク質についての基礎的知見を得ることは極めて重要である。そこで本研究では、ニホンウナギ雌の成熟過程における VTG および卵黄タンパク質の性状や動態をタンパク並びに遺伝子レベルでの発現変化を解析した。得られた結果は、以下の通りである。

成熟に伴う VTG の動態を調べるため、肝臓を組織学的に観察し、抗ニホンウナギ LV 血清 (α -LV) を用いた免疫組織化学による VTG 産生細胞の観察を行った。その結果、成熟に伴い肝細胞中に脂肪滴が増加し、核移動期には肝細胞の大部分を占めた。一方、VTG 産生細胞は成熟に伴い増加し続けた。この最終成熟期における肝細胞中の脂肪滴の異常な増加、および VTG 産生細胞の増加は、ウナギの人為催熟の問題点の 1 つであると推測された。

SDS-PAGE を用いて血中 VTG の電気泳動的变化を調べたところ、VTG は、 α -LV を用いたウエスタンブロット解析により、分子量約 200 kDa の 1 本のバンドとして検出され、成熟に伴いその反応性は増大した。そこで、次に、ELISA および一次元免疫拡散法を用いて、より詳細に成熟に伴う血中 VTG 量の変化を調べた結

果、血中 VTG 量は、投与により、第 1 次卵黄球期に達した個体では増加し、第 2 次および第 3 次卵黄球期に達した個体に達すると、やや減少し、低値を推移する傾向がみられ、核移動期に達すると、血中 VTG 量が再び増加することが明らかになった。この変化は、これまでに報告されているニホンウナギの成熟に伴う血中 E2 量の変化とはほぼ相関していた。しかし、ニホンウナギの成熟に伴う血中 VTG 量の変化は他の魚種のそれと異なっており、人為催熟されたウナギ特有の現象、すなわち人為催熟による結果の 1 つであると推測された。

ニホンウナギ VTG の 1 次構造解析を行うため、先ず、精製 VTG および LV の部分アミノ酸配列の分析を行った。その結果、精製 VTG および LV から数種の部分アミノ酸配列が得られ、それらは、これまでに報告されている硬骨魚類の VTG のアミノ酸配列と高い相同性を示した。

ニホンウナギの VTG cDNA の単離および塩基配列の決定を行った。その結果、1644 bp の大きさを持つ cDNA 断片が得られ、その塩基配列を決定した。この cDNA 断片は、アミノ酸配列においてこれまでに報告されている硬骨魚類の VTG のアミノ酸配列と高い相同性を示し、上述のニホンウナギ VTG および LV の部分アミノ酸配列と一致する部位が存在した。また、この cDNA 断片をプローブとして用いて、ノーザンブロット解析を行ったところ、E2 投与魚およびサケ脳下垂体投与により成熟が進行した個体において、約 5.8 kb の特異的バンドが認められ、投与前の未熟魚では認められなかった。このことから、今回得られた cDNA 断片はニホンウナギ VTG をコードしていることが示された。

得られた VTG cDNA をプローブに用いたノーザンブロット解析により、サケ脳下垂体および E2 の連続投与に伴うニホンウナギ雌の肝臓での VTG mRNA の発現変化を比較した。その結果、サケ脳下垂体投与に伴う肝臓での VTG mRNA の発現変化は、血中 VTG 量の変化とはほぼ相関していることが明らかになった。一方、E2 投与により誘導される VTG mRNA の発現変化と血中 VTG 量の変化には、相関関係はみられなかった。また、サケ脳下垂体投与により誘導された VTG mRNA の発現量が、E2 投与による発現量よりも多いことや、E2 投与により誘導された血中 VTG のほとんどが 卵母細胞に取り込まれなかったことから、サケ脳下垂体に含まれる様々な物質が VTG 合成や VTG の卵母細胞への取り込みに必要であることが推測された。

VTG が、卵母細胞に取り込まれた後、解裂して卵黄タンパク質として蓄積していく過程を形態学および生化学的手法により調べた。その結果、血中で分子量約 200 kDa の 2 量体として存在するニホンウナギの VTG は、分子構造に大きな変化を示さず卵母細胞に取り込まれ、サブユニットの分子量が約 110 および 80 kDa の LV として蓄積し、核移動期に達すると、LV の低分子化が起こることが示唆された。また、この低分子化は、卵母細胞の透明化および吸水による卵径の増大と密接に関わっていることが示唆された。

発生のエネルギー源として働くばかりではなく、胚発生に必要な生理活性物質と結合して、それらを卵母細胞に輸送する働きがある VTG の物理化学的性状の解析の手始めとして、甲状腺ホルモン (throxine: T₄, triiodothyronine: T₃) と VTG および LV との結合性について調べた。その結果、VTG は、T₄ と結合して、卵母細胞に T₄ を輸送する働きがあることが明らかになった。また、卵母細胞内で、T₄ は LV と結合していることも明らかとなった。

上述のように、本研究では、ニホンウナギの人為催熟に伴う肝臓でのビテロゲニン遺伝子の発現変化、血中ビテロゲニンの変化、および卵黄タンパク質の変化を明らかにした。これらの結果は、ニホンウナギの生殖線発達の制御機構の解明に重要な基礎的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評定した。