

学 位 論 文 題 名

Molecular biological studies on ovarian steroid hormone
biosynthesis in Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギ卵巣のステロイドホルモン生合成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*) は水産養殖上重要な魚種である。しかし、本種は飼育環境下では成熟しない。また、降海時の下リウナギの卵巣卵の多くは、卵黄形成初期まで発達しているが、それ以上に成熟段階が進んだ卵巣を持つ個体は捕獲されていない。そのため、これまで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おり、成熟卵および孵化稚魚を得ることに成功している。しかし、その結果は必ずしも安定しておらず、催熟技術の改善が望まれている。これらの問題点を解決し、最適な催熟技法を確立するためには、生殖腺の発達を制御する内分泌因子に関する詳細な知見が不可欠である。

魚類の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に制御されている。一般に、卵黄形成には エストラジオール-17 β (E_2) が、最終成熟には 17 α , 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) が、重要な役割を果たしていると考えられている。そのため、多くの魚種の卵濾胞において E_2 および DHP の合成に関する研究がなされおり、ウナギでも、卵巣の発達に伴うこれらステロイドホルモンの合成能の変化等が調べられている。しかし、これらステロイドの合成経路に関しては、未だ不明な点が多い。また、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ると考えられている。そのため、卵巣での

ステロイドホルモンの合成機構を理解するためには、それぞれのステロイド合成酵素遺伝子の発現変化を明らかにする必要がある。しかし、ニホンウナギの卵巢においてその発現変化が調べられているのは アロマターゼ (P450 arom) のみである。本研究は、卵巢の発達に伴うステロイド合成経路の変化を明らかにするとともに、幾つかのステロイド合成酵素に関して遺伝子レベルでの知見を得ることにより、ニホンウナギ雌のステロイドホルモン合成をより詳細に理解することを目的に行われた。

先ず、卵黄形成初期 (SPH 投与前)、卵黄形成中期および核移動期の卵濾胞をプレグネノロン (Preg) とともに培養し、培養後のステロイド代謝物を解析した。卵黄形成初期の卵濾胞は Preg を他のステロイドに殆ど転換しなかった。卵黄形成中期では、Preg は、幾つかのステロイド代謝物に転換され、中でもアンドロゲンであるアンドロステンジオン (A) およびデヒドロエピアンドロステロン (DHA) が、どの個体においても主要な代謝物として検出された。一方、核移動期では、A および DHA にかわって 17α -ヒドロキシプロゲステロン (17α -OHP) および DHP が多量に合成された。以上の結果、本種の卵濾胞では SPH 投与により各種ステロイド合成酵素が活性化され、卵黄形成中期には主にアンドロゲンが、核移動期には 17α -OHP および DHP が合成されるステロイド合成経路が誘導されることが明らかとなった。また、このステロイド合成経路の変換は、主に C₁₇₋₂₀ 側鎖切断酵素活性の低下および 20 β -水酸基脱水素酵素 (20 β -HSD) 活性の上昇に起因していると考えられた。 P450c₁₇ は、哺乳類において 17α 水酸化酵素および C₁₇₋₂₀ 側鎖切断酵素の二つの酵素活性有することが知られており、ウナギの卵巢においてはアンドロゲンおよび DHP 双方の合成に関与していると考えられる。そこで、ウナギ P450c₁₇ cDNA の構造解析を行った。ウナギ P450c₁₇ cDNA から推定されるアミノ酸配列は他の動物種のもものと高い相同性を示した。遺伝子導入によりウナギ P450c₁₇ を COS-7 細胞中で発現させ、その酵素活性を調べたところ、 17α 水酸化酵素および C₁₇₋₂₀ 側鎖切断酵素の両酵素活性を示した。次に、成熟に伴う P450c₁₇ mRNA 量の変化を調べた。

SPH 投与前の卵巣では P450c17 mRNA は検出されなかった。催熟により卵黄形成が始まると、P450c17 mRNA が検出されはじめ卵黄形成中期までその量は増加し、その後大きな変化を示さなかった。以上の結果、SPH 投与により P450c17 mRNA の転写が誘導されることが示された。また、ウナギ P450c17 は 17α 水酸化酵素および C17-20 側鎖切断酵素の二つの酵素活性を有しており、卵黄形成中期ではアンドロゲンの、核移動期では 17α -OHP や DHP の合成に重要な役割を果たしていると考えられた。

20 β -HSD は、 17α -OHP を DHP に直接転換する酵素である。近年ブタ精巣の 20 β -HSD の一次構造が決定され、可溶性タンパクの一つであるカルボニルリダクターゼ (CR) であることが明らかにされた。そのため、魚類の 20 β -HSD も CR 様タンパクであると考えられている。そこで次に、ウナギ卵巣の 20 β -HSD のタンパクレベルでの性状解析および CR cDNA の構造解析を行い、20 β -HSD が CR であるか否かを検討した。20 β -HSD 活性は、ウナギ卵巣において主にミトコンドリアおよびミクロソーム画分に分布しており、本酵素は細胞膜結合型タンパクであった。20 β -HSD 活性は SPH 投与前の卵巣で検出され、その後卵巣の発達に伴ない上昇した。ウナギ CR cDNA から推定されるアミノ酸配列は、他の動物種のものと同じ高相同性を示した。また、その立体構造も高度に保存されていると推測され、ウナギ CR は哺乳類の CR と同様に可溶性タンパクであると考えられた。卵巣の発達に伴う CR mRNA 量の変化を調べたところ、卵黄形成中期で若干高まったが、その後大きな変化を示さなかった。更に、CR 遺伝子を導入した COS-7 細胞は、20 β -HSD 活性を示さなかった。以上の結果、ウナギの卵巣では、SPH 投与により 20 β -HSD 活性が高まることが示された。また、本種の 20 β -HSD は CR 様タンパクではないことが示唆され、CR と異なる 20 β -HSD 遺伝子の単離および構造解析が今後の課題として残された。

最後に、P450arom とともにエストロゲン合成の最終段階を触媒する酵素である 17β -水酸基脱水素酵素タイプ-I (17β -HSD I) の cDNA を単離した。単離したウナギ 17β -HSD I cDNA をヒト腎臓由来 293 細胞 (HK293) に導

入した。遺伝子を導入した HK293 を A、テストステロン、エストロン (E₁) および E₂ と培養した。培養後、ステロイド代謝物を解析したところ、本酵素は E₁ から E₂ を合成する還元反応のみを触媒した。また、17 β -HSD I mRNA は SPH 投与前の個体の卵巣では検出されなかったものの、SPH 投与後は全個体において検出され成熟に伴って大きな変化を示さなかった。以上の結果、17 β -HSD I の基質特異性よりウナギ卵巣においては、E₂ は主に E₁ の前駆体である A から E₁ を経て合成されることが示された。また、17 β -HSD I mRNA の転写活性は SPH 投与により誘導されるものの、成熟に伴い大きな変化を示さないことが明らかとなった。これまでに知られている卵巣の発達に伴う E₂ 合成能および P450arom mRNA 量の変化と 17 β -HSD I mRNA 量の変化を考え合わせると本種の卵巣における E₂ 産生の制限要因は P450arom であると考えられた。

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 biological studies on ovarian steroid hormone biosynthesis in Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギ卵巣のステロイドホルモン生合成に関する分子生物学的研究)

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は水産養殖上重要な魚種である。しかし、本種は飼育環境下では成熟しない。また、降海時の下りウナギの卵巣卵の多くは、卵黄形成初期まで発達しているが、それ以上に成熟段階が進んだ卵巣を持つ個体は捕獲されていない。そのため、これまで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、その結果は必ずしも安定しておらず、催熟技術の改善が望まれている。最適な催熟技法を確立するためには、生殖腺の発達を制御する内分泌因子に関する詳細な知見が不可欠である。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に制御されているが、ウナギでも、E₂ が卵黄形成に、17 α ,20 β -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関与していると考えられている。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生合成に関して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、卵黄形成初期 (SPH 投与前)、卵黄形成中期および核移動期の卵濾胞をプレグネノロン (Preg) とともに培養し、培養後のステロイド代謝物を解析した。その結果、SPH 投与前の卵黄形成初期の卵濾胞は Preg を他のステロイドに殆ど転換しないのに対し、SPH 投与後は各種ステロイド合成酵素が活性化され、卵黄形成中期には主にアンドロゲンが、核移動期には 17 α -ヒドロキシプロゲステロン (17 α -OHP) および DHP が合成されるステロイド合成経路が誘導されることが明らかとなった。また、このステロイド合成経路の変換は、主に C₁₇₋₂₀ 側鎖切断酵素活性の低下および 20 β -水酸基脱水素酵素 (20 β -HSD) 活性の上昇に起因していると考えられた。

P450c17 は、哺乳類において 17 α 水酸化酵素および C₁₇₋₂₀ 側鎖切断酵素の二つの

酵素活性有することが知られている。そこで、ウナギ P450c17 cDNA を単離した。単離した P450c17 cDNA を用いてタンパクを発現させ、その酵素活性を調べたところ、17 α 水酸化酵素および C17-20 側鎖切断酵素の両酵素活性を示した。また、本酵素 mRNA は、SPH 投与前の卵巣では検出されなかったものの、催熟により卵黄形成が始まると、検出されはじめ卵黄形成中期までその量は増加し、その後大きな変化を示さなかった。以上の結果、SPH 投与により P450c17 mRNA の転写が誘導されることが示された。また、ウナギ P450c17 は17 α 水酸化酵素および C17-20 側鎖切断酵素活性を有しており、卵黄形成中期ではアンドロゲンの、核移動期では 17 α -OHP や DHP の合成に重要な役割を果たしていると考えられた。

20 β -HSD は、17 α -OHP を DHP に直接転換する酵素である。近年ブタ精巣の 20 β -HSD の一次構造が決定され、可溶性タンパクの一つであるカルボニルリダクターゼ (CR) であることが明らかにされた。そのため、魚類の 20 β -HSD も CR 様タンパクであると考えられている。そこで次に、ウナギ卵巣の 20 β -HSD のタンパクレベルでの性状解析および CR cDNA の構造解析を行い、20 β -HSD が CR であるか否かを検討した。20 β -HSD 活性は、ウナギ卵巣において主にミトコンドリアおよびミクロソーム画分に分布しており、本酵素は細胞膜結合型タンパクであった。20 β -HSD 活性は SPH 投与前の卵巣で検出され、その後卵巣の発達に伴い上昇した。ウナギ CR cDNA から推定されるアミノ酸配列は、他の動物種のものと同じ相同性を示し、哺乳類のものと同様に可溶性タンパクであると考えられた。卵巣の発達に伴う CR mRNA 量の変化を調べたところ、卵黄形成中期で若干高まったが、その後大きな変化を示さなかった。更に、CR 遺伝子を導入した COS-7 細胞は、20 β -HSD 活性を示さなかった。以上の結果、ウナギの卵巣では、SPH 投与により 20 β -HSD 活性が高まることが示された。また、本種の 20 β -HSD は CR ではないことが魚類で初めて示された。

最後に、P450arom とともにエストロゲン合成の最終段階を触媒する 17 β -水酸基脱水素酵素タイプ-I (17 β -HSD-I) の cDNA を魚類で初めて単離した。単離したウナギ 17 β -HSD-I cDNA を用いてタンパクを発現させ、その酵素活性を調べたところ、本酵素はエストロン (E1) から E2 を合成する反応のみを触媒した。また、17 β -HSD-I mRNA は SPH 投与前の個体の卵巣では検出されなかったものの、SPH 投与後は全個体において検出され成熟に伴って大きな変化を示さなかった。以上の結果、17 β -HSD-I の基質特異性よりウナギ卵巣においては、E2 は主に E1 の前駆体であるアンドロステジオン から E1 を経て合成されることが示された。また、17 β -HSD-I mRNA の転写活性は SPH 投与により誘導されるものの、成熟に伴い大きな変化を示さないことが明らかとなった。これまでに知られている卵巣の発達に伴う E2 合成能および P450arom mRNA 量の変化と 17 β -HSD-I mRNA 量の変化を考え合わせると本種の卵巣における E2 産生の制限要因は P450arom であると考えられた。

上述のように、本研究では、人為催熟されたウナギ雌を用い、卵黄形成および卵母細胞の最終成熟を制御する E2 および DHP の合成に関与するステロイド合成酵素に関する詳細

な知見が数多く得られた。これらの結果は、人為催熟により誘導される卵黄形成および最終成熟の問題点をステロイドホルモン合成の観点から考察する足がかりとなり、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。