

学 位 論 文 題 名

Molecular endocrinological studies on estrogen
receptor α and β in the Japanese eel,
Anguilla japonica

（ニホンウナギのエストロジェンレセプター α 及び β に
関する分子内分泌学的研究）

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養殖魚として経済的価値の高い魚種である。しかし、その種苗は天然で捕獲されるシラスに完全に依存しているため、近年のシラスの漁獲量の減少に伴い人工種苗技術の確立が望まれている。これまで性成熟したウナギが天然で捕獲された例はなく、また飼育環境下では性成熟が起きないためにホルモン投与による人為催熟が試みられているが、安定した成果は得られていない。従って、本種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、ウナギの性成熟機構の解明が必要であり、そのための基礎的な知見の集積が急務である。

一般に硬骨魚類の生殖腺の発達には脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン（GTH）の作用により生殖腺で生成される性ステロイドホルモンによって制御されている。成熟途上の雌においては GTH の作用下にエストロジェン（estradiol-17 β ; E2）が卵濾胞細胞で合成される。E2 は肝臓に作用して、卵黄前駆物質であるビテロジェニン（VTG）の合成、分泌を誘導する。VTG は血流を介して卵母細胞に特異的に取り込まれ、卵黄タンパク質として蓄積される。この E2 作用による肝臓での VTG 合成の際には、E2 が肝細胞核中に存在するエストロジェンレセプター（ER）と特異的に結合することにより E2 の作用が

発現することが知られている。従って、卵黄形成に関わる E2 の作用機構の解明には ER の詳細な研究が必要である。

近年、様々な動物種において ER の一次構造が明らかにされ、遺伝子レベルでの研究が進められている。一昨年、ヒト、ラット及びマウスにおいて新しいタイプの ER が単離され、ER には ER α と ER β の二つのサブタイプが存在することが明らかとなった。ニホンウナギにおいても、すでに単離されている ER とは異なる新たな ER のサブタイプが単離された。その塩基配列は他種との相同性から ER α であると考えられ、以前に単離された ER は ER β であると考えられた。そこで本研究は、ニホンウナギ雌の成熟に関わる E2 の作用機構を解明することを目的として、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いた ER 遺伝子発現測定系を確立し、従来のノーザンブロット法と比較した。さらに ER α 及び ER β mRNA を測り分ける RT-PCR 測定系を確立し、催熟過程のニホンウナギ雌における ER α 及び ER β の各組織における mRNA 量の変化を調べた。また E2 投与に伴う肝臓 ER α 及び ER β の発現変化についても検討した。

ニホンウナギの ER は発現量が少なく、ノーザンブロット法では解析が困難であることから、RT-PCR を用いた高感度の ER 遺伝子発現測定系を確立した。まず、細胞骨格を構成する β -actin 及び γ -actin の塩基配列を決定し、RT-PCR 測定系の内部対象として用いた。ER と actin を特異的に認識するプライマーを合成し、PCR を行ったところ、予測されたサイズに一本の明瞭なバンドがそれぞれ観察された。また、測定したすべての組織において、ER と actin の RT-PCR 産物の増幅効率は 16 - 18 サイクルの間で等しかった。ER の測定値はサンプル毎に両遺伝子の増幅産物量を調べ、両者の増幅効率が等しいサイクルにおいて actin との相対値として算出した。サケ脳下垂体ホモジェネート (SPH) を二回投与して人為催熟したニホンウナギ雌の肝臓における ER mRNA 量を RT-PCR 測定系を用いて測定したところ、未処理の個体と比較して約 2.6

倍増加し、ノーザンブロット法による測定と同様の結果を示した。さらに、本測定系を用いて、体腔壁、脳下垂体、脳、卵巣における ER mRNA 量を調べたところ、肝臓とは対照的に SPH 投与による変化は見られなかった。今回確立した RT-PCR を用いた ER 遺伝子の測定系は、従来のノーザンブロット法と比較して非常に高感度であり、これまで ER mRNA を検出することができなかった組織においても ER mRNA 量の測定を可能にした点で非常に有用な測定系であることが示された。

ER の発現調節をさらに詳細に調べるために ER α 及び ER β mRNA を測り分ける RT-PCR 測定系を確立した。ER α と ER β に特異的なプライマーを合成し PCR を行ったところ、ER α 及び ER β プライマーにより明瞭な一本のバンドがそれぞれ増幅された。次に ER α 及び ER β プライマーの特異性を調べるために、得られた PCR 産物を制限酵素で消化して切断パターンを調べた。両 PCR 産物の消化切断パターンは予測された ER α 及び ER β の切断パターンと一致した。また ER α 及び ER β の cDNA 断片を鋳型とした PCR では、ER α プライマーは ER α cDNA 断片のみを、ER β プライマーは ER β cDNA 断片のみを増幅し、それぞれ異なるサブタイプの cDNA 断片は増幅しなかった。これらの結果は、ER α 及び ER β プライマーが特異的にそれぞれの ER のサブタイプを増幅していることを示している。SPH 投与による肝臓 ER α 及び ER β mRNA の変化は、SPH を二回投与した個体において未投与個体と比較して約 2.5 倍増加した。以上の結果から、ER α 及び ER β に特異的なプライマーにより ER α 及び ER β mRNA を測り分ける系が確立された。本測定系は高感度である上、相同性の高い ER α 及び ER β mRNA を確実に測り分けられる点で非常に優れた測定系である。

ニホンウナギ雌の各組織（肝臓、体腔壁、脳下垂体、脳及び卵巣）における人為催熟に伴う ER α 及び ER β mRNA 量の発現変化を調べた。その結果、各組織において両 ER は発現レベルは異なっていたが、ほぼ同様の発現変化を示

した。肝臓における両 ER mRNA 量は、人為催熟後急激に増加し、卵黄形成初期の個体において未投与個体と比較して約 2.5 倍と最高値を示した。卵黄形成中期では mRNA 量は減少し、低値を維持した。卵巣形成後期にはいると両 mRNA 量は再び増加し、核移動期以降は減少した。体腔壁における ER α 及び ER β mRNA 量の変化は、人為催熟に伴い減少する傾向を示した。脳下垂体における両 ER mRNA は、人為催熟に伴って肝臓と同様の変化を示した。脳での ER α 及び ER β の mRNA レベルは非常に低く、SPH 投与による変化は認められなかった。卵巣における ER α 及び ER β mRNA 量は極めて低く、ER α は発現は認められるものの、本測定系では測定できなかった。また催熟期間を通して卵巣 ER β mRNA 量に変化は認められなかった。人為催熟に伴う ER α 及び ER β の発現変化は組織によって異なったことから、成熟に伴う ER α 及び ER β の発現調節には組織特異性があるものと考えられた。

RT-PCR 測定系を用いて E2 投与した養殖ウナギ雌の肝臓における ER α 及び ER β mRNA の発現を調べた。E2 を週一回、8 週間投与したところ、ER α mRNA 量は緩やかに減少した。一方、ER β mRNA 量は E2 投与 2 週目に増加し、6 週目に未投与個体のレベルまで減少した後、8 週目に再び増加する傾向を示した。この結果は、SPH 投与実験における ER β の変化と同様であった。さらに E2 を一回投与した個体の肝臓では、ER α mRNA 量は変化しなかったのに対して、ER β mRNA 量は増加した。これらの結果から、ER β は E2 によって発現が誘導されるのに対して、ER α の発現は E2 により誘導されないか又は抑制されることが示唆された。SPH と E2 投与では ER α の発現変化が異なることから、成熟に伴う ER α の発現調節には E2 に加えて SPH に含まれる何らかの内分泌因子が関与しているものと推測された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	麦谷	泰雄
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 endocrinological studies on estrogen receptor α and β in the Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギのエストロジェンレセプター α 及び β に
関する分子内分泌学的研究)

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は、日本の水産業において養殖魚として経済的価値の高い魚種である。しかし、これまで性成熟したウナギが天然で捕獲された例はない。また、飼育環境下では性成熟が起きないためにホルモン投与などによる人為催熟が試みられている。本種の人為催熟技術確立し安定した種苗生産を行うためには、ウナギの性成熟機構の解明が必要であり、そのための基礎的な知見の集積が急務である。

一般に硬骨魚類の卵黄形成過程では、エストロジェン (estradiol-17 β ; E2) の作用下に、卵黄前駆物質であるビテロジェニン (VTG) が肝臓で合成される。VTG は血流を介して卵母細胞に取り込まれ、卵黄形成が進行する。この E2 作用による肝臓での VTG 合成の際には、E2 が肝細胞核中に存在するエストロジェンレセプター (ER) と特異的に結合することにより E2 の作用が発現することが知られている。従って、卵黄形成に関わる E2 の作用機構の解明には ER の詳細な研究が必要である。そこで本研究は、ニホンウナギ雌の成熟に関わる E2 の作用機構を解明することを目的として ER の発現調節に関する分子内分泌学的研究を行った。

ニホンウナギの ER は発現量が少なく、ノーザンブロット法では解析が困難なことから、RT-PCR を用いた高感度の ER 遺伝子発現測定系を確立した。その結果、ER と actin を特異的に認識するプライマーを合成し PCR を行ったところ、ER と actin の RT-PCR 産物の増幅効率 は 16・18 サイクルの間で等しかった。また、

サケ脳下垂体ホモジェネート (SPH) を二回投与して人為催熟したウナギ肝臓の ER mRNA 量を RT-PCR 測定系を用いて測定したところ、未処理の個体と比較して約 2.6 倍増加し、ノーザンブロット法による測定と同様の結果を示した。さらに、本測定系を用いて、体腔壁、脳下垂体、脳、卵巣における ER mRNA 量を調べたところ、すべての組織において ER の検出が可能であった。以上の結果から、RT-PCR を用いた ER 遺伝子の測定系は、従来のノーザンブロット法と比較して非常に高感度であり、これまで ER mRNA を検出することができなかった組織においても ER mRNA 量の測定を可能にした点で非常に有用な測定系であることが示された。

近年、これまでの ER α とは異なる新しい ER のサブタイプである ER β が哺乳類において単離された。ニホンウナギにおいても ER には ER α と ER β の二つのサブタイプが存在することが明らかにされた。そこで ER の発現調節をさらに詳細に調べるために、ER α 及び ER β mRNA を測り分ける RT-PCR 測定系を確立した。その結果、ER α 及び ER β プライマーは特異的にそれぞれの ER のサブタイプを増幅した。また、両 ER プライマーはそれぞれ異なるサブタイプの cDNA 断片は増幅しなかった。これらの結果は、ER α 及び ER β プライマーが特異的にそれぞれの ER のサブタイプを増幅していることを示している。以上の結果から、両サブタイプに特異的なプライマーを作成することにより、ER α 及び ER β mRNA を測り分ける RT-PCR 測定系が哺乳類以外で初めて確立された。本測定系は高感度であるうえに、相同性の高い ER α 及び ER β mRNA を確実に測り分けられる点で非常に優れた測定系であることが示された。

人為催熟時におけるニホンウナギ ER α 及び ER β の発現変化を詳細に調べるために、肝臓、体腔壁、脳下垂体、脳及び卵巣における人為催熟に伴う両 ER の発現変化を RT-PCR 測定系を用いて調べた。その結果、肝臓における両 ER mRNA 量は、卵黄形成初期の個体において最高値を示した後、卵黄形成中期の個体では減少して低値を維持した。卵巣形成後期に入ると両 mRNA 量は再び増加し、核移動期以降は減少した。体腔壁における両 ER mRNA 量の変化は、人為催熟に伴い減少する傾向を示した。脳下垂体における両 ER mRNA の変化のパターンは肝臓と同様の傾向がみられた。脳及び卵巣での両 ER の mRNA レベルは非常に低く、SPH 投与による変化は認められなかった。以上の結果、人為催熟に伴う ER α 及び ER β の発現変化は組織によって異なったことから、成熟に伴う ER α 及び ER β の発現調節には組織特異性があるものと考えられた。

最後に、肝臓において ER α 及び ER β が E₂ により誘導されるか否かを調べるために、E₂ 投与した養殖ウナギ雌の肝臓における両 ER mRNA 量を測定した。E₂ を週一回、8 週間投与したところ、ER α mRNA 量は緩やかに減少した。一方、ER β mRNA 量は E₂ 投与 2 週目に増加し、6 週目に未投与個体のレベルまで減少した後、8 週目に再び増加する傾向を示した。さらに E₂ を一回投与した個体の肝臓では、ER α mRNA 量は変化しなかったのに対して、ER β mRNA 量は増加した。これらの結果から、ER β は E₂ によって発現が誘導されるのに対して、ER α の発現は

E2 により誘導されないか又は抑制されることが示唆された。

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、E2 の転写制御因子である ER α 及び ER β の発現調節に関する詳細な知見が哺乳類以外で初めて得られた。これらの結果は、人為催熟により誘導される卵黄形成過程の問題点を E2 の作用機構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。