

学 位 論 文 題 名

Studies on Mechanisms of the Inhibition
of Vitellogenin Induction by Aluminium and Cadmium
in the Primary Culture of Hepatocytes
in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*

（ニジマスの初代培養肝細胞におけるアルミニウムおよび
カドミウムによるビテロゲニンの合成抑制機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

近年生産活動に起因する酸性雨が世界的に問題となっている。酸性雨は、自動車や工場からの排気に含まれる二酸化硫黄や炭酸窒素が雨水に溶け込み硫酸や硝酸となり発生する。この問題は森林資源等の陸圏への影響だけではなく、河川と湖沼の酸性化が引き起こされることにより魚類等の水圏生物の存在に非常に深刻な影響を及ぼしており、魚卵数の減少および卵の小型化等による魚類の再生産機構への弊害が顕在化している。また、酸性雨等により環境水中のアルミニウム (Al) やカドミウム (Cd) 等の有害金属濃度が増加し水圏生物の生殖機能に及ぼす影響が懸念されている。これまで Al は *in vitro* で、Cd は *in vivo* でビテロゲニン (VTG) の合成を抑制することが報告されている。しかし、どのような機構のよりこれら金属が VTG の合成を抑制するのかはまだ明らかではない。

一般的に魚類を含む卵生動物の卵黄前駆体として機能している VTG はエストラジオール-17 β (E₂) の刺激により肝臓で合成され、血液を経て卵巣細胞膜に存在する VTG レセプターを介して卵細胞中に取り込まれ、リポビテリン、ホスビチンおよび β' -component に分離され卵黄物質として卵細胞に蓄積し胚発生時期および仔魚期の栄養源として利用されるものである。したがって Al および Cd による VTG の合成抑制機構を明らかにすることは水産学上重要な課題である。

そこで本研究では、ニジマスの培養肝細胞を用い Al と Cd が VTG および VTG mRNA に及ぼす影響を電気泳動およびノーザンブロッティングに

より調べた。さらに、これら金属が エストロゲンレセプター (ER) に及ぼす影響を調べた。

I. ニジマスの初代培養肝細胞における E₂ 添加による VTG 合成

本章では、培養肝細胞実験の妥当性を調べるため、Al (10⁻⁶–10⁻⁴ M) または Cd (10⁻⁹–10⁻⁶ M) を添加培養し、これら金属が細胞の形態、DNA 量および生存率に及ぼす影響を調べた。また、E₂を添加することにより VTG 合成の一時的な変化を電気泳動で調べた。Al または Cd 添加により細胞の形態、DNA 量および生存率への影響はなかった。E₂ 添加により二日目から 175 kDa の位置に薄い VTG のバンドが確認され時間経過によりバンドが濃くなった。パイオイメージにより全タンパク質に対する VTG の割合を算出し、培養五日目で7.3%を示した。以上のことから、肝細胞培養は VTG の合成機構および Al と Cd による VTG の合成抑制機構を究明する優秀な実験だと考えられる。

II. VTG 合成に及ぼす Al および Cd の影響

本章では、Al または Cd を添加後五日間培養し、これら元素が VTG 合成に及ぼす影響を調べた。また、培地から Al と Cd を除去することにより VTG の合成が回復するかどうかを調べた。Al 添加により VTG の合成割合が濃度依存的に減少し、5×10⁻⁵ M および 10⁻⁴ M で VTG の合成割合が E₂ のみ加えた場合と比べ、有意に減少した。しかし、Cd は 10⁻⁹ M から 10⁻⁷ M まで、VTG の合成に影響しなかったが、10⁻⁶ M で顕著に抑制され、対照群に比べ34%まで有意に減少した。また、Al除去後、四日目まで VTG の合成は抑制されたが、5日目で多少回復し、七日目では対照群と同じように回復した。これに対して、Cd の場合は抑制された VTG の合成は Cd 除去後七日目でも回復しなかった。したがって、Al は VTG 合成を濃度依存的に抑制した。しかし、Cd の場合は濃度依存性が見られず 10⁻⁶ M で抑制された。さらに、Al は VTG 合成を可逆的に Cd は不可逆的に VTG の合成を抑制することが分かった。

III. VTG mRNAに及ぼす Al および Cd の影響

どのような機構のよりこれら金属が VTG 合成を抑制するのかを調べるため、まず DNA の情報から VTG 分子の合成を指示するものである VTG mRNA に及ぼす影響が考えられ、本章では、VTG mRNA の一時的な変化

および Al および Cd が VTG mRNA に及ぼす影響を調べた。VTG mRNA は、E₂添加後一日目から6.6kbの位置に観察され培養時間に伴って、培養五日目までバンドが濃くなっていることが分かった。また、Al添加により VTG mRNA のバンドが濃度依存的に薄くなり、Al 濃度増加により直線的に減少し、 $r=-0.98$ の有意な負の相関が選べた。しかし、Cd により VTG mRNA の発現量は、 10^{-7} Mまではほとんど影響をうけなかったが、 10^{-6} Mでは顕著に減少した。この抑制は、VTG の抑制と同じように Al は、濃度依存的に、Cd は、濃度依存性はみられず 10^{-6} Mで VTG mRNA を抑制した。以上のことから、VTG合成は Al および Cd により転写段階で抑制されることが分かった。

IV. ERに及ぼす Al および Cd の影響

転写段階の影響が ER 段階から引き起こされるかどうかを調べる必要があると思われ、本章ではAl および Cdが ERに対する放射性E₂ ([³H]E₂)の結合活性およびE₂とERの結合親和性に及ぼす影響を調べた。

IV-1. ER に対する [³H]E₂ の結合活性に及ぼす Al および Cd の影響

二日間前培養後、培地に E₂ と [³H]E₂、Al (10^{-4} M)、Cd (10^{-6} M) または、E₂ 作用阻害剤である 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) (10^{-8} - 10^{-5} M) を添加培養し培地を取り除き VTG を分析した。また、残っている細胞を 0.3N NaOHで溶かし細胞中に取り込まれた [³H]E₂ の活性をタンパク質 mg あたり dpm で示した。まず、VTG の合成を抑制することが知られている 4-OHT を添加し、本実験条件かで VTG の合成および [³H]E₂ の活性がどのような影響を受けるかを調べた。4-OHT 濃度増加により VTG の合成および [³H]E₂ 活性が顕著に抑制された。さらに、Al および Cd を加えた実験でも E₂ のみに比べ VTG の合成割合が完全に抑制された。しかし、[³H]E₂ 活性においては、E₂のみ添加した実験群に比べ、Al と Cdを加えた実験群で33%、29%を抑制した。これらのことから Al と Cd は ER段階でVTG合成を阻害するが、ER 段階以外の転写段階も抑制することが分かった。

IV-2. E₂ と ER の結合親和性に及ぼすAl および Cd の影響

Al と Cd が ER に対する E₂ 親和性に及ぼす影響を ER α 競争キットを

用い、ELISA により調べた。 E_2 と 4-OHT の場合は濃度増加により結合を抑制し、 10^5 nM で E_2 は100%、4-OHT は98%の結合を抑制した。しかし、Al と Cd の場合は、ER 結合に対する影響はいずれの濃度でもなかった。これらのことから、Al と Cd は、 E_2 と ER の結合には影響しないことが分かった。したがって Al および Cd による ER 段階の阻害は ER の発現によることが示唆された。

以上の結果から、ニジマスの肝細胞培養における VTG の合成は Al および Cd により転写段階で抑制される。Al は VTG および VTG mRNA を濃度依存的に抑制するが Cd の場合は濃度依存性が見られず 10^{-6} M で抑制する。さらに Al と Cd は少なくとも VTG の合成を ER 段階で抑制する。この抑制は、 E_2 と ER の結合親和性を阻害するのではなく ER の合成を抑制することによることが考えられる。今後 VTG の合成抑制機構をもっと明らかにするため Al および Cd が ER mRNA の発現量 に及ぼす影響について検討すべきである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 麦 谷 泰 雄

副 査 教 授 原 彰 彦

副 査 助 教 授 清 水 幹 博

学 位 論 文 題 名

Studies on Mechanisms of the Inhibition of Vitellogenin Induction by Aluminium and Cadmium in the Primary Culture of Hepatocytes in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*

(ニジマスの初代培養肝細胞におけるアルミニウムおよび
カドミウムによるビテロゲニンの合成抑制機構に関する研究)

近年生産活動に起因する酸性雨が世界的に問題になっている。この問題は森林資源等の陸圏への影響に止まらず、河川や湖沼に生息している魚類の生理にも深刻な影響を及ぼしている。また酸性雨に伴い、陸圏から可溶化したAl、Cd等の有害金属元素が淡水域に流れ込み、蓄積することにより魚卵数の減少や卵の成熟不全を引き起こし、魚類の再生産への弊害が顕在化している。本研究は酸性雨に伴い淡水域で増加が懸念されているAlとCdが、卵黄成分の前駆体であるビテロゲニン(VTG)の肝臓での合成にどのように影響を及ぼすかを、ニジマスの肝細胞培養法により調べ、さらにその作用機構について解析したものである。得られた結果の概要は下記の通りである。

1. Al (10^{-6} ~ 10^{-4} M) およびCd (10^{-9} ~ 10^{-6} M) は培養肝細胞の生存率およびDNA量に影響がなく、本法はこれら元素によるVTG合成への影響を調べるのに適した方法であることを示した。

2. AlとCdのVTG合成に及ぼす影響は、培地をSDS-PAGEで分析後、光学的定量により調べた。またVTGmRNAの発現量はノーザンブロット後、同様に定量した。

3. Alは濃度依存的に ($r = -0.97$)、Cdは濃度非依存的にエストロゲン (E_2 , 2×10^{-6} M) によるVTGの合成を抑制した。またAlによる抑制は、Al除去後7日目でも回

復したが、Cdによる抑制は回復しなかった。したがってAlによる抑制は可逆的であり、Cdによる抑制は不可逆的であった。

4. VTGmRNAのバンドはE₂添加後1日目から発現し、培養時間と共に増加し、5日目で最大になった。

5. VTGmRNAの発現は、Alにより濃度依存的に ($r = -0.98$)、またCdにより濃度非依存的に抑制された。

6. E₂により肝細胞のE₂レセプターの発現が顕著に増加し、処理3日目で最大に達し、このレベルは少なくとも5日目まで維持された。

7. これらの元素はE₂ (3H-E₂)レセプターの結合を低下させたが、E₂とレセプターの結合親和性には影響がなかった。これらのことから、E₂によるレセプターの発現がAlやCdにより抑制されることが示された。

これらの研究成果は、酸性雨にともなう河川・湖沼のAlやCd濃度の増加が、肝臓におけるVTGの合成をレセプターおよび転写段階で阻害することを直接示したものであり、酸性雨に伴う魚卵数の減少や成熟不全の原因の一端を明らかにしたものである。よって審査員一同は申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。