

## 学 位 論 文 題 名

Immunochemical and molecular biological studies of  
choriogenin in red lip mullet (*Chelon haematocheilus*)

(メナダのコリオジェニンに関する免疫生化学的および分子生物学的研究)

## 学位論文内容の要旨

内分泌かく乱化学物質（Endocrine Disrupting Chemicals: EDCs）は、生体内の内分泌因子と類似した作用を顕すこと、もしくはその作用を阻害することにより、生体の内分泌機能をかく乱する物質群である。これら EDCs は河川を含む広域な環境中に混入し、ヒトを含めた野生生物に深刻な影響を及ぼす可能性がある。生物の生体反応を用いてその応答性を評価する手法（バイオアッセイ）は、未確認な化学物質に起因する環境汚染を調査する際に大変有効な手段となる。一般に卵生脊椎動物の卵黄蛋白前駆物質であるビテロジェニン（Vg）および卵膜蛋白前駆物質であるコリオジェニン（Chg）は、エストロジェン感受性の雌特異蛋白質として知られる。これらの蛋白質は外因性のエストロジェン暴露によっても産生されることから、エストロジェン様活性を持つ EDCs（環境エストロジェン）のバイオアッセイにおける生物指標分子（バイオマーカー）として利用される。

メナダ（*Chelon haematocheilus*）は生息域が広く、主に底性のデトライタスを索餌することから底質の影響を受けやすいため、環境エストロジェン調査の対象魚種とされている。しかし、本種のバイオマーカーに関する基礎的な性状解析例は非常に少なく、特に Chg に関する報告はこれまでにない。さらに近年の研究により、多くの魚類でこれらバイオマーカーには分子多型性が確認されているが、メナダにおける知見はない。多型性を考慮したバイオマーカーの性状解析を進めることは、本種を用いた正確で実用的なバイオアッセイの確立に必要不可欠である。本研究では、メナダを用いた実用的な環境エストロジェン

のバイオアッセイ系の確立を目的として、その基礎となるバイオマーカーの詳細な性状解析を、主に免疫生化学と分子生物学的手法を用いて行い以下の知見を得た。

メナダにエストラジオール- $17\beta$  ( $E_2$ ) を投与し、その血清から種々のクロマトグラフィーを用いて 2 種類の Chg を精製した。精製品のインタクト分子量はゲル濾過で 215 kDa および 69 kDa であり、その他 SDS-PAGE での分子量・アミノ酸組成・抗原性等の解析から、前者を本種の Chg H サブタイプ、後者を Chg L サブタイプと同定した。また、各々を家兎に免疫し、Chg H に対する特異抗体 (anti-Chg H) および Chg L に対する特異抗体 (anti-Chg L) を作製した。一方、近縁種のボラで作製したサブタイプ特異抗体を用い、メナダ血清において抗原性と分子量の異なる 3 種の Vg サブタイプ (VgA, VgB, VgC) を同定し、このうち特に VgB サブタイプを精製し、その特異抗体を作製した。

エストロジェン処理を行ったメナダの肝臓から 3 種類の完全長 Chg cDNA (Chg H1、Chg H2、Chg L) と 2 種類の Vg (VgA, VgB) cDNA 断片を単離した。メナダの Vg 遺伝子サブタイプをボラのそれらと同様に分類し、その相同性と上記の抗原性を併せて考慮した結果、メナダの VgB cDNA は本種の主要な Vg である VgB 蛋白をコードする事が確認された。一方、特に混乱している Chg サブタイプの分類に際し、Chg を含む zona pellucida (ZP) 遺伝子ファミリーにおける新たな分類法を確立し、これに基づき、上記メナダ Chg 遺伝子サブタイプを Chg Ha1、Chg Ha2 および Chg L に分類した。これら完全長 Chg サブタイプ cDNA の演繹アミノ酸配列の相同性はメナダとメダカ間で最も高かった (50–77%)。卵膜蛋白の内部アミノ酸配列のペプチドマッピングと各 Chg サブタイプの推定分子量を考慮した結果、Chg Ha cDNA は Chg H 蛋白を、Chg L cDNA は Chg L 蛋白をコードする事が示唆された。

2 種の Chg (Chg H, Chg L) および VgB 血中量は、各々のサブタイプ特異抗体を用いて確立した Mancini 法により測定した。一方、各 Chg および VgB 遺伝子の発現量はサブタイプ特異プライマーを用いたリアルタイム定量 RT-PCR (qRT-PCR) にて測定し、内部標準とした elongation factor 1- $\alpha$  (EF 1- $\alpha$ ) 遺伝子発現量で標準化した。人工海水中で数ヶ月間馴致した未成熟メナダへのエストロジェン投与実験において、全ての投与群で、これら

マーカーの遺伝子発現および蛋白誘導のピーク値は VgB > Chg H > Chg L となり、特に蛋白に関しては、低濃度のエストロジェン処理に対し、VgB 蛋白のみに誘導が確認された。このことから、メナダでは VgB が最も感度が良く、広いダイナミックレンジを持つ優れたバイオマーカー分子であることが確認された。

一方、汚染河川のモデルである函館市の常磐川と小田島川のエストロジェン活性を、河口域にて採取した未成熟個体の血清における各マーカーの蛋白量から比較したところ、両河川で非常に多量の VgB が誘導された個体が出現したが、血中量に個体差が大きく両河川間で有意差は認められなかった。しかし、Chg 蛋白の誘導は、常磐川からの個体にのみ見られ、両河川間にエストロジェン活性の差が確認された。この例から VgB と同時に Chg の発現量を測定することによって、環境エストロジェンの影響評価の精度が向上することが示唆された。さらに、両河川において検出された各 Chg と VgB 蛋白量は、エストロジェン投与実験のイニシャルコントロール群におけるベースライン（Mancini 法の検出限界以下）や、比較的清浄であると判断される中国の天津沿岸域で採取された雄個体中の各蛋白量と比べ明らかに高値を示し、成熟雌魚の血中レベルと同様であったことから、同河川域における強い環境エストロジェン活性が示唆された。

以上、本研究では、メナダの 2 種の Chg と VgB を免疫生化学的および分子生物学的手法を用いてサブタイプレベルで同定した。特に Chg の一次構造解析は、独自のサブタイプ分類法に基づいて行い、その精製法の確立と併せ、ボラ科魚類を含む海産魚で初めての詳細な分子性状解析となった。また各マーカー蛋白質・遺伝子発現のサブタイプ特異的な定量法を新たに開発し、これらを同時に用いて各分子のエストロジェン投与による発現性状、ならびに未成熟および成熟雌雄における発現性状に関する本種の基礎的な生理知見を得た。さらに汚染モデル河川における予備的な環境エストロジェン活性調査を行い、複合的な多型バイオマーカーを用いる重要性を示唆した。以上の知見は、メナダを用いた環境エストロジェンのバイオアッセイにおいて、その正確性と実用性を飛躍的に向上する成果であり、今後の本研究分野の発展に大きく寄与するものと期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 彰 彦  
副 査 教 授 足 立 伸 次  
副 査 准教授 東 藤 孝  
副 査 助 教 平 松 尚 志

## 学 位 論 文 題 名

### Immunochemical and molecular biological studies of choriogenin in red lip mullet (*Chelon haematocheilus*)

(メナダのコリオジェニンに関する免疫生化学的および分子生物学的研究)

内分泌かく乱化学物質 (Endocrine Disrupting Chemicals: EDCs) は、生体内の内分泌因子と類似した作用を顕すこと、もしくはその作用を阻害することにより生体の内分泌機能をかく乱する物質群である。EDCs はヒトを含めた野生生物に深刻な影響を及ぼす可能性があり、その影響調査には生物の生体反応を用いて応答性を評価する手法 (バイオアッセイ) が有効な手段となっている。卵生脊椎動物の卵黄蛋白前駆物質ビテロジェニン (Vg) および卵膜蛋白前駆物質コリオジェニン (Chg) は、エストロゲン感受性の雌特異蛋白質として知られる。これら蛋白質は外因性のエストロゲン暴露によっても産生されることから、エストロゲン様活性を持つ EDCs (環境エストロゲン) のバイオアッセイにおける生物指標分子 (バイオマーカー) として利用される。メナダ (*Chelon haematocheilus*) は生息域が広く、主に底性のデトライタスを索餌することから底質の影響を受けやすいため、環境エストロゲン調査の対象魚種とされている。しかし、本種のバイオマーカーに関する基礎的な性状解析例は非常に少なく、特に Chg に関する報告はこれまでにない。本研究では、メナダを用いた実用的な環境エストロゲンのバイオアッセイ系の確立を目的として、その基礎となるバイオマーカーの詳細な性状解析を免疫生化学的手法および分子生物学的手法を用いて行い以下の知見を得た。

メナダの血清から種々のクロマトグラフィーを用いて 2 種の Chg 蛋白を精製した。精製品のゲル濾過

での分子量 (215 kDa および 69 kDa) や SDS-PAGE での分子量 (68 kDa および 51 kDa)、さらにアミノ酸組成および抗原性等の解析から、高分子の Chg を本種の Chg H、もう一方を Chg L と同定した。一方、血清に 3 種の Vg (VgA, VgB および VgC) を同定し、このうち本種の主要な Vg である VgB を精製した。また、これら 3 つの精製蛋白 (Chg H、Chg L および VgB) に対する特異抗体を作製した。

肝臓から 3 種の完全長 Chg cDNA (Chg H1、Chg H2 および Chg L) と 2 種の Vg (VgA および VgB) cDNA 断片を単離した。本種および他魚種の Chg を含む zona pellucida 遺伝子ファミリーにおける新たな分類法を確立し、上記 Chg 遺伝子を Chg Ha1、Chg Ha2 および Chg L に分類した。ペプチドマッピング解析と各 Chg サブタイプの分子量査定の結果、Chg Ha cDNA は Chg H 蛋白、Chg L cDNA は Chg L 蛋白をコードすることを明らかにした。一方、VgB cDNA は相同性と抗原性から VgB 蛋白をコードすることを確認した。

2 種の Chg (Chg H および Chg L) と VgB に関して、特異抗体を用いた Mancini 法および特異プライマーを用いたリアルタイム定量 RT-PCR 法を確立した。未成熟個体へのエストロジェン投与実験を行い、各マーカーの遺伝子発現様式および蛋白誘導様式を観察した結果、VgB は最もエストロジェン刺激に対する感度が高く、広いダイナミックレンジを持つ優れたバイオマーカーであることを確認した。一方、函館市の常磐川と小田島川の河口域にて採取した未成熟個体の血清における各マーカーの蛋白量を測定し、両河川のエストロジェン活性を評価した。両河川の個体で成熟雌個体に観察される濃度と同等またはそれ以上の多量な VgB が検出され、本種の正常ベースラインおよび他の清浄水域 (中国天津沿岸) から得られた雄個体血中 VgB 量と比べ明らかに高値を示したことより、同河川域における強い環境エストロジェン活性を示唆した。この際、血中 VgB 濃度には河川間で有意差は認められなかったものの、Chg 蛋白は常磐川からの個体にのみ検出され、両河川にエストロジェン活性の差を確認した。このことから VgB と同時に Chg を測定することによって、活性評価の精度が向上することを示した。

以上、本研究は、メナダの多型 Chg と VgB を蛋白および遺伝子レベルで同定した。特に Chg の一次構造解析は独自の分類法に基づいて行い、精製法の確立と併せて海産魚で初めて詳細な分子性状を解析した。また、各蛋白質・遺伝子発現に対する特異的な定量法を新たに開発し、各分子のエストロジェン投与による発現様式に関する知見を得た。さらに予備的な野外調査の結果から、各バイオマーカーを併用

することで詳細かつ正確な環境エストロジェン活性の評価が可能となることを示した。これらの結果は、メナダを用いた環境エストロジェンのバイオアッセイにおける正確性と実用性を飛躍的に向上する成果を提供した。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。