HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	チョウザメ類における卵成熟誘起ステロイドの同定とその産生制御機構に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	長谷川, 祐也
Citation	北海道大学. 博士(水産科学) 甲第14759号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/86102
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Yuya_Hasegawa_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

主論文の要約

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：長谷川　祐也

学 位 論 文 題 目
チョウザメ類における卵成熟誘起ステロイドの同定と その産生制御機構に関する研究

本研究では、チョウザメ類の卵成熟誘起ステロイド（MIS）を同定し、その産生制御機構を明らかにすることを目的とした。過去の研究から、チョウザメ類の MIS が未同定ステロイドである可能性が残されているため、高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析計（LC/MS/MS）を用いて、卵成熟期に産生されるステロイドを包括的に調べた。また、卵成熟期に産生されるステロイドの卵成熟誘起活性を調べた（第II章）。次に、17α, 20β-ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（DHP）産生制御機構を解明するため、DHP 産生に至るステロイド合成酵素をコードする遺伝子を同定後、その発現動態を調べた（第III章）。さらにステロイド合成酵素関連遺伝子の転写調節機構を調べた（第IV章）。以下に得られた知見を要約する。

1)　チョウザメ類における卵成熟期に産生されるステロイドの包括的解析

過去の研究で、チョウザメ類の卵成熟期に産生されるステロイドが調べられたが、他魚種で MIS であると同定されている DHP および 17α, 20β, 21-トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（20β-S）の産生量が卵成熟中に急増する例は示されていない。このことから、チョウザメ類の MIS が未同定ステロイドである

可能性が残されている。そこで、まず、血中ステロイドの包括的解析を行なった。その結果、黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ （LHRHa）投与から 24 時間後に、DHP、20β-S、17α, 20α-ジヒドロキシ-4- プレグネン-3-オン（α-DHP）、20β-ヒドロキシプロゲステロンおよび 11-デ オキシコルチゾルの血中量が増加した。その中でも、DHP が最も高い血中量を示したが、血中 DHP 量は他 C21 ステロイドと比べて顕著に高値を示さなかった。また、高い血中量を示す未同定ステロイドはみられなかった。投与から 24 時間後にはほとんどの卵濾胞が卵核胞崩壊（GVBD）に至っていることから、卵成熟後に DHP が他のステロイドへと代謝された可能性が考えられた。次に、*in vitro* における卵濾胞産生ステロイドの包括的解析を行なった。LHRHa 投与から 24 時間後に採取した卵濾胞は既に卵成熟に至っていることから、卵成熟開始直後の卵濾胞を用いて産生ステロイドを調べた。その結果、培養から 12 時間後に、DHP 産生量が他ステロイドと比べて顕著に高値を示した。また、培養から 24 時間後には、DHP の産生量が減少し、20β-S の産生量が増加したことから、DHP は卵成熟後に 20β-S に代謝されることが示唆された。また、*In vitro* においても高い産生量を示す未同定ステロイドは検出されなかった。以上の結果から、チョウザメ類において DHP が最も卵成熟中に産生される C21 ステロイドは DHP であり、20β-S は DHP からの代謝物であることが示唆された。本研究では、卵成熟期のチョウザメ類における DHP 産生のピークを初めて捉え、卵成熟中に最も産生されるステロイドは DHP であると示された。

2) 卵成熟期に産生されるステロイドの卵成熟誘起活性

過去の研究で、既知ステロイドの卵成熟誘起活性が調べられ、17α-ヒドロキシプロゲステロン（17OHP）および 17OHP から転換される DHP、20β-S、

α-DHP の卵成熟誘起活性に差はみられないことが報告されている。そこで、本研究では段階希釈物を用いることで既知ステロイドの卵成熟誘起活性を精査した。その結果、17OHP、DHP および α-DHP の卵成熟誘起活性は同等であり、MIS が DHP であると同定されている魚種でみられるような顕著に高い卵成熟誘起活性を示すステロイドはみられなかった。次に、卵濾胞培養液抽出物に含まれるステロイドを定量解析後、同じ濃度の既知ステロイドを添加して、卵濾胞培養液抽出物との卵成熟誘起活性を比較した。その結果、既知ステロイド添加群および卵濾胞培養液抽出物添加群における卵成熟誘起活性に差はみられず、高い卵成熟誘起活性を示す未同定ステロイドが存在しない可能性が考えられた。さらに、DHP から 5α もしくは 5β-リダクターゼにより転換されることが予想される分子量 334 の未同定化合物を HPLC により分取し、卵成熟誘起活性を測定した結果、DHP と比べて低い卵成熟誘起活性を示した。よって、DHP の卵成熟誘起アッセイにおいて、DHP から転換される化合物が主に卵成熟を誘起する MIS である可能性は低いと考えられた。以上より、DHP と同等の卵成熟誘起活性を示すステロイドはあったものの、未同定ステロイドを含めた C21 ステロイドの中で DHP より高い卵成熟誘起活性を示すステロイドはみられなかった。産生ステロイドの包括的解析の結果から、卵成熟中に最も産生されるステロイドは DHP であり、他ステロイドは卵成熟開始直後に産生される中間代謝物または、卵成熟後に産生量が増加する代謝物であることが示唆された。従って、高い卵成熟誘起活性を有し、卵成熟中に最も産生されるステロイドは DHP であると結論されたことから、チョウザメ類の MIS は DHP であると同定した。

3)　ステロイド合成酵素関連遺伝子の酵素活性および発現動態

第II章において、チョウザメ類の MIS は DHP であると同定した。DHP は P5、P4、17OHP5 および 17OHP を介し、3β-水酸基脱水素酵素/Δ5-4 異性化酵素（3β-HSD）、17α-水酸化酵素および 20β-水酸基脱水素酵素（20β-HSD）の働きにより合成される。ナイルティラピアおよびメダカでは、p450C17-I（*cyp17a1*）が 17α-水酸化酵素および C17-20 側鎖切断酵素を、p450C17-II（*cyp17a2*）が 17α-水酸化酵素をコードすることが示されている。また、卵成熟期に *cyp17a1* の発現が抑制されることでステロイド転換経路が切り替わり、*cyp17a2* の発現が促進されて 17OHP 産生が誘導されると考えられている。近年、サクラマスにおいて、17β-水酸基脱水素酵素タイプ 12-like（*hsd17b12L*）が 17OHP を DHP に転換する強力な 20β-HSD 活性を有し、その mRNA 量は卵成熟期に急増することが示された。チョウザメ類の MIS が DHP である場合、これらステロイド合成酵素関連遺伝子が存在し、卵成熟期に発現変動すると予想される。そこで、チョウザメ類における DHP 産生制御を明らかにするため、3β-HSD をコードする hsd3b、cyp17a1/2 および hsd17b12L の酵素活性および発現動態を調べた。その結果、アムールチョウザメ *hsd3b* は P5 および 17OHP5 をそれぞれ P4 および 17OHP に転換する 3β-HSD 活性を示した。次に、アムールチョウザメ *cyp17a1* の転写産物は、P5 および P4 をそれぞれ 17OHP5、DHEA および 17OHP および A4 に転換する 17α-水酸化酵素および C17-20 側鎖切断酵素活性を示した。続いて、アムールチョウザメ *cyp17a2* の転写産物は P5 および P4 を 17OHP5 および 17OHP に転換する 17α-水酸化酵素活性のみを示した。最後に、アムールチョウザメ *hsd17b12L* の転写産物は 17OHP を DHP に転換する強力な 20β-HSD 活性を示した。チョウザメ類における 17OHP および DHP 産生を担うステロイド合成酵素関連遺伝子はチョウザメ類より上位に位置する硬骨魚類と同じであり、条

鰭類全体において DHP 産生を担うステロイド合成酵素関連遺伝子は一貫していることが示唆された。

続いて、*in vivo* および *in vitro* において *hsd3b*、*cyp17a1/2* および *hsd17b12L* の発現動態を調べた。アムールチョウザメ *hsd3b* mRNA 量は、卵成熟期に急増し、その発現は LH 刺激により誘導されることが示唆された。硬骨魚類では、卵成熟期に *hsd3b* の発現が誘導されるかどうか詳細に調べられておらず、卵成熟期に *hsd3b* mRNA 量が急増する例をアムールチョウザメで初めて見い出した。次に、卵成熟期において、アムールチョウザメ *cyp17a1* mRNA 発現は下方制御され、アムールチョウザメ *cyp17a2* mRNA 発現は上方制御されることが示唆された。最後に、アムールチョウザメ *hsd17b12L* mRNA 量は卵成熟期に増加し、LH 刺激により誘導されるが、その誘導はサクラマス *hsd17b12L* と比べて強くないことが示唆された。また、アムールチョウザメ *cyp17a1* mRNA 発現にメダカでみられるような急激な抑制はみられなかった。従って、3β-HSD による P4 の産生調節がアムールチョウザメの DHP 産生に重要であることが示唆された。さらに、未排卵個体では *cyp17a1* mRNA 発現は抑制されず、また、排卵個体における *hsd17b12L* mRNA 量は未排卵個体と比べて有意に高値を示したことから、*cyp17a1* mRNA 発現の抑制および *hsd17b12L* mRNA の発現誘導が特に DHP 産生を通した排卵誘導に重要であることが示唆された。DHP 産生を担うステロイド合成酵素が LH 刺激により制御されることが明らかとなったことで、チョウザメ類の MIS は DHP であることがさらに裏付けられた。本研究で得られた知見は、条鰭類における MIS 産生制御機構の普遍性および多様性の理解を推し進めるものである。

4) ステロイド合成酵素の転写調節

アムールチョウザメ *hsd3b*、*cyp17a1*、*cyp17a2* およびコチョウザメ *hsd17b12L* の転写調節機構を調べた。アムールチョウザメ *hsd3b* および *cyp17a2* のプロモーターアッセイを行なった結果、ロシアチョウザメ黄体形成ホルモン受容体（LHR）発現ベクターをトランスフェクションし、かつ組換え黄体形成ホルモン（LH）を添加した群における相対積算発光量は、対照群と比べて有意に高値を示した。よって、*hsd3b* および *cyp17a2* は LH 刺激により直接的に環状アデノシン一リン酸（cAMP）応答配列を介し、転写が開始されることが示唆された。また、LH 刺激による cAMP の濃度上昇に伴うプロモーター領域の活性化度は *hsd3b* と *cyp17a2* との間に差があり、*hsd3b* プロモーター領域の活性化は *cyp17a2* と比べてより急激であった。これは *in vivo* および *in vitro* における *hsd3b* および *cyp17a2* の mRNA 発現誘導の結果と一致しており、プロモーターアッセイの結果は *in vivo* における制御機構をよく反映しているものと思われる。このことから、卵成熟期に大量分泌された LH が、LHR と結合し、cAMP 濃度を上昇させ、cAMP 応答配列を介して、直接的に *hsd3b* および *cyp17a2* の転写が誘導されることが示唆された。さらに、アムールチョウザメ *nr5a1* は、LH シグナルを介した *hsd3b* および *cyp17a2* の転写を活性化することが示唆された。続いて、アムールチョウザメ *cyp17a1* のプロモーターアッセイにおいて、*nr5a1 type I/II*およびロシアチョウザメ LHR を共トランスフェクションし、組換え LH を添加した群における相対積算発光量は、対照群と比べて有意な差を示さなかった。よって、アムールチョウザメ *cyp17a1* の転写は cAMP 応答配列を介して直接開始されず、転写因子を介する可能性が考えられた。最後に、コチョウザメ *hsd17b12L* のプロモーターアッセイを行なった結果、*nr5a1 type I/II*、ロシアチョウザメ *LHR* を共トランスフェクションし、組換え LH を添加した群における相対積算発光量は対照群と比べて、有意な差を示さなかった。これは、*In*

vivo および *in vitro* において、アムールチョウザメ *hsd17b12L* mRNA 発現が LH 刺激により誘導された結果と一致しないことから、アムールチョウザメ *hsd17b12L* の転写は LH サージにより直接的に開始されるのではなく未知の転写因子を介することが示唆された。

以上より、アムールチョウザメ *hsd3b* および *cyp17a2* の転写は LH サージにより直接的に開始されるが、コチョウザメ *hsd17b12L* の転写は、未知の転写因子を介して転写されることが示唆された。これら研究成果より、これまでチョウザメ類では全く不明であった卵成熟機構解明が大きく進展したと思われる。本研究で得られた知見は、条鰭類における MIS 産生制御機構の普遍性および多様性の理解を推し進めるものである。また、これらの知見は、排卵誘導適期の推定など種苗生産技術の確立に貢献できると期待される。