



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular Biological and Immunobiochemical Studies of Multiple Vitellogenins in Dojo Loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>) : Integration of Basic Information to be Practical Biomarkers for Evaluating Aquatic Estrogenic Activities [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	呉, 美琴
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11328号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55368
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Wu_Meiqin_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：呉 美琴

審査委員	主査 教授	足 立 伸 次
	副査 教授	都 木 靖 彰
	副査 教授	征 矢 野 清 (長崎大学)
	副査 名誉教授	原 彰 彦
	副査 准教授	東 藤 孝
	副査 准教授	平 松 尚 志

学 位 論 文 題 目

Molecular Biological and Immunobiochemical Studies of Multiple Vitellogenins in Dojo Loach
(*Misgurnus anguillicaudatus*): Integration of Basic Information to be Practical Biomarkers for
Evaluating Aquatic Estrogenic Activities

(ドジョウの多型ビテロジェニンに関する分子生物学的及び免疫生化学的研究:
水圏エストロゲン活性評価の実用的バイオマーカーとしての基礎的情報の集積)

環境水中には人間活動により排出された様々な化学物質が混入している。それらの中には女性ホルモン(エストロゲン)様活性を示すものがあり、エストロゲン様内分泌かく乱化学物質(EEDC)と呼ばれている。これまでに、EEDC 汚染が原因と考えられる魚類の生殖腺組織異常等が報告され、同物質による水棲生物の繁殖への影響が危惧されている。

魚類の雌は、卵黄形成期になると内因性のエストロジェンの刺激により肝臓でビテロジェニン (Vtg) と呼ばれる卵黄蛋白前駆物質を合成し、これを血中に分泌する。Vtg は、性成熟期の雌魚にのみ検出される雌特異蛋白であり、通常は雄や未成熟魚には検出されない。そのため、雄や未成熟魚の血中に検出された Vtg は、生息水域の EEDC 汚染を示すバイオマーカーとして用いられる。

ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) は東アジア地域の河川や水田に広く分布し、泥とともに有機物を摂取する雑食性の淡水魚である。また、比較的汚染された水にも棲息し、胸鰭によって雌雄判別が容易なことから、本種は淡水域の EEDC 汚染評価において、国際的

な共通指標種として注目されている。しかしながら、本種の Vtg 遺伝子及び蛋白質に関する知見は少ない。

本研究では、ドジョウを用いた EEDC 汚染評価系の確立を目指し、そのために必要な基礎的知見や技術の集積を目的として、以下の研究を行った。

まず、ドジョウ Vtg 遺伝子の cDNA クローニングを行った結果、本種肝臓より 7 種類の *vtg* cDNA がクローニングされ、これらは大別すると 2 つのサブタイプに分類された。即ち、Vtg1 から 6 は、 β' -component から C 末端領域を欠損する truncated 型 Vtg であり、一方、Vtg7 はリポビテリンのみから構成される不完全型 Vtg であった。また、分子系統樹解析を行った結果、ドジョウ Vtg1 から 6 は、コイ目 Vtg の truncated 型タイプである VtgAo1 タイプとクラスターを形成し、一方、Vtg7 は魚類の VtgC タイプに属した。

次にこれらの転写産物がコードする Vtg 蛋白の同定を試みた。まず、大腸菌発現系を用いて VtgAo1 と VtgC の各々一部の配列を標的として組み換え蛋白を作成し、それぞれをウサギに免疫することで、各 Vtg サブタイプに特異的な抗体を作製した。この抗体を用い、各 Vtg 蛋白の検出を試みた結果、血中では VtgAo1 はメジャータイプ、VtgC はマイナータイプであることが確認された。このことから、ドジョウを評価モデルに使用する場合、VtgAo1 をバイオマーカーとして選択する事を推奨した。

続いて、VtgAo1 のエストロジェンに対する感受性を確認するため、 17α -ethynylestradiol (EE2) 及び 17β -estradiol (E2) を用いドジョウの暴露実験を行った。その結果、*vtgAo1* 遺伝子及び同蛋白の発現は、エストロジェンの暴露濃度や時間に依存して増加した。従って、ドジョウの *vtgAo1*/VtgAo1 をバイオマーカーに用いることによって、汚染濃度や汚染域における滞在時間を反映したバイオアッセイが可能である事を示した。

更に、実際にドジョウの *vtgAo1* をバイオマーカーとして用いて、1 週間の暴露試験によって環境水の EEDC 活性評価を試みた結果、調査河川が同活性を持つと判断された。従って、ドジョウを用いた暴露試験は、短期間で高感度に環境水中の EEDC 活性を評価でき、将来、異なる水域の同活性を比較する手段として、有効であると考えられた。

最後に、中国における 2 つの淡水域について、実際に野生のドジョウを採集し、EEDC の影響を予備的に調査した。捕獲されたドジョウにおいて、オスでも *vtgAo1* の発現が見られたものの、その発現量は性成熟雌個体の約 0.3%程度と極くわずかであり、また生殖腺に異常な形態を示す個体は全く存在しなかった。このことより調査域は EEDC 活性は認められるものの、極めて低レベルであると判断された。

以上、本研究では、ドジョウの *vtg*/Vtg をバイオマーカー用いた EEDC 汚染評価系の確立に必要な基礎的知見や技術を集積することができた。本研究で得られた結果は、今後の東アジア水域における EEDC 汚染調査に大きく貢献(こうけん)するものと期待される。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。