



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on Mechanism of Endocytosis of Vitellogenin via its Receptor on the Oocyte of Cutthroat Trout, <i>Oncorhynchus clarki</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	水田, 紘子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11334号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55429
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroko_Mizuta_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：水田 紘子

審査委員	主査	教授	足立	伸次
	副査	教授	都木	靖彰
	副査	准教授	平松	尚志
	副査	准教授	東藤	孝
	副査	名誉教授	原	彰彦
	副査	講師	清水	宗敬

学 位 論 文 題 目

Studies on Mechanism of Endocytosis of Vitellogenin via its Receptor
on the Oocyte of Cutthroat Trout, *Oncorhynchus clarki*
(カットスロートトラウト卵母細胞における受容体を介した
ビテロジェニンエンドサイトーシス機構に関する研究)

魚類の卵巣発達に関する分子制御機構について理解を深めることは、飼育下において雌親魚の性成熟や繁殖を適切に管理あるいは制御し、効率的に質の良い種苗を生産する技術確立する上で重要な基礎となる。魚類の卵母細胞は、ビテロジェニン (Vtg) と呼ばれる卵黄蛋白前駆物質を血液中から取り込み急速に成長する。Vtg の取り込みは、同細胞膜上に存在する Vtg 受容体 (Vtgr) を介したエンドサイトーシスにより制御されるが、その詳細は不明な点が多い。一方、哺乳類においてリポ蛋白質受容体 (LR) は小胞体 (ER) で合成され、LR 関連蛋白質 (RAP) といった ER 内のシャペロンの作用によりリガンドとの結合能を得ると考えられている。本研究では、サケ科魚類のカットスロートトラウト (*Oncorhynchus clarki*) をモデル魚として、魚類の卵母細胞における Vtgr を介した Vtg のエンドサイトーシス機構に関して基礎的知見を集積することを目的とした。同機構に関与することが予想される Vtgr、常染色体劣性高コレステロール血症原因蛋白質 (Arh)、およびクラスリン重鎖 (Cltc) に着目し、これらの卵巣における発現・局在を遺伝子並びに蛋白質レベルで解析した。また、Rap を Vtgr のシャペロン候補とし、その機能について予備的な解析を行った。

まず、本種卵巣より完全長の *vtgr* cDNA をクローニングした。*In situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法を用いて *vtgr* mRNA の発現解析を行った結果、*vtgr* は周辺仁期の卵母細胞質中で強く発現していた。その陽性シグナルは卵母細胞の発達に伴って徐々に減少し、卵黄形成期では殆ど検出されなくなった。また、リアルタイム定量 PCR (rtqRT-PCR) 法により卵巣における *vtgr* mRNA 発現量を測定した結果、上記の結果と良く一致する発現パターンが得られた。抗 *Vtgr* 抗体 (a-*Vtgr*) を作製し、これを用いた免疫組織化学的解析 (IHC 法) により *Vtgr* の卵巣における局在を調べた結果、*Vtgr* は周辺仁期では卵母細胞質中に均一に分布し、油球期には徐々にその局在を卵母細胞の周縁部に移した。卵黄形成期でも、引き続き同周縁部に局在した。

本種卵巣より 2 種類の完全長 *arh* cDNA (*arhI*、*arhII*) をクローニングした。rtqRT-PCR 法を用い、卵巣における 2 種 *arh* mRNA の発現を各々定量した結果、特に、*arhII* は *vtgr* と同様の発現パターンを示した。このことから、卵母細胞における *Vtgr* を介した *Vtg* エンドサイトーシスに、*ArhII* が関与する可能性が示された。

次に、本種卵巣より 3 種類の完全長 *cltc* cDNA (*cltc-a1*、*-a2*、*-b*) を得た。rtqRT-PCR 法によりこれらの卵巣における発現を各々定量した結果、特に、*cltc-a1* は *vtgr* や *arhII* と同様の発現パターンを示した。また、抗 *Cltc* 抗体 (a-*Cltc*) を作製し、これを用いた IHC 法により *Cltc* の卵巣における局在を調べた結果、*Cltc* は *Vtgr* と同様の局在パターンを示した。これらのことから、卵母細胞における *Vtg* のエンドサイトーシスに *Cltc-a1* が関与する可能性が示された。

これまで、哺乳類由来 Lenti-X 293T 細胞に本種 *Vtgr* を単独で発現させても、発現した *Vtgr* は *Vtg* 結合能を持たないことが示されている。本研究では同細胞発現系にて本種 *Vtgr* と *Rap* を共発現させ、*Vtgr* が *Vtg* 結合能を得るか否かを観察することで、*Vtgr* に対する *Rap* のシャペロン機能について予備的な確認を行った。本種 *Vtgr* と *Rap* をトランスフェクションした細胞において、*rap* mRNA および *Vtgr* 蛋白質の発現が確認された。しかし、発現した *Vtgr* は *Vtg* との結合性を示さず、今回得られた *Rap* が *Vtgr* のシャペロンであるという証拠を示すには至らなかった。

本研究は、魚類の卵巣における *Vtgr* の発現・局在パターンを遺伝子・蛋白質レベルで同時に解析した初めての報告である。また、これまでに魚類において知見の無いエンドサイトーシス関連因子についても同様に解析し、*ArhII* と *Cltc-a1* が卵母細胞における *Vtg* エンドサイトーシス機構に関与する可能性を強く示唆した。一方、*Rap* に関する予備的な機能解析を行ったものの、同因子を *Vtgr* のシャペロンと同定するには至らなかった。以上、本研究の成果は、魚類卵巣における *Vtgr* を介した *Vtg* のエンドサイトーシス機構に関して新たな基礎的知見を提供すると共に、これら知見を基盤とする魚類の卵黄形成機構について理解を深めることに貢献した。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。