



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 entire text]
Author(s)	水田, 紘子
Description	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。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/55431
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroko_Mizuta_summary.pdf



学位論文内容の要約

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：水田 紘子

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。一般に、リポ蛋白質受容体 (LR) はリガンドと結合すると、LR アダプター蛋白質やクラスリンと呼ばれるエンドサイトーシス関連因子と複合体を形成し、エンドサイトーシスを開始する。最近、アフリカツメガエルにおいて、LR アダプター蛋白質の一つである常染色体劣性高コレステロール血症原因蛋白質 (Arh) が、Vtgr を介した Vtg のエンドサイトーシスに関与することが示唆された。また、哺乳類のクラスリンは重鎖と軽鎖から構成され、重鎖には2種類のタイプ (CTLG、CLTD) が報告されているが、CLTGのみが受容体を介したエンドサイトーシスに関与すると考えられている。一方、哺乳類において 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。以上の様に、様々な因子が LR を介したエンドサイトーシスに関与しており、魚類の卵黄形成過程にもこれらの因子が関与すると予想される。本研究では、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、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、その卵巣における Vtgr 及びエンドサイトーシス関連因子 (Arh、Cltc) の発現・局在を遺伝子並びに蛋白質レベルで解析し、

本種の卵黄形成過程におけるこれら因子の関与について考察した。また、Vtgr のシャペロン候補である Rap について予備的な機能解析を行った。

まず、本種卵巢より完全長の *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。卵母細胞の発達に伴って徐々にその陽性シグナルは減少し、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) 法により卵巢における *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。さらに異なる組織間で *vtgr* の発現量を比較した結果、前卵黄形成期の卵巢が最も高い値を示した。次に、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 の卵巢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。Vtgr は Vtg の取り込みがまだ起こらない油球期で既に卵母細胞の周縁部に局在し、卵黄形成期での Vtg の活発な取り込みに備えていると考えられた。

本種卵巢より 2 種類の完全長 *arh* cDNA (*arhI*、*arhII*) をクローニングした。2 種 *arh* 共通のプローブを用いた ISH 法による解析の結果、*arh* は周辺仁期の卵母細胞質中に強い発現を示し、卵成長に伴って *vtgr* の時と同様な局在変化を示した。さらに rtqRT-PCR 法を用い、卵巢における 2 種 *arh* mRNA の発現を各々定量した結果、各 *arh* は卵発達に伴い異なる発現パターンを示した。特に、*arhII* の発現は前卵黄形成期で強く、卵母細胞の発達に伴って徐々に減少し、卵黄形成期で最低値を示した。この発現パターンは、*vtgr* の発現パターンと非常に良く似ていた。また、異なる組織間で *arhII* の発現量を比較した結果、前卵黄形成期の卵巢が最も高い値を示した。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、本種卵巢より 3 種類の完全長 *cltc* cDNA (*cltc-a1*、*cltc-a2*、*cltc-b*) を得た。rtqRT-PCR 法により、卵巢における 3 種 *cltc* mRNA の発現を各々定量した結果、各 *cltc* は卵発達に伴いそれぞれ異なる発現パターンを示した。特に、*cltc-a1* は *vtgr* と *arhII* の発現パターンと同様に卵発達に関連した変化を示した。また共通 *cltc* プローブを用いた ISH 法の結果は、*vtgr* や *arhII* のそれとほぼ一致していた。次に、抗 Cltc 抗体 (a-Cltc) を作製し、これを用いた IHC 法により Cltc の卵巢における局在を調べた結果、Cltc は周辺仁期では卵母細胞質中に均一に分布し、油球期にはその局在を卵母細胞の周縁部に移した。卵黄形成期でも、Cltc は同周縁部に局在した。この局在パターンは Vtgr のパターンと非

常に良く似ていた。これらのことから、卵母細胞における Vtgr を介した Vtg エンドサイトーシスに Cltc-a1 が関与する可能性が示された。

先の研究（円子、2012；堀場、2013）において、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。本種卵巣より完全長の *rap* cDNA を得た。発現ベクターに本種 *vtgr* 及び *rap* 配列を個別に導入し、Vtgr ベクターのみ（コントロール）、あるいは両ベクターを Lenti-X 293T 細胞にトランスフェクションした後、3 日間培養した。両細胞における Vtgr 蛋白質の発現は、 α -Vtgr を用いた Western blot により確認された。一方、*rap* の発現も転写レベルで確認された。しかし、両細胞を試料として標識 Vtg を用いた ligand blot に供したところ、共に標識 Vtg と結合を示す蛋白質バンドは検出されず、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。今後、他のシャペロン因子の探索も含め、機能的な Vtgr の生成機構に関してはさらなる解析が必要である。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。