HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on mechanisms underlying the control of dual vitellogenin gene expressions in inshore hagfish (Eptatretus burgeri) [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	西宮, 攻
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11528号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57117
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Osamu_Nishimiya_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：西宮　攻

学 位 論 文 題 目

Studies on mechanisms underlying the control of dual vitellogenin gene expressions in inshore hagfish (*Eptatretus burgeri*)

（ヌタウナギにおける 2 種ビテロジェニン遺伝子の発現制御機構に関する研究）

魚類を含めた水産有用種の増養殖において、種苗生産を効率的に行うためには、高品質の卵を多量に得ることが重要である。一般に、魚類を含む卵生脊椎動物の卵は多量の卵黄を蓄積する。卵黄は、受精後の胚や稚仔魚に必須の栄養源であり、卵の品質（卵質）を決定する主要な要因の一つである。従って、魚類の卵黄形成機構を理解することは、水産有用種の種苗生産技術の開発・発展において重要な意義を持つ。

卵黄を構成する物質は、主にビテロジェニン（Vtg）と呼ばれる雌特異血清蛋白質に由来する。一般に、硬骨魚類を含む卵生脊椎動物において、Vtg の合成は肝臓でエストロジェン（一般にエストラジオール-17β ; E2）により誘導される。この E2 による Vtg 合成誘導機構については分子レベルで明らかにされており、肝細胞内における E2 とエストロジェン受容体（ER）の結合、並びにその複合体の Vtg 遺伝子プロモーター内におけるエストロジェン反応性エレメント（ERE）への結合は、Vtg 遺伝子発現誘導に必要不可欠な過程である。一方、系統進化上、最初期に分化した卵生脊椎動物である無顎類のヌタウナギ類においては、Vtg 合成機構に関する知見がほとんどない。本研究は、卵生脊椎動物における卵黄形成機構の成立と進化を理解するための一助として、無顎類のヌタウナギ（*Eptatretus burgeri*）をモデルに、Vtg 遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。

先ず、ヌタウナギ雌の肝臓より 2 種 ER（ER1 および ER2）の完全長 cDNA をクローニングした。他種 ER との分子系統樹解析において、ヌタウナギの 2 種 ER の分岐は、一般的な脊椎動物の ER サブタイプ（αとβ）のクレード分岐以前に認められた。2 種 ER mRNA 発現量を組織間で比較したところ、ER1 mRNA 発現量は雌雄共に生殖腺で最も高かったのに対し、ER2 mRNA 発現量は雄では精巣で最も高かったが、雌では組織間での有意差が見ら

れなかった。次に、レポーターアッセイ系を用いて、ヌタウナギ 2 種 ER の機能性について調べた。その結果、エストロジェン特異的なレポーター遺伝子の顕著な転写活性化が認められた。さらに、2 種 ER ともに ERαアゴニストによる顕著な転写活性化が見られたが、ERβアゴニストの効果は低かった。また、エストロン、E2、エストリオール（E3）については、両 ER 共に濃度依存的にレポーター活性を増加させることが確認されたが、E3 の効果が最も強かった。これらの結果より、ヌタウナギの 2 種 ER は共に、一般的な卵生脊椎動物 ER と同様、エストロジェン特異的なリガンド選択性、さらにはリガンド依存的な標的遺伝子の転写活性化能を有することが明らかになった。また、2 種 ER のリガンド親和性に差異が認められたものの、ともに ERαに類似していることが示唆された。

次に、様々な成熟段階のヌタウナギ雌雄ならびに性的未分化個体を用いて、肝臓中の 2 種 Vtg（Vtg1 および Vtg2）および 2 種 ER の各 mRNA 発現量と血中 E2 量の関係について解析した。その結果、両 Vtg および ER1 mRNA 発現量は雌において生殖腺体指数（GSI）と正の相関を示したが、ER2 mRNA 発現量は GSI と相関を見せなかった。また、両 Vtg および ER1 遺伝子発現量は、何れの雌雄および性的未分化個体においても血中 E2 量との相関が見られなかったのに対し、ER2 mRNA 発現量は雄および未分化個体において負の相関を示した。両 Vtg mRNA 発現量は正の相関を示し、ER1 mRNA 発現量とも正の相関を示した。しかし、血中 E2 量は性別や生殖腺の成熟度に関らず常に低値（32.6 ~ 326.8 pg/ml）であった。

そこで次に、E2 投与により Vtg や ER 遺伝子の発現を誘導できるか確かめるため、E2（10 μg/body または 100 μg/body）を封入したサイラスティックチューブをヌタウナギ（未成熟雌、雄および性的未分化個体の混合群）に 2 週間または 4 週間インプラントした。その結果、肝臓中の Vtg1 mRNA 発現量は E2 （100 μg/body）を 4 週間投与した群でのみ有意な増加が見られた。しかし、E2 未投与の成熟雌の肝臓中 Vtg1 遺伝子発現量と比較して平均値で約 1/10 と顕著に低かった。また、肝臓中の Vtg2 mRNA および両 ER mRNA 発現量は、E2 投与による有意な増加は認められなかった。

また、ヌタウナギ成熟雌および雄の肝臓片（20 mg）を E2（10^{-7} M）、成熟雌および雌血清（10%または 50%）を添加した条件で 1 日または、2 日間培養した際の両 Vtg mRNA 発現量の変化を確認した。その結果、成熟雌肝臓片では、成熟雌血清（10%）添加群でのみ、成熟雌肝臓片の 1 日目に対照群に対して Vtg2 mRNA 発現量が有意に高い値を示した。一方、雄肝臓片では E2 を 2 日間添加した群でのみイニシャル群および対照群に対して Vtg1

mRNA 発現量が有意に高い値を示した。しかし、この値は未添加の成熟雌の肝臓片の Vtg1 mRNA 発現量と比較して約 1/800 と遥かに及ばなかった。また、雌雄の肝臓片は共に他の添加群では、両 Vtg mRNA 発現量の有意な変化が認められなかった。

最後に、ヌタウナギ Vtg 遺伝子の転写制御機構を明らかにすべく、両 Vtg 遺伝子のプロモーター解析を行った。先ず、ヌタウナギのゲノム DNA より Vtg1 および Vtg2 遺伝子のプロモーター領域をクローニングした。その結果、各プロモーター領域には ERE の保存配列と完全に一致する配列は見られなかったものの、ERE 様配列や 1/2ERE 配列の存在は確認された。続いて、両 Vtg プロモーターの機能性を確認するために、レポーターアッセイ系に供した。その結果、Vtg1 および Vtg2 プロモーターは共に、ER1 または ER2 の存在下で E2 依存的にレポーター遺伝子の転写を促進した。また、この E2 による転写促進においては、2 種 ER 共に Vtg1 プロモーターの方が Vtg2 プロモーターよりも高いレポーター活性を示した。これらの結果より、ヌタウナギ 2 種 Vtg プロモーターは、他の卵生脊椎動物における Vtg プロモーターと同様に ER と E2 による転写促進を受けることが明らかになるとともに、両者の活性には差異がある可能性が示された。

以上の結果より、ヌタウナギは他の卵生脊椎動物と同様に機能的な ER や Vtg プロモーターを持つことが初めて明らかにされた。また、雌において生殖腺の成熟に伴い両 Vtg 遺伝子発現が増加することが示された。しかし、成熟雌においても血中 E2 量は低値であり、*in vivo* および *in vitro* 実験系において E2 による Vtg 遺伝子発現量の顕著な増加は認められなかった。これらのことから、ヌタウナギにおける Vtg 遺伝子発現制御機構は、一般的な卵生脊椎動物と異なり、E2 や ER を介した経路が主要ではないことが強く示され、他のホルモンや転写調節因子等が Vtg 遺伝子の発現を制御している可能性が考えられた。また一方で、雄や未分化個体の肝臓において何らかの因子が、E2 や ER を介した Vtg 遺伝子の発現制御を抑制している可能性も考慮された。本研究で得られた結果は、ヌタウナギの繁殖生理学において新知見を提供しただけでなく、魚類を含む卵生脊椎動物の Vtg 遺伝子発現機構の成立と進化において重要な知見をもたらした。