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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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：西宮　攻

審査委員	主査　教授	足立　伸次
	副査　名誉教授	原　彰彦
	副査　教授	荒井　克俊
	副査　准教授	東藤　孝
	副査　准教授	平松　尚志

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）

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、受精後の胚や仔魚に必須の栄養源であり、卵質を決定する主要な要因の一つである。

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 Vtg 合成誘導機構において、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、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。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結果、ヌタウナギの2種ERは共に、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を明らかにした。

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量を解析した。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）の増加に伴い増加したが、ER2 mRNA発現量は変化しなかった。一方、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僅かに増加した。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Vtg2 mRNA発現量が僅かに増加した。一方、雄肝臓片ではE2を2日間添加した群でのみVtg1 mRNA発現量が僅かに増加した。

最後に、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様配列や1/2ERE配列の存在が確認された。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、ヌタウナギ2種Vtgプロモーターは、ERとE2による転写促進を受けることを明らかにした。

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を初めて明らかにした。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にも関らず、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、E2やERを介した経路が主要ではなく、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、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と共に、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。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。