



Title	Studies on Mechanisms of Production and Accumulation of Dual Vitellogenins in Salmonid Species [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	莚平, 裕次
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11981号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59906
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuji_Mushirobira_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：薙 平 裕 次

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 Mechanisms of Production and Accumulation of

Dual Vitellogenins in Salmonid Species

（サケ科魚類の2型ビテロジェニン合成および蓄積機構に関する研究）

近年、世界中で水産物の需要が高まっており、その安定的な供給には増養殖事業の持続的発展が必要である。増養殖対象種の配偶子形成過程を明らかにすることは、人工種苗の生産性や質を改善するための基礎として重要である。

硬骨魚類の卵は多量の卵黄を含み、卵黄は胚や稚仔魚の栄養源となる。そのため、適切な卵黄の蓄積は良質な卵を得る上で必要不可欠である。卵黄成分は主に肝臓で合成されるビテロジェニン（Vtg）に由来し、その形成過程（卵黄形成）は以下のように進む。まず、卵巢由来のエストラジオール-17 β （E₂）が血流を介して肝臓へ運ばれる。E₂はエストロジェン受容体（Er）と複合体を形成し、*vtg* 遺伝子プロモーター領域上のエストロジェン反応性エレメント（ERE）に結合し、*vtg* が転写・翻訳される。Vtg は血中へ分泌され、卵母細胞膜に局在する Vtg 受容体を介して卵母細胞内へ取り込まれる。近年、複数の *vtg*/Vtg サブタイプの存在が明らかになり、卵質には Vtg の量だけでなく Vtg サブタイプの比率なども重要であることが示唆されている。本研究はサケ科魚類のカットスロートトラウトをモデル魚として、硬骨魚類の卵黄形成機構、特に多型 Vtg の肝臓での転写調節機構および卵母細胞での取り込み調節機構に関する基礎的知見を得る事を目的とした。

まず、カットスロートトラウトの肝臓から2種類の *vtg* サブタイプ (*vtgAs* と *vtgC*) の完全長 cDNA をクローニングした。*vtgAs* と *vtgC* の cDNA はそれぞれ 1,659 と 1,281 アミノ酸残基をコードし、その一次構造は異なっていた。

肝臓における2型 *vtg* の発現および血中 E_2 量の卵成長に伴う変化を観察した結果、これらは卵黄形成期に増加し産卵期に減少した。一方、血中の *VtgAs* と *VtgC* 量も卵黄形成期に増加したが、産卵期でも高値を維持した。これらのことから、両 *vtg/Vtg* サブタイプは卵成長に伴い同調的に変化することが示された。

次に、本種2型 *vtg* 遺伝子のプロモーター解析を行った。本種のゲノム DNA からプロモーター領域をクローニングした。*vtgAs* では2種類の上流配列が得られ、*vtgC* では1種類の上流配列が得られた。各プロモーター領域の ERE を探索したところ、*vtgAs* プロモーター1のみ ERE が確認され、ERE 様配列 (ERE-like) や ERE の片側配列 (1/2ERE) はすべてのプロモーターで確認された。本種の雌肝臓から α タイプ *er* (*eral*) をクローニングし、各 *vtg* プロモーターと *eral* を用いてレポーターアッセイを行った。いずれの *vtg* プロモーターも 10^{-7} M の E_2 添加群でレポーター活性が有意に増加し、特に *vtgAs* プロモーター1で最も高い活性が見られた。また、各 *vtg* プロモーターの 50%効果濃度 (EC_{50}) は各 *vtg* プロモーター間でほぼ同様 ($0.94 \sim 2.1 \times 10^{-8}$ M) であった。レポーターアッセイの結果から、*vtgAs* は *vtgC* よりも E_2 に対する高い転写活性を持つが、 E_2 に対する感受性はあまり変わらないことが示された。

本種卵巣からクローニングされている低密度リポタンパク質受容体関連蛋白 13 (Lrp13) に関して詳細な解析を行った。Lrp13 の組み換えタンパク質を家兎へ免疫し、Lrp13 に対する特異抗体 (a-Lrp13) を作製した。これを用いて本種卵巣の免疫組織化学的観察を行ったところ、免疫蛍光シグナルは油球期から卵黄形成期にかけて観察され、特に、卵母細胞膜内周部、卵膜、卵膜と顆粒膜細胞の間隙で観察された。

本種卵巣膜画分に対して、標識2型 *Vtg* を用いたリガンドブロットと並行し、a-Lrp13 を用いたウェスタンブロットを行った。その結果、Lrp13 (190 ~ 210 kDa) は *VtgAs* と特異的に結合することが示唆された。加えて、>250 kDa の受容体は *VtgAs* と *VtgC* の双方に結合するが、150 kDa の受容体は *VtgC* に特異的に結合することが示唆された。

本研究は魚類で初めて同一魚種における多型 *vtg/Vtg* の転写および取り込み過程を詳細に解析し、サケ科魚類の卵黄形成モデルに新たな知見を加えた。

以上、本研究の成果は、卵生脊椎動物における卵黄形成機構を理解するための重要な基礎的知見を提供した。また、将来的にこれらを利用し同機構を人為的に制御することで、増養殖対象種の人工繁殖技術の改善に資すると考えられた。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。