



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on Mechanisms of Production and Accumulation of Dual Vitellogenins in Salmonid Species [an abstract of entire text]
Author(s)	莚平, 裕次
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11981号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59907
Type	doctoral thesis
File Information	Yuji_Mushirobira_summary.pdf



主論文の要約

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：薙平 裕次

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。これを達成するための課題の1つに効率的かつ高品質な種苗生産技術の開発が挙げられる。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）と呼ばれる卵黄タンパク前駆物質に由来し、その形成過程（卵黄形成）は以下のように進む。まず、卵巣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は核内受容体の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、酵素的分解を経た後に卵黄を形成する。近年、複数の *vtg*/Vtg サブタイプの存在が魚類全般で明らかになり、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。しかし、多型 *vtg*/Vtg の転写や取り込みの制御機構に関する知見は限られている。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雌あるいは E₂ 投与魚の肝臓から2種類の *vtg* サブタイプ（*vtgAs* と *vtgC*）の全翻訳領域を含む 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 のアミノ酸残基をコードし、両者は 23.3%の同一性と 42.0%の

類似性を示した。系統樹解析では本種 VtgAs はサケ科魚類の VtgAs とクラスターを形成し、本種 VtgC は硬骨魚類の VtgC とクラスターを形成した。

本種 vtg/Vtg の発現性状を把握するため、肝臓における 2 型 vtg の発現および血中 E₂ 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。肝臓での両 vtg の発現は GSI と E₂ の双方と強い正の相関が見られたが、2 型 Vtg の血中量は GSI と E₂ の上昇に伴って増加した後、プラトーに達する傾向が見られた。また、肝臓 2 型 vtg 発現量の間、あるいは血中 2 型 Vtg 量の間には各々強い正の相関が確認された。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 の転写調節機構について、各 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 2 型 vtg のプロモーター領域をクローニングした。vtgAs では翻訳開始点から 1,288 bp と 1,114bp の 2 種類の上流配列が得られ、前者を vtgAs プロモーター1、後者を vtgAs プロモーター2 とした。vtgC では翻訳開始点から 1,336 bp 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 のみコンセンサス ERE が確認された。一方、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。vtgAs プロモーター1 と 2 の相同性は 56.8% であり、また各々は vtgC プロモーターと 35.5%、37.4% の相同性を示した。

本種の雌肝臓から α タイプ *er* (*era1*) をクローニングし、各 vtg プロモーターと *era1* 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 E₂ 添加群は E₂ 未添加群に比べて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 プロモーターの最低効果濃度 (LOEC) はいずれも 10⁻⁸ M となり、50% 効果濃度 (EC₅₀) も各 vtg プロモーター間でほぼ同様 (0.94 ~ 2.1 × 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 E₂ に対する高い転写活性を持つが、E₂ に対する感受性は vtgAs と vtgC であまり変わらないことが示された。

新規のリポタンパク質受容体として本種卵巣からクローニングされている Lr13+1 に関して詳細な解析を行った。系統樹解析により、本種 Lr13+1 は最近 Vtg 受容体の一つとして同定された低密度リポタンパク質受容体関連蛋白 13 (Lrp13) と同一のクラスターを形成した。このことから、本種 Lr13+1 を Lrp13 と名付けた。

Lrp13 のリガンド結合領域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の卵母細胞膜周辺に観察され、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 や血漿リポタンパクをリガンドに用いたりガン
ドブロットと並行し、a-Lrp13 や LR8 型 Vtg 受容体に対する抗体 (a-Vtgr) を用いたウェス
タンブロットを行った。標識 VtgAs を用いたりガンドブロットでは、95 ~ 110 kDa, 190 ~ 210
kD および >250 kDa にバンドが観察された。ウェスタンブロットでは、a-Vtgr は 95 ~ 110 kDa、
a-Lrp13 は 190 ~ 210 kDa の位置に陽性反応が見られた。一方、標識 VtgC を用いたりガン
ドブロットでは 150 kDa と >250 kDa にバンドが観察された。以上の結果から、LR8 型 Vtgr
と Lrp13 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。すなわち、1) 2 型 *vtg* の
転写は、血中 E₂ 量の増加に伴い同調的に促進されること、2) *vtgAs* が *vtgC* よりも多量に
転写される一因として、前者の高いプロモーターの転写活性が挙げられること、3) 血中
へ分泌された 2 型 Vtg は Vtgr や Lrp13 を含む少なくとも 4 種類の受容体による選択的取り
込みによって蓄積されることを明らかにし、これらを加えた新たな卵黄形成モデルを提唱
した。

以上、本研究の成果は、多様な繁殖様式を持つ卵生脊椎動物における卵黄形成機構の共
通性や違いを理解するための重要な基礎的知見を提供し、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る。