



Title	チョウザメの多型ピテロジェニンに関する分子生物学的および免疫生化学的研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	前林, 衛
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第12215号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61633
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mamoru_Maebayashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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：前林 衛

学 位 論 文 題 目

チョウザメの多型ビテロジェニンに関する分子生物学的および免疫生化学的研究

(Molecular Biological and Immunobiochemical Studies of Multiple Vitellogenins in Sturgeons)

チョウザメ類はその卵がキャビアとして広く知られることから商業的価値が高い。商業的な重要課題として飼育方式の効率化などによる生産コストの低減が挙げられる。チョウザメ類は成熟まで多くの年数を要することから、早期の雌雄判別手法の確立が望まれるとともに、再生産技術の基盤となる性成熟度判定手法の開発も重要なテーマである。

ビテロジェニン (Vtg) は雌雄判別や性成熟度判定に利用できるバイオマーカーとして知られる。Vtgはエストラジオール- 17β (E_2) の作用により肝臓で合成され、血流を介して卵巣に運ばれ、卵母細胞内に取り込まれた後、卵黄蛋白質の主成分であるリポビテリン (Lv)、フォスビチン (Pv)、 β' -コンポーネント (β' -c) およびC-ターミナルコンポーネント (C-t) へ分子解裂され卵黄を構築する。

近年、遺伝子レベルおよび蛋白質レベルで *vtg*/Vtg の多型性が明らかになっており、これに基づく新たな卵黄形成のメカニズムとその系統進化に伴う変遷が解明されつつある。チョウザメ類において *vtg*/Vtg の多型性に関する基礎的知見を集積することは、チョウザメ類の繁殖生理機構、特に卵黄形成機構を理解する一助となるとともに、卵生動物における同機構の進化的変遷を理解する上で重要である。一方、多型Vtgの精製法の確立や特異抗体の作製は、雌雄判別や性成熟度判定の技術開発基盤としても重要である。

以上の背景に基づき、本研究では、チョウザメ類において特に未解明な *vtg*/Vtg の多型性に着目し、同魚類の *vtg*/Vtg の性状や構造に関する基礎的な知見を得ることを目的に実験を行った。初めにアムールチョウザメを用いて複数の *vtg* 遺伝子転写産物の探索と一次構造解析を試みると共に、各 *vtg* 発現の E_2 への応答性について解析した。次に、ベステルを用いてVtgやLvの精製法の確立とVtgサブタイプ特異抗血清の作製を試み、同精製品と抗血清の性状を解析した。

通常法としてRT-PCR法を介したVtgのcDNAクローニングを試みた結果、演繹ア

ミノ酸1,769残基をコードする全翻訳領域を含む全長5,307 bp のコンティグ配列を得て、これを*vtg1/Vtg1*とした（推定分子量：195,658）。

次に、*vtg1/Vtg1*クローニングの過程で、これと異なる配列のクローンを得、新規*vtg*転写産物（*vtg2*）の断片と考えた。この配列を基にRT-PCRとRACE法を組み合わせ、演繹アミノ酸1,749残基をコードする全翻訳領域を含む全長 5,247 bp のコンティグ配列を得て、これを*vtg2/Vtg2*とした（推定分子量：193,068）。

一方、次世代シーケンサー（NGS）解析を活用し、新規*vtg*遺伝子転写産物の探索を試みた。NGS解析 由来のESTデータベースからVtg 様コンティグを探索した結果、新規 *vtg* 候補の断片配列情報を得た。この配列情報を基に RT-PCR と RACE 法を組み合わせ、最終的に 5,319 bp、1,773個の演繹アミノ酸残基をコードする翻訳領域全体を含むコンティグ配列が得られ、これを*vtg3/Vtg3*とした（推定分子量：195,127）。

得られたVtg1、Vtg2およびVtg3の演繹アミノ酸配列は、いずれもN末端側から15個の推定シグナルペプチドに続き、Lv重鎖（LvH）、Pv、Lv軽鎖（LvL）、および β' -c /C-tの全ての卵黄蛋白質領域を含む完全型Vtgのドメイン構造を呈した。これら3型Vtg と他魚種Vtgの演繹アミノ酸配列について近隣接合法による分子系統樹解析を行った結果、Vtg1はシベリアチョウザメVtgと同一のクレードを形成し、シロチョウザメVtgと隣接した。一方、Vtg2とVtg3は、これとは異なるクレードを形成し、スポットテッドガーと隣接していた。系統樹解析と併せ、Finn and Kristoffersen（2007）の分類法を適用し、今回クローニングされたアムールチョウザメの*vtgs/Vtgs*、即ち*vtg1/Vtg1*、*vtg2/Vtg2*および*vtg3/Vtg3*を、それぞれ*vtgAB1/VtgAB1*、*vtgAB2a/VtgAB2a*および*vtgAB2b/VtgAB2b*と命名した。

E2処理したアムールチョウザメの肝臓における3型*vtg* mRNA発現変化をリアルタイム定量PCRにより定量した。E₂はkg体重あたり低濃度10 μ g（3尾）および高濃度1000 μ g（3尾）投与し、溶媒のみを投与したものをコントロール（2尾）とした。E₂投与前（0日目）、投与1日、3日および7日後に麻酔し、バイオブシーにより肝臓小片を採取し測定試料とした。E2投与1日以降の発現変動を観察した結果、全ての*vtg*サブタイプにおいて、10 μ g/kg区は投与後1日目、1,000 μ g/kg区は投与後3日目に発現平均値の最大値がみられ、その後低下する傾向がみられた。また、どの経過日数においても発現平均値はE₂濃度に依存して高かった。各*vtg*サブタイプ間の量的関係において、10 μ g/kgの低濃度暴露区では、*vtgAB2b*（*vtg3*）が他の*vtg*サブタイプと比べ検出限界以下の個体の割合が多く、また、その発現平均値の最大（1日目）もその他の*vtg*のそれ（1日目）と比べ低かった。*vtgAB1*（*vtg1*）と*vtgAB2a*（*vtg2*）は両者で同様の値と挙動を示し、平均最大値もほぼ同レベルであった。この傾向は100 μ g/kg区でも同様であった。よって、転写産物レベルにおいて本種の主要な*vtg*は*vtgAB1*と*vtgAB2a*であり、*vtgAB2b*はマイナーなタイプである

と考えられた。

ベステル卵巣および E₂ 処理したベステルの血清 (E₂S) から、様々なカラムクロマトグラフィーを組み合わせ、それぞれ単型の Lv と Vtg の精製を試みた結果、精製過程において複数分子種の Lv 様および Vtg 様蛋白質が検出された。多くの精製品の場合、それらに対して作製した抗血清は免疫化学的に複数分子種の Lv 様および Vtg 様蛋白質を検出し、Vtg サブタイプ特異抗体を作製するのに適していないことが明らかであった。一方、免疫吸着カラム由来の精製 Vtg は免疫化学的に一分子種として高度に精製され、インタクトでは 520 kDa、SDS-PAGE では 200 kDa と 105 kDa にメインバンドが観察された。また、同精製 Vtg に対する抗血清は、E₂S および 卵抽出液に対してそれぞれ移動度が同じ 1 本の沈降線を示したことから、単一 Vtg サブタイプに特異的であると考えられた。同精製 Vtg の LC-MS/MS 解析を行った結果、VtgAB2b を主要な構成成分とすることが示唆された。

VtgAB1およびVtgAB2aの断片配列をコードする組換え蛋白質 (rVtgAB1および rVtgAB2a) を作製しそれらに対する抗体を作製した。その結果、作製した抗体は各Vtgサブタイプ抗原に特異的であり、またE₂S中の異なるVtgを検出した。

以上、本研究は最新のNGS解析を含む分子生物学的解析を用い、アムールチョウザメから3型の *vtg*/VtgのcDNAクローニングに成功し、その一次構造に基づく分類を行った。また、各 *vtg* 転写産物のE₂刺激に対する発現誘導性状を把握した。これらの知見はチョウザメ類で初めて得られたものである。更にベステルよりVtgAB2bが主要成分と考えられる精製Vtgを得、更にVtgAB1およびVtgAB2a由来の組換えVtgペプチドを作製した。これらを抗原として使用することにより、各々が由来すると考えられるVtgの特異抗血清が作製され得ることを確認した。

本章で得られた知見や精製・抗体作製技術は、Vtgをマーカーとしたチョウザメ類の雌雄・性成熟度判別技術の開発基盤として極めて重要であり、将来的に同魚類の安定的な種苗生産や増養殖事業の持続的発展に資すると考えられる。また、基礎生物学的な視点では、これまで未解明であったチョウザメ類 *vtg*/Vtgの多型性とその繁殖生理における重要性を理解するための一助となると共に、卵生動物における卵黄形成機構の系統進化に伴う変遷を理解する上で重要な知見を提供した。