



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/61633">https://hdl.handle.net/2115/61633</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Mamoru_Maebayashi_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：前 林 衛

|      |    |      |         |
|------|----|------|---------|
| 審査委員 | 主査 | 教授   | 足 立 伸 次 |
|      | 副査 | 教授   | 荒 井 克 俊 |
|      | 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

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が、成熟まで年数を要するため、増養殖技術の効率化によるコスト削減が望まれる。その解決策の一つとして、早期雌雄判別手法や再生産技術の基盤となる性成熟度判定手法の開発は重要な課題である。

ビテロジェニン (Vtg) は雌雄判別や性成熟度判定のバイオマーカーとして知られるが、チョウザメ類のvtg/Vtgに関する知見は少ない。近年、他魚種では、遺伝子および蛋白質レベルでvtg/Vtgの多型性が明らかになっている。チョウザメ類のvtg/Vtgの多型性に関する基礎的知見を集積することは卵黄形成機構を理解する一助となる。一方、多型Vtgの精製や特異抗体の作製は、雌雄判別や性成熟度判定の技術基盤としても重要である。本研究では、チョウザメ類において未解明な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知見を得ることを目的に実験を行った。

アムールチョウザメを用いた複数vtg転写産物の探索では、通常法としてRT-PCR法を介したvtgのcDNAクローニングを行った。その結果、5,307 bp、1,769個の演繹アミノ酸残基および 5,247 bp、1,749個の演繹アミノ酸残基をコードする全翻訳領域を含むコンティグ配列を得て、それぞれvtg1/Vtg1（推定分子量：195,658）およびvtg2/Vtg2（推定分子量：193,068）とした。一方、次世代シーケンサー（NGS）を用い、新規vtg転写産物の探索

を試みた結果、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)。Vtg1、Vtg2およびVtg3の演繹アミノ酸配列は、全ての卵黄蛋白質領域を含む完全型Vtgで、演繹アミノ酸による分子系統樹解析の結果、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、異なるクレードを形成し、スポットドガーVtgと隣接した。系統樹解析と併せ、Finn & Kristoffersen (2007) の分類法を適用し、*vtg/Vtg1*、*vtg/Vtg2*および*vtg/Vtg3*を、それぞれ*vtg/VtgAB1*、*vtg/VtgAB2a*および*vtg/VtgAB2b*と命名した。

E<sub>2</sub>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。E<sub>2</sub>を、10μg/kg (3尾) および1000μg/kg (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。E<sub>2</sub>投与前 (0日)、投与1日、3日および7日後に麻酔し、バイオプシーにより肝臓小片を採取した。10μg/kg区は投与1日後、1,000 μg/kg区は投与3日後に発現平均値の最大値がみられ、その後低下した。また、発現量はいずれもE<sub>2</sub>濃度に依存して高く、各*vtg*サブタイプの量的関係は、*vtgAB2a* ≥ *vtgAB1* > *vtgAB2b* となり、*vtgAB2b*はマイナーなサブタイプと考えられた。

ベステル卵巣およびE<sub>2</sub>処理血清 (E<sub>2</sub>S) から、様々な手法を用いLvとVtgの精製を試みた。その中でも、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、E<sub>2</sub>Sおよび卵巣抽出液に対してそれぞれ1本の沈降線を示し、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は、LC-MS/MS解析の結果、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結果、抗体は各Vtgサブタイプ抗原に特異的であり、またE<sub>2</sub>S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* 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E<sub>2</sub>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。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。

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。