



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on molecular mechanisms underlying regulation of hepatic estrogen-responsive genes in cutthroat trout, <i>Oncorhynchus clarki</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	永田, 淳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13535号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74256
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_Nagata_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：永 田 淳

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	東 藤 孝
	副査 准教授	平 松 尚 志
	副査 名誉教授	原 彰 彦

学 位 論 文 題 目

Studies on molecular mechanisms underlying regulation of hepatic estrogen-responsive genes

in cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*

（カットスロートトラウト肝臓におけるエストロジェン応答性遺伝子の発現調節機構
に関する研究）

一般に硬骨魚類の卵は、厚く固い卵膜に覆われており、また内部には多量の卵黄を有している。サケ科魚類を含む多くの魚類では、卵膜成分は主に肝臓で合成される卵膜蛋白前駆物質、コリオジェニン（Chg）に由来する。また、魚類を始めとする全ての卵生脊椎動物において、卵黄成分は肝臓で合成される卵黄蛋白前駆物質、ビテロジェニン（Vtg）に由来する。これら Chg と Vtg の産生は、肝細胞核中でエストロジェン（一般にエストラジオール-17 β : E2）がエストロジェン受容体（Er）と結合し、標的遺伝子のプロモーター領域に作用することで誘導される。サケ科魚類では、Chg に 3 種（H α 、H β 、L）、Vtg に 2 種（As、C）、Er に 4 種（ α 1、 α 2、 β 1、 β 2）のサブタイプ分子が存在することが知られており、肝臓において 3 種 *chg* 遺伝子と 2 種 *vtg* 遺伝子に加えて *eral* 遺伝子の発現が E2 により誘導されることが示されている。しかし、どのような機構で E2 がこれら多数の遺伝子の発現制御を行っているのかは不明である。そこで本研究では、サケ科魚類のカットスロートトラウト（*Oncorhynchus clarki*）を研究モデルに用いて、肝臓における 3 種 *chg* と 2 種 *vtg*、*eral* 遺伝子の E2 による発現制御機構を明らかにすることを目的に実験を行った。

先ず、雌の生殖周期に伴う肝臓中の各 mRNA 発現量の変化を調べた。肝臓中の 3 種 *chg*

と *eral* の各 mRNA 量をリアルタイム定量 PCR 法 (qPCR 法) で測定し、同一サンプルで既に解析済みの血中 E2 量ならびに肝臓中の 2 種 *vtg* mRNA 量と比較した。その結果、3 種 *chg* mRNA 量は、E2 量や 2 種 *vtg* mRNA 量と同様に卵黄形成の進行に伴い増加した。しかし、排卵直後の 2 月には、E2 量と 2 種 *vtg* mRNA 量は減少したが、3 種 *chg* mRNA 量は高値を維持した。一方、*eral* mRNA 量は、卵黄形成開始時の 8 月に増加してピークを示し、その後は漸減した。

次に、E2 生体内投与による肝臓中の各 mRNA 発現量の変化を調べた。1 歳魚に E2 を投与 (低濃度群 : 50 $\mu\text{g/kg}$ 体重、中濃度群 : 500 $\mu\text{g/kg}$ 体重、高濃度群 : 5000 $\mu\text{g/kg}$ 体重) して、投与 2 および 5 日後の肝臓における 3 種 *chg* と *eral* の各 mRNA 量を qPCR 法により測定し、同一サンプルを用いて既に解析済みの 2 種 *vtg* mRNA 量と比較した。その結果、3 種 *chg* と *eral* の mRNA 量は 2 種 *vtg* 量と同様に、いずれの日数でも E2 の投与量依存的に増加する傾向を示した。しかし、投与 2 日後から 5 日後にかけては、E2 高濃度群の 3 種 *chg* と *vtgAs* の mRNA 量は増加したが、*eral* と *vtgC* の mRNA 量は変化を示さなかった。

さらに、雄由来の初代培養肝細胞を用いて、E2 処理による各 mRNA 発現量の変化を調べた。まず、高濃度 (10^{-6} M) の E2 を添加して 24、72 時間後の培養肝細胞中の 3 種 *chg* と 2 種 *vtg*、*eral* mRNA 量を qPCR 法で測定した。培地は 24 時間毎に半量を交換した。その結果、24、72 時間後ともに全ての mRNA 量は E2 添加により有意に増加した。また、E2 添加群の mRNA 量は 24 時間から 72 時間にかけて増加、もしくはその発現量を維持した。次に、培地交換は行わずに 10^{-11} ~ 10^{-6} M の種々の E2 濃度による mRNA 量の変化を調べた。その結果、3 種 *chg* と 2 種 *vtg* mRNA 量はいずれの処理時間においても濃度依存的に増加し、高濃度処理群においては、24 時間から 72 時間にかけて増加した。各遺伝子の最低影響濃度は *chgH β* (10^{-10} M) < *chgH α* 、*chgL*、*vtgAs* (10^{-9} M) < *vtgC* (10^{-8} M) であった。一方、*eral* mRNA 量は 24 時間後に E2 濃度依存的な増加が認められたが、72 時間後には減少した。

Er による各遺伝子の発現制御機構について明らかにするため、各遺伝子プロモーターと 4 種 Er を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、いずれの Er を用いた場合でも、全てのプロモーターにおいて、 10^{-6} M の E2 処理によりレポーター活性量が増加した。しかし、各 Er サブタイプ間で各プロモーターの転写活性化の強度には相違がみられた。以上の結果から、異なる転写活性を持つ Er サブタイプが複合的に作用することにより、各遺伝子の E2 応答性に違いを生み出すことが示唆された。

本研究は、サケ科魚類の肝臓における 3 種 *chg* と 2 種 *vtg*、*eral* の E2 応答性を初めて単一魚種で詳細に解析し、これら E2 応答性遺伝子の発現制御機構に新たな知見を加えた。

以上、本研究の成果は、魚類における卵膜・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。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。