HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on molecular mechanisms underlying regulation of hepatic estrogen-responsive genes in cutthroat trout, Oncorhynchus clarki [an abstract of entire text]
Author(s)	永田, 淳
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13535号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74257
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_Nagata_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

主論文の要約

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：永田　淳

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、厚い卵膜に覆われており、また内部には多量の卵黄を蓄積する。卵膜は卵を保護し、卵黄は受精後の胚や稚仔魚の発達に必要な栄養源となる。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前駆タンパク質、コリオジェニン（Chg）に由来する。また、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前駆タンパク質、ビテロジェニン（Vtg）に由来する。これらChgとVtgの産生は、エストロジェン（一般にエストラジオール-17β：E2）によって、エストロジェン受容体（Er）を介し、以下のような機構で誘導される。先ず、E2は肝細胞内でErと結合し、複合体を形成する。このE2-ER複合体は核内に移行し、標的遺伝子プロモーター領域内のエストロジェン応答性エレメント（ERE）に結合して標的遺伝子の転写を促進する。近年、Chg、Vtg、Erには複数のサブタイプが存在することが明らかにされており、サケ科魚類ではChgに3種（ChgHα、ChgHβ、ChgL）、Vtgに2種（VtgAs、VtgC）、Erに4種（Erα1、Erα2、Erβ1、Erβ2）のサブタイプが存在する。肝臓では、4種*er*のうち、*erα1* のみが強いE2応答性の発現を示すことから、Erα1が主要なErとして機能すると考えられている。しかし、E2がこれら多数のE2応答性遺伝子の発現をどのような機構で制御し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、肝細胞における3種*chg*、2種*vtg*、*erα1*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とした。

先ず、雌の生殖周期に伴う肝臓中のE2応答性遺伝子の各mRNA発現量の変化を調べた。

肝臓中の3種*chg*および*erα1*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量は血中E2量および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、血中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、*erα1* mRNA量は、血中E2量や3種*chg*、2種*vtg*量が増加し始める8月（卵黄形成開始時）に最大値を示し、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。成熟雄および未成熟雌雄の 1 歳魚に E2 投与（低投与量：50 μg/kg 体重、中投与量：500 μg/kg 体重、高投与量：5000 μg/kg 体重）を行った。投与 2、5 日後の肝臓における、3 種 *chg* と *erα1* 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 *erα1* 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、2 日目から 5 日目にかけては、E2 高投与量群の 3 種 *chg* と *vtgAs* mRNA 量は増加したが、*erα1* と *vtgC* mRNA 量は変化を示さなかった。

さらに、雄魚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。先ず、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*、2 種 *vtg*、*erα1* 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、全ての mRNA は、24、72 時間後の双方で、E2 添加群はコントロール群に対して有意に高値を示した。また、E2 添加群では 24 時間から 72 時間にかけて各 mRNA 量は増加、もしくはその発現量を維持した。次に、10^{-11} ~ 10^{-6} M の各濃度の E2 添加群を設け、24、72 時間後の肝細胞中の各 mRNA 量を測定した。この際には、培地交換は行わなかった。その結果、3 種 *chg* と 2 種 *vtg* mRNA 量はいずれの暴露時間において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（LOEC: Lowest Observed Effect Concentration）は *chgHβ*（10^{-10} M）< *chgHα, chgL, vtgAs*（10^{-9} M）< *vtgC*（10^{-8} M）であった。一方、*erα1* mRNA 量は暴露 24 時間後には 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。

最後に、3種*chg*と2種*vtg*、*erα1*の各遺伝子のプロモーター領域について解析した。先ず、ゲノムDNAから各遺伝子のプロモーター領域をクローニングしたところ、ERE配列を含む各種転写調節因子の結合配列の種類や数は各遺伝子間で異なっていた。各遺伝子プロモーターとErα1を用いてレポーターアッセイを行ったところ、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。その活性は高いものから順に*chgHα*、*vtgAs*、*chgHβ*、*chgL*、*vtgC*、*erα1*であり、*chgHα*と*vtgAs*、*chgHβ*が溶媒コントロール群に対して有意に高値を示した。そこで、*chgHα*と*vtgAs*、*chgHβ*の各プロモーターについて、種々の濃度（10^{-11} ~ 10^{-6} M）のE2処理によるレポーター活性を測定したところ、LOECはいずれも10^{-8} M となり、50%効果濃度もプロモーター間でほぼ同様（1.82 ~ 3.98 × 10^{-8} M）であった。従って、Erα1による*chgHα*と*vtgAs*、*chgHβ*の各プロモーターの活性化において、各プロモーター間で転写活性は異なっているが、E2感受性はほぼ同じであることが示唆された。次に、3種のErサブタイプ（Erα2、Erβ1、Erβ2）と各プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、全てのErサブタイプおよびプロモーターの組み合わせにおいて、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ことから、4種のErサブタイプは*chg*、*vtg*、*erα1*に対して異なる転写促進能を持つことが示唆された。

以上、本研究はサケ科魚類の肝臓における3種*chg*、2種*vtg*、*erα1*のE2応答性をこれまでで初めて単一魚種で詳細に解析し、E2応答性遺伝子の発現制御機構モデルに新たな知見を加えた。即ち、1）3種*chg*と2種*vtg*、*erα1*は*in vivo*と*ex vivo*において異なる発現パターンを示すこと、2）4種のErサブタイプがいずれも各E2応答性遺伝子の発現制御に関わることを明らかにした。本研究の成果は、魚類の肝臓におけるE2応答性遺伝子のE2による発現制御機構の解明に向けた重要な知見を提供するとともに、将来的には水産増養殖事業の種苗生産における卵質の改善等の応用面でも貢献することが期待される。