HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	チョウザメ類における卵成熟誘起ステロイドの同定とその産生制御機構に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	長谷川, 祐也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第14759号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86101
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuya_Hasegawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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：長谷川　祐也

学 位 論 文 題 目

チョウザメ類における卵成熟誘起ステロイドの同定と その産生制御機構に関する研究

一般に、硬骨魚類の卵形成過程は卵成長期および卵成熟期にわけられる。卵成熟期では、脳下垂体から分泌される黄体形成ホルモン（LH）の刺激により卵成熟誘起ステロイド（MIS）が産生され、卵成熟および排卵が誘起される。サケ科魚類やニホンウナギなどで C21 ステロイドである 17α, 20β-ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（DHP）が MIS として同定されている。また、一部の魚種では、DHP から代謝される 17α, 20β, 21-トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（20β-S）が MIS とされている。しかし、チョウザメ類では未だ MIS は同定されていない。

チョウザメ類は、飼育下では卵成熟および排卵が起こらないため、一般的には黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）を投与することで排卵を誘導している。しかし、排卵誘導時期が適切でなければ排卵は誘導されず、種苗生産を行なう上で大きな障壁となっている。この問題を解決するためには、卵成熟機構を分子レベルで理解し、適切な分子指標を得た上で排卵誘導適期を推定する必要がある。そこで本研究では、チョウザメ類における MIS を同定し、その産生制御機構を明らかにすることを目的とした。

まず、チョウザメ類において、血中ステロイドおよび卵濾胞産生ステロイドの包括的解析を行ない、卵成熟期に最も多量に産生されるステロイドを探索した。その結果、未同定ステロイドを含めた C21 ステロイドの中で、DHP が卵成熟中に最も高い血中量を示した。次に、*in vitro* における卵濾胞産生ステロイドを包括的に調べた結果、卵成熟中の卵濾胞における DHP 産生量は、他 C21 ステロイドと比べて顕著に高値を示した。また、卵成熟後

には、DHP の産生量が減少し、20β-S の産生量が増加したことから、DHP は卵成熟後に 20β-S へと代謝されることが示唆された。次に、卵成熟期に産生される C21 ステロイドの卵成熟誘起活性を測定した結果、DHP の卵成熟誘起活性は、DHP の前駆体である 17α-ヒドロキシプロゲステロン（17OHP）、17OHP から合成される 17α, 20α-ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（α-DHP）および 20β-S と同等であったものの、これらのステロイドより高い卵成熟誘起活性を示すステロイドはみられなかった。高い卵成熟誘起活性を示したこれらステロイドの中で、17OHP および α-DHP は卵成熟期における産生量は低く、また、20β-S は DHP の代謝物であると考えられた。従って、高い卵成熟誘起活性を有し、卵成熟中に最も多く産生されるステロイドは DHP であると結論されたことから、チョウザメ類の MIS は DHP であると同定した。

DHP はプレグネノロン（P5）、プロゲステロン（P4）、17α-ヒドロキシプレグネノロン（17OHP5）および 17OHP を介し、3β-水酸基脱水素酵素/Δ5-4-異性化酵素（3β-HSD）、17α-水酸化酵素および 20β-水酸基脱水素酵素（20β-HSD）の働きにより合成される。ナイルティラピアおよびメダカでは、P450c17-I（*cyp17a1*）が 17α-水酸化酵素および C17-20 側鎖切断酵素を、P450c17-II（*cyp17a2*）が 17α-水酸化酵素をコードすることが示されている。また、卵成熟期に *cyp17a1* の発現が抑制されることでステロイド転換経路が切り替わり、代わりに *cyp17a2* の発現が促進されて 17OHP 産生が誘導されると考えられている。近年、サクラマスにおいて、*hsd17b12L* が 17OHP を DHP に転換する強力な 20β-HSD 活性を有し、その mRNA 量は卵成熟期に急増することが示された。チョウザメ類の MIS が DHP である場合、これらステロイド合成酵素関連遺伝子が存在し、卵成熟期に発現変動すると予想された。そこで、チョウザメ類における DHP 産生制御機構を明らかにする目的で、3β-HSD をコードする *hsd3b*、*cyp17a1/2* および *hsd17b12L* の酵素活性および発現動態を調べた。

アムールチョウザメ hsd3b は P5 および 17OHP5 をそれぞれ P4 および 17OHP に転換する 3β-HSD 活性を示した。続いて、アムールチョウザメ cyp17a1 は P5 および P4 をそれぞれ 17OHP5、デヒドロエピアンドロステロン、および 17OHP、アンドロステンジオンに転換する 17α-水酸化酵素活性および C17-20 側鎖切断酵素活性を示した。一方、アムールチョ

ウザメ cyp17a2 は P5 および P4 をそれぞれ 17OHP5 および 17OHP に転換する 17α-水酸化酵素活性のみを示した。さらに、アムールチョウザメ hsd17b12L は、17OHP を DHP に転換する強力な 20β-HSD 活性を示した。アムールチョウザメにおいて、DHP 産生を担う酵素をコードする遺伝子は、チョウザメ類より上位に位置するサクラマスやナイルティラピアと共通していたことから、条鰭類を通して DHP 産生を担うステロイド合成酵素をコードする遺伝子は一貫していることが示された。次に、*in vivo* および *in vitro* における発現動態を解析した結果、卵成熟期に LH の刺激によりアムールチョウザメ *hsd3b* mRNA 量が急増した。硬骨魚類では、卵成熟期に *hsd3b* の発現が誘導されるかどうか詳細に調べられておらず、卵成熟期に *hsd3b* mRNA 量が急増する例をアムールチョウザメで初めて見い出した。その後、 *cyp17a1* mRNA 発現の抑制および *cyp17a2* mRNA 発現の促進が生じ、P4 から 17OHP が産生されることが示唆された。17OHP が産生された後、*hsd17b12L* mRNA 発現が LH 刺激により誘導され、DHP が産生されると思われた。しかし、アムールチョウザメ *hsd17b12L* mRNA の LH 刺激による発現誘導はサクラマスと異なり強くないことが示唆された。また、アムールチョウザメ *cyp17a1* mRNA 発現にメダカでみられるような急激な抑制はみられなかった。従って、3β-HSD による P4 の産生調節がアムールチョウザメの DHP 産生に重要であることが示唆された。さらに、未排卵個体では *cyp17a1* mRNA 発現は抑制されず、また、排卵個体における *hsd17b12L* mRNA 量は未排卵個体と比べて有意に高値を示したことから、*cyp17a1*mRNA 発現の抑制および *hsd17b12L* の発現誘導が卵成熟および排卵の誘導に極めて重要であることが示された。

最後に、チョウザメ類において、*hsd3b*、*cyp17a1/2* および *hsd17b12L* の転写が LH 刺激によって直接制御されるのかどうか明らかにするため、プロモーターアッセイにより転写調節機構を調べた。その結果、アムールチョウザメ *hsd3b* および *cyp17a2* は LH 刺激により直接的に cAMP 応答配列を介した転写が開始されることが明らかになった。また、その転写は、ad4bp/sf-1 により活性化されることが示された。一方、アムールチョウザメ *cyp17a1* およびコチョウザメ *hsd17b12L* の転写は、LH 刺激により直接的に開始されず、ad4bp/sf-1 によってもその転写は活性化されなかった。卵濾胞におけるアムールチョウザメ

hsd17b12L の mRNA 発現は、LH 刺激により誘導されたことから、*hsd17b12L* の転写は LH シグナルから未知の転写因子を介して誘導されることが示唆された。

以上より、MIS 候補として挙げられたいくつかのステロイドの中で卵成熟中に最も産生されるステロイドは DHP であり、他ステロイドは卵成熟開始直後に産生される中間代謝物または、卵成熟後に産生量が増加する代謝物であることが示唆された。さらに、DHP と同等の卵成熟誘起活性を示すステロイドはあったものの、未同定ステロイドを含めた C21 ステロイドの中で DHP より高い卵成熟誘起活性を示すステロイドはみられなかった。従って、本研究では、活性画分とバイオアッセイによる MIS 同定には至らなかったものの、その産生量からチョウザメ類の MIS は DHP であると同定した。また、LH 刺激により、卵成熟期に *hsd3b*、*cyp17a2* および *hsd17b12L* の mRNA 発現が促進、*cyp17a1* の mRNA 発現が抑制されることで DHP が産生されることが示唆された。DHP 産生を担うステロイド合成酵素が LH 刺激により発現変動することが明らかとなったことで、チョウザメ類の MIS は DHP であることがさらに裏付けられた。本研究成果により、不明瞭な点が多かったチョウザメ類の卵成熟機構解明が大きく進展した。本研究で得られた知見は、条鰭類における MIS 産生制御機構の普遍性および多様性の理解を推し進めるものである。また、これらの知見は、排卵誘導適期の推定など種苗生産技術の確立に貢献できると期待される。