



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on immunochemical and molecular biological characterization of novel urinary proteins of Sebastes rockfish and its application to aquaculture [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	山口, 燿
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第15711号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92476
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yo_Yamaguchi_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： 山口 燿

学 位 論 文 題 目

Studies on immunochemical and molecular biological characterization of novel urinary proteins of *Sebastes* rockfish and its application to aquaculture

(メバル属魚類における新規雄尿タンパク質の免疫化学的及び分子生物学的性状解析並びにその水産増養殖への応用に関する研究)

魚類増養殖における種苗生産や育種の効率化には、対象種の繁殖生理機構の理解が必要不可欠である。胎生メバル (*Sebastes*) 属魚類 (以下、メバル類) は、北太平洋沿岸域における重要な水産資源であり、各国で種苗の放流や養殖が取り組まれている。本邦のメバル類では、近年、人工授精技術を基盤とした養殖技術開発が進められているが、成熟雄を選定する際の不確実性が種苗生産の効率化を阻んでおり、解決すべき課題となっている。即ち、現行の人工授精手順では、外部形態に基づいて成熟雄を選び、精巢を摘出する。しかし、この手法では成熟雄を正確に選ぶことは難しく、雌や未成熟雄の誤同定に伴う親魚の無駄な殺処分に至っており、より正確な雄成熟度の判定技術が求められる。近年、クロソイ (*S. schlegelii*) をはじめとするメバル類の雄が、交尾期に、未知タンパク質を含む多量の尿を膀胱に貯留することが明らかになった。メバル類は、求愛行動中に雄が雌に対して放尿様行動を示すことから、雄尿タンパク質は繁殖に関わる機能物質と推察される。一方、同タンパク質は雄成熟度を反映する生体指標となる可能性もある。本研究はメバル類雄尿中の約 15-20 kDa のタンパク質 (以下、HMWups) に焦点を当て、その分子種の同定、発現パターンおよび産生機構の検証と、同タンパク質を用いた雄成熟度の判定法を開発することを目的とした。

第2章では、HMWups の分子種を同定し、その発現パターンを解析した。クロソイ雄全尿および陰イオン交換カラムを用いて部分精製した HMWups を、質量分析計を用いたタンパク質同定分析に供し、4 種の候補タンパク質を得た。クロソイ公開 RNA-seq データを用

いて遺伝子構造と転写産物の組織発現分布を *in silico* 解析した結果、候補タンパク質の遺伝子は 6 つのエキソンから構成されるものと推定され、その転写産物は精巣と雄腎臓で高発現を示した。候補タンパク質の cDNA クローニングの結果、リポカリン型プロスタグランジン D₂ 合成酵素ホモログ (LPGDSh) の cDNA 配列が得られた。非交尾期と交尾期のクロソイ雌雄における各種組織での LPGDSh mRNA 発現量をリアルタイム定量 PCR (qRT-PCR) で測定した結果、交尾期雄の精巣・体腎・頭腎で高い発現が認められた。大腸菌発現系を用いてクロソイ LPGDSh の組換えタンパク質 (rLPGDShp) を作製した。これを家兎に免疫し、抗体 (a-LPGDShp) を得た。同抗体を用いた Western blot 解析において、HMWups は免疫陽性反応を呈し、質量分析での同定結果が免疫化学的に支持された。交尾期クロソイ雄の精巣と体腎を、a-LPGDShp を用いた免疫組織化学染色 (IHC) に供した結果、精巣ではセルトリ細胞と精小嚢内腔が、体腎では尿細管が免疫陽性反応を呈した。以上、メバル類 HMWups の分子種および主要産生器官が初めて同定された。

第 3 章では、アンドロゲンに着目して、体腎における LPGDSh の産生機構を検証した。まず、クロソイ 1 歳魚雌雄へのメチルテストステロン (MT) 投与試験を実施した。投与群には MT を 1 mg/kg 魚体重で投与し、対照群には溶媒を投与した。投与前と投与後 3 時点で体腎を採取して LPGDSh mRNA 発現量を qRT-PCR で測定したほか、一部個体の体腎を a-LPGDShp を用いた IHC 解析に供した。その結果、MT 投与 168 時間後の投与群は対照群と比べて有意に高い LPGDSh mRNA 発現を示すとともに、尿細管に顕著な a-LPGDShp の免疫陽性反応を呈した。交尾期成熟クロソイ雄の体腎を試料とした *in situ* hybridization (ISH) 解析により、アンドロゲン受容体 2 種 (*ara* と *arβ*) mRNA の局在を調べた結果、双方とも尿細管での発現が認められた。HEK293 細胞と、アンドロゲン応答配列 (ARE) を内包したレポーターベクター (pGL4.23-[4xARE]) を用いたレポーターアッセイにおいて、クロソイ Ara と Arβ はアンドロゲン依存的に転写活性を示した。LPGDSh 遺伝子の 5' 側上流ゲノム領域 (-3412/-1) を単離し、ARE 様モチーフを *in silico* 検索した結果、22 のモチーフが検索された。単離した 5' 側上流ゲノム領域をレポーターベクターにクローニングし、クロソイ Ar 存在下における同領域のアンドロゲン応答性をレポーターアッセイによって検証した結果、同領域は 11-ケトテストステロンによる生理学的濃度範囲内での濃度依存的な転写活性化が示された。さらに、この 5' 側上流ゲノム領域の長さを変えたレポーターベクター 3 種 (-1110/-1; -2100/-1; -3412/-1) を作製し、同様にレポーターアッセイを実施し

たところ、-2100~-1110 bp の領域がアンドロゲン応答性の有無に寄与する領域であることが示唆された。以上、クロソイ体腎における LPGDSh 産生は Ar を介したアンドロゲンの作用によって転写レベルで上方制御されることが示された。

第 4 章では、メバル類血清中より LPGDSh と抗原性を共通するタンパク質 (以下、リポカリン様タンパク質) を見出し、同タンパク質と雄成熟度の関連を検証した。まず、a-LPGDShp IgG を固相抗体および一次抗体として用いたジゴキシゲニン標識サンドイッチ酵素免疫測定法 (ELISA) を確立した。スタンダード (rLPGDShp) と、クロソイおよびエゾメバル (*S. taczanowskii*) 雄血清の段階希釈系列は良好な平行性を示した。アッセイ内・アッセイ間変動テストと添加回収試験の結果、定量値の再現性と真度が高い、rLPGDShp 等量 0.391~12.5 ng/mL を測定範囲とする ELISA が確立できた。この ELISA を用いて、飼育下クロソイと野外採集および飼育下エゾメバルの血清中リポカリン様タンパク質濃度を測定した。クロソイでは、交尾期雄の血清中濃度は、非交尾期の雄および交尾期/非交尾期の雌と比べて有意に高い値を示し、雄生殖腺体指数 (GSI) と有意な正の相関 ($r = 0.74$) を示した。同様に、交尾期に野外採取したエゾメバルでは、雄は雌よりも有意に高い血清中濃度を示した。飼育下エゾメバル雌雄について血清中濃度の周年動態を観察した結果、雄では GSI と同調した動態を示し、GSI と有意な正の相関 ($r = 0.83$) を示した。成熟後期または機能的成熟期の精巣成熟段階にある雄の血清中濃度は、他の段階 (成熟早期、成熟中期、休止期) にある雄よりも有意に高い値を示した。以上、血清中リポカリン様タンパク質濃度を指標としてメバル類の雄成熟度を推定できることが示された。

本研究は、メバル類で初めて、雄尿タンパク質の主要成分の分子種並びにその発現パターンと産生機構を明らかにした。また、雄成熟度の推定が可能な血中指標タンパク質を発見した。本研究の成果は、メバル類の繁殖生理機構を理解するための重要な基礎的知見を提供し、メバル類の増養殖事業の効率化に貢献するものである。