



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, 耀
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_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： 山口 燿

	主査	教授	東藤	孝
審査委員	副査	教授	都木	靖彰
	副査	准教授	平松	尚志

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)

クロソイ (*Sebastes schlegelii*) 等の胎生メバル属魚類 (以下、メバル類) は、北海道沿岸の重要な水産資源として位置付けられ、道内の種苗生産施設では、資源増強や養殖事業の確立を目標とした種苗生産が取り組まれている。近年、メバル類の人工授精技術が開発され、同技術を基盤とした養殖技術開発が推進されている。現行の人工授精では、まず、泌尿生殖突起の外部形態等に基づいて、成熟精巣を持つ雄を目視で選定し、精巣を摘出する。精巣の摘出は致命的な開腹処置によってなされるため、親魚集団から成熟精巣を持つ雄を正確に選定する必要がある。しかし、外部形態の目視に基づいた従来の選定方法は正確性に難があることから、より正確な成熟雄の代替法が求められる。一方、近年の研究から、交尾期のメバル類の雄が、膀胱内に多量の未知タンパク質を含む尿を貯留することが判明した。

メバル類の雄は、求愛行動中に雌に対する放尿様行動を示す。このことから、雄尿タンパク質は、メバル類の繁殖に関与する生理活性物質と推察される。加えて、同タンパク質を、雄成熟度を反映する生理指標として利用できる可能性も指摘される。本研究は、メバル類雄尿タンパク質のうち、特に分子量 15-20 kDa の高分子量尿タンパク質 (HMWups) に着目して解析した。

第二章では、HMWups の分子種の同定とその発現パターンの解析を行なった。まず、クロソイ雄尿を、質量分析計を用いたタンパク質同定分析に供し、互いに類似した 4 種の候

補タンパク質を得た。これら候補の 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。LPGDSh 転写産物の発現パターンを定量 PCR 法によって調べた結果、交尾期雄の精巣、体腎および頭腎で高発現が認められた。続いて、大腸菌発現系を用いてクロソイ LPGDSh 組換えタンパク質 (rLPGDShp) を作製し、これを家兎に免疫して家兎抗血清 (a-rLPGDShp) を得た。a-rLPGDShp を用いた Western blot 解析では HMWups が免疫陽性反応を呈し、HMWups が LPGDSh であることが免疫化学的に支持された。また、a-rLPGDShp を用いた免疫組織化学染色 (IHC) の結果、精巣および腎臓組織における LPGDSh の局在が明らかとなった。

第三章では、クロソイ体腎における、アンドロゲンによる LPGDSh の産生機構を検証した。まず、未成熟雌雄を用いて、メチルテストステロン (MT) の投与による LPGDSh 発現誘導試験を実施した。その結果、体腎における LPGDSh mRNA・タンパク質の発現は MT 投与によって誘導された。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。また、HEK293 細胞を用いたレポーターアッセイによって、クロソイ Ara と Arβ の転写活性およびリガンド濃度依存性・リガンド選択性が明らかになった。LPGDSh 遺伝子の 5'側上流 ゲノム領域 (-3412/-1) を単離し、同様のレポーターアッセイに供した結果、同領域は 11-ケトテストステロン濃度依存的な転写活性化を示した。また、同領域の -2100 ~ -1110 bp の領域に LPGDSh 遺伝子のアンドロゲン応答性に寄与する領域が存在することが示唆された。

第四章では、メバル類の血清中より、a-rLPGDShp に対して免疫陽性反応を呈する新規タンパク質 (以下、リポカリン様タンパク質) を見出し、同タンパク質の雄成熟度指標としての有効性を検証した。まず、a-rLPGDShp と rLPGDShp を用いてリポカリン様タンパク質を測定する酵素免疫測定法 (ELISA) を確立した。この ELISA により、飼育下クロソイと野外採集および飼育下エゾメバル (*S. taczanowskii*) の血清中リポカリン様タンパク質濃度を測定した。その結果、両魚種において、血清中濃度は交尾期の雄で高濃度となった。また、雄の血清中濃度は、生殖腺体指数と高い正の相関を示した。飼育下エゾメバルについて、リポカリン様タンパク質濃度と生殖腺成熟度の関連を調べた結果、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、他の成熟段階にある雄よりも有意に高い値を示した。

本研究の成果は、メバル類の雄尿タンパク質に関する新たな基礎的知見を提供し、将来的には、メバル類の繁殖生理機構の解明および増養殖事業の効率化に貢献するものと期待される。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。