

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成10年度博士課程 進学

氏 名 筒井 直昭

指導教官名 会田 勝美

論文題目 クルマエビのvitellogeninに関する分子生物学的研究

卵生の脊椎動物や無脊椎動物にとって、卵黄形成は生殖の中でも重要な過程の一つである。卵黄形成期になると卵母細胞中には様々な物質が取り込まれてゆくが、このうちの大部分はvitellin (Vt)というタンパク質である。Vtは、アミノ酸や脂質、糖質、イオン等の供給源として、胚発生の際に重要な役割を果たすとされている。Vtの前駆体であるvitellogenin (Vg)の産生部位は、脊椎動物では肝臓、昆虫では主に脂肪体であり、その産生は、脊椎動物ではエストロゲン、昆虫では幼若ホルモンやエクジソン等によって制御されることが知られている。エビ類は世界的に重要な水産物であり、養殖も盛んに行われているものの、卵黄形成をはじめとした生殖現象を制御する機構について不明な点が数多く残されている。これはVgの性状に関する知見、さらにそれをコードする遺伝子の発現等に関する知見が甲殻類においてほとんど得られていないことによるところが大きい。

最近、著者の所属する研究室において、クルマエビの卵巣からVtが精製され、186 kDa、128 kDa、91 kDaという3種類のサブユニットが含まれることが明らかとなった。91 kDaサブユニットについては、N末端アミノ酸配列と、いくつかの内部アミノ酸配列が決定された。本研究では、これらの情報を元にVgをコードするcDNAを単離し構造解析を行うこと、その遺伝子発現を調べること、さらにその遺伝子発現を制御する物質を探索することによって、クルマエビの卵黄形成の制御機構を明らかにすることを目的とした。

1. クルマエビのVgの構造

91 kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列を元にプライマーを作成し、それらを用いてPCRを行うことで、91 kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列をコードするcDNA断片を得た。次に5'-RACE法を行い、より長いcDNA断片を得た。これをプローブとして、クルマエビの卵巣から構築したcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたcDNAの塩基配列を解析し、そこから新たなプローブを作成して同じライブラリーのスクリーニングを行うということを繰り返し行った。こうして得られた配列をオーバーラップさせることによって、VgをコードするcDNAの全塩基配列を明らかにした。このcDNAは2587残基のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。演繹アミノ酸配列中には、91 kDaサブユニットの内部アミノ酸配列が全て含まれていた。また、186 kDaと128 kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列を解析した結果、それらは同じ配列を有しており、さらにそれが演繹アミノ酸配列中に存在することも確認された。そしてその直前に、ズブチリシンというプロテアーゼによって認識されるアミノ酸配列が存在した。すなわち、クルマエビのVgは、91 kDaサブユニット—ズブチリシン認識配列—186 kDaサブユニットという順序でmRNA上にコードされているということが判明した。

血リンパ液中のVgと卵巣中のVtの動態を調べた結果、Vgには186 kDaと91 kDaのサブユニットが含まれており、Vtには186 kDa、128 kDa、91 kDaの主要なサブユニットの他に、100 kDaほどのサブユニットがいくつか含まれることが分かった。これらの結果を併せると、巨大な前駆体として合成されたVgはズブチリシン様プロテアーゼによりプロセッシングを受け、2つのサブユニットになり、血リンパ液中に放出される。そして卵母細胞内に取り込まれた後、さらなる分解を受けて、128kDaやその他のサブユニットが生じるものと考えられた。

これに加え、クルマエビの肝臓から構築したcDNAライブラリーからも、VgをコードするcDNAクローンが得られた。このクローンは5'側が欠落していたので、5'-RACE法によりその部分を補った。肝臓で発現しているVgは、卵巣で発現しているVgに対し、塩基配列のレベルで99.4%の同一率を、アミノ酸配列のレベルで99.1%の同一率を示した。肝臓と卵巣のcDNAライブラリーを構築するために用いたRNAは、それぞれ別個体より調製したものであることを考えると、この約1%の違いは個体差によるもので、同一個体の肝臓と卵巣では同じ構造を持つVgが合成されていると予想された。また、クルマエビのVgは、ごく最近明らかにされたザリガニのVgに対して約40%の同一率を、昆虫のアポリポフォリン、ヒトのアポリポタンパク質B-100、魚類のVgに対して約20%の同一率を示した。

2. クルマエビのVgをコードするmRNAの発現解析

得られたcDNAの一部をプローブとして用い、VgをコードするmRNA (Vg-mRNA) の組織特異的発現をノーザンブロット法によって調べた。その結果、Vg-mRNAは肝臓と卵巣とにおいて検出され、表皮組織を含む尾扇、皮下脂肪組織を含む腹部筋肉、そして腸管では検出されなかった。次に、成熟に伴うVg-mRNA量の変動を調べるため、日本栽培漁業協会百島事業場の自然環境下の養殖池で成熟したエビを5つの成熟段階に分類し、それぞれのmRNA量を調べた。肝臓では、前卵黄形成期(平均GSI=0.33%)に属する個体でも僅かにmRNAが発現している個体が存在し、PAS-陽性顆粒期(平均GSI=1.56%)から卵黄球期前期(平均GSI=2.47%)、そして卵黄球期後期(平均GSI=5.88%)に至るまでmRNA量が増加し続け、ほぼ卵黄蓄積の終了した卵黄球期後期(平均GSI=8.24%)ではそれまでの半分程度に減少した。卵巣においては、前卵黄形成期ではmRNAの発現が全く観察されず、PAS-陽性顆粒期から発現がみられ、卵黄球期前期に至るまで発現量が増加し、卵黄球期後期では減少して低い値を保った。肝臓と卵巣とでは、Vg-mRNAの発現プロフィールが異なっていたことから、このmRNAの発現は2つの組織で異なる制御を受けている可能性が考えられた。さらに、未熟なエビの両眼柄を切除し、人為的に成熟を誘導した場合のVg-mRNA量の変化についても調べた。11月に体重23 g前後のエビを用いて実験を行った場合には、2つの組織でVg-mRNAの発現が増加した。一方、4月に体重18 g前後のエビを用いて実験を行った場合には、卵巣のVg-mRNA量はGSIの上昇に伴い増加したものの、肝臓のVg-mRNA量はほとんど増加しなかった。このことから、眼柄切除によってVgの発現は、卵巣では必ず誘導されるものの、肝臓では必ずしも天然と同様の発現が誘導されるわけではなく、それは眼柄切除の時期や個体の体重等、諸条件により左右される可能性があると考えられた。

3. クルマエビのVg-mRNAの発現を制御する因子の探索

Vgは、主として卵黄形成期に合成されるタンパク質であることから、Vg-mRNAは成熟の分子指標になると考えられた。そこで、クルマエビの卵巣の器官培養系を構築し、これを用いてVg-mRNAの発現に影響を及ぼす物質の探索を行った。成熟した卵巣を培養系へ移し、Vg-mRNA量の推移を観察したところ、培養開始時を100として、1日後に66、2日後に24、3日後に12と減少し続けた。これに対し、グリセルアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼをコードするmRNAは、培養開始時を100として、1日後に110、2日後に117、3日後に112と、ほぼ同じ発現量を維持し続けた。よってこの系においては、卵巣は自発的にVg-mRNAを合成しないと判断された。この培養系を用い、Vg-mRNAの発現に影響を及ぼす物質の探索を行った。成熟したクルマエビから一対の腹部卵

巢を摘出し、片方はコントロールとして、もう片方には様々な物質を加えてそれぞれ培養し、培養後の両者のVg-mRNA量を比較することにより加えた物質の影響を評価した。その結果、脱皮ホルモンである20-ヒドロキシエクジソン、昆虫の幼若ホルモンに類似した構造を持つファルネセン酸メチル、クルマエビの脳の水抽出画分およびメタノール抽出画分、そしてクルマエビの胸部神経節の水抽出画分は、Vg-mRNAの発現にほとんど影響を及ぼさなかった。クルマエビのサイナス腺抽出物は、2.5匹分/mlの濃度において、Vg-mRNAの発現を約20%抑制したが、用量反応性がみられなかった。このサイナス腺に含まれるペプチドで、血糖上昇活性と、卵巣でのタンパク質合成を阻害する活性とを持つことが知られているSGP-IIIは、顕著な効果を示さなかった。その一方で、クルマエビの胸部神経節のメタノール抽出画分は、10匹分/mlの濃度でVg-mRNAの発現を約30%抑制し、0.5匹分/mlの濃度でも約15%の抑制効果を示した。

以上、本研究では、クルマエビのVgをコードするcDNAの全構造を決定することによって、甲殻類では世界で初めてVgの全一次構造を解明するとともに、Vg-mRNAの発現部位が肝臓と卵巣であることを明らかにした。また、両組織について成熟に伴うVg-mRNA量の変動を明らかにした。さらに、Vg-mRNAの発現に影響を及ぼす物質の探索を、卵巣の器官培養系を用いて行った。ここで得られた基礎的知見は、クルマエビをはじめとした甲殻類の生殖現象を分子レベルから解明する上で非常に重要であり、クルマエビの種苗生産や養殖という応用分野の発展にも寄与するものと思われる。