

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 筒井直昭

卵生の動物では卵母細胞中に大量の卵黄タンパク質（Vt）が蓄積される。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機構については不明な点が数多く残されている。これはVgの構造や産生機構等に関する知見が殆ど得られていないことによるところが大きい。そこで申請者は、VgをコードするcDNAを単離して一次構造を決定し、Vg遺伝子の発現機構を解析することによって、クルマエビの卵黄形成機構に関する基礎知見を得ることを目的として、本研究を行った。

第1章では、卵巣cDNAライブラリーよりVg-cDNAをクローニングし、Vgの一次構造を決定した。その結果、Vg-cDNAは2587残基のアミノ酸からなる285kDaタンパク質をコードしていることが判明した。演繹アミノ酸配列のN末端側から、後述の91kDaサブユニット、その直後に、プロテアーゼの一種のズブチリシンによって認識されるアミノ酸配列、さらに186kDaのサブユニットが存在した。

第2章では、肝臓cDNAライブラリーから、VgをコードするcDNAクローンを得て、その構造を明らかにした。その結果、同一個体の肝臓と卵巣では同じ構造のVgが合成されていると考えられた。

第3章では血リンパ中のVgと卵巣中のVtを構成するサブユニットについて検討した。その結果、Vgは91kDaと186kDaサブユニットの複合体であること、Vtは91kDa、128kDa、186kDaの主要サブユニットの他に、100kDa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。さらに128kDaと186kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列はVg前駆体の711番目からの配列と同一であることも判明した。これらの結果から、肝臓と卵巣で合成されたVg前駆体（285kDa）はプロテアーゼによりプロセッシングを受け、91kDaと186kDaの2つのサブユニットに切断されて血リンパ中に分泌されたのち、複合体を形成する。その後卵母細胞内に取り込まれ、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。

第4章では、得られたcDNAの一部をプローブとして、Vgをコードする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内、そして腸管では検出されなかった。次に、自然環境下の養殖池で成熟したエビを各成熟段階に分類し、成熟に伴うVg-mRNA量の変動を調べた。肝臓と卵巣とでは、共に卵黄形成の進行に伴いVg-mRNA量が増加したが、ピークに達する成熟段階が異なるこ

とから、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。その結果、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、眼柄切除の時期や個体のサイズ等、諸条件により左右される可能性があることが分かった。

第5章では、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。その結果、20-ヒドロキシエクジソン、methyl farnesoate、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、そして胸部神経節の水抽出画分は、Vg-mRNAの発現に殆ど影響を及ぼさないことが分かった。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、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を持つペプチド（SGP-III）は、顕著な効果を示さなかった。その一方、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、本研究は、クルマエビVgの全一次構造を明らかにし、Vg遺伝子の発現部位が肝臓と卵巣であること、さらに成熟に伴うVg遺伝子の発現機構の一端を明らかにしたもので学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。