

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15581

研究課題名（和文）真骨魚類における卵の浮遊性獲得機構とその進化生物的背景の解明

研究課題名（英文）Elucidation of egg buoyancy acquisition mechanism and its evolutionary biological background in teleosts

研究代表者

西宮 攻（Nishimiya, Osamu）

愛媛大学・南予水産研究センター・特定助教

研究者番号：10824138

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小型マグロ類であるスマ（*Euthynnus affinis*）において、成熟雌の肝臓中の3種卵黄タンパク前駆物質（ビテロジェニン；Vtg）における発現量を比較したところ、vtgAaおよびvtgAbの発現量がvtgCに比べて高かったが、両vtg間では顕著な差はなかった。一方で、vtgAaとvtgAbのプロモーター領域の配列を比較したところ、エストロゲン応答性配列様の数などに差異があった。両プロモーターはエストロゲンへの応答性にも違いがある可能性があり、卵巣の成長段階によって発現量に差異が生じる可能性がある。本研究では本種におけるvtg転写調節機構の解明に向けた基礎的な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の産卵様式は、一般的に系統分類学的に古いグループでは水に沈む「沈性卵」を生む一方、真骨魚では海水中で浮く卵「浮遊性卵」を生むものが登場した。これにより産卵域が広範囲に広がり、現在では多様性・資源量ともに最も繁栄する海産魚類グループが形成されたと推察される。浮遊性卵の形成機構は、2種のVtgに由来する卵黄タンパク質が卵母細胞内に取り込まれた際の蓄積比率により「軽い卵」、「重い卵」の調節がなされると考えられている。しかし、その蓄積比率の調節機構は明らかになっておらず、また系統進化上この機構を獲得するにあたっての経緯は未解明であり、本研究は学術・水産業の両面に有益な基礎的知見を提供するに至った。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to elucidate the regulatory mechanism of vtg transcription in kawakawa (*Euthynnus affinis*) and its involvement in the accumulation of vtg subtypes in oocytes.

The hepatic expression levels of three types of vitellogenins (vtgs) in mature female kawakawa were compared. The results revealed that the expression levels of vtgAa and vtgAb were higher than that of vtgC, but no significant difference was observed between the two vtgs. On the other hand, the promoter sequences of vtgAa and vtgAb differed in the number of estrogen-responsive sequences. Therefore, it is possible that both promoters exhibit distinct responsiveness to E2, which may lead to variations in expression levels depending on the stage of ovarian development. This study provides essential knowledge for understanding the regulatory mechanism of vtg transcription in this species.

研究分野：水産

キーワード：スマ 卵黄形成 浮遊性卵 ビテロジェニン 2型Vtgシステム Vtgプロモーター エストロゲン応答性配列 繁殖生理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

魚類の産卵様式は、一般的に系統分類学的に古いグループでは水に沈む「沈性卵」を生むが、真骨魚では海水中で浮く卵「浮遊性卵」を生むものが登場した。これにより産卵域が広範囲に広がり、現在では多様性・資源量ともに最も繁栄する海産魚類グループが形成されたと推察される。一方、浮遊性卵を産する魚類(マグロ、スマ、ブリなど)の種苗生産において親魚のコンディションによっては、浮遊できず沈下してしまう状態の悪い卵を多く産する場合があるが、これは卵の浮遊性獲得機構が正常に機能していない可能性がある。しかし、卵の浮遊性の獲得機構については断片的にしか分かっておらず、その全貌は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、学術・水産業の両面に有益な知見を得るべく、真骨魚類における卵の浮遊性獲得機構とその機構を獲得するにあたった系統進化上の経緯を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

卵の浮遊性獲得は、卵母細胞に取り込まれた卵黄タンパク前駆物質(ビテロジェニン; Vtg)に起因すると考えられている。Vtgは卵黄形成期の肝臓において雌性ホルモン(エストラジオール-17 β ; E2)が作用することで合成が促進される。その後分泌されたVtgは、血流を介して卵母細胞に取り込まれ蓄積される。進化が進んだ硬骨魚類は、3型のVtg(VtgAa, VtgAb, VtgC)を持つことが知られているが、そのうち主要な2種類のVtgを卵母細胞内で分解し分けることが卵の浮遊性獲得に繋がる(2型Vtgシステム; 文献1)。しかし卵母細胞内のVtgサブタイプごとの蓄積比率の調節機構の全貌は未だ解明されていない。これらの蓄積比率の調節の要因の1つは、肝臓におけるVtgサブタイプごとの合成比率の違いによるものと考え検証することとした。

3. 研究の方法

進化が進んだ硬骨魚類である小型のマグロ類のスマ(*Euthynnus affinis*)を対象に成熟雌の肝臓中のvtgサブタイプごとの発現量を比較した。当研究室のスマゲノムデータベースを利用して主要な2種vtgを検索し、この情報をもとに本種の血球より得たゲノムDNAから2種vtgプロモーター領域をクローニングし、シーケンス解析を行った。

4. 研究成果

本種の成熟雌の肝臓ではvtgAaおよびvtgAbの発現量がvtgCに比べて高かったが、両vtg間では顕著な差はなかった(図1)。

vtgAaおよびvtgAbの開始コドンよりそれぞれ3,000bp上流の塩基配列をクローニングした(図2)。vtgAaプロモーター領域にはvtgの発現に関わる転写因子の結合配列として最も重要なエストロゲン応答性の保存相補配列(ERE; GGTCAnnnTGACC)が1つ、1配列異なるERE様配列(ERE-like)が1つ、相補配列の片側のみのEREハーフサイト(1/2ERE)が2つ確認された。一方、vtgAbプロモーター領域にはEREは見られなかったものの、1~4配列異なるERE-likeが3つ、相補配列の片側のみの1/2EREが6つ確認された。また他魚種においてvtgの発現に関わるとされるCREB、GATA、USF、SP1といった転写因子の結合配列も確認できた。このように、vtgAaとvtgAbのプロモーター領域の配列を比較したところ、EREやERE様配列などvtgの発現調節に関わる転写調節因子の結合配列の数などに差異があった(図)。このことから、両プロモーターはエストロゲンへの応答性に違いがある可

能性があり、血中 E2 量や卵巣の成長段階によって発現量に差異が生じる可能性が考えられた。これまでに *vlg* プロモーター領域のサブタイプ間の転写活性の比較については、これまでに無顎類のヌタウナギを対象に行っており、両プロモーターの転写活性には差異があることを示した（西宮ら、未発表）。その後、Mushirobira et al. (2018; 文献 2) によりサケ科のカットスロートトラウトの 3 種 *vlg* プロモーターの転写活性においてもサブタイプ間の差異があることが報告されている。何れも系統進化上古い動物または魚種であるが、進化が進んだ浮遊性卵を産する魚類においても同様に *vlg* の発現パターンに差異があると考えるのが妥当である。

本研究においては、進化が進んだ硬骨魚類における卵母細胞における主要 *Vtg* サブタイプの蓄積比率と肝臓での同遺伝子サブタイプの転写調節との関連性に迫る結果までは得られなかったが、当課題の解明に向けた基礎的な知見を集積することができた。

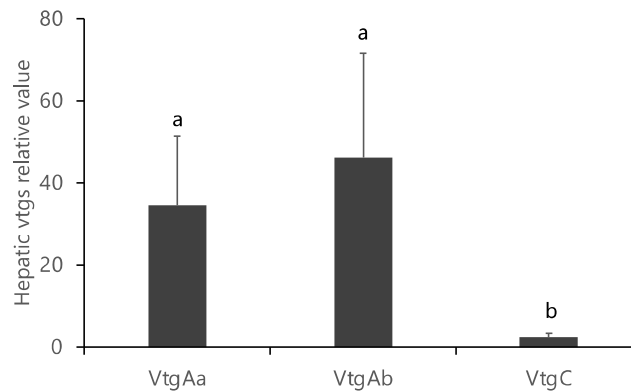


図 1. スマの成熟雌の肝臓における 3 種 *vtg* 発現量

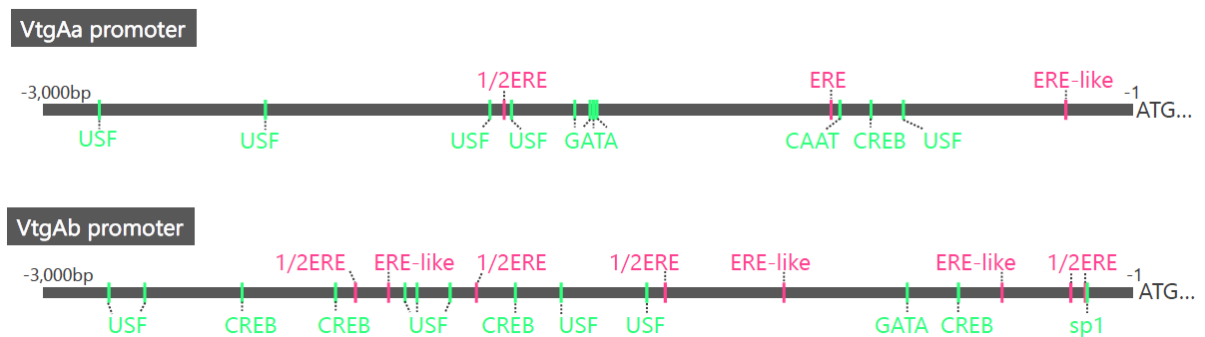


図 2. スマの 2 種 *vtg* プロモーター領域の模式図と *vtg* 遺伝子発現に関わる転写因子の結合配列の位置

< 引用文献 >

1. Mushirobira, Y., Nishimiya, O., Nagata, J., Todo, T., Hara, A., Reading, B. J., and Hiramatsu, N. (2018). Molecular cloning of vitellogenin gene promoters and in vitro and in vivo transcription profiles following estradiol-17 β administration in the cutthroat trout. *General and Comparative Endocrinology*, 267, 157-166.
2. Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C. V., and Hara, A. (1999). Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Developmental Biology*, 213(1), 18-32.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------