

氏 名	甲 高 彩 華
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	博甲第 225 号
学位授与の日付	2018 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文の題目	クルマエビの甲殻類雌性ホルモン様分子の探索および生理機能の解明
論 文 審 査 委 員	主査 神奈川大学 准教授 大 平 剛
	副査 神奈川大学 教授 小笠原 強
	副査 神奈川大学 教授 泉 進
	副査 東海大学 准教授 片 山 秀 和

【論文内容の要旨】

本論文では、クルマエビの眼柄で発現する CFSH (Maj-CFSH_ES) と、卵巢で発現する CFSH (Maj-CFSH_OV) が存在することを明らかにした。そして、Maj-CFSH_ES と Maj-CFSH_OV の生理機能を明らかにするために、の局在解析、周年変動の解析、投与実験を行った。以下、各章ごとにその要旨を記載する。

緒論

ここでは、本研究の背景を示し、特に本研究の必要性を明確に示した。

第 1 章 クルマエビ眼柄甲殻類雌性ホルモン様分子 (Maj-CFSH_ES) に関する研究

クルマエビ CFSH の探索と生理機能の解析を目的として、クルマエビの眼柄で発現する CFSH (Maj-CFSH_ES) 前駆体をコードする cDNA のクローニングを行った。そして、Maj-CFSH_ES と既知 CFSH や CFSH ホモログのアミノ酸配列を比較することで、2 種類のサブタイプ (Type I と Type II) に分類できることを明らかにした。次に、Maj-CFSH_ES の遺伝子発現を調べたところ、Maj-CFSH_ES は雌雄の眼柄で発現しており、アオガニのような雌特異的な発現は観察されなかった。この結果は、Maj-CFSH_ES が雌性ホルモンではなく、新たな生物活性を有していることを示している。次いで、*in situ* hybridization により、Maj-CFSH_ES の局在を解析したところ、Maj-CFSH_ES mRNA は終髄 X 器官 (MTGX) に存在する神経分泌細胞と、内髄 X 器官 (MIGX) に存在する神経分泌細胞で発現していた。また、抗 Maj-CFSH_ES 抗体を用いた免疫組織化学染色では、サイナス腺が特異的に染色された。これらのことから、Maj-CFSH_ES はクルマエビの新たな眼柄ホルモンであり、既知の甲殻類血糖上昇ホルモンや脱皮抑制ホルモンのようにサイナス腺から血リンパ中に放出されると考えられた。Maj-CFSH_ES には新たな生物活性を有する可能性が示唆されたため、Maj-CFSH_ES の遺伝子発現の周年変動を Real time RT-PCR で調べた。その結果、Maj-CFSH_ES は雌雄共に繁殖期の 4 月から 9 月に発現量が増加していた。この結果より、Maj-CFSH_ES がクルマエビの卵黄形成や精子形成の制御や、雌雄の繁殖行動を制御している可能性が示唆された。また、サイナス腺から天然 Maj-CFSH_ES を精製し、雌雄のクル

マエビの稚エビに投与してみた。Maj-CFSH_ES がアオガニ CFSH と同じ生物活性を持つのであれば、Maj-CFSH_ES を投与した雄の稚エビの外部形態が雌性化すると考えられたが、外部形態への影響は観察されなかった。この結果からも、Maj-CFSH_ES はクルマエビの雌性ホルモンではないと考えられた。予想外の結果として、Maj-CFSH_ES の投与は雌の成長を抑制し、雄の成長を促進した。このような結果になった理由は現段階では分からないが、少なくとも CFSH の感受性は雌雄で異なることが明らかとなった。

第2章 クルマエビ卵巢甲殻類雌性ホルモン様分子 (Maj-CFSH_OV) に関する研究

新規の CFSH 様の分子を探索することを目的として、クルマエビの卵巢で発現する CFSH (Maj-CFSH_OV) 前駆体をコードする cDNA のクローニングを行った。Maj-CFSH_OV には Type I の CFSH で保存されている 8 つのシステイン残基が存在することから Type I に属すると考えられた。しかし、Maj-CFSH_OV のアスパラギン結合型糖鎖の付加配列の位置は保存されておらず、Maj-CFSH_OV のみ N 末端に近い部分に存在した。Type I で保存されていた N 結合型糖鎖の付加配列の位置が異なっていた。このため、Maj-CFSH_OV は既知の Type I や Type II の CFSH とは異なる新規の CFSH と考えられた。Maj-CFSH_OV の遺伝子発現を調べたところ、雌の卵巢と雄の精巣で発現が観察されたが、Maj-CFSH_OV の遺伝子発現量は卵巢の方が高かった。Maj-CFSH_OV の局在を *in situ* hybridization と免疫組織化学染色で調べた結果、Maj-CFSH_OV はクルマエビの成熟した卵巢の卵原細胞と未熟な卵母細胞で発現しており、成熟した卵母細胞では発現していなかった。また、クルマエビの未成熟な卵巢ではどの細胞でも発現していなかった。Maj-CFSH_OV は成熟した卵巢でのみ発現していたことから卵成熟に関わっていると考えられた。この結果を検証するために、Maj-CFSH_OV の遺伝子発現の周年変動を Real time RT-PCR で調べてみた。その結果、Maj-CFSH_OV の遺伝子発現量は繁殖期である 4~9 月に増加し、非繁殖期には減少した。この結果からも、Maj-CFSH_OV は卵成熟に関わっていると考えられた。

総合考察

最後に、2 章までの結果を踏まえて、本研究の総括を行った。

【論文審査の結果の要旨】

本研究を開始した当初、エビ類の CFSH に関する研究は皆無であった。本研究により、クルマエビには眼柄で発現する Maj-CFSH_ES と、卵巢で発現する Maj-CFSH_OV が存在することを明らかにすることができた。これら 2 種類がエビ類で同定された初めての CFSH である。また、同一種に複数種類の CFSH が存在することを示した最初の例でもある。また、CFSH の生物活性はアオガニ CFSH でのみしか明らかにされていなかったが、本研究により CFSH は性ホルモン以外に多様な機能を有する可能性を示すことができた。これらの成果は、関連する分野における先駆的な業績として高く評価される。

以上の理由により、審査員一同は一致して本論文の学術的価値を高く評価し、博士（理学）の学位論文として十分価値があると認定した。