

## 論 文 要 旨

## 論 文 題 目

***In vitro* Studies on Hormonal Regulation of Vitellogenin  
Synthesis in Tilapia Hepatocytes****Abstract**

Vitellogenin (VTG) is a precursor form of egg yolk proteins, which appear only in the blood circulation of female fish and its synthesis in the liver is considered to be regulated by several hormones. The aim of the present study was to clarify hormonal regulation of VTG synthesis in the liver of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Simplicity of the experiment was carried out by developing a primary culture system of the hepatocytes.

Two types of VTG (VTG210 and VTG140) were purified from the blood of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)-injected male tilapia by combination of ion-exchange chromatography and gel filtration. VTG had apparent molecular masses of 370 and 220 kDa by gel filtration (Superdex 200) and 210 and 140 kDa by SDS-PAGE (7.5%), respectively. Western blot analysis showed that antibodies raised against the purified proteins reacted only with respective protein band, while antibody raised against egg homogenate reacted with both proteins. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for specifically detecting VTG210 and VTG140 was developed. Assay accuracy and validation revealed that ELISA for each VTG was specific for target VTG. The highest viability of the cultured hepatocytes and synthesis of VTG after E<sub>2</sub> treatment were confirmed, when the isolated hepatocytes were cultured in the serum-free Leibovitz-15 (L-15) medium containing 5 mM NaHCO<sub>3</sub> at 28 °C. Additional nutrition and hormones were not required for long-term maintenance of the hepatocytes *in vitro*, suggesting that nutrition requirement and culture condition are different among fish species and need to be optimized in each species.

Of the hormones tested in the present study for *in vitro* induction of VTG, E<sub>2</sub>, and androgens had stimulatory effect. Cortisol showed stimulatory and inhibitory effect according to individuals. The results suggest that these steroid hormones are related to VTG synthesis in the liver. There was a dose dependent effect of E<sub>2</sub> on VTG synthesis. Induction of VTG210 after the hormone treatment was faster than VTG140. It was considered that there is difference in the hormonal response between two VTG. Co-treatment of E<sub>2</sub> and tamoxifen, an inhibitor of estrogen, resulted in drastic decrease of VTG synthesis, suggesting that VTG

論 文 要 旨

continue

synthesis starts by binding  $E_2$  to ER. When mRNA expression of VTG, ER and vigilin (a stabilizer of VTG mRNA) in the hepatocytes were assessed after  $E_2$  treatment, peak of ER mRNA expression was followed by increases in VTG and vigilin mRNA. These results suggest that cooperative expression of these three genes in the hepatocytes after  $E_2$  action is needed to be induction and maintenance of VTG mRNA and/or molecule. Treatments of testosterone,  $17\alpha$ -methyltestosterone and  $5\alpha$ -dihydrotestosterone resulted in induction of VTG in the female hepatocytes. Co-treatment of  $E_2$  and the androgens enhanced VTG synthesis in the male hepatocytes. Tamoxifen reduced VTG synthesis by the androgens, suggesting that the androgens bind ER and, consequently, exert estrogenic action. On the other hand, treatment of chlormadinone acetate (CMA), an antiandrogen reagent, increased in production of VTG with  $E_2$  and DHT. It was possible that, like androgen action to ER,  $E_2$  binds AR and exert androgen action.

Addition of nonylphenol (NP), an estrogenic compound, into the medium induced VTG. Co-treatment of NP and tamoxifen reduced VTG synthesis. The level of VTG induction by NP was different among companies. These results suggest that NP mimics estrogen action and induces VTG and that estrogenic potential of the NP products is synergistic by admixtures. It is considered that the tilapia hepatocyte culture system is available for screening of endocrine disruptors.

The present study revealed that  $E_2$  is a strong inducer of VTG in the tilapia hepatocytes. Since several hormones such as the androgens and cortisol involve in synthesizing VTG in the hepatocytes, it is concluded that multi-hormonal regulation of vitellogenesis occurs in the liver.

氏 名 金 柄 鏡

平成14年 2月 14日

琉球大学大学院  
理工学研究科長 殿

論文審査委員

主査氏名 村井 実

副査氏名 伊佐 英信

副査氏名 中村 将

副査氏名 竹村 明洋



学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

学位（博士）の申請に対し、学位論文の審査及び最終試験を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	専攻名 海洋環境学 氏名 金柄 鎬	学籍番号	[REDACTED]
指導教官名	村井 実		
成績評価	学位論文 (合格) 不合格	最終試験 (合格) 不合格	
論文題目	In vitro Studies on Hormonal Regulation of Vitellogenin Synthesis in Tilapia Hepatocytes		
<p>審査要旨 (2000字以内)</p> <p>本論文は、肝臓において合成される卵黄タンパク質前駆物質（ビテロジェニン、VTG）合成の内分泌制御機構をテラピア (<i>Oreochromis mossambicus</i>) の肝実質初代培養系を利用して明らかにしようとしたものである。雌性ホルモン (Estradiol-17β ; E<sub>2</sub>) を投与したテラピア血漿中から、イオン交換クロマトグラフィとゲル濾過を用いて二種類のタンパク質が精製された。これらのタンパク質はゲル濾過で 370kDa と 220kDa、SDS 電気泳動で 210kDa と 140kDa の分子量を持ち、Western Blot でウサギ抗テラピア卵抽出物抗血清と特異的に反応したことから本種の VTG であることが明らかにされた。精製したタンパク質 (VTG140 と VTG210) に対して反応する特異抗体を作成後 ELISA を行った結果、VTG140 と VTG210 が特異的に検出された。コラゲナーゼを含む</p>			

## 審査要旨

緩衝液を肝門脈から灌流することにより、92%以上の生存率をもつテラピア肝実質分離細胞が得られた。様々な培養液や培養条件のうち、分離した肝実質細胞は 28°C に設定した 5 mM NaHCO<sub>3</sub> を含む血清成分無添加の Leibovitz-15 中で最も早い伸展と長い生存を示した。この培養条件での VTG 合成活性は他の培養条件よりも高かった。生体外におけるテラピア肝実質細胞の維持や VTG 合成にはインシュリンや成長ホルモン (GH) を必要とせず、この点はウナギやニジマスの肝実質細胞とは大きく異なることが示唆された。

VTG 誘導に効果があるホルモンを明らかにするために、E<sub>2</sub>、雄性ホルモン、黄体ホルモン、cortisol、GH、テラピア脳下垂体抽出物、甲状腺ホルモン、インシュリン及びメラトニンが培養液中に単独添加された。その結果、常に VTG 誘導効果を示したホルモンは E<sub>2</sub> と雄性ホルモン、また用いる肝実質細胞によって誘導もしくは阻害効果を示したのは cortisol であった。その他のホルモンは VTG 誘導に効果を示さなかった。

E<sub>2</sub> による VTG 誘導効果が調べられた結果、濃度依存的に培養液中の VTG 合成が高まった。E<sub>2</sub> 投与後では VTG210 の方が VTG140 よりも培養液中に早く検出できるようになり、さらにその合成量も多かった。この結果から E<sub>2</sub> による二種の VTG 合成に何らかの差があることが示唆された。E<sub>2</sub> とその阻害剤 (tamoxifen ; Tam) を同時に添加すると VTG 合成が阻害されたことから、VTG 合成は E<sub>2</sub> が雌性ホルモン受容体 (ER) に結合することにより開始されることが示唆された。VTG 遺伝子安定化作用があると考えられているピジリン遺伝子、ER 遺伝子及び VTG 遺伝子の雌性ホルモン添加後の肝臓における発現変化を調べた結果、ER 遺伝子が先ず増加し、その後 VTG 遺伝子とピジリン遺伝子が同時に増加した。この結果から、これらの 3 つの遺伝子の発現が VTG 合成に関与している可能性が示唆された。雌の肝実質細胞初代培養系に雄性ホルモンを添加すると VTG 量の増加が認められた。雄の肝実質細胞初代培養系に E<sub>2</sub> と雄性ホルモンを同時投与すると E<sub>2</sub> 単独投与よりも VTG 合成が高まった。雄性ホルモンによる VTG 合成活性は Tam 添加により阻害されたため、雄性ホルモンが ER に結合して VTG 合成活性を示すと考えられた。雄性ホルモン阻害剤 (Chlormadinon acetate) と E<sub>2</sub> や DHT の同時添加は VTG 合成を高めたため、雄性ホルモン受容体も VTG 合成に関与している可能性が考えられた。

雌性ホルモン活性を有する nonylphenol (NP) を培養液中に添加すると VTG 合成が誘導された。Tam と NP の同時投与は VTG 合成を減少させたことから、NP は雌性ホルモン受容体に結合することにより雌性ホルモン活性を示すことが考えられた。用いた三種類の NP では VTG 誘導に差があることも明らかにされ、テラピアの肝細胞初代培養系が内分泌かく乱物質のスクリーニングに有用であることが明らかにされた。

この論文ではテラピア肝実質細胞初代培養系が世界で初めて確立され、肝臓における VTG 合成が複数のホルモンによって制御されている可能性が示された。VTG 合成部位における複合制御機構の詳細な検討は本研究が初めてであり、魚類生殖生物学に新たな知見を加えるものである。この点は高く評価でき学位論文としてふさわしいと結論された。