原著論文紹介

ニホンウナギの濾胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモン： ショウジョウバエS2細胞による機能的な組換え体の作製と その生殖生理への作用

風 藤 行 紀 (水産総合研究セ・養殖研)

E-mail: kazeto@fra.affrc.go.jp

1. はじめに

脳下垂体糖タンパクホルモンファミリーに属する生殖腺刺激ホルモン (GTH) は、脊椎動物を通して生殖腺におけるステロイド産生や配偶子形成を制御する主要な因子である¹⁾。また一般に、GTHには濾胞刺激ホルモンと (FSH) と黄体形成ホルモン (LH) の2種が知られている。サケ科魚類においてはFSHは主に配偶子の発達にLHは成熟にそれぞれ役割を果たすことが示唆されているが^{2~4)}、その他魚類における両GTHの特異的役割に関しては殆ど不明である (図1)。ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は、飼育環境下では生殖腺が発達しないが、サケ脳下垂体 (SPE) などの外因性の生殖腺刺激因子により配偶子形成を *in vivo*⁵⁾ および *in vitro*⁶⁾ の双方で誘導することが出来る。そのため、魚類生殖腺の生殖生理学的研究における優れたモデルとして精力的に研究され、GTH^{7, 8)} を始めとする多くの生殖関連遺伝子^{9~12)} の単離が行われてきた。本研究では先ず、ショウジョウバエS2細胞の発現系¹³⁾ を用いて、ニホンウナギの組換えFSHおよびLHを大量に産生した。更に、両GTHの特異的役割を明らかにすることを目的として、様々な実験系により、その生物活性を詳細に調べた。

2. 組換えウナギGTHの大量産生

既知のウナギ糖タンパクホルモン α サブユニットおよびFSH β あるいはLH β サブユニット cDNAを組み込んだ発現ベクターを構築し、

図1 脳下垂体糖タンパクホルモンファミリーと2種類の生殖腺刺激ホルモンの予想される役割

S2細胞に導入した。次に α および β サブユニットを同時に発現していると考えられる細胞のみを選抜、得られた細胞株を大量に培養した。培養後、各種クロマトグラフィーにより、それぞれの組換えタンパクの精製を試みた。得られたサンプルをSDS-PAGE、 α および各 β サブユニットに対する特異抗体を用いたウェスタンブロットに供した結果、各サンプルは α および対応する β サブユニットを含み且つ高度に精製されていることが明らかとなった。また、その産生量はFSHおよびLHで、それぞれ約4mgおよび2.5mg/L-培養液と高値を示した。

3. 組換えウナギGTHの *in vitro*における生物活性

組換えGTHの生物活性を、その受容体 (FSH受容体:FSHR、LH受容体:LHR) を用いたレポーターアッセイにより調べた。その結果、FSHRはFSHおよび高濃度のLHに

より活性化されたのに対し、LHRはLHによってのみ活性化された。次に、未熟精巣の組織片を組換えGTHと共に18時間培養した。培養後、液中に放出された11-ケトテストステロン(精子形成誘導ステロイド)量および組織中の各種ステロイド合成酵素遺伝子の発現量を調べた。その結果、両GTHが未熟精巣においてステロイド合成酵素遺伝子の活性化を介して11-ケトテストステロンの産生量を増加させること、この作用は特にFSHで顕著なことが明らかとなった。また、同様の精巣器官培養を4週間行ない組織学的観察に供したところ、全精子形成過程が誘導され、特にFSHでは低濃度から精子形成誘導能を有することが示された。

4. 組換えウナギGTHの*in vivo*における生物活性

次に、これらGTHのウナギ生体への投与実験を行なった。未熟雌ウナギに100 μ g/ml-体重で組換えGTHを週一回、8回投与した。また、ウナギリンガーを投与する陰性対照群およびSPEを投与する陽性対照群も設けた。投与終了後、生殖腺を摘出、生殖腺体指数(GSI)を算定およびその組織学的観察を行なった。SPE投与群では、対照群に比べGSIが20倍以上の高値を示したのに対し、FSHあるいはLH投与群では有意差は認められなかった。組織学的観察では、対照群の卵母細胞が前卵黄形期なのに対し、FSH投与群で僅かな卵黄球の蓄積が認められるに留まった。

5. まとめ

本研究では*in vitro*で非常に高い生物活性を示す組換えニホンウナギFSHおよびLHの作製に成功した。また、FSHおよびLHは、その受容体の活性化、生殖腺におけるステロイド産生および配偶子形成誘導の様式がことなることから、役割を一部共有しながらも生殖生理に特異的な働きを有していることが強く示唆された。しかし、*in vitro*での高い活性にも関わらず、組換えGTHの生殖腺への

作用は*in vivo*では殆ど確認出来なかった。一般に、糖タンパク質の生体内寿命は糖鎖を構成する糖の種類や複雑さに影響される。また、ショウジョウバエ等の無脊椎動物の糖タンパクでは糖鎖が非常に単純なことが知られている。そのため、今回作製した組換えGTHは生体内で速やかに分解されている可能性が考えられた。FSHおよびLHの特異的役割の解析には両者の生体内での作用を詳細に解析することが不可欠であるが、このような研究には脊椎動物由来の細胞をホストに作製した組換え体が必要であると考えられた。

本論文は、Japanese Eel Follicle-Stimulating Hormone (Fsh) and Luteinizing Hormone (Lh): Production of Biologically Active Recombinant Fsh and Lh by Drosophila S2 Cells and Their Differential Actions on the Reproductive Biology (Kazeto Y, Kohara M, Miura T, Miura C, Yamaguchi S, Trant JM, Adachi S, Yamauchi K)と題し、Biol Reprod, (2008) 79, 938-946に公表した。

文 献

- 1) Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW, 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*, **11**, 177-199.
- 2) Suzuki K, Nagahama Y, Kawauchi H, 1988. Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol*, **71**, 452-458.
- 3) Tyler CR, Sumpter JP, Kawauchi H, Swanson P, 1991. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol*, **84**, 291-299.
- 4) Planas JV, Athos J, Goetz FW, Swanson P, 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biol Reprod*, **62**, 1262-1269.
- 5) Yamamoto K, Yamauchi K, 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of larvae in aquarium. *Nature*, **263**, 241.
- 6) Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagaha-

- ma Y, 1991 Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Dev Biol*, **146**, 258-262.
- 7) Yoshiura Y, Suetake H, Aida K, 1999. Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen Comp Endocrinol*, **114**, 121-131.
 - 8) Nagae M, Todo T, Gen K, Kato Y, Young G, Adachi S, Yamauchi K, 1996. Molecular cloning of the cDNAs encoding pituitary glycoprotein hormone α - and gonadotropin II β -subunits of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, and increase in their mRNAs during ovarian development induced by injection of chum salmon pituitary homogenate. *J Mol Endocrinol*, **16**, 171-181.
 - 9) Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aida K, Miura T, 2007. Follicle stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol Reprod*, **77**, 970-977.
 - 10) Kazeto Y, Ijiri S, Todo T, Adachi S, Yamauchi K, 2000. Molecular cloning and characterization of Japanese eel ovarian P450c17 (CYP17) cDNA. *Gen Comp Endocrinol*, **118**, 123-133.
 - 11) Kazeto Y, Ijiri S, Matsubara H, Adachi S, Yamauchi K, 2003. Molecular cloning and characterization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/D4-D5 isomerase cDNAs from Japanese eel ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**, 49-56.
 - 12) Kazeto Y, Ijiri S, Adachi S, Yamauchi K, 2006. Cloning and characterization of a cDNA encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (CYP11A1): tissue-distribution and changes in the transcript abundance in ovarian tissue of Japanese eel, *Anguilla japonica*, during artificially induced sexual development. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **99**, 121-128.
 - 13) Zmora N, Kazeto Y, Kumar RS, Schulz RW, Trant JM, 2007. Production of recombinant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) FSH and LH in S2 *Drosophila* cell line and an indication of their different actions. *J Endocrinol*, **194**, 407-416.

モザンビークティラピアにおけるソマトラクチンの単離と海水馴致、ストレス、絶食条件下における遺伝子発現動態

内 田 勝 久 (新潟大・理・臨海)
E-mail: k-uchida@cc.niigata-u.ac.jp

1. はじめに

1990年代初めにタラやヒラメの下垂体より精製されたホルモンは、そのアミノ酸配列が成長ホルモン (somatotropin, GH) とプロラクチン (prolactin, PRL) に類似していたため、ソマトラクチン (somatolactin, SL) と命名された^{1, 2)}。SLは下垂体中葉で産生され、現在までに、真骨類に加え、軟骨類や肉鰐類で同定されているが、無顎類や軟骨魚類、四足動物では未同定である³⁾。SLは、サケ科魚類のSLを除き、糖鎖を持つ糖タンパク質ホルモンであり³⁾、数種の魚類には2種のサブ

タイプ (SL α とSL β) が存在する⁴⁾。このホルモンは、生殖や成長、ストレス応答や酸-塩基調節、体色調節や脂質代謝などに寄与することが報告され^{3, 5, 6)}、その機能の多様性が示唆されている。

モザンビーク原産のティラピア (*Oreochromis mossambicus*) は、淡水と海水中で棲息が可能な広塩性魚類であり、浸透圧調節、成長・代謝、免疫系における下垂体GH/PRL分子族の機能を理解するための研究材料として汎用されてきた^{7, 8)}。この魚種においては、GHやPRLに加え、PRL受容体や2種類の