

平成21年5月1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580190

研究課題名（和文） アワビの成長促進因子の同定と成長促進機構の解明

研究課題名（英文） Research on Identification and Characterization of Growth Factor in Abalone

研究代表者

森山 俊介（MORIYAMA SHUNSUKE）

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：50222352

研究成果の概要：

本研究は、成長ホルモン遺伝子が無脊椎動物に起源する仮説およびサケ成長ホルモンがエゾアワビ稚貝の成長を促進する発見に基づいて、軟骨魚類と無顎類の成長促進に関与するホルモン受容体を同定した。また、アワビの脳神経節にサケの成長ホルモン抗体に対する免疫反応陽性細胞群を検出し、その組織から成長促進因子および遺伝子を単離するとともに成長促進因子受容体を探索した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：成長ホルモン、脳下垂体ホルモン、分子進化、アワビ、成長促進因子、受容体

1. 研究開始当初の背景

魚類を含む脊椎動物の脳下垂体から分泌される成長ホルモン（GH）は、成長を統御する内分泌系の要に位置するホルモンであり、GHの成長促進作用は、おもにインスリン様成長因子（IGF）を介して発揮される。また、脳下垂体からのGHの分泌は視床下部ホルモンにより制御される。これまでの研究により、硬骨魚類の成長促進に関与する視床下部-脳下垂体-肝臓系のホルモンと受容体が同定され、成長促進機構に関する研究は飛躍的に進展し、その基礎的知見は、水産増養殖魚の生産性を向上させる成長促進技術に応用されている。一方、軟骨魚類と無顎類では、視床下部-脳下垂体-肝臓系のホルモンは、ごく限

られた種で同定されているに過ぎず、これらホルモン受容体が未同定であるため、成長促進機構に関する知見は乏しい。

魚類の脳下垂体にはGHと構造が類似するプロラクチン（PRL）とソマトラクチン（SL）が存在し、これらのホルモンは共通の祖先遺伝子の重複によって生じ、機能が分化したホルモン、成長ホルモン分子族、と考えられている。我々は、系統進化上重要な位置にある硬骨魚類、軟骨魚類と無顎類の成長ホルモン分子族を同定し、これらホルモンの構造比較を基にして、分子進化と機能の分化を考察し、成長ホルモン分子族は約5.5億年前に遺伝子重複によって生じたと推定した。この仮説に基づいて、東北地方で極めて重要な水産資源

であり、効率よく成長を促進させる技術開発が求められているエゾアワビ, *Haliotis discus hannai*, 稚貝の成長がサケ GH により促進されることを発見した。このことはアワビがサケ GH を認識したことになり、アワビに脊椎動物の GH に類似の成長促進因子が存在することを示唆する。しかし、アワビを含め無脊椎動物における成長促進因子の生化学的、免疫組織化学的および分子生物学知見は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究は、成長ホルモン分子族の分子進化の考察から導きだした GH 遺伝子が無脊椎動物に起源する仮説およびサケ GH がアワビ稚貝の成長を促進する発見に基づいて、1. 軟骨魚類と無顎類の成長促進に関与するホルモンおよび受容体を同定し、その機能を検討した。2. 無脊椎動物における成長促進因子の存在を明らかにするために、サケ GH および抗体をプローブとして、アワビにおける成長促進因子の産生細胞を検索し、成長促進因子と成長促進因子受容体を探索した。

3. 研究の方法

(1) 軟骨魚類の成長促進に関与するホルモンと受容体の同定

軟骨魚類・板鰓類のドチザメ, *Triakis scyllium*, の成魚から採取した脳の抽出物から硬骨魚類のプロラクチン放出ペプチド (PrRP) ホモログをサケ PrRP 抗体固定化カラムで濃縮し、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製した。また、PrRP ホモログの組織分布をサケ PrRP 抗体を用いた免疫組織染色により調べた。ドチザメの脳下垂体を合成したドチザメ PrRP ホモログで培養し、GH 遺伝子の発現レベルを測定した。

ドチザメの脳下垂体の抽出物から GH をゲル濾過および HPLC で精製し、N 末端部の構造を決定した。

ドチザメの肝臓から魚類の IGF-I と IGF-II の構造比較を基に作成したプライマーを用いた PCR により、ドチザメの IGF-I と IGF-II cDNA をクローニングした。ドチザメの肝臓片を GH で培養し、IGF-I と IGF-II の発現レベルを測定した。

ドチザメの肝臓からゾウギンザメのゲノム情報から推定した GH 受容体の構造を基に作成したプライマーを用いた PCR により、ドチザメの GH 受容体 cDNA をクローニングした。

(2) 無顎類の成長促進に関与するホルモンと受容体の同定

無顎類・円口類のウミヤツメ, *Petromyzon marinus*, の成魚から採取した肝臓から硬骨魚類と軟骨魚類の IGF-I と II、また、ウミヤツメと大西洋ヌタウナギの IGF の構造比較を

基に作成したプライマーを用いた PCR によりウミヤツメ IGF cDNA をクローニングした。また、硬骨魚類および軟骨魚類の GH 受容体の構造比較を基に作成したプライマーを用いた PCR により、ウミヤツメ GH 受容体 cDNA のクローニングを行なった。

(3) アワビの成長促進因子産生細胞の検索
サケ GH がアワビ稚貝の成長促進に有効である発見に基づいて、サケ GH 抗体、PRL 抗体と SL 抗体に対する免疫陽性細胞を免疫組織染色により検索した。また、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 抗体および PrRP 抗体を用いた免疫組織染色を行なった。

(4) アワビの成長促進因子の探索

アワビ (殻長約 5 cm) から採取した脳神経節の 200 mM 酢酸アンモニウム (pH 9) 抽出物をゲル濾過および HPLC で精製した。各フラクションをサケ GH 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより免疫陽性反応を示すタンパク質を検索し、アミノ末端部の配列を解析した。

脊椎動物の GH の構造を比較し、保存性の高い領域の塩基配列を基に作成したプライマーおよび決定したサケ GH 抗体に対する免疫反応陽性タンパク質の構造を基に作成したプライマーを用いた PCR により、脳神経節から成長促進因子 cDNA をクローニングした。

アワビ脳神経節から cDNA ライブラリーを作成し、2000 クローンについて塩基配列を解析し、成長促進因子 cDNA を検索した。

(5) アワビの成長促進因子受容体の探索

サケ GH (5 μ g) をアワビ稚貝 (殻長約 1 cm) の筋肉内に注射した後、サケ GH 抗体に対する免疫陽性反応を示す組織を免疫組織染色により調べた。

サケ GH を注射した後、GH 抗体に対して免疫陽性反応を示した組織をアワビ稚貝から採取して一本鎖 cDNA を調製した。脊椎動物の GH 受容体の構造を比較し、保存性の高い領域の塩基配列を基に作成したプライマーを用いた PCR により成長促進因子受容体 cDNA のクローニングを試みた。

4. 研究成果

(1) 軟骨魚類の成長促進に関与するホルモンと受容体の同定

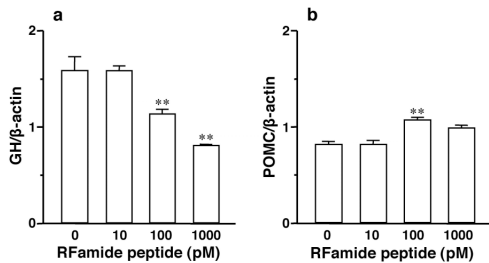
ドチザメ脳から C 末端に Arg-Phe-アミド構造 (RF-amide) を有する 20 アミノ酸残基からなる PrRP ホモログを単離した。このペプチドの構造はドチザメ PrRP ホモログ前駆体の 55 位~74 位に相当した。ドチザメ PrRP ホモログはウシ PrRP とは 8 残基、硬骨魚類とは 2 残基、また、ウミヤツメ PrRP ホモログ A と B とは 5 および 6 残基が異なっていた。PrRP

ホモログ細胞体は視床下部腹側部と視索前野に認められ、PrRP ホモログ陽性繊維は視床下部のみならず脳内に広く分布し、その一部は脳下垂体中葉にも投射されていた。

Shark RfA : STNIDPFWYVGRGVRPIGRF-NH₂
 Teleost PrRP : *PE*****-NH₂
 Lamprey RfA-A : SASNAGSD*N*E*F*****-NH₂
 Lamprey RfA-B : GREVN*L*****-NH₂
 Frog PrRP : SRSENHQIDNR*PE***Y*****-NH₂
 Chicken C-RfA : SRPFKHQIDNR*PE*****-NH₂
 Chicken PrRP : GLRERSMEIRNPD***S**T***I**V***-NH₂
 Bovine PrRP31 : SRAHQSMIEIRTPD*N*A**A***I**V***-NH₂

PrRP および PrRP ホモログの構造比較

ドチザメ脳下垂体を合成 PrRP ホモログで培養すると、GH 遺伝子の発現を濃度依存的に減少させた。一方、プロオピオメラノコルチン遺伝子の発現レベルは増加した。これまでの研究により、硬骨魚類の PrRP 及び無顎類の PrRP ホモログを単離し、これらのペプチドが脳下垂体からの GH の放出を抑制することを明らかにしている。したがって、哺乳類の PrRP に構造が類似する RF-amide ペプチドは魚類に普遍的に存在し、脊椎動物を通して GH 放出抑制活性を有すると考えられる。



ドチザメ PrRP ホモログの脳下垂体の GH (a) と POMC (b) 遺伝子の発現に及ぼす効果

ドチザメ脳下垂体の抽出物からヨシキリザメ GH 抗体に対する分子量 22kDa のタンパク質を単離し、N 末端部 (15 残基) の配列を決定した。その配列はドチザメ GH 前駆体の 28 位-42 位に相当したことから、ドチザメ GH は、他の板鰐類と同様に、183 アミノ酸残基からなることがわかった。

	1	10	20	30	40	50	60
Banded houndshark :	YPLPTLSDLFNAVHRAQQLHLVAAETCKDFERKYIPEEQRHSHKSSPSAFCQSETIPAP						
Blue Shark :	YPLPTLSDLFNAVHRAQQLHLVAAETCKDFERKYIPEEQRHSHKSSPSAFCQSETIPAP						
Dogfish :	YPLPTLSDLFNAVHRAQQLHLVAAETCKDFERKYIPEEQRHSHKSSPSAFCQSETIPAP						
	70	80	90	100	110	120	
Banded houndshark :	TGKEDAQQSDRELLLYSRLIQSWLNSIQNSRAFRTSDRVYRKLDDLKEGTSALIKTLE						
Blue Shark :	TGKEDAQQSDRELLLYSRLIQSWLNSIQNSRAFRTSDRVYRKLDDLKEGTSALIKTLE						
Dogfish :	TGKEDAQQSDRELLLYSRLIQSWLNSIQNSRAFRTSDRVYRKLDDLKEGTSALIKTLE						
	130	140	150	160	170	180	
Banded houndshark :	DGSSQDFARLQFSNERFDGNSSEALMKNYGLLACFKKDMHKVETLKVYVNCRFAESN						
Blue Shark :	DGSSQDFARLQFSNERFDGNSSEALMKNYGLLACFKKDMHKVETLKVYVNCRFAESN						
Dogfish :	DGSSQDFARLQFSNERFDGNSSEALMKNYGLLACFKKDMHKVETLKVYVNCRFAESN						
	183						
Banded houndshark :	CTV						
Blue Shark :	CTV						
Dogfish :	CTV						

ドチザメ、ヨシキリザメとアブラツノザメ GH のアミノ酸配列の比較

ドチザメ GH はヨシキリザメとアブラツノザメの GH に対して 88% と 85% の相対率を示した。ドチザメ GH 産生細胞は脳下垂体の前葉主部に認められた。ドチザメ肝臓片を GH で培養すると、他の板鰐類と同様に、IGF-I と II 遺伝子の発現を増加させることがわかった。

ドチザメ肝臓から硬骨魚類の GH 受容体に対して 39% の相同性を示す翻訳アミノ酸配列をコードする cDNA (314 塩基) をクローニングした。このクローンを GH 受容体の断片と推定して、5' および 3' 末端領域のクローニングを行なったが、全塩基配列を決定するまでには至らなかった。現在、ドチザメ GH 受容体 cDNA のクローニングを継続している。

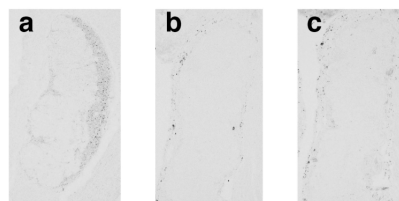
(2) 無顎類の成長促進に関与するホルモンと受容体の同定

ウミヤツメ肝臓から既知の IGF に対して 50% の相対率を示す、IGF cDNA 断片をクローニングした。したがって、ウミヤツメには構造の類似する 2 種類に IGF が存在すると考えられる。現在、第 2 の IGF cDNA の全塩基配列を決定するためのクローニングおよびこの遺伝子の GH による発現促進効果に関する実験を継続している。

ウミヤツメ肝臓から GH 受容体 cDNA のクローニングを試みたが、硬骨魚類および軟骨魚類の GH 受容体に構造が類似するクローンを得ることはできなかった。今後、GH cDNA を増幅するためのプライマーを再設計する必要がある。

(3) アワビの成長促進因子産生細胞の検索

サケ GH 抗体を用いた免疫組織染色を行なった結果、免疫陽性細胞群はアワビの脳神経節に認められた。この陽性細胞はサメ GH 抗体でも染色された。一方、サケおよびサメ GH で吸収した抗体では免疫陽性細胞は染色されなかった。サケ PRL および SL 抗体で染色される細胞群も脳神経節に観察された。これらのことから、成長促進因子は脳神経節で産生されていると考えられる。



アワビの脳神経節における GH 陽性細胞 (a)、PRL 陽性細胞 (b) と SL 陽性細胞 (c)。サケ GH、PRL と SL 抗体：5000 倍希釈

GnRH 抗体で染色させる細胞群と陽性繊維は脳神経節に認められた。また、サケ PrRP 抗体に陽性に反応する細胞および陽性繊維も脳神経節に観察された。これらのことから、アワビの脳神経節で GnRH および PrRP 様ペ

チドも存在すると考えられる。

(4) アワビの成長促進因子の探索

アワビ脳神経節の酢酸アンモニウム抽出物をゲル濾過および HPLC に付して分画した結果、サケ GH 抗体にして免疫陽性反応を有する分子量 20 KDa と 18 KDa のタンパク質を検出した。これらの陽性タンパク質のアミノ末端部の配列を決定したが、魚類の GH に対して類似性は認められなかった。

ab 20 KDa : A-P-A-G-F-T-D-A-M-Q-F-K-N-K-A-Salmon GH : I-E-N-Q-R-L-F-N-I-A-V-S-R-V-Q-Salmon PRL: I-G-L-S-D-L-M-E-R-A-S-Q-R-S-D-Salmon SL : V-P-L-E-C-K-D-E-Q-G-S-I-I-L-C-ab 18 KDa : S-K-X-Q-Y-K-P-X-M-P-

サケ GH 抗体に対する免疫反応陽性タンパク質 (20 KDa と 18 kDa) の N 末端部とサケの成長ホルモン分子族との構造比較

脳神経節一本鎖 cDNA を鋳型として、魚類の GH の構造比較に基づいて作成したプライマーを用いて PCR を行なった結果、GH において最も保存性の高い C 末端領域に類似した cDNA 断片をクローン化した。しかし、この cDNA の全構造を決定することはできなかった。

また、魚類の GH 増幅用プライマーと単離したサケ GH 抗体に免疫陽性タンパク質の N 末端部の構造を基に作成したプライマーを組み合わせて PCR を行なったが、魚類の GH に構造が類似する cDNA を増幅することはできなかった。一方、アワビ脳神経節 cDNA ライブラリーを作成し、718 個のクローンの塩基配列を解析したが、魚類の GH に構造が類似するクローンは得られなかった。今後、アワビの成長促進因子 cDNA をクローニングするためには、単離したタンパク質の分子内の構造を決定すること、また、成長促進因子 cDNA を増幅するためのプライマーを再設計する必要がある。

アワビ脳神経節の EST 解析

アミノ酸配列の相同性検索結果	クローン数
IGF結合タンパク質-2 (ブタ)	2
バソトシン遺伝子 (太平洋メクラウナギ)	1
アネキシンA11b (ゼブラフィッシュ)	1
ビタミンB12受容体 (ヒト)	4
嗅覚受容体 (イヌ)	2
発育調製Gタンパク質共役受容体 (マウス)	1
リボソームタンパク質類	6 8
チューブリン類	1 3
ケラチン類	5
アクチン類	4
レクチン類	4
酵素類	7 7
未同定	6 2
その他	4 7 4
合計	7 1 8

(5) アワビの成長促進因子受容体の探索

サケ GH をアワビ稚貝に筋肉注射した結果、注射開始から 1 日目の臍肝臓の一部にサケ GH 抗体に対する免疫陽性反応が観察された。この陽性反応は注射開始から 2 日目には消失した。この結果は、サケ GH を認識する受容体が臍肝臓に存在すること考えられる。

アワビの臍肝臓から調製した一本鎖 cDNA を鋳型とし、脊椎動物の GH 受容体の構造比較を基に作成したプライマーを用いて PCR を行なったが、脊椎動物の GH 受容体に構造が類似する cDNA を増幅することはできなかった。今後、アワビの成長促進因子受容体 cDNA をクローニングするためには、プライマーを再設計する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Moriyama S, Furukawa S, Kawauchi H. Growth stimulation of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*, by feeding with salmon growth hormone in sodium alginate gel. *Fis. Sci.*, In press. 査読有.
- ② Uchida K, Moriyama S, Breves JP, Fox BK, Pierce AL, Borski RJ, Hirano T, Grau EG. cDNA cloning and isolation of somatolactin in Mozambique tilapia and effects of seawater acclimation, confinement stress, and fasting on its pituitary expression. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 161, 162-170, (2009) 査読有.
- ③ Moriyama S, Oda M, Yamazaki T, Yamaguchi K, Amiya N, Takahashi A, Amano M, Goto T, Nozaki M, Meguro H, Kawauchi H. Gene structure and functional characterization of growth hormone in dogfish, *Squalus acanthias*. *Zool. Sci.*, 25, 604-613. (2008) 査読有.
- ④ Moriyama S, Tashiro K, Furukawa S, Kawauchi H. Ability of salmon growth hormone to accelerate the somatic growth of juvenile abalone *Haliotis discus hannai*. *Fis. Sci.*, 74, 860-866. (2008) 査読有.
- ⑤ Takahashi A, Kobayashi Y, Moriyama S, Hyodo S. Evaluation of posttranslational processing of proopiomelanocortin in the banded houndshark pituitary by combined cDNA cloning and mass spectrometry. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 157, 41-48. (2008) 査読有.
- ⑥ Moriyama S, Kasahara M, Amiya N, Takahashi A, Amano M, Sower SA, Yamamori K, Kawauchi H. RFamide peptides inhibit the expression of melanotropin and growth hormone genes in the pituitary of an Agnathan, the sea lamprey, *Petromyzon*

marinus. *Endocrinology*, 148, 3740-3749. (2007) 査読有.

- ⑦ Takahashi A, Nakata O, Moriyama S, Nozaki M, Joss MPJ, Sower SA, Kawauchi K. Occurrence of two functionally distinct proopiomelanocortin genes in all modern lampreys. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148, 72-78. (2006) 査読有.
- ⑧ Moriyama S, Oda M, Takahashi A, Sower SA, Kawauchi H. Genomic structure of the sea lamprey growth hormone-encoding gene. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148, 33-40. (2006) 査読有.
- ⑨ Sower SA, Moriyama S, Kasahara M, Takahashi A, Nozaki M, Uchida K, Dahlstrom JM, Kawauchi H. Identification of sea lamprey GTHb-like cDNA and its evolutionary implications. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148, 22-32. (2006) 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 森山俊介, 阿見弥典子, 天野勝文, 高橋明義, 兵藤晋. 軟骨魚類のプロラクチン放出ペプチドホモログの単離、組織分布と生物活性. 第 33 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム. 2008. 12. 5. 広島.
- ② 野崎眞澄, 下谷豊和, 内田勝久, 森山俊介, 高橋明義, 川内浩司, Stacia A Sower. 無顎類からみた腺性下垂体ホルモンの進化. 第 32 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム. 2007. 10. 12. 日光.
- ③ 森山俊介. 魚類の成長ホルモンと成長促進機構. 動物学会関連集会「ホメオスタシス研究会」. 2007. 9. 20. 弘前.
- ④ 森山俊介. ドチザメの成長促進に関与する視床下部・下垂体ホルモン. 東京大学海洋研究所共同利用研究集会「軟骨魚類を探る」. 2006. 12. 1. 東京.
- ⑤ 森山俊介, 熊田ひかり, 西野愛子, 前田知里, 阿見弥典子, 天野勝文, 兵藤晋, 川内浩司. 軟骨魚類の成長促進に関与する視床下部および下垂体ホルモンの同定. 第 31 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 2006. 11. 3. 札幌.
- ⑥ 森山俊介, 熊田ひかり, 前田知里, 阿見弥典子, 天野勝文, 兵藤晋, 川内浩司. 軟骨魚類の成長促進に関与する視床下部および下垂体ホルモンの同定. 日本下垂体研究会第 21 回学術集会. 2006. 8. 3. 静岡.
- ⑦ 森山俊介, 阿見弥典子, 天野勝文, 兵藤晋, 高橋明義, 野崎眞澄, Sower, S. A., 川内浩司. 魚類のプロラクチン放出ペプチドの構造と生物活性. 第 19 回「遺伝子とその周辺」研究会. 2006. 8. 2. 相模原.
- ⑧ Moriyama, S. Structures and tissues distributions of growth hormone and

insulin-like growth factor-I receptors in salmon. VIIth International Congress on the Biology of Fish. 2006. 7. 22. Newfoundland, Canada.

- ⑨ 森山俊介, 阿見弥典子, 天野勝文, 兵藤晋, 高橋明義, 野崎眞澄, Sower, S. A., 川内浩司. 魚類のプロラクチン放出ペプチドの構造と生物活性. 第 3 回 GPCR 研究会. 2006. 5. 13. 東京

[図書] (計 3 件)

- ① Kawauchi H, Sower SA, Moriyama S. Chapter 5: The neuroendocrine regulation of prolactin and somatolactin secretion. Elsevier, Fish Physiology: Fish Neuroendocrinology, Vol. 28, In press.
- ② 森山俊介. 成長因子. 南江堂. ホルモンハンドブック (2007) p.1340-1522.
- ③ 川内浩司, 高橋明義, 森山俊介. 下垂体ホルモンの多様性. 培風館. シリーズ 21 世紀の動物科学 (10) 内分泌と生命現象. (2007). pp. 7-39.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 俊介 (MORIYAMA SHUNSUKE)
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号: 50222352

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高橋 明義 (TAKAHASHI AKIYOSHI)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号: 10183849

天野 勝文 (AMANO MASAFUMI)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号: 10296428

内田 勝久 (UCHIDA KATSUHISA)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号: 50360508