

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32615

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380116

研究課題名(和文) 組換え生殖腺刺激ホルモンによる水産重要魚種の性成熟促進技法の開発

研究課題名(英文) Development of novel methods of induction of sexual maturation in aquaculture fishes using recombinant gonadotropins

研究代表者

小林 牧人 (KOBAYASHI, Makito)

国際基督教大学・教養学部・教授

研究者番号：30183809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：水産増養殖において効率的な魚類の生殖制御を行うには、魚類の生殖内分泌の基礎的知見が必須であるが、魚類の下垂体生殖腺刺激ホルモン(GTH)の分泌動態、生理作用については、まだ不明な点が多い。その理由の一つとして、研究に必要な魚類のGTHの入手が困難であることがあげられる。そこで研究代表者らはカイコを宿主として遺伝子工学的に魚類の組換えGTHの作製を行い、研究者に供給することを試みた。本研究では、組換えGTHの作製効率、精製法の検討、投与後の魚体内でのホルモンの安定性、生物活性、投与時の魚のホルモン感受性について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Knowledge of reproductive endocrinology of fish is essential for the efficient aquaculture. However, information on the function of pituitary gonadotropin of fish is not clearly known because of unavailability of the hormones. Therefore, we started a project to produce recombinant fish gonadotropins biotechnologically using silkworm larvae as a host and distribute the hormones to fish biologists for their research. In the present study, we investigated the efficiency of the hormone production, method of hormone purification, stability of administered hormones in fish, biological activities of hormones, and sensitivity to the hormones in recipient fish.

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：生殖腺刺激ホルモン 組換えホルモン バイオテクノロジー 魚類 性成熟促進 養殖

## 1. 研究開始当初の背景

水産増養殖において効率的な魚類の生殖制御を行うには魚類の生殖内分泌の基礎的知見が必須である。しかし他の脊椎動物の研究とくらべて魚類の研究は遅れている。その理由の一つとして研究に必要な下垂体生殖腺刺激ホルモン(GTH)の入手が困難であり、そのことが魚類のGTH研究の進展の妨げとなっていた。従来研究用の下垂体ホルモンは、大量の下垂体を魚類から採取し、種々のクロマトグラフィーにより純化・精製を行っていた。魚類の下垂体の採取作業は基本的に手作業で、多大な労力を要する。また種々のクロマトグラフィーによる精製は、担当者にそれなりの経験と技術を要し、費用も安価ではない。さらにいったんホルモンの精製ができて、精製したホルモンをすべて使用してしまうとまた下垂体採取のステップに戻るため、継続的なホルモンの精製、研究者への供給はあまり行われてこなかった。このような状況を解決するために、研究代表者らは遺伝子工学的に組換え魚類下垂体ホルモンを作製し、作製されたホルモンを継続的に魚類内分泌学研究者に供給し、魚類生殖内分泌学の発展を計画した。

一方、これまでに研究代表者らは、カイコを宿主として魚類のGTHの作製に成功しており(株式会社シスメックスとの共同研究、旧社名カタクラ工業)、またこの方法では従来の培養細胞を宿主とした組換えホルモンより大量の組換えホルモンの作製が可能であることを明らかにした。このような経緯により研究代表者らは、組換え魚類下垂体ホルモンの大量生産・研究者への供給を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子工学的に魚類下垂体ホルモンの作製を行い、作製されたホルモンを

研究に活用することにより、魚類の生殖内分泌学的知見が得られ、これらの知見が水産増養殖に応用されることを期待している。そのためには、組換えホルモンを作製・投与する上での種々の問題点を解決する必要がある。本研究では、組換えホルモンの作製効率向上、ホルモンの投与効果の増大を図るために、以下の項目について検討を行った。

- 1) 種々の魚種のホルモンの作製と作製効率
- 2) 遺伝子コンストラクトの改変による作製効率の向上
- 3) ホルモンの精製法の検討
- 4) ホルモン構造の改変による体内安定性
- 5) ホルモンの生物活性
- 6) 魚のホルモン感受性とホルモン投与効果

## 3. 研究の方法

- 1) 種々の魚種のホルモンの作製と作製効率

これまでに研究代表者はウナギ、マンシュウマスの組換えGTH(濾胞刺激ホルモンFSHと黄体形成ホルモンLHの2種類のGTH)の作製を行って来た。これらの魚種のGTHはカイコ体液中に約1-2mg/mLの高濃度でホルモンを生産することができた。これは他の魚種、他の下垂体ホルモンについても当てはまるのかを調べるために、キンギョ、ブリおよびメダカのGTH(FSHとLH)、マンシュウマス甲状腺刺激ホルモン(TSH)、さらにキンギョのソマトラクチンおよびの9種類のホルモンの作製を行った。

- 2) 遺伝子コンストラクトの改変による作製効率の向上

キンギョ、ブリの組換えGTHの生産量がウナギ、マンシュウマスのGTHの生産量に比べて低量であったため、キンギョ、ブリのGTHの遺伝子コンストラクトについて、本来の非翻訳領域の付加を行い、生産量の増加がみられるか検討した。

### 3) ホルモンの精製の検討

これまでホルモンの精製のために、ホルモンの一部に Histidine-tag (His-tag) を付けることにより、生産溶液からホルモンのアフィニティー精製を行うのが定法であった。しかしソマトラクチン および を作製した際、His-tag による精製では精製効率が非常に悪く、今回新たに FLAG-tag の導入を検討した。

### 4) ホルモン構造の改変による体内安定性

GTH および TSH は糖タンパク質ホルモンで、タンパク質部分にシアル酸などの糖が付加している。シアル酸は体内でのホルモンの分解抑制効果を持ち、ホルモンの体内での安定性に寄与している。しかし本研究で宿主として用いているカイコでは、タンパク質部分に付加される糖の種類はマンノースであり、シアル酸を付加することができない。その結果、投与したホルモンがすぐに体内で分解され、ホルモンの効果が低減されると言われている。一方、これまでの糖鎖研究から、特定のアミノ酸配列をもつペプチドは、糖鎖の立体構造を模倣することが可能であるとの報告がなされている ( グライコレプリカペプチド )。そこで本研究では、シアル酸の構造を模倣するペプチドをウナギ FSH に組み込み、この改変 FSH が通常の FSH より体内での高い安定性をもつか、キングヨを用いて検討した。なお血液中の改変 FSH の濃度は、His-tag を検出する ELISA により測定した。

### 5) ホルモンの生物活性

メダカの FSH および LH の生物活性をメダカの卵成熟を指標として *in vitro* で調べた。

### 6) 魚のホルモン感受性とホルモン投与効果

ホルモンを投与する際に、投与される魚の生理状態によってホルモンの効果が大きく影響を受けることが知られている。カンモンハタでは雄からのフェロモンを受容した雌ではホルモン ( 市販のヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン ) の効果が異なることが示唆されて

いる。本研究では、フェロモンがホルモン投与の効果に及ぼす影響について、卵成熟を指標として調べた。

## 4. 研究成果

本研究では、研究の方法で述べた項目に関して、以下の結果が得られた。

### 1) 種々の魚種のホルモンの作製と作製効率

これまでウナギ、マンシュウマスの GTH はカイコ体液中に 1-2mg/mL の高濃度でホルモンが生産されたが、ブリ、キングヨでは 0.2-0.3mg/mL、メダカは 0.5-1.0mg/mL、ソマトラクチン 、 は 0.3mg/mL と魚種、ホルモンの種類により生産量が大きく異なることが明らかとなった。

### 2) 遺伝子コンストラクトの改変による作製効率の向上

ホルモンの作製効率の向上を期待し、ブリおよびキングヨの GTH の遺伝子コンストラクトに非翻訳領域を付加したが、ホルモンの生産効率はむしろ低下した。

### 3) ホルモンの精製の検討

ソマトラクチン の の精製の際、His-tag を付加したホルモンでは精製による純度が上がらなかったが FLAG-tag を付加したホルモンでは純度が 90% 近くまで大きく上昇した。ホルモンの種類により tag の種類を変える必要があることが明らかとなった。

### 4) ホルモン構造の改変による体内安定性

シアル酸の構造を模倣するペプチドを付加したウナギ FSH をキングヨに投与して、その体内での消長を調べたが、ペプチドを付加していないものと比べて体内に長く残るといった結果は得られなかった。

### 5) ホルモンの生物活性

メダカの卵成熟を指標として FSH と LH の生物活性を調べたところ、LH により卵成熟は誘起されるが、FSH はその作用がないことが

明らかとなった。

6) 魚のホルモン感受性とホルモン投与効果  
カンモンハタでは、性成熟した雌にホルモン投与前に雄の飼育水(フェロモンを含むと考えられる)を与えておくことにより、GTHの投与効果が増強され、より多くの個体で卵成熟が起こることが明らかとなった。

以上、本研究により、魚類の種々の組換えホルモンを作製し、それらを活用した研究がなされつつある。カイコを宿主として組換えホルモンを作製した際、糖鎖としてシアル酸が付加されないため、*in vivo*でのホルモン効果が減少する可能性があるが、体内での代謝を考慮する必要のない*in vitro*での研究には、十分使用可能であると考えられた。今後、本研究で作製されたホルモンを国内外の研究者に供給することにより、魚類生殖内分泌学の発展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Shin, J., Kim, M.A., Kobayashi, M., and Sohn, Y.C. Production of characterization of recombinant Manchurian trout thyrotropin. *Fish Physiol Biochem.*, 査読有り, 39 (2013) 1353-1363.

Kagawa, H., Sakurai, Y., Horiuchi, R., Kazeto, Y., Gen, K., Imaizumi, H., Masuda, Y. Mechanism of oocyte maturation and ovulation and its application to seed production in the Japanese eel. *Fish Physiol. Biochem.*, 査読有り, 39 (2013) 13-17.

Kagawa, H., Fujie, N., Imaizumi, H., Masuda, Y., Oda, K., Adachi, J., Nishi, A., Hashimoto, H., Teruya, K., Kaji, S.

Using osmotic pumps to deliver hormones to induce sexual maturation of female Japanese eels, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 査読有り, 388 (2013) 30-34.

Aizen, J., Kowalsman, N., Kobayashi, M., Hollander, L., Sohn, Y.C., Yoshizaki, G., Niv, M. Y., and Levavi-Sivan, B. Experimental and computational study of the inter- and intra-species specificity of gonadotropins for various gonadotropin receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 査読有り, 364 (2012) 89-100.

Aizen, J., Kobayashi, M., Selicharova, H., Sohn, Y.C., Yoshizaki, G., and Levavi-Sivan, B. Steroidogenic response of carp ovaries to piscine FSH and LH depends on the reproductive phase. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有り, 178 (2012) 28-36.

[学会発表](計 9 件)

入路光雄・征矢野清. カンパチ GtH 受容体の同定と卵巣に於ける遺伝子発現の周年変化. 日本水産学会春季大会 2014 年 3 月 28-30 日, 北海道大学水産学部, 函館市.

Nagahama, Y. Regulation of ovarian development and oocyte maturation in fish. 7th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative endocrinology, 2014 年 3 月 18-23 日, National Taiwan Ocean University, Keelung Taiwan.

Soyano, K. Pheromonal control of final oocyte maturation and lunar-related spawning in grouper. 7th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania

Society for Comparative endocrinology, 2014年 3月 18-23日, National Taiwan Ocean University, Keelung Taiwan.

Yamamoto, K., Nakagawa, M., Yoshida, K., Hotta, T., Tsusaki, T., Izumida, D., Soyano, K. Influence of age and growth on pubertal development in *Epinephelus bruneus*. The 10<sup>th</sup> International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, 2013年 11月 18-21日, Jeju National University, Jeju, Korea.

Yamaguchi, T., Tawaki, S., Kawabata, Y., Takebe, T., Nanami, A., Sato, T., Teruya, K., Soyano, K. The biological information of final maturation in the white-streaked grouper. The 10<sup>th</sup> International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, 2013年 11月 18-21日, Jeju National University, Jeju, Korea.

山元啓資・中川雅弘・吉田一範・堀田卓朗・津崎龍雄・泉田大介・征矢野清・クエの年齢と成熟に関する生理学的研究。平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 2013年 9月 19-22日, 三重大学, 津市。

Soyano, K. The final oocyte maturation regulated by the pheromone released from male in the honeycomb grouper *Epinephelus merra*. 7th International Symp. on Fish Endocrinology, 2012年 9月 3-6日, Buenos Aires, Argentina.

谷洸祐・征矢野清。カンパチの初回成熟開始に及ぼすヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (HCG) およびテストステロン (T) の影響。第 11 回日本水産増殖学会, 2012年 12月 8日, 長崎市。

東森生・高橋明義・小林牧人・内山実・松田恒平。キングヨ稚魚の体色変化とソマ

トラクチン 2 分子種の発現変動。日本比較内分泌学会, 2012年 11月 29日-12月 1日, 福井大学, 福井市。

〔図書〕(計 2 件)

天野勝文, 小林牧人, 金子豊二, 会田勝美。恒星社厚生閣, 内分泌, 「増補改訂版 魚類生理学の基礎」, 2013, p.133-143.

小林牧人, 大久保範聡, 足立伸次。恒星社厚生閣, 内分泌, 「増補改訂版 魚類生理学の基礎」, 2013, p.149-183.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 牧人 (KOBAYASHI, Makito)  
国際基督教大学・教養学部・教授  
研究者番号: 30183809

(2) 研究分担者

香川 浩彦 (KAGAWA, Hirohiko)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号: 60169381

征矢野 清 (SOYANO, Kiyoshi)  
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (環シナ)・教授  
研究者番号: 80260735

吉崎 悟朗 (Yoshizaki, Goro)

東京海洋大学・海洋科学部・准教授

研究者番号：70281003

(2011年度-2012年度)

布柴 達男 (NUNOSHIBA, Tatsuo)

国際基督教大学・教養学部・教授

研究者番号：10270802

早川 洋一 (HAYAKAWA, Yoichi)

国際基督教大学・アーツ・サイエンス学  
科・研究員

研究者番号：50384011

(2011年度のみ)

(3)連携研究者

吉崎 悟朗 (Yoshizaki, Goro)

東京海洋大学・海洋科学部・教授

研究者番号：70281003

(2013年度のみ)