

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580266

研究課題名(和文) 小型歯鯨類における胎盤性性腺刺激ホルモンの探索

研究課題名(英文) Studies on chorionic gonadotropins in dolphins

研究代表者

朝比奈 潔 (ASAHINA, Kiyoshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：10147671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では濾胞刺激ホルモン(FSH)に注目し、和歌山県太地町でのバンドウイルカ追い込み漁で得られた、異なる妊娠段階の個体より胎盤組織を採取し、FSH サブユニットの発現動態を比較・検討した。また、特異抗体を用いた免疫組織化学染色により、胎盤組織内のFSHの分布を調べた。妊娠初期～後期の胎盤組織においてFSHの発現が認められた。免疫組織化学染色の結果、陽性反応は母体および胎児側の絨毛上皮に認められたが、反応は胎児側細胞ではるかに強かった。発現量の比較では、下垂体に比べ胎盤での発現は低い、組織量を考慮すると、バンドウイルカの胎盤性FSHは妊娠の維持等に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The function of placenta in cetaceans is still unclear. Some cetaceans, such as dolphins, have a long gestational period almost comparable with that of humans. In the previous study, we demonstrated that luteinizing hormone (LH) like substances exist in a bottlenose dolphin placenta. In the present study, we obtained the evidence that dolphin placenta also produces and secretes follicle stimulating hormone (FSH). Dolphin placentae and pituitaries were collected from wild pregnant (early, middle, and late stages) bottlenose dolphin captured in the traditional drive fisheries at Taiji, Wakayama prefecture. We cloned cDNAs encoding FSHbeta subunit. The FSHbeta cDNA could be detected in the placentae from all the stages, although the expression was much weaker than that in the pituitaries. Immunohistochemical observations employing anti-canine FSH revealed positive staining in both the maternal and fetal villous tissues, showing much stronger reaction in the latter.

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：鯨類 胎盤 濾胞刺激ホルモン 黄体形成ホルモン

### 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類における生殖腺刺激ホルモン産生のは下垂体と胎盤であるが、鯨類の下垂体を集めることは容易でない。そこで、小型歯鯨類(イルカ類)の妊娠期間がヒトとほぼ等しいこと、イルカ類の胎盤の構造がウマと同様、上皮絨毛膜胎盤であること、また、ヒトを含む霊長類とウマの胎盤は胎盤性の生殖腺刺激ホルモンを分泌することに着目し、比較的手が容易なイルカ類の胎盤から生殖腺刺激ホルモンを検索することとした。

### 2. 研究の目的

胎盤は母体側の組織と胎児側の組織が複合したものである。当研究室でのこれまでの研究から、cDNA塩基配列の比較によりバンドウイルカ胎盤が下垂体の黄体形成ホルモン(LH)とほぼ同一の分子を産生する可能性が示された。この研究の過程で、LHだけでなく濾胞刺激ホルモン(FSH)の産生を示唆する結果も得られた。

そこで、本研究では追い込み漁などで入手が可能なバンドウイルカ胎盤を材料として、鯨類胎盤におけるFSHの産生、および産生動態を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

和歌山県太地町での追い込み漁により得られたバンドウイルカ妊娠個体3頭(妊娠初期、中期、後期)の胎盤および下垂体を材料とした。胎盤は便宜的に5部位に分け(図1)、それぞれから組織を採取した。

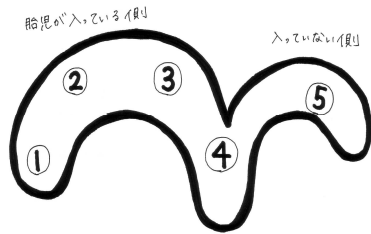


図1. バンドウイルカ胎盤模式図  
~ はサンプリング箇所を示す  
( ~ は胎児発達側)

各胎盤組織および下垂体から常法に従いRNAを抽出し、合成したcDNAを鋳型とするRT-PCRを行った。また、各組織を組織観察用に固定し、FSHに対する特異抗体を用いた免疫組織化学染色に供した。

### 4. 研究成果

FSHサブユニットのopen reading frameを増幅するプライマーを用いたRT-PCRの結果、いずれの妊娠時期の胎盤においても、下垂体に比べ発現は低かったが、FSHの発現が確認された。部位別に見ると、胎児の入っていない部位と、および胎児側の部位においていずれの妊娠時期にもFSHの発現が認められたのに対し、部位と部位では、それぞれ妊娠中期と後期に発現が見られなくなった。

組織学的に見ると、バンドウイルカ胎盤は

母体側組織と胎児側組織の密接度が低い上皮絨毛膜胎盤に分類された。

妊娠初期の胎盤ではまだ絨毛の形成は見られず、双方の組織が部分的に接しているのみであった(図2-A)。

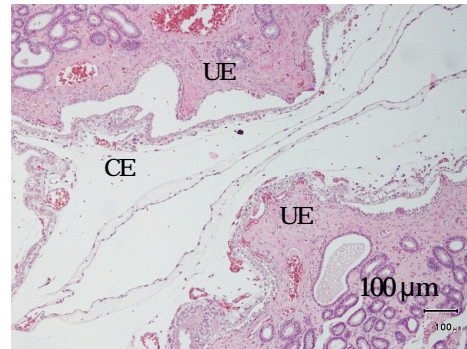


図2-A 妊娠初期の胎盤組織像 HE染色  
UE, 子宮上皮細胞(母体側);  
CE, 栄養芽細胞(胎児側): 以下同様

妊娠中期の胎盤では、母体側および胎児側組織が発達し入り組んだ構造が確認されたが、母体側絨毛に比べ胎児側絨毛の方が太かった(図2-B)。

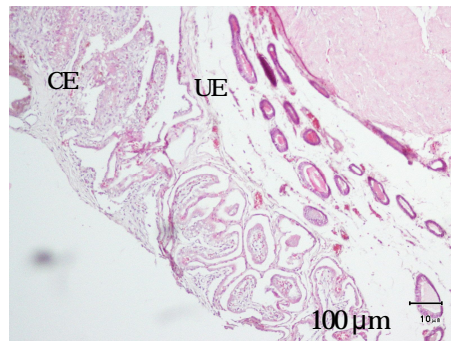


図2-B 妊娠中期の胎盤組織像 HE染色

妊娠後期の胎盤においては、中期に比べより複雑に双方から絨毛が入り込み、母体側絨毛も胎児側絨毛と同程度に厚さを増した(図2-C)。

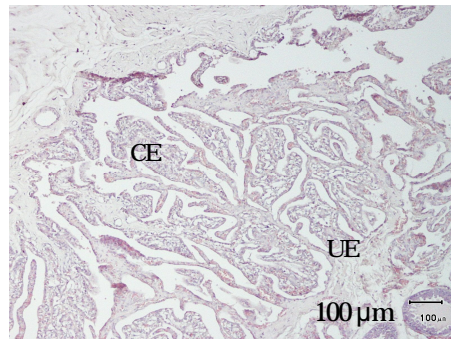


図2-C 妊娠後期の胎盤組織像 HE染色

ほ乳類のFSHに対する特異抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、バンドウイルカ下垂体(図3)と胎盤組織(図4)において陽性反応が認められた。

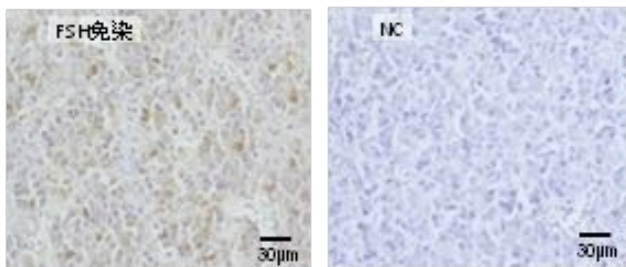


図 3. 抗 FSH 抗体を用いたバンドウイルカ下垂体組織の免疫組織化学染色：NC，陰性対照

胎盤組織においては、母体側と胎児側のいずれの絨毛上皮細胞においても陽性反応が認められたが、反応は母体側に比べ、胎児側で強かった（図 4）。

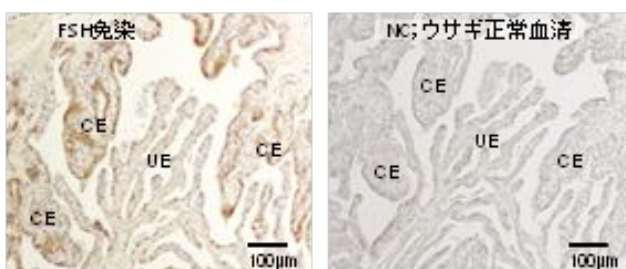


図 4. 抗 FSH 抗体を用いたバンドウイルカ胎盤組織の免疫組織化学染色：NC，陰性対照  
UE，子宮上皮細胞（母体側）；  
CE，栄養芽細胞（胎児側）

#### タンパク質としての FSH の単離

凍結保存した妊娠後期のバンドウイルカ下垂体および胎盤組織の一部を用いて FSH の単離を試みた。常法により組織からタンパク質を抽出し、SDS 電気泳動によりタンパク質を分離した。この際、1 サンプルにつき還元処理と非還元処理のものを用意した。

泳動後のゲルを、CBB 染色および抗 FSH に対する特異抗体を用いた Western Blotting により解析した。

結果を図 5 に示す。下垂体および胎盤組織抽出物を用いた Western Blotting の結果、下垂体組織については明瞭な結果が得られた（図 5 の赤実線で囲んだ部分）。FSH は鎖と鎖からなるヘテロダイマーであり、分子量は 30kDa 前後と推定される。非還元処理ではヘテロダイマーのままなので 25～30kDa のバンドが認められたが、還元処理後はその結合が切れるため、非還元サンプルよりも小さい 20kDa 付近にバンドが見られたと考えられる。また、FSH は糖が付加した糖タンパク質なので、バンドがスメア的なものとなったと考えられる。還元処理後は二つのバンドに分かれるはずであるが、分子量が同程度であるためバンドが重なった可能性がある。

一方、胎盤組織からは抗 FSH 抗体に対する明瞭な陽性反応が見られなかった。おそらく、

胎盤組織中に単位重量あたり存在する FSH の量が下垂体組織に比べかなり低いのである。胎盤における FSH mRNA の発現量が下垂体に比べ低かったこともそれを裏付ける。

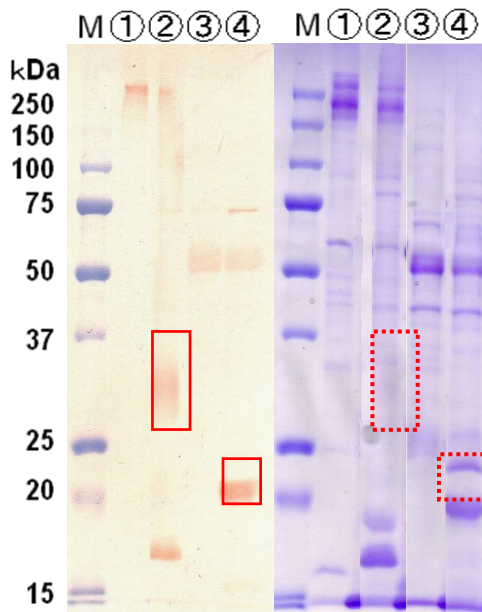


図 5. バンドウイルカ胎盤および下垂体組織抽出物の SDS 電気泳動像：CBB 染色（右）と Western Blotting：M，マーカー；①，78 抽出物（非還元）；②，下垂体抽出物（非還元）；③，胎盤抽出物（還元）；④，下垂体抽出物（還元）

#### 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 3 件）

Itoi, S., Yoshikawa, S., Asahina, K., Suzuki, M., Ishizuka, K., Takimoto, N., Mitsuoka, R., Yokoyama, N., Detake, A., Takayanagi, C., Eguchi, M., Tatsuno, R., Kawane, M., Kokubo, S., Takanashi, S., Miura, A., Suitoh, K., Takatani, T., Arakawa, O., Sakakura, Y., Sugita, H., Larval pufferfish protected by maternal tetrodotoxin, *Toxicol*, 査読有り、78, 35-40, 2014.

Okihara, R.S.n., Saito, T., Ogata, H., Ohsaki, A., Iida, T., Asahina, K., Mitamura, K., Ikegawa, S., Hofmann, A.E., and Hagey, L.R., N-methyltaurine N-acyl amidated bile acids and deoxycholic acid in the bile of angelfish (Pomacanthidae): a novel bile acid profile in Perciform fish, *Steroids*, 査読有り、80, 15-23, 2014.

Sawayama, E., Asahina, K., Takagi, M., Parentage assessment of incomplete ossification in larval Japanese flounder by microsatellite DNA markers, *Aquaculture*, 査読有り、420-421,

509-5013, 2014.

〔学会発表〕(計 2件)

立石綾香、鈴木美和、川添一郎、朝比奈 潔、  
バンドウイルカの胎盤性性腺刺激ホルモン  
における産生動態と分布、平成 23 年度日本  
水産学会秋季大会、2011 年 9 月 29 日、長崎  
大学(長崎)。

立石綾香、鈴木美和、川添一郎、朝比奈 潔、  
バンドウイルカ胎盤における濾胞刺激ホル  
モンの産生動態、平成 23 年度日本水産学会  
春季大会、2011 年 3 月 30 日、東京海洋大学  
(東京)。

〔図書〕(計 1件)

朝比奈 潔、厚生社恒星閣、水族館と海の  
生き物たち、88-98、2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

朝比奈 潔 (ASAHINA, Kiyoshi)  
日本大学生物資源科学部 教授  
研究者番号：10147671

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：