

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580256

研究課題名(和文) サケ科魚類の成長を司るインスリン様成長因子結合蛋白の組換え蛋白の作製

研究課題名(英文) Production of recombinant salmon insulin-like growth factor binding proteins

研究代表者

清水 宗敬 (Shimizu, Munetaka)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・講師

研究者番号：90431337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、魚類の成長に重要なインスリン様成長因子-1(IGF-1)の活性を調節しているIGF結合蛋白(IGFBP)の組換え蛋白を作製し、脳下垂体における作用を解析した。まずサクラマス未成熟魚の脳下垂体培養系を確立した。次に、大腸菌発現系により機能的な組換えIGFBPを発現させた。そして、組換えIGFBPをIGF-1とともに脳下垂体培養系に添加した。結果、IGF-1活性の阻害型と考えられていたIGFBP-1は、脳下垂体においては促進型として働くことを初めて示唆した。今回作製した組換え蛋白を用いることにより、さらに詳細な魚類の成長調節メカニズムの解析が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The present study dealt with production of functional recombinant insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) that are important regulators of IGFs. We first established a primary pituitary cell culture for immature masu salmon. We next expressed recombinant IGFBP-1a and -1b using bacterial cell system. These recombinant IGFBPs were added to the pituitary cell culture to look at how the inhibitory action of IGF-1 on GH release was modulated. The result suggests that although salmon IGFBP-1a and -1b were believed to be inhibitors of IGF-1 actions, they actually enhanced the action of IGF-1 on the pituitary. Availability of recombinant protein will be extremely useful to further analyze functions of fish IGFBPs.

研究分野：魚類生理学

キーワード：成長 サケ科魚類 ホルモン 組換え蛋白

1. 研究開始当初の背景

水産学において、魚の成長を正確に評価し、制御することは非常に重要である。魚類の成長は、内分泌的には主に成長ホルモン (GH) とインスリン様成長因子-1 (IGF-1) により調節されている。特に血中 IGF-1 は GH の成長促進作用を仲介すると共に、魚のフィードバックにより、脳下垂体での GH の合成・分泌を抑制する。一方、IGF-1 の生物活性は複数存在する IGF 結合蛋白 (IGFBP) により厳密に調節されている。しかし、魚類ではそれらの機能はほとんど分かっていない。申請者はこれまでにサケ科魚類の血中に 3 種の IGFBP を検出した。特に、そのうちの 2 つは IGFBP-1 のサブタイプ (1a と 1b) であり、IGF-1 による成長の「阻害型」であることを提唱してきた。

2. 研究の目的

本研究ではサケ科魚類の血中主要 IGFBP の機能解析を目標として、活性を持った組換え蛋白を作製し、脳下垂体培養系を用いて、IGF-1 の GH 合成・分泌阻害作用に与える IGFBP の影響を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) GH 測定系の確立

まず、脳下垂体から培養液中に分泌される GH 蛋白量を定量するため、時間分解蛍光免疫測定系 (TR-FIA) の確立を行った。精製シロザケ GH (北里大学・森山俊介教授より提供) をビオチン標識し、ウサギ抗シロザケ GH 抗体 (北海道大学・原 彰彦名誉教授より提供) を用いた競合法を試みた。

次に、脳下垂体中の *gh* mRNA 測定のため、リアルタイム定量 PCR (qPCR) 法を確立した。連携研究者である新潟大学・安東宏徳教授が設計したサクラマス *gh* に対するプライマーを用い、サイバークリーンによる方法を最適化した。また、内部標準遺伝子として、*ef-1α* を用いた。

(2) 初代脳下垂体細胞培養系の確立

連携研究者とともに、サクラマス 1 年魚を用いて初代脳下垂体細胞培養系の確立を行った。摘出した脳下垂体を細断後、コラゲナーゼで処理して培養プレートに播いて 12 日で培養した。

(3) 組換え IGFBP の作製と精製

まず、サクラマスの肝臓から IGFBP-1a と -1b の翻訳領域 cDNA をクローニングした。そして、蛋白の可溶性を高めるチオレドキシ (trx) を融合パートナーとして pET32a に組み込み、発現ベクターを構築した。これを蛋白質の正しい立体構造の再生が効率的に行われる大腸菌 RosettaGAMIK に形質転換した。培養後、IPTG (isopropyl-β-thiogalactoside) により組換え蛋白の発現を誘導した。次に、組換え融合蛋白をニッケ

ルアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。さらに融合パートナー (trx) をエンテロキナーゼにより切断した。発現、精製および酵素消化後の組換え蛋白を電気泳動および標識ヒト IGF-1 を用いたリガンドプロットングにて解析した。

(4) 組換え IGFBP の機能解析

脳下垂体細胞培養系を用いて、精製した組換え融合 IGFBP-1a と -1b を IGF-1 と複合添加して効果を調べた。

4. 研究成果

(1) GH 測定系の確立

GH の TR-FIA では、良好なスタンダードカーブが得られ、脳下垂体培養液とも交差性を示した (図 1)。しかし、培養液にはビオチンが含まれていることが分かったため、測定の際には全てのウェルに同一量の培養液を添加することにした。結果、培養液中の GH 蛋白量の定量が可能となった。

gh mRNA 測定のための qPCR においても良好なスタンダードが得られた。

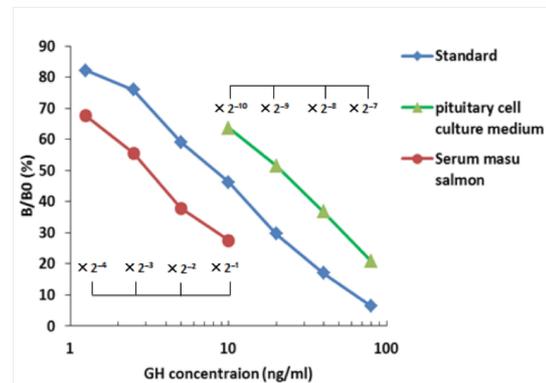


図 1. GH TR-FIA のスタンダードカーブ、培養液と血清の希釈系列。

(2) 初代脳下垂体細胞培養系の確立

連携研究者とともに未成熟サクラマス 1 年魚の初代脳下垂体培養系の最適化を行なったところ、3 日間は良好に培養できることが分かった。

この系にサケ IGF-1 (sIGF-1) を添加し、GH 抑制効果を調べた。結果、sIGF-1 は添加量依存的に有意に GH 分泌量を低下させ、未熟魚の雌雄では明瞭な違いは認められなかった。

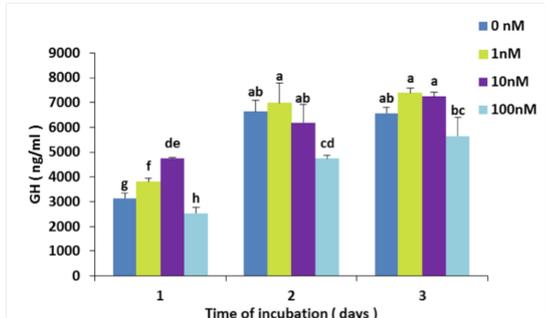


図 2. 脳下垂体培養系における IGF-1 の GH 分泌の抑制効果。

一方、脳下垂体 gh mRNA 量については sIGF-I 添加により減少傾向が認められたものの、有意ではなかった。また、培養日数が経過するにつれ、対照群の GH 分泌量が減少したことから、sIGF-I の効果を調べるには培養日数が短い方が適していると考えられた。

次に、sIGF-I とヒト IGF-I (hIGF-I) の効果を比較した。両者とも濃度依存的に脳下垂体からの GH 分泌量を減少させ、その効果は低濃度の sIGF-I でやや強いことが示唆された。一方、gh mRNA は両 IGF-I の添加により減少する傾向に留まったことから、IGF-I による GH 抑制効果は主に分泌レベルで働いていることが示唆された。

(3) 組換え IGFBP の作製と精製

クローニングしたサクラマス IGFBP-1a と -1b を In Fusion 法によって発現ベクター (pET32a) にサブクローニングした。そして、大腸菌を形質転換した。IPTG 添加によって組換え蛋白の合成を誘導させたところ、目的の位置にバンドが認められた。次に蛋白質の抽出を行ったが、組換え蛋白は可溶性画分よりも不溶性画分に多く検出された。そのため、不溶性画分を回収して尿素により可溶化させ、その後透析により巻き戻した。続いてこの画分をニッケルカラムに吸着させ、イミダゾールにより溶出して精製した。

精製した組換え融合 IGFBP をエンテロキナーゼにより限定分解し、His タグおよび trx を分離した。酵素処理後の試料を電気泳動で解析したところ、IGFBP-1a では 28 kDa、IGFBP-1b では 22 kDa の位置にバンドが認められ、インタクトに近い組換え IGFBP が得られたと考えられた (図 3)。さらにこれらの試料を標識 hIGF-I を用いたりガンドプロットングに供したところ、目的の位置にバンドが検出された。これらの結果から、融合蛋白から分離され、IGF 結合能を持った組換え IGFBP-1a と -1b が作製されたと判断した。IGFBP-1a に関しては、酵素消化後のバンドは明瞭であり、回収率も高いと考えられた。

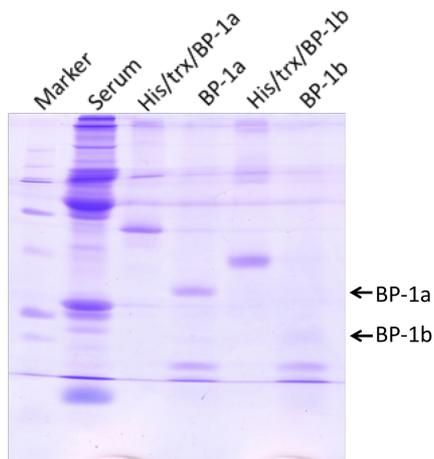


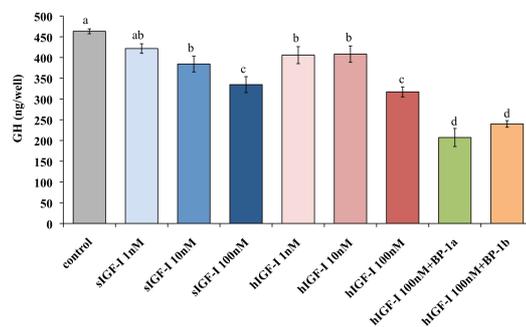
図 3. 組換えサケ IGFBP-1a と -1b の作製

一方、IGFBP-1b に関しては、酵素処理を行うと電気泳動上のバンドが弱くなることから、IGFBP-1b は染色性が低いか、酵素によって部分分解されている可能性が考えられた。今後、酵素切断部位が異なる発現ベクターを用いることにより、組換え IGFBP-1b の回収率の向上が期待できる。

(4) 組換え IGFBP の機能解析

組換え融合 IGFBP-1a と -1b に良好な IGF 結合能が確認されたため、脳下垂体培養系を用いてこれらの機能解析を行った。IGF-I に組換え IGFBP-1a もしくは -1b を複合添加したところ、IGF-I の GH 分泌抑制効果が増強された。IGFBP-1 タイプは従来 IGF-I 作用の阻害型と考えられていたが、本研究の結果は予想に反するものであった。この結果は、サケ科魚類の血中 IGF-I 活性の阻害型と考えられている IGFBP-1a と -1b は、状況によっては促進型としても機能しうることを示唆している。今後さらに詳細に機能を解析することにより、魚類の成長における IGFBP の役割が明らかになると考えられる。

GH release (24h)



gh expression

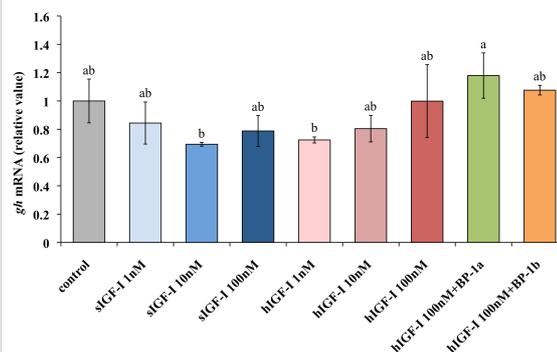


図 4. 脳下垂体培養細胞の GH 分泌 (上段) と mRNA (下段) におよぼす IGF-I と組換え IGFBP-1a と -1b の影響

以上、本研究では、サクラマス未熟魚の初代脳下垂体培養系と GH 測定系を確立するとともに、大腸菌発現系を用いて機能的な組換えサケ IGFBP-1a と -1b の作製を行った。そして、培養系と組換え蛋白を用いた解析から、

サケ科魚類において IGFBP-1 が IGF-I 活性を阻害するだけでなく、状況によっては促進する可能性を初めて示唆した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Fukuda, M., Kaneko, N., Kawaguchi, K., Hevrøy, E.M., Hara, A., and Shimizu, M. (2015) Development of a time-resolved fluoroimmunoassay for salmon insulin-like growth factor binding protein-1b. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* (in press). DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.04.016 [査読あり]

Hevrøy, E.M., Hunskaar, C., de Gelder, S., Shimizu, M., Waagbø, R., Breck, O., Takle, H., Sussort, S., and Hansen, T. (2013) GH-IGF system regulation of attenuated muscle growth and lipolysis in Atlantic salmon reared at elevated temperatures. *Journal of Comparative Physiology B* 183:243-259. DOI: 10.1007/s00360-012-0704-5 [査読あり]

Kawaguchi, K., Kaneko, N., Fukuda, M., Nakano, Y., Kimura, S., Hara, A., and Shimizu, M. (2013) Responses of insulin-like growth factor (IGF)-I and two IGF-binding protein-1 subtypes to fasting and re-feeding, and their relationships with individual growth rates in yearling masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 165:191-198. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.02.029 [査読あり]

[学会発表](計4件)

Munetaka Shimizu, Kohei Kawaguchi, Miki Fukuda, Nobuto Kaneko, and Yusuke Nakano. Two insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 subtypes as negative growth indices in salmon. 11th International Congress on the Biology of Fish (Heriot-Watt University, Edinburgh, UK), August 6, 2014

福田美樹・川口航平・木村志津雄・原 彰彦・清水宗敬、サケ科魚類のインスリン様成長因子結合蛋白の免疫測定法の確立と成長との関係、第7回サケ学研究会、北海道大学(札幌、北海道)、平成25年12月22日

川口航平・福田美樹・中野裕介・木村志津雄・原 彰彦・清水宗敬、サクラマス2種類のインスリン様成長因子結合蛋白-1の絶食・再給餌に対する反応と成長率との関係、

平成25年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学(品川、東京)、平成25年3月28日

Munetaka Shimizu, Seira Suzuki, Keisuke Kishimoto, Teppei Yamaguchi, Akihiko Hara. Circulating salmon insulin-like growth factor binding proteins: Duplication matters. 7th International Symposium on Fish Endocrinology (NH City & Tower, Buenos Aires, Argentina), Sept 3-6, 2012

[図書](計4件)

Shimizu, M. Insulin-like growth factor-I. In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology (Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K., eds.), San Diego:Elsevier 2015 (in press).

Shimizu, M. Insulin-like growth factor-II. In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology (Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K., eds.), San Diego:Elsevier 2015 (in press).

Shimizu, M. Insulin-like growth factor binding proteins. In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology (Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K., eds.), San Diego:Elsevier 2015 (in press).

清水宗敬、サケの成長をモニタリングする、サケ学大全(帰山・永田・中川編:北海道大学出版会、北海道札幌)、2013年、296(113-116)

[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

<http://www.geocities.co.jp/CollegeLife/3845/ms-topj.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 宗敬 (SHIMIZU, Munetaka)
北海道大学・大学院水産科学研究院・講師
研究者番号: 90431337

(3)連携研究者

安東 宏徳 (ANDO, Hironori)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号: 60221743