

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580273

研究課題名(和文) 生殖腺刺激ホルモンによるマダイの初回成熟機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the puberty of red seabream with special reference to gonadotropins

研究代表者

奥澤 公一 (OKUZAWA, Koichi)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主幹研究員

研究者番号：00211813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の性成熟が開始する過程で中心的な役割を担う2種類の生殖腺刺激ホルモン(GTH)のうち、これまでは限られた種類の魚でしか確立していなかった濾胞刺激ホルモン(FSH)の濃度測定法をマダイについて新たに開発し、マダイFSHの分泌動態や分泌制御を調べ、マダイでは生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンはFSH分泌を促進しないことを明らかにした。また、マダイのFSHともう一つのGTHである黄体形成ホルモン(LH)を恒常的に発現する細胞株を樹立し、数十ミリグラムレベルの組換えホルモンを作製することに成功した。今後はこのホルモンを用いたFSHおよびLH作用の詳細の解明と成熟促進技術の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The two gonadotropins, follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), play pivotal roles in the puberty in fish. We have newly established the method for measuring the FSH of the red seabream and elucidated the seasonal changes of FSH concentrations in the plasma of the red seabream with this method. Also, we found that gonadotropin-releasing hormone stimulates LH secretion but does not stimulate FSH secretion from the pituitary in the red seabream through the several in vivo and in vitro studies. In addition, we have established two stable cell lines that secrete FSH and LH of the red seabream, respectively and succeeded in obtaining sufficient amount of recombinant hormones (30 - 60 mg) that can be utilized for the studies for artificial induction of sexual maturation in 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：マダイ 生殖腺刺激ホルモン ラジオイムノアッセイ 組換えタンパク 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

生物にとって生殖は子孫を残すための極めて重要な生命活動である。自己の遺伝子をより多く子孫に伝え永続させるために生物種ごとに多様な繁殖戦略が展開されている。とりわけ「どの程度成長してから繁殖に参加すべきか?」という選択は繁殖戦略上の重要課題である。体が大きければ配偶者をめぐるライバルとの闘争に有利であり、また卵や精子もより多く作ることが可能となる。一方で体を大きくするためにはそれなりの時間がかかるので、成熟可能サイズに達する前に死亡するリスクが高まり、成長した後は大きな体を維持するためのコストがかかる。また、一世代が長くなることにより進化速度が遅くなり環境への適応が難しくなるデメリットがある。

未熟な生物が生涯で初めて成熟する過程である初回成熟(春機発動期の到来、puberty)は成熟可能体サイズ、成熟可能年齢と深く関連しているが、その制御機構については魚類ではほとんどわかっていない。もし初回成熟の機構が解明できれば生物学上の大きな進歩であると同時に水産養殖業への多大な貢献が期待できる。現在、魚介類の中でも代表的な食材となっているマグロ類、中でも最高級のクロマグロの親は体長2m、体重300kg以上に達する、また鍋料理の材料として珍重される高級魚であるハタの仲間クエの雄は成熟するまでに10年近くを要する。そのためこれらの魚種では養殖を行うために必要な稚魚(種苗)を得るための親魚を飼育して産卵させるために莫大なコストがかかることが大きな問題となっている。魚類における初回成熟の機構が解明されればこれらの魚を小型・若齢で成熟・産卵させることが期待され、水産養殖業界に多大な貢献となる。

魚類の成熟・産卵は他の脊椎動物と同様、視床下部 脳下垂体 生殖腺軸と呼ばれる内分泌系により支配されている。視床下部、脳下垂体、生殖腺のいずれもが重要な役割を担っており、どこかの機能が不全に陥ればその個体は配偶子(卵、精子)を作ることができず、子孫を残すことができなくなる。ところが魚類の生殖内分泌学においてはその重要性にもかかわらず適切な研究手法が無いために進展していない研究領域が存在しており、その中でも最も重要なものが生殖腺刺激ホルモン(GTH)に関する研究である。特に濾胞刺激ホルモン(FSH)に関してはサケ科魚類とティラピアを除いて測定系が開発されておらず、他の魚種ではその分泌動態や制御機構については全く研究されていない状態であり魚類生殖内分泌学の発展を阻害する大きな要因となっている。

サケ科魚類での研究によれば、FSHは性成熟の初期に働くホルモンとして知られている。雌ではFSHの刺激により卵巣で性ステロイドホルモン(主としてエストラジオール

-17、 E_2)が作られ、この E_2 の作用により肝臓で卵黄タンパク質前駆体が産生され卵に取り込まれることで卵が成長する。つまり、初回成熟のメルクマールとなる現象がFSHの分泌開始であると考えられる。

近年、組換えタンパク質作製技術の進歩によりFSH測定系開発に必要な十分量の組換えFSHタンパクが得られるようになってきた。われわれは共通のサブユニットを持つためにこれまで困難であった、FSHと黄体形成ホルモン(LH)を血液中、脳下垂体中などで特異的に測り分けるための独創的な着想を得た。すなわち、FSHとLHに共通であるサブユニットを別の動物種(ウサギ)のものに置き換えたキメラタンパクを人為的に合成し、これを家兔に免疫して抗体を作製すればウサギのサブユニットに対する抗体は生成せずFSH、LHのそれぞれに特異的な抗体を得ることができるはずである。このようにして得た特異抗体を用いてFSH、LHに特異的な放射免疫測定法(ラジオイムノアッセイ、RIA)を開発することで、これらホルモンの動態、制御機構、機能の解明が可能となる。

2. 研究の目的

魚類の初回成熟機構を解明するため、魚類の生殖腺の発達を直接制御している2種類のGTH、すなわち、FSHとLHの特異的かつ高感度な測定系を開発し、それらの分泌動態および制御機構を解明する。とりわけ未解明な点が多いFSHに着目し、マダイを材料として魚類において初回成熟がFSHおよびLHによりどのように制御されているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マダイの2種類のGTH(FSHとLH)測定系の開発

マダイのFSH鎖およびLH鎖をコードするcDNAとウサギの糖タンパクホルモン鎖をコードするcDNAを連結し発現ベクターを構築した。これをヒト腎臓293細胞に導入し発現させて組換えキメラFSHおよびLHを作製した。これを家兔に免疫して得た抗血清と以前にマダイ脳下垂体から精製したFSHおよびLH標品を用いてRIAを開発した。

(2) マダイ初回成熟過程のGTHの分泌動態の解明

増養殖研究所の地先海面に設置した網生け簀で初回成熟前のマダイ(実験開始時において1歳魚)を飼育し、2011年10月から翌年10月まで1~2ヶ月おきに魚を取り上げて脳下垂体中と血液中のFSHおよびLH濃度を測定した。同時に性ステロイドホルモンの分泌動態や生殖腺の発達過程を調査した。

(3) 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が脳下垂体からのFSHとLHの分泌に及ぼす影響

GnRHは視床下部の神経細胞でつくられ、神経分泌により脳下垂体に作用してFSHとLHの

分泌を促進するとされているが魚類でのその作用には未だ不明な点が多い。そこで未成熟魚と産卵期の成熟魚に GnRH を投与し FSH と LH の分泌に及ぼす影響を調べた。

2011年11月に未熟なマダイ1才魚に対し、GnRH アナログ (250 µg/kg 体重) をコレステロールペレットにして背部筋肉中に投与し、7日後に採血して血中 FSH および LH 濃度を測定し、対照群 (GnRH アナログ投与なし) と比較した。

2012年5月に産卵期にある成熟した4歳雄魚 (体重3 kg) に対し、GnRH アナログを生理食塩水に溶解して体重1 kg あたり 100 µg を腹腔内に投与した。投与後経時的に採血して血漿中の FSH および LH 濃度を測定した。

2013年3月に成熟した雄マダイから脳下垂体を取りだしトリプシン消化により細胞を分散させ 24 穴プレートに一穴あたり 2.5×10^5 個の細胞を入れ 15 で2日間培養した。その後、培養液を交換し GnRH アナログを 10pM から 10nM までの濃度範囲で加えて 15 で4時間培養し培養液中に放出された FSH と LH を測定した。

(4) 組換えマダイ FSH および LH の作製と未熟マダイへの投与実験

魚類の FSH と LH の作用については未だ不明な点が残されている。特に FSH については投与に用いる適当なホルモン剤が存在していなかったため、その役割については遺伝子発現動態からの推測の域をでていない。そこで、生体への投与実験に用いることができる量の組換えマダイ FSH と LH をほ乳類の培養細胞を使って作製しマダイ未成魚への投与実験を行った。

4. 研究成果

(1) マダイの2種類のGTH (FSH と LH) 測定系の開発

FSH については十分な力価の抗血清が得られたが LH については抗血清の力価が不十分であったので FSH のみについてRIAを開発した。このRIAにおいて、マダイ脳下垂体抽出液の希釈系列は標準品の希釈系列と平行になった。またマダイ LH をほとんど認識せず、FSH との交差率は $B/B_0=50\%$ となる濃度の比較で 1.5% 以下であった (図1)。また検出限界はおよそ 1 ng であり、マダイ血液中の FSH 濃度測定が可能であった。

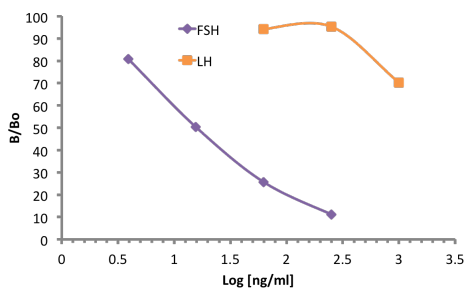


図1. マダイ FSH RIA における FSH と LH の交差性

LH については以前に開発したRIAを用いて以下の実験の濃度測定を行った。

(2) マダイ初回成熟過程のGTHの分泌動態の解明

調査した満1歳から2歳のマダイは、卵巣を持つ雌個体と精巣または両性生殖線を持つ個体 (マダイは幼時雌雄同体) に分かれたので、雌個体と雄ないし雌雄同体個体 (以後便宜的に雄と記す) に分けて解析した。雄の血漿中の FSH および LH 濃度は産卵期 (4月) と8月に高い傾向が見られた (図2)。雌では血漿 FSH は顕著な変化を示さず、血漿 LH は雄と同様に産卵期と8月に高い傾向があった。雄の脳下垂体中の FSH 含量は1歳の10月から4月まで上昇し6月に低下した後再び8月に高値を示した。一方脳下垂体 LH 含量は2、3、4月に高く、それ以外の月は低かった。雌の脳下垂体中の FSH 含量は雄に比べて 1/2 から 1/13 程度と低く顕著な変化は見られなかった。LH については雄同様2月から4月に高かった。

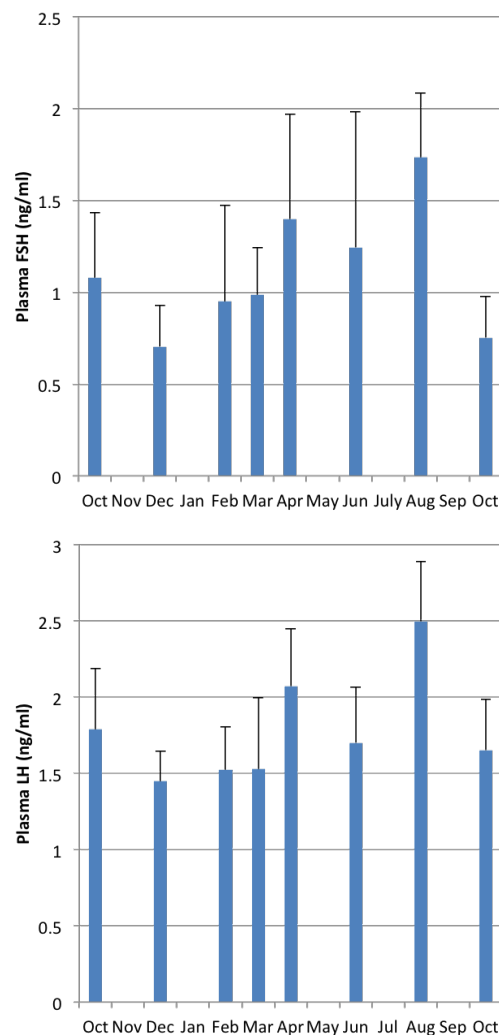


図2. マダイ初回成熟過程における血漿中の FSH (上) および LH (下) 濃度の季節変化

産卵期に雄の血漿および脳下垂体中の FSH と LH および雌の LH 濃度が高いことは性成熟にともなう両ホルモンの産生および分泌の高進と考えられるが、産卵期が終了して3ヶ月ほ

どたった 8 月に血中ホルモン量が高くなることに関してはその生理的意義やメカニズムは不明であり今後さらに解明が必要である。

(3) 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) が脳下垂体からの FSH と LH の分泌に及ぼす影響

未熟魚への *in vivo* 投与

GnRH アナログ投与により血中 LH 濃度は顕著に増加したが FSH 濃度は増加しなかった (図 3)

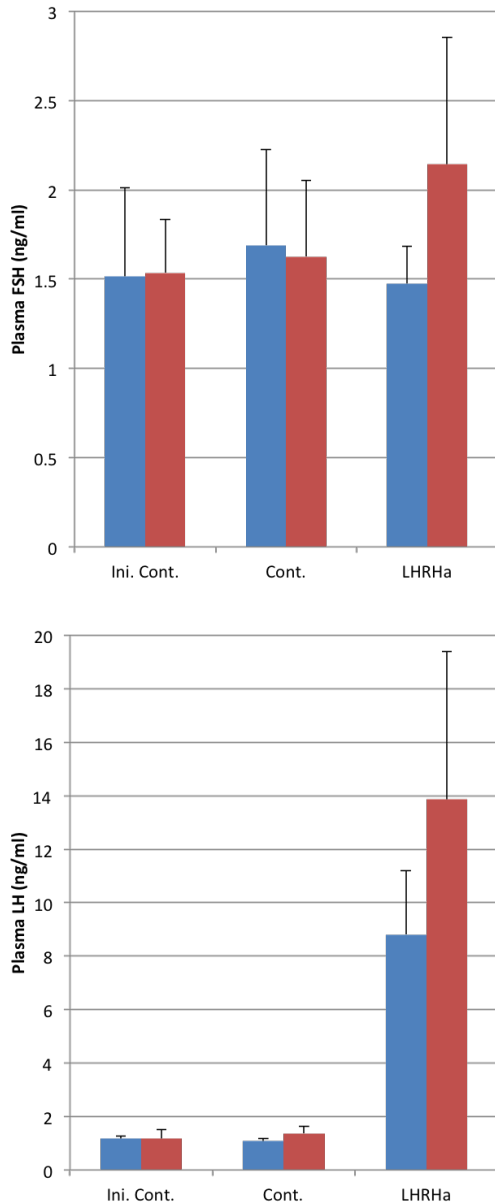


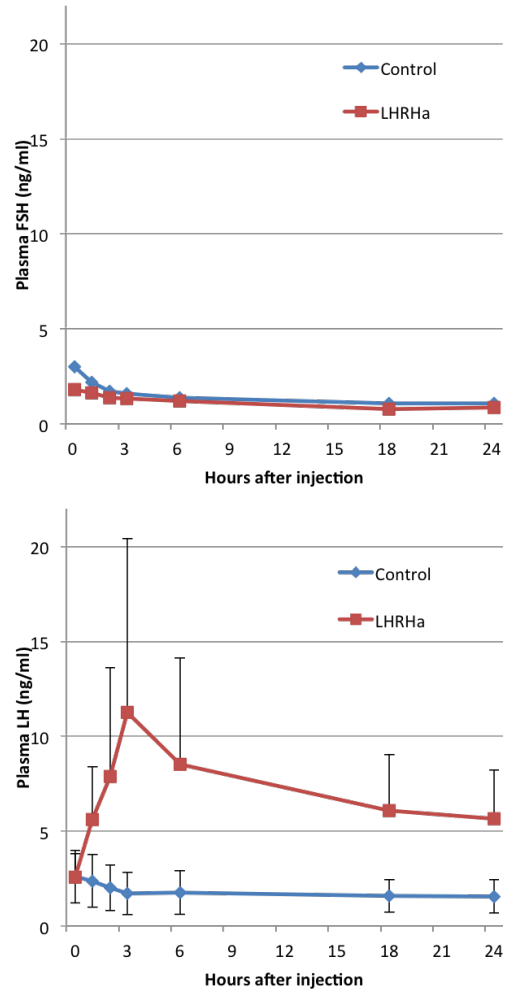
図 3 . マダイ未熟魚 (1 歳魚) への GnRH アナログ投与が血漿中の FSH (上) と LH (下) 濃度に及ぼす影響。赤は雌、青は雄または両性生殖腺を持つ個体。Ini. Cont.: 実験開始時、Cont.: 対照区 (投与なし)、LHRHa : LHRH アナログ投与区

産卵期の成熟雄への *in vivo* 投与

GnRH アナログ投与により血漿中の LH 濃度は急上昇し、投与 3 時間後に 10 ng/ml 以上となった。その後緩やかに減少したが投与 2 4 時

間後にも 5ng/ml 以上の高い値であった。一方血漿中の FSH 濃度には変化が見られなかった (図 4)

図 4 . 産卵期の成熟雄 (4 歳魚) への GnRH アナログ



in vivo 投与が血漿中の FSH (上) および LH (下) 濃度に及ぼす影響

脳下垂体細胞培養系を用いた *in vitro* 投与実験において GnRH アナログにより LH は濃度依存的に分泌が促進されたが FSH の分泌は促進されなかった。以上の 3 つの実験から、マダイにおいては FSH は GnRH による分泌促進を受けないことが強く示唆された。

(4) 組換えマダイ FSH および LH の作製と未熟マダイへの投与実験

魚類の初回成熟における GTH の役割を解明するため、GTH 投与によるマダイの初回成熟誘導を試みた。実験に必要な 2 種類の GTH (FSH と LH) を作製するため、マダイ FSH および LH をほ乳類の培養細胞で恒常的に発現する細胞株を樹立し、この細胞の培養液約 10 L から 30mg の FSH と 65mg の LH を作製した。マダイの産卵期に、初回成熟前の体重 600 ~ 900g のマダイを用いて、作製した組換え FSH または LH、2 mg/尾をリン酸緩衝液に溶解し、

浸透圧ポンプに入れマダイの腹腔内に投与した。この方法で約0.1mg/日のホルモンが魚に供給される。対照群としてリン酸緩衝液を同様に投与した。同時に、マダイの初回成熟誘導に有効なことが知られている GnRH アナログをコレステロールペレットにしてマダイの背筋中に埋め込んだ。各実験区雌雄合わせて10個体を用いた。投与から2週間後に魚を解剖し生殖腺の発達を調べたところ、FSH、LHいずれの投与区においても対照区との差は認められなかった。一方 GnRH アナログを投与した個体では著しい生殖腺の発達が観察された。本研究の成果により GnRH アナログはマダイでは LH のみを分泌させることが解明されている。今回の実験ではホルモンの投与量が十分ではなかったことも考えられる。本研究によりこれまで不可能だったマダイ FSH の測定が可能になり、マダイでは GnRH は LH のみを分泌させ FSH を分泌させないことを明らかにした。GnRH はマダイの雌に初回成熟を誘起できるので、マダイ雌では LH のみで未熟な状態から完全に成熟するまでの過程を誘起できることになる。今後はこのような現象が他の魚種にも当てはまるのかについて検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1件)

奥澤 公一・風藤 行紀・田中 秀樹・
玄 浩一郎・山口 寿哉・宇治 督、マ
ダイ濾胞刺激ホルモンのラジオイムノア
ッセイの開発、平成24年度日本水産学
会春季大会、2012年3月27日、東
京海洋大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥澤 公一 (OKUZAWA, Koichi)
水産総合研究センター・増養殖研究所・主
幹研究員
研究者番号：00211813

(2) 研究分担者

玄 浩一郎 (GEN, Koichiro)
水産総合研究センター・西海区水産研究
所・主任研究員
研究者番号：80372051

風藤 行紀 (KAZETO, Yukinori)
水産総合研究センター・増養殖研究所・
主任研究員
研究者番号：60399996

田中 秀樹 (TANAKA, Hideki)
水産総合研究センター・増養殖研究所・
グループ長
研究者番号：00372029