

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15322

研究課題名(和文)海産魚マサバをモデルとした生殖における魚類レプチンの機能解析

研究課題名(英文)Studies on the leptin function in the reproduction of chub mackerel

研究代表者

大賀 浩史(Ohga, Hirofumi)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：60792299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、栄養情報ホルモンであるレプチンが、水産重要種のマサバの生殖腺発達に与える影響を調べた。組換えレプチンを作製し、(1)脳下垂体初代培養細胞を用いたin vitroバイオアッセイ、(2)初回成熟前の雌個体への筋中投与、および(3)脳室内(ICV)投与を行った。レプチン刺激は脳下垂体細胞からの生殖腺刺激ホルモン(GTH)分泌を強く誘発した。筋中へのレプチン投与は卵巣発達を促進し、初回成熟を早期に誘導した。ICV投与は、GTH放出ホルモン(GnRH)とGTH遺伝子発現量を有意に上昇させた。レプチンがマサバの生殖軸活性化および初回成熟開始の重要なシグナルであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

初回成熟には、十分な栄養状態が必須である。脂肪細胞から分泌されるレプチンは、現在の栄養情報を生殖軸に伝えることで、成熟開始の可否を決める重要なホルモンであることが哺乳類で知られている。本研究では、魚類の生殖にもレプチン情報が極めて重要であることを初めて示した。また、レプチン投与が生殖腺の発達を促進し初回成熟を早期化に誘導することを示した。これらの知見は、魚類の繁殖制御システムの解明において、有用な学術的知見を提供するものである。また、水産重要種の養殖における、成熟の人為的制御および成熟早期化技術につながる基礎的な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated the effect of leptin stimulation on important reproductive factors and ovarian development in marine teleost chub mackerel (*Scomber japonicus*). Recombinant leptin was prepared and the following three tests were conducted for functional analysis: (a) in vitro bioassay using primary pituitary cells, (b) chronic leptin treatment for pre-pubertal females, and (c) intracerebroventricular (ICV) administration. Leptin stimulation strongly induced gonadotropin secretion from pituitary cells collected from pre-pubertal females. Chronic leptin treatment significantly promoted ovarian development and triggered pubertal onset. ICV leptin administration significantly upregulated gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin synthesis in sexually immature females. These results strongly suggest that leptin is an important signal for reproductive axis activation.

研究分野：魚類繁殖生理学、水産学

キーワード：完全養殖 初回成熟の早期化 生殖内分泌学

1. 研究開始当初の背景

哺乳類で脂肪組織より分泌されるレプチンは、視床下部へ運ばれ、食欲の抑制および代謝調整や、個体の恒常性の維持に関与するホルモンとして知られている。一方で、レプチンは性機能へ分配できる現在の体内エネルギー量を生殖系へ伝え、成熟開始の可否を決める重要な役割をもつ。

最近、魚類でもレプチンとその受容体遺伝子が同定されており、魚類レプチンは哺乳類と異なり主に肝臓で発現することや、いくつかの魚種では 2 種類のレプチンが報告されている。しかし、組換えレプチンを含めた魚類の先行レプチン研究のほとんどが、食欲・代謝調節に関するものであり、性機能の調節に関するレプチン機能の研究は未だ報告がなかった。

これまでに我々は、マサバを海産有用種のモデルと位置づけ、性腺軸における重要因子に関する基盤情報の整備を行っており、2 種類のレプチン (*lepa* と *lepb*) およびレプチン受容体 (*lepr*) の同定に成功していた。

タンパク質立体構造の予測モデルより、マサバの 2 種レプチンは哺乳類のレプチンと極めて近似した構造を示し、他魚種の報告同様、主に肝臓での遺伝子発現が認められた。さらに、遺伝子量を初回成熟期間にわたって測定したところ、雄個体では肝臓の *lepa* は性成熟ステージの進行に伴って増加し、脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン (GTH) 遺伝子量の増加と強い相関を示した。以上の結果は、マサバでも哺乳類同様、性腺軸の活性化におけるレプチンの関与を積極的に支持する可能性を示唆している。しかし、研究開始当初では限られた条件・標本における発現遺伝子の定量を行ったのみであり、性成熟の調節におけるレプチンの機能のより詳細な検討を必要としていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、マサバを有用海産魚種のモデルとして、レプチンが性腺軸の活性化に与える影響について、組換えホルモンの作製や細胞組織学的な解析をとおして明らかにした。

3. 研究の方法

組換えホルモンの作製

タンパク質レベルでの各種機能解析を目的として、マサバレプチンの組換えホルモンの作製を行った。作製した組換えレプチンの活性は、哺乳類細胞に発現させたマサバ LepR に対するシグナル伝達能を指標に評価した。

脳下垂体初代培養細胞を用いた *in vitro* バイオアッセイ

マサバのレプチンが脳下垂体における 2 種の GTH (濾胞刺激ホルモン: FSH と黄体形成ホルモン: LH) 放出に与える影響を明らかにするために、脳下垂体初代培養細胞への組換えレプチンの添加による *in vitro* バイオアッセイを行った。培地中に放出された FSH と LH 量を定量した。

未成熟魚への組換えレプチンの長期投与

レプチンが生殖腺の発達に与える影響を評価するために、初回成熟前の未成熟魚に対し組換えレプチンを 3 日ごとに 4 回、筋中投与した。

組換えレプチンの脳室内評価

マサバのレプチンが生殖内分泌軸の各種重要因子に与える影響を評価するために、未成熟魚の脳室内に組換えレプチンを投与した。脳内視索前野の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン 1 型 (GnRH1) および脳下垂体の FSH と LH 遺伝子量を qRT-PCR 法により定量した。

4. 研究成果

大腸菌発現系を用いて組換えレプチンの作製を行った。ポリアクリルアミド電気泳動の結果、標的タンパク質の推定分子量 (17.997 kDa) に強いバンドが観察された。最終的に目的の組換えタンパク質を約 9.7 mg 取得した。レポーター遺伝子アッセイの結果、作製した組換えレプチンは、濃度依存的な細胞内シグナル伝達能を示した。

複数の初回成熟過程の雌個体より収集された脳下垂体から初代培養系を作製し、組換えレプチンを添加した。初回成熟前の脳下垂体では、レプチン濃度依存的に FSH と LH の基礎分泌が増加した。対照的に、初回成熟直後 (卵黄形成の初期から中期) の脳下垂体では、FSH および LH の基礎分泌量は変化しなかった。成熟個体の脳下垂体では 1 nM のレプチン添加により FSH 分泌量が有意に増加したが、反応強度は初回成熟前の脳下垂体と比較して低かった。レプチンは成熟個体の LH 分泌には影響を与えなかった。

初回成熟前の雌個体への長期的なレプチン投与では、レプチン投与群は対照群と比較して有意に高い生殖腺重量指数を示した。また、レプチン投与群において、最も発達した卵の平均直径

は対照群の平均直径よりも有意に大きく、組織学的分析により、卵黄蓄積を開始している個体の割合が高いことが認められた。

組換えレプチンの脳室内への投与は、未成熟期の雌成魚の脳下垂体における FSH および LH の b サブユニット遺伝子量を有意に増加させた。また、脳内視索前野における GnRH1 遺伝子量を有意に増加させた。

本研究では、硬骨魚類であるマサバにおいても哺乳類同様に、栄養情報ホルモンであるレプチンが生殖軸の活性化および初回成熟の誘導に重要な役割を果たすことを初めて示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohga H, Ito K, Matsumori K, Kimura R, Ohta K, Matsuyama M	4. 巻 292
2. 論文標題 Leptin stimulates gonadotropin release and ovarian development in marine teleost chub mackerel	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi-org.anywhere.lib.kyushu-u.ac.jp/10.1016/j.yggen.2020.113442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirofumi Ohga, Kojiro Matsumori, Ryuto Kimura, Hajime Kitano, Keishi Sakaguchi, Kohei Ohta, Michiya Matsuyama
2. 発表標題 Leptin potentially leads to puberty via follicle-stimulating hormone regulation in chub mackerel, a scombroid teleost
3. 学会等名 8th Intercongress symposium of the Asia and Oceania Society for the Comparative Endocrinology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大賀浩史、松森皇士郎、木村龍人、北野載、坂口圭史、太田耕平、松山倫也
2. 発表標題 マサバの初回成熟におけるレプチンの機能解析
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会仙台大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大賀浩史、松森皇士郎、北野載、坂口圭史、太田耕平、松山倫也
2. 発表標題 マサバ組換えレプチンの機能推定 - 初回成熟過程のGTH放出に対する影響について -
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大賀浩史、松森皇士郎、松山倫也
2. 発表標題 マサバ脳下垂体初代培養細胞からのGTH分泌に及ぼすレプチンの影響
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤晃輔、大賀浩史、松森皇士郎、太田耕平、松山倫也
2. 発表標題 マサバレプチンの生体投与が生殖内分泌軸に与える影響
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大賀浩史、伊藤晃輔、松森皇士郎、太田耕平、松山倫也
2. 発表標題 魚類の初回成熟における栄養情報：レプチン刺激はマサバのGTH放出と卵巣発達を促進する
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会埼玉大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----