

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19227

研究課題名(和文)抗体を用いた魚類性成熟制御法の開発

研究課題名(英文)Regulation of sexual maturation of fish by using gonad specific antibodies

研究代表者

近藤 秀裕(Kondo, Hidehiro)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：20314635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生殖腺刺激ホルモン受容体に特異的に結合する特異抗体を応用し、生殖腺の発達を抑制する手法の開発を試みた。ウサギを免疫しニジマス生殖腺刺激ホルモン受容体に対する抗血清を調製し、ここからIgGを精製したものを特異抗体として実験に用いた。本抗体を魚に投与し約6ヶ月飼育したところ、抗体を投与した個体において成長の亢進がみられたものの当初の仮説とは逆に生殖腺の発達は促進された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類養殖では生殖腺の発達が生産物の価値および品質に影響を及ぼすことがある。養殖魚において生殖腺の発達を制御することができれば効率的な生産が可能となることが期待される。本研究では、生殖腺刺激ホルモンに対する抗体を用いた生殖腺の発達制御を試みたが、残念ながら本抗体では魚類生殖腺の発達を阻害することができなかった。生殖腺の発達は生殖細胞の分化に伴い起こるため、今後、生殖細胞そのものを標的とした生殖腺発達の阻害手法の開発を検討している。

研究成果の概要(英文)：The value and quality of aquaculture products are strongly affected by the gonadal development of fish. The control of gonadal development may allow us to produce the fish more efficiently. In this study, we attempted to develop a method to control the gonadal development of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by administering specific antibodies against the gonadotropin receptors. We developed the specific antiserum against the fish follicle stimulating hormone and luteinizing hormone by immunizing rabbits and purified the IgG as the specific antibodies. On 6 months after the first administration of the antibodies, the antibody injected fish were larger than the controls; however, the gonads in the fish were more developed.

研究分野：魚介類免疫学

キーワード：バイオテクノロジー 抗体 魚類生殖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

魚類養殖において魚の卵巣や精巣といった生殖腺は、それ自体が食品として価値を持つ場合を除いて、非可食部として廃棄されてしまう。生殖腺が発達すると、養殖魚の筋肉中の脂肪が落ちてしまうなどの影響により呈味が落ちることから、魚体の商品価値が低くなってしまふことがある。したがって、養殖魚の生産現場では魚種によっては生殖腺が発達する時期には出荷を抑えることもある。さらに、生殖腺の発達は個体のエネルギーを消費させることから、成長を抑制する。実際、不妊である三倍体個体は通常の個体よりも大きくなる傾向にある。このように魚類において生殖腺の発達を制御することができれば効率的な養殖生産が可能となることが考えられる。生殖腺を発達させないための方法として、遺伝子組み換えや三倍体化などが考えられるが、全ての養殖対象魚種にこれらの技術を応用することは難しい。

脊椎動物の獲得免疫系は、自身の情報伝達物質に対して特異的な抗体を産生することにより、生体に影響を及ぼしてしまうことがある。このような現象を応用して、家畜のような哺乳類では不認可技術が開発されており、魚類においても生殖腺の発達に關与するホルモンの働きを阻害する抗体を作らせる試みがなされている。しかしながら、これまでの研究では、特異的な抗体を誘導した場合であっても、生殖腺の発達を顕著に阻害するまでには至っていない。魚類では免疫に伴う抗体応答はみられるものの、抗体価の十分な上昇がみられない場合が多く、上記の実験でも産生された特異的な抗体の量や質の問題で生殖腺の発達が完全に阻害されなかった可能性が考えられた。

抗体を用いて生体分子の機能を制御する方法として、ほ乳類を用いて作製した抗体を用いる研究が行われている。これは、特異的な抗体が標的分子と結合してその働きを阻害することにより機能阻害すると考えられる。ほ乳類の抗体は魚類のものに比べ、免疫に伴い抗体価が顕著に高くなることからより効果的に作用するものと考えられる。近年、魚類特異的な免疫グロブリンである免疫グロブリン T (IgT) の機能を解析するため、IgT に対するモノクローナル抗体をニジマス個体に投与する実験が行われた (Takizawa ら、日本魚病学会 2017 春季大会)。この報告で著者らは、抗原特異的なモノクローナル抗体と、マウス抗体に対するニジマス抗血清を同時に投与することで、1 ヶ月以上に渡って IgT の発現を抑制することが可能なことを示した。この結果について申請者は、細胞膜上に存在する IgT にマウス抗体が結合し、その抗体を認識したニジマス抗体が IgT 産生細胞に対する免疫を活性化した結果、細胞の機能が長期に渡って阻害されたのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

上記の背景のもと申請者は、生殖腺に特異的に存在する細胞膜上のタンパク質に対するほ乳類特異抗体を継続的に投与することにより、生殖腺の発達を抑制できるのではないかと発想に至った。そこで本研究は、主要な生殖腺刺激ホルモンである脳刺激ホルモン (FSH) および黄体形成ホルモン (LH) を標的として、各受容体に結合するほ乳類抗体を作製し、これを魚類個体に投与することで魚類の生殖腺発達を阻害できるかどうかを調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ニジマス FSH および LH 受容体の細胞外ドメインをコードするアミノ酸配列より抗原部位を予測し、対応するペプチド断片をそれぞれ 2 本ずつ合成した。得られたペプチドを KLH とコンジュゲートしたものをういウサギを免疫し、得られた抗血清より Protein A カラムを用いて IgG 画分を調製した。

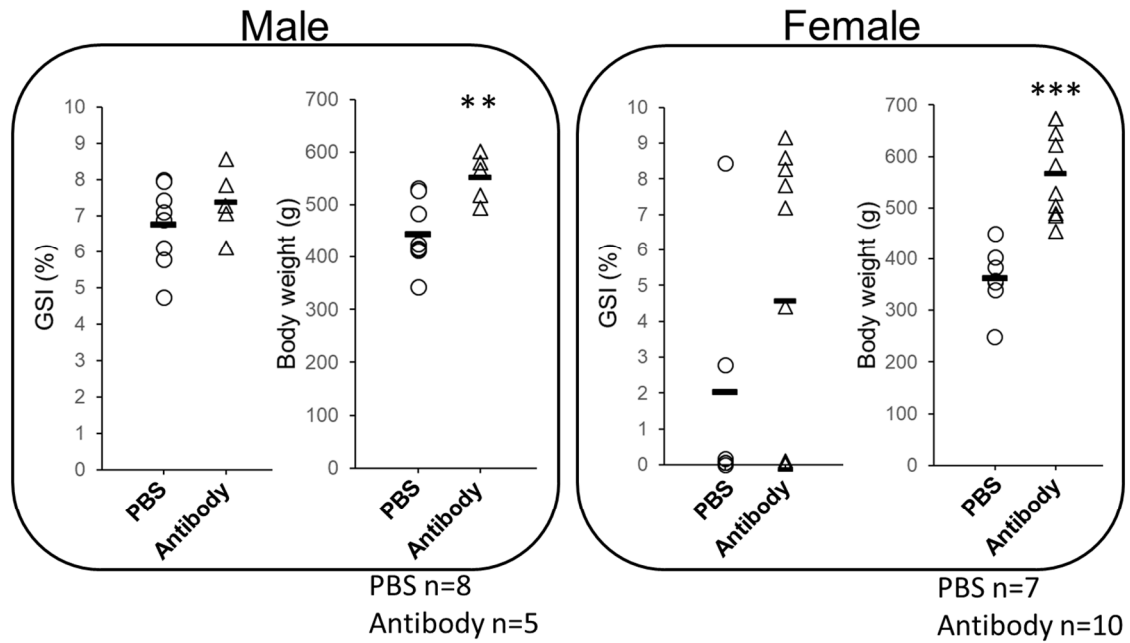
得られた抗体をそれぞれ 10 µg ずつ混合し、ニジマス (平均体長 19 cm、平均体重 136 g) 20 尾に投与した。対照区として生理食塩水を投与した区を設けた。1 回目の投与後、1 ヶ月おきに合計 3 回抗体を注射した。その後、約 3 ヶ月飼育した後、体長および体重を測定し、血液および生殖腺を採取した。血液は 4 度凝固させたものを遠心分離により血清を回収し、ウサギ IgG に対する抗体価を測定した。生殖腺は重量を測定した後、ブアン液により固定した。さらに組織切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオシン染色により形態観察を行い、生殖腺の発達段階を決定した。

### 4. 研究成果

得られた抗体を用い、ニジマス生殖腺に対して免疫染色を行ったところ、特に抗 FSH 受容体抗体でシグナルがみられた。雌雄それぞれの生殖腺由来の cDNA を鋳型として RT-PCR を試みたところ、未成熟の生殖腺ではいずれの遺伝子も発現を確認することができなかった。また、FSH 受容体遺伝子は成熟した精巣および卵巣で発現していたが、LHR はいずれにおいても発現が確認されなかった。

次に、得られた抗体を用いた投与実験を行った。抗体投与区および生理食塩水投与区のニジマスについて、最初の抗体接種から 146 日目後の体重および生殖腺重量を測定した。測定した体重および生殖腺重量から、除生殖腺体重および生殖腺重量比 (GSI) を求めたところ、除生殖腺重量は雌雄ともに抗体投与区で生理食塩水投与区に対して有意に高い値を示した (図 1)。しかしながら、生理食塩水区では寄生虫症が発生したため、このような成長の差が個体の投与によるものかどうかは不明である。一方、GSI は、オスではいずれの区の個体も 7% 程度と顕著な差は見られなかったものの、メスでは GSI が 7% 以上となった個体

が抗体投与区で 10 尾中 5 尾がであったのに対し、生理食塩水投与区では 7 尾中 1 尾しかみられなかった (図 1)。



\*\*Significant different from PBS group ( $p < 0.01$ ).

\*\*\*Significant different from PBS group ( $p < 0.001$ ).

図 1 抗体投与 146 日目のオスおよびメスにおける生殖腺体重比 (GSI) および除生殖腺体重 PBS、生理食塩水投与区 ; Antibody、抗体投与区

次に、サンプリングした血清について、ELISA 法を用いたウサギ IgG に対する抗体価を測定したところ、抗体投与区では、生理食塩水投与区に比べて若干高い価を示したが、その差は非常に小さかった。また、組織切片についてはオスのみで解析することができたが、精巢の発達度合いについて抗体投与区ではすべての個体が放精直前であったのに対し、生理食塩水投与区では未熟な生殖腺が混在していた。

このように、ニジマスの生殖腺刺激ホルモン受容体に対する抗体を投与することにより、明確な違いはないものの、当初の仮説とは反対に生殖腺の発達を促進する傾向がみられた。今回、対照区において寄生虫症が発生したため、抗体投与そのものよりも感染症の影響により成長および生殖腺の発達が抑制された可能性がある。しかしながら少なくとも、生殖腺刺激ホルモン受容体に対するウサギ抗体の投与は、ニジマスにおいて生殖腺そのものに影響を及ぼさないことが示された。近年、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンのノックアウト魚が作出されているが、これらの個体は正常に繁殖できることが示されている。すなわち、魚類では生殖ホルモンの働きを阻害しただけでは性成熟を抑制できない可能性も考えられた。

生殖腺は生殖細胞の分化に伴い発達する。すなわち、生殖細胞を直接排除することが可能となれば、性成熟を抑制できる可能性がある。本研究では生殖腺刺激ホルモンを対象として抗体による阻害を試みたが、現在引き続き、生殖細胞の元となる始原生殖細胞を認識する抗体を用い、魚類の性成熟を抑制することが可能かどうかを検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若山大介・原川 明宏・横田 昌樹・廣野育生・近藤秀裕
2. 発表標題 抗生殖腺刺激ホルモン受容体抗体によるニジマス性成熟阻害
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----