

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007 年度～2009 年度
課題番号：19570056
研究課題名（和文）メクラウナギにおける組換え生殖腺刺激ホルモンの構築と人為催熟技術の確立
研究課題名（英文）Construction of recombinant gonadotropin and establishment of the artificial fertilization system in hagfish.
研究代表者
内田 勝久（Katsuhisa Uchida）
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号：50360508

研究成果の概要（和文）：

下垂体から分泌され、生殖腺を刺激するホルモン（ゴナドトロピン；GTH）は、顎を持つ脊椎動物では、性ステロイドを介した配偶子の形成・成熟や、繁殖行動の誘起に必須の役割を担っている。本研究では、現存する最古の脊椎動物であるヌタ（メクラ）ウナギの下垂体 GTH 遺伝子の同定を発端に、酵母細胞を宿主として組換え型 GTH を遺伝子工学的に構築している。この組換え型ホルモンは、ヌタウナギ自身が持つ天然型 GTH と生化学的に極めて類似した構造を持ち、生殖腺からの性ステロイドの分泌を促進することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Gonadotropins (GTHs) in jawed vertebrates, are synthesized and secreted from the pituitary and stimulate the gonads inducing the synthesis and release of sex steroid hormones, which in turn elicit growth and maturation of the gonads. Based on the nucleotide sequence of GTH in most primitive jawless vertebrates, brown hagfish (*Paramyxine atami*), we have constructed the recombinant protein using the methylotrophic yeast (*Pichia pastoris*). The protein has shown similar biochemical characteristics with native hagfish GTH, and has stimulated the release of sex steroids from organ-cultured gonad of hagfish, suggesting similar biological actions, gonadotropic actions, of the recombinant hormone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：比較内分泌学、生理学、生殖、進化、ホルモン

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、今からおよそ 5 億年前に出現し、さまざまな環境に適応して生息域を広げ、進化を遂げてきた。脊椎動物の適応放散の背景には、神経系や内分泌系といった情報伝達系の進化とその機能の多様化が関わっている。下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GTH) は、生殖腺の発達や配偶子の形成・成熟に関わる内分泌因子であり、顎を持つ脊椎動物 (顎口類) の生殖内分泌現象において中枢的役割を担っている。しかしながら、脊椎動物の進化の最初期に出現した、顎を持たない無顎類・ヌタ (メクラ) ウナギにおいては、これまで下垂体ホルモンの存在すら疑問視されてきたため、ホルモン分子の単離や機能解析は全くなされておらず、この動物の生殖現象と内分泌系による制御機構に関する知見は極めて乏しい。

近年、申請者らは、新潟県産のクロヌタウナギ (*Paramyxine atami*) の下垂体 cDNA ライブラリーを構築し、GTH α 鎖と β 鎖をコードする遺伝子を単離し、この分子が脊椎動物の GTH の共通祖先分子であることを示唆している。さらに、この分子は性成熟の進んだ個体で発現量が高まることから、クロヌタウナギの GTH が生殖現象に大きく寄与している可能性を示唆している。今後、クロヌタウナギの GTH の機能や、この動物群における生殖内分泌現象を総括的に理解するためには、この動物自身の GTH タンパクの単離が必要不可欠であるが、本種の下垂体は非常に小さく、原始的な形態をしているため、下垂体から GTH を大量に精製することは現実的ではない。近年、急速に進歩を遂げた遺伝子工学的手法および生化学的

手法により、様々な動物種において組換えホルモンが構築され、ホルモン分子の生理機能の解明といった基礎研究のみならず、医薬・農畜水産業などの分野でも組換えホルモンが利用されている。組換え型 GTH に関しては、酵母、昆虫、哺乳類の細胞の発現系を用いて、生理活性の認められるホルモンが構築され、魚類においても生殖内分泌機構の解明に寄与している。従って、組換えホルモンの構築技術をヌタウナギ類に適用し、生理活性のある GTH が大量に作出できれば、この動物の生殖内分泌機構に関する知見を飛躍的に増大させることが可能である。

一方、尾索動物のホヤ、頭索動物のナメクジウオ、無顎類のヤツメウナギにおいては、初期発生過程が良く知られており、これらの動物群は“脊索動物の進化と多様性”を発生学的な視点で理解するうえで極めて重要な動物群である。しかし、ヌタウナギ類の産卵場所や繁殖行動はまったく知られておらず、その胚発生の全過程については、19 世紀末に Dean により記載されているのみであり、ヌタウナギ類における発生学的知見は皆無に等しい。このような背景から、ヌタウナギの受精卵や初期発生胚を恒常的に得るには、これまで日本産ウナギで取り組まれているように、GTH の投与による人為催熟技術の確立が最善の策である。ヌタウナギ類において組換え型 GTH を構築し、それを用いてこの動物群の生殖内分泌機構を十分に理解できれば、人為催熟技術の確立と初期発生胚の入手に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究においては、(1) クロスタウナギより単離された GTH 遺伝子の配列を基盤に組換えホルモンを構築する、(2) その生化学的・生物学的特性を調べ、その機能を理解する、(3) 組換え型 GTH を用いてヌタウナギ類の生殖内分泌機構を十分に理解し、それを人為催熟技術へ応用し、発生学的にほとんど未知である初期発生胚を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組換え型タンパクの構築とその生化学的特性の理解

単離したクロスタウナギの GTH α 鎖と β 鎖遺伝子から推定されるアミノ酸配列に 6 分子のヒスチジンが付加されるように、GTH 遺伝子を PCR 法により増幅した。これらの増幅産物を同一の発現ベクターに組み込み、 α 鎖と β 鎖を共発現するベクターを構築した。両ベクターを、メタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) に共導入し、形質転換体を作出した。得られた形質転換体をメタノール存在下で培養し、酵母培養液中に組換え型タンパクを発現・分泌させた。次に、培養上清を SDS-PAGE により分離した後、Western blot 法を用いて、ヒスチジン分子ならびに GTH α 鎖ならびに β 鎖に特異的な抗血清により、組換え型タンパクを発現するクローンの選別、組換え型タンパクの生化学的特性の評価を進めた。また、抗ヌタウナギ GTH 抗体に免疫陽性反応を示すタンパク分画のアミノ酸配列解析も行った。

(2) 組換えホルモンの生物学的活性の評価

組換え型ホルモンの生理活性を知るうえで、下垂体に含まれる天然型 GTH を単離することは必須である。そこで、組換え型 GTH の生物学的検定の前段階として、天然型ヌタウナギ GTH を単離することを試みた。まず、成

熟したクロスタウナギの下垂体を採取し、その抽出物をゲル濾過カラムや HPLC により分画化した。クロスタウナギ GTH に特異的な抗血清を用いて、各分画サンプルにおける免疫陽性反応を調べ、天然型 GTH の単離・精製を行った。精製タンパクの一部はアミノ酸配列解析に用い、N 末端側のアミノ酸配列の構造が、遺伝子構造から推定される配列と合致することを確認した。次に、組換えタンパクを最も効率良く発現する酵母細胞を大量に培養し、得られた組換え型 GTH ならびに天然型 GTH の双方を用いて、それらの生物活性を以下の方法で調べた。

クロスタウナギの生殖腺(精巣)の器官培養系を確立し、成熟の進んだ個体の精巣片を天然型ならびに組換え型 GTH を含む培養液中で 24 時間培養した。培養液中に放出された性ステロイド[エストラジオール 17 β (E2) ならびにテストステロン (T)] 量を時間分解蛍光免疫測定法により定量し、GTH 分子のステロイド分泌能を解析した。

(3) 組換え型 GTH を用いた血中ホルモン量の測定系の確立

ヌタウナギ類において血液中の GTH 量を測定することは、この動物の生殖内分泌現象を理解するために必須である。ヌタウナギにおいても、構築した組換え型 GTH を基盤に、血中 GTH 量を測定するための免疫測定法の確立を目指した。本研究では、単離・精製した組換え型 GTH をウサギに免疫し、抗血清を作製した。なお、抗血清の作製に関しては、抗原の連続投与、ウサギの管理・飼育、採血などはすべてオペロンバイオテクノロジー(株)に委託した。

4. 研究成果

(1) 組換えホルモンの構築と生化学的特性

クロスタウナギの GTH 遺伝子を PCR 法によ

り増幅し、組換え型タンパクを発現する形質転換体を8個得た。これらの形質転換体を発現誘導し、培養上清を抗ヒスチジン抗体により Western blot 解析し、組換えタンパクを発現するクローンのスクリーニングを行った。その結果、複数のクローンが分子量約 40 KDa のタンパクを産生していることが示された。さらに、これらの陽性形質転換体を大量に発現誘導し、その培養上清から精製したタンパクに還元処理を施した結果、分子量約 25 KDa と 22 KDa の2種類のタンパクが認められた。これら2種類のタンパクは、抗ヌタウナギ GTH α 鎖抗体と β 鎖抗体にそれぞれ陽性反応を示した(図1)。以上の結果から、酵母細胞を宿主として作出した組換え型タンパクは2量体構造をとり、ヌタウナギの下垂体に存在する天然型 GTH に極めて類似した構造であることが示唆される。さらに、組換え型 GTH のアミノ酸配列解析から、2種類のタンパクのN末端約10残基の配列は、天然型 GTH のアミノ酸配列と極めて高い相同性を示した。

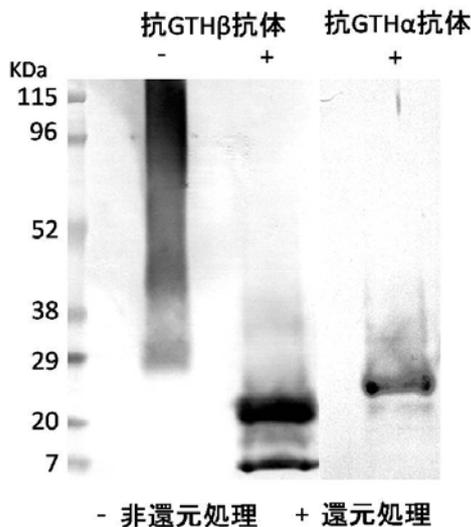


図1 組換え型タンパクの抗 GTH 抗体による Western Blot 解析

(2) 組換え型ホルモンの生物学的活性
精製した天然型ならびに組換え型 GTH を、

クロスタウナギの精巢を用いた器官培養系に供し、培養液中への性ステロイド [エストラジオール 17 β (E2) およびテストステロン (T)] の放出量を指標に、両者の生理活性を解析した。その結果、天然型 GTH では、5 μ g/ml の濃度で E2 や T の分泌量が対照群に比べ有意に増加した。一方、組換え型 GTH を高濃度(10 μ g/ml)で処理した場合、培養液中への E2 (図 2A) と T (図 2B) の分泌量は約 1.7 倍に増加した。以上の結果は、作出

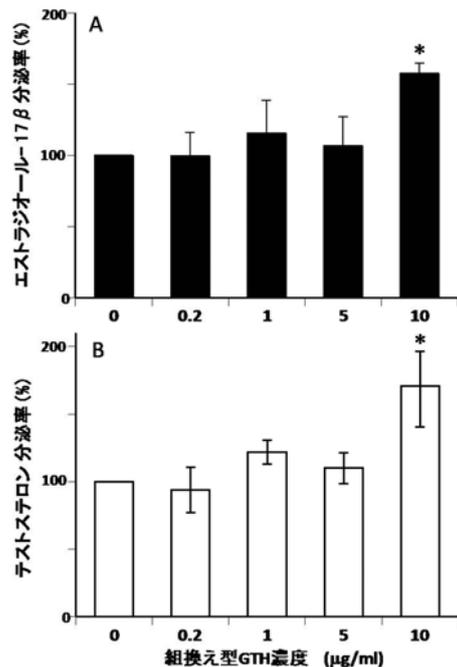


図2 組換え型 GTH の生物活性

した組換えタンパクが生殖腺に作用し、ステロイドの分泌を促す、GTH 様の機能を持つことを示唆している。

(3) 血中 GTH の測定系の確立を目指して

精製した組換え型 GTH を抗原分子とし、これをウサギに免疫し、血中 GTH を測定するための特異的抗血清を得た。現在、抗血清の特異性を解析しており、特異性を明らかにしたうえで、ヌタウナギ類の血中 GTH 量を測定するための免疫測定系の確立を進めたいと考

えている。ヌタウナギ類においては、GTHが繁殖過程のどのタイミングで分泌されるのかといった、血中GTHの分泌プロファイルに関する知見が全く知られていない。ヌタウナギ類におけるGTHの分泌に関する知見は、この動物群の生殖内分泌現象の理解を大きく進展させると考えている。

無顎類・ヌタウナギは、現存する最古の脊椎動物であるにも関わらず、生物学的な知見が極めて乏しく、“謎に満ちた生きた化石”と言える。しかし、この動物群を理解しなければ、今日大繁栄を遂げた脊椎動物の進化や多様性を理解することはできない。本研究で構築した組換え型GTHや、それを基盤に作出した抗血清は、ヌタウナギ類における生殖内分泌現象を理解するうえで、極めて重要なKey Moleculeとなることが期待され、今後、謎に包まれてきたヌタウナギ類の生殖内分泌現象の全貌の理解が敏速に、かつ、着実に進むと考えられる。さらに、これらの分子種を基盤に、ヌタウナギ類の生殖腺の機能分化と内分泌系による制御機構が十分に理解され、組換え型ホルモンを人為催熟技術に結び付けられれば、この動物の繁殖行動の理解や、恒常的な胚の入手に端を発した初期発生、初期成長過程の理解へも繋がり、国内外で活発に研究が展開されている比較内分泌学の分野のみならず、発生、進化、行動、生態、生理学といった多くの学術分野に新たな知見を波及できると考えられる。

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7件)

- ① Furukawa F, Watanabe S, Kaneko T, Uchida K. (2010). Changes in gene expression levels of somatolactin in the pituitary and morphology of gill mitochondria-rich cells in Mozambique

tilapia after transfer to acidic freshwater (pH 3.5). *General and Comparative Endocrinology*. Vol.166. pp. 549-555. 査読有.

- ② Uchida K., Moriyama S., Breves J.P., Fox B.K., 他4名. (2009). cDNA cloning and isolation of somatolactin in Mozambique tilapia, and effects of seawater acclimation, confinement stress, fasting on its pituitary expression. *General and Comparative Endocrinology*, Vol.161, pp.162-170. 査読有.
- ③ Nozaki M. (2008). The hagfish pituitary gland and its putative adenohipophysial hormones. *Zoological Science*. Vol. 25. pp.1028-1036. 査読有.
- ④ Nozaki M., Ominato K., Shimotani T., Kawachi H., Youson J.H., Sower S.A. (2008). Identity and distribution of immunoreactive adenohipophysial cells in the pituitary during the life cycle of sea lampreys, *Petromyzon marinus*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol.155. pp. 403-412. 査読有.
- ⑤ Kavanaugh S.I., Nozaki M., Sower S.A. (2008). Origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in vertebrates: Identification of a novel GnRH in a basal vertebrates, the sea lamprey. *Endocrinology*. Vol.149. pp. 3860-3869. 査読有.
- ⑥ Moriyama S., Oda M., Tamazaki T., Yamaguchi K., Amiya N., Takahashi A., Amano M., Goto T., Nozaki M., 他2名. (2008). Gene structure and functional characterization of growth hormone in dogfish, *Squalus acanthias*. *Zoological Science*. Vol. 25. pp. 604-613. 査読有.
- ⑦ Nozaki M., Shimotani T., Uchida K. (2007). Gonadotropin-like and adrenocorticotropin-like cells in the pituitary gland of hagfish, *Paramyxine atami*: immunohistochemistry in combination with lectin histochemistry. *Cell and*

Tissue Research. Vol. 328. pp. 563–572.
査読有.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Nozaki M., Honda K., Miki M., Shimotani T., Uchida K. Effects of estradiol and testosterone treatment on GTH and ACTH cells in the pituitary of the hagfish. 6th *Intercongress Symposium of the Asia Oceania Society for Comparative Endocrinology*. January 19–22, 2010. New Zealand.
 - ② 内田勝久、亀井宏泰、森山俊介、野崎眞澄、他 2 名. クロスタウナギにおける組織換え生殖腺刺激ホルモンの構築. *日本動物学会第 80 回大会*. 2009 年 9 月 19 日. 静岡.
 - ③ 野崎眞澄、本田香織、三木誠、下谷豊和、内田勝久. クロスタウナギの腺下垂体細胞に対するエストロゲンとテストステロン投与の影響. *日本動物学会第 80 回大会*. 2009 年 9 月 19 日. 静岡.
 - ④ 大杉知裕、内田勝久、野崎眞澄、筒井和義. スタウナギの新規 RFamide ペプチドの同定と生理作用の解析. *日本動物学会第 80 回大会*. 2009 年 9 月 19 日. 静岡.
 - ⑤ Nozaki M., Uchida K., Miki M., Shimotani T., Honda K., Moriyama S. Identification of hagfish gonadotropin (GTH) and cellular distribution of GTH and adrenocorticotropin (ACTH) in the hagfish adenohypophysis. *The 16th International Congress of Comparative Endocrinology*. June 22–26, 2009. Hong Kong.
 - ⑥ Osugi T., Uchida K., Nozaki M., Sower S.A., Tsutsui K. Novel hagfish hypothalamic RFamide peptides: isolation, localization and biological activity. *The 16th International Congress of Comparative Endocrinology*. June 22–26, 2009. Hong Kong.
 - ⑦ 内田勝久、森山俊介、千葉洋明、下谷豊和、野崎眞澄. クロスタウナギにおける生殖腺刺激ホルモンの単離・精製と機能解析. *日本比較内分泌学会第 33 回大会*. 2008 年 12 月 6 日. 広島.
 - ⑧ Nozaki M., Uchida K., Miki M., Shimotani S., Honda K., Moriyama S. Identity of hagfish gonadotropin (GTH) and cellular distribution of GTH and adrenocorticotropin (ACTH) in the hagfish adenohypophysis. *The 15th CDB Meeting, “Advances in Cyclostome Research: Body plan and developmental programs before jawed vertebrates*. January 25, 2008. Kobe, Japan.
 - ⑨ Nozaki M., Shimotani S., Uchida K., Moriyama S. Identification of hagfish gonadotropin (GTH) and its evolutionary implication. *Okazaki Biology Conference, OBC 6 on “Marine Biology”*. December 3, 2007. Okazaki, Japan.
 - ⑩ 内田勝久. 最古の脊椎動物・スタウナギの生殖腺刺激ホルモン. 平成 19 年度 東京大学海洋研究所共同利用研究集会「魚類の適応と進化の統合生物学: 遺伝子から行動まで」. 2007 年 11 月 16 日. 東京.
 - ⑪ 野崎眞澄、下谷豊和、内田勝久、森山俊介、高橋明義、川内浩司、Stacia A. Sower. 無顎類からみた下垂体と腺下垂体ホルモンの進化. *日本比較内分泌学会第 32 回大会*. 2007 年 10 月 12 日. 栃木.
 - ⑫ 内田勝久、森山俊介、本田香織、下谷豊和、野崎眞澄. クロスタウナギの下垂体における生殖腺刺激ホルモン遺伝子発現解析. *日本動物学会第 78 回大会*. 2007 年 9 月 20 日. 青森.
 - ⑬ 野崎眞澄、下谷豊和、内田勝久、安田明和. クロスタウナギの腺下垂体における ACTH 細胞の同定. *日本動物学会第 78 回大会*. 2007 年 9 月 20 日. 青森.
 - ⑭ 内田勝久. 新潟県産クロスタウナギの生殖腺刺激ホルモン遺伝子の単離を究端に. *日本下垂体研究会第 22 回学術集会*. 2007 年 8 月 25 日. 神奈川.
6. 研究組織
- (1) 研究代表 内田 勝久 (Katsuhisa Uchida)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号: 50360508
 - (2) 研究分担者 野崎 眞澄 (Masumi Nozaki)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号: 70136232