

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：94316

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15600

研究課題名（和文）長期的なレプチン投与が魚類の生殖腺発達に与える影響の検証

研究課題名（英文）Verification of the effects of long-term leptin administration on gonad development in fish

研究代表者

大賀 浩史（Ohga, Hirofumi）

リージョナルフィッシュ株式会社（研究開発部）・研究開発部・主任研究員

研究者番号：60792299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：摂食調節ホルモンであるレプチンがマサバの性機能調節に与える影響について調べた。血中レプチン濃度を測定するELISAを開発し摂餌後の分泌動態を調べた結果、食後2時間では、摂餌群は非摂餌群と比較して有意な高値を示したことより、レプチンが本種の摂食調節に関与することが示唆された。大腸菌発現系を用いて組換えレプチンを合成し、脳下垂体の初代培養系に添加した結果、濾胞刺激ホルモン（FSH）と黄体形成ホルモン（LH）の分泌が促された。また、細胞組織学的な解析により、脳下垂体のFSHとLHの産生細胞上にレプチン受容体が局在することが示され、それらの分泌がレプチンの直接的な制御下にあることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栄養状態と性機能には密接な関係があり、栄養不良は性機能を強く抑制する。この作用は、肝臓から分泌される栄養情報ホルモンであるレプチンによるものが大きい。一方、魚類のレプチンについては、摂食調節における機能と性機能調節に与える影響の両面において、研究例が少なく不明な点が多い。本研究ではマサバ特異的なELISAにより、本種のレプチンが摂食調節に関与する可能性が示された。また、生殖内分泌軸の中心的なホルモンである生殖腺刺激ホルモンの分泌がレプチンの直接的な支配下にあることを魚類で初めて示した。特に魚類ではFSHの分泌調節機構は明らかになっておらず、その上流制御因子の一つを示した初めての研究例となった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of leptin, a nutritional information hormone, on regulation of reproductive function in chub mackerel. We developed an ELISA to measure serum leptin concentration and investigated the secretion dynamics after feeding. Two hours after feeding, the fed group showed significantly higher leptin levels than the non-fed group. This suggests that leptin is involved in feeding regulation in this species. Recombinant leptin was synthesized using an E. coli expression system. When added to a primary pituitary culture system, the secretion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) was stimulated. Furthermore, cell histological analysis showed that leptin receptors are localized on FSH and LH producing cells in the pituitary gland, indicating that their secretion is under the direct control of leptin.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：レプチン分泌動態 生殖腺刺激ホルモン分泌調節 レプチンによる摂食調節と性機能調節 初回成熟

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の性成熟は脳-脳下垂体-生殖腺を結ぶ生殖内分泌軸(BPG-axis)により制御される。この中で特に中枢的な役割を担うのが、脳の視床下部より放出される生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)および、その刺激により脳下垂体より分泌される生殖腺刺激ホルモン(GTH)である。GTHは2種類のホルモン(濾胞刺激ホルモン:FSHと黄体形成ホルモン:LH)より構成され、マサバでは哺乳類同様、FSHが卵黄蓄積(卵発達)を促進し、LHが排卵を誘発する。

一方、GnRH遺伝子をKOしたメダカでは、排卵は起こらないものの正常な卵発達が認められることより、魚類ではGnRHはLHの制御に必須である一方、FSHの制御には関与しない可能性が示唆されている。マサバ脳下垂体初代培養細胞を用いた申請者らの研究においても、GnRH刺激はLH放出を誘発するがFSH放出には影響を与えなかった。即ち、魚類では卵黄蓄積を促進するFSHの制御因子は未だに不明である。

思春期発達(初回成熟)の成否は個体の栄養状態に大きく左右され、栄養不良は性機能を強く抑制する。脂肪細胞より分泌されるレプチンは食欲や代謝調節を行うほかに、現在の栄養状態をBPG-axisに伝えることが哺乳類で知られている。実際に脳下垂体のGTH産生細胞ではレプチン受容体(LepR)が発現しており、レプチンがGTHの分泌調節に直接的に関与する。また、レプチンは様々な介在ニューロンを通じてGnRHの制御を行うことが知られている。このように、レプチンにより中枢へ伝えられる情報は、成熟開始の許容信号としてBPG-axisの活性化に深く関与する。実際に思春期前のマウスにレプチンを投与すると、思春期発達が早期に開始することが示されている。

魚類ではいくつかの種においてレプチン遺伝子が同定されているが、BPG-axisに与える直接的な影響を調べた報告は一例もなく、その機能はほとんど不明である。我々はこれまでに、マサバにおいてレプチンおよびLepRの同定に成功している。マサバレプチンの組換えホルモンを作製し、栄養状態の良好な初回成熟前の雌個体より採取した脳下垂体初代培養細胞に添加した結果、レプチンの濃度依存的にFSHおよびLHの放出が強く促進されることを魚類で初めて示した。更に、組換えレプチンを未成熟雌個体の脳室内に投与した結果、GnRH、FSHおよびLH遺伝子量が有意に増加することを魚類で初めて報告した。以上の結果は、魚類でもBPG-axisの活性化にレプチンが直接的に関与する可能性を示唆している。特に、強いFSH分泌促進能を示した点に注目したい。即ち、本種レプチンは卵黄蓄積を開始し初回成熟を迎えるための許容信号として、FSH放出の制御に関与する重要因子の1つである可能性がある。

2. 研究の目的

本課題では、「レプチン投与はBPG-axisの活性化に影響を与え、初回成熟の開始および卵発達を効率的に促進するか?」を学術的「問い」に設定し、レプチンを長期的に生体投与することによりBPG-axisの活性化を促し、初回成熟の開始および卵黄蓄積の促進を促すことができるかを検証することを目的とした。そのために、先ず、本種のレプチン機能に関する基盤情報を整備するために、レプチンがBPG-axisの中枢ホルモンであるGTHの分泌調節に与える影響を調べるとともに、血中濃度の測定により摂餌調節に与える影響を調べた。

3. 研究の方法

研究目的を達成するために、以下の5項目に関する研究を行った。

(1) 大腸菌発現系を用いたマサバ組換えレプチンの大量合成法の確立

タンパク質発現ベクターのコドンの最適化や、タンパク質の可溶化を促進することが知られているシャペロンタンパク質との共発現システムの構築を通して、正しい立体構造を保持した活性型タンパク質の大量合成を目指す。

(2) マサバレプチンの血中測定系の開発

マサバ生体内におけるレプチンの分泌動態を明らかにするために、レプチンの血中濃度を測定する ELISA を開発する。抗マサバレプチンポリクローナル抗体を作製し、その特異性を組換えレプチンを抗原としたウエスタンブロッティングにより確認する。ELISA は、試料溶液をマイクロプレートに吸着させる直接吸着法をベースに開発する。

(3) 摂食調節におけるレプチン機能の推定

本種のレプチンが摂食調節に与える影響を検証するために、給餌後に継時的に血液を採取し、血中のレプチン濃度の変化を、作製した ELISA を用いて明らかにする。

(4) GTH 産生細胞と LepR の細胞組織学的解析

脳下垂体の GTH 産生細胞に LepR が局在しているかを、細胞組織学的な解析を通して明らかにする。蛍光標識した *fshb* と *lhb* および *lepr* mRNA プロブを用いて、*in situ* hybridization を行い、共局在の有無を検証する。

(5) レプチン投与試験

組換えレプチンの生体投与を行う。試験魚には複数の生殖ステージおよび年齢(初回成熟前、初回成熟途中、成魚未成熟期および成魚生殖腺発達途中)の雌雄個体を用いる。レプチン処理後の生殖腺重量指数(GSI)を算出するとともに、生殖腺の組織切片を作製して発達状況の観察を行う。GnRH, FSH および LH など生殖重要因子の遺伝子発現に与える影響を、qRT-PCR 法により調べる。また、血中のステロイドホルモン量の変化を、市販の ELISA キットを用いて調べる。

4. 研究成果

(1) 大腸菌発現系を用いたマサバ組換えレプチンの大量合成法の確立

大腸菌発現系による本種の組換えレプチンの発現では、発現タンパク質の大部分が封入体として不溶化することがわかっていたため、タンパク質の可溶化を促進することが知られているシャペロンタンパク質との共発現システムを構築した。しかし、目的タンパク質の発現は認められたものの、可溶性画分からの十分量の組換えホルモンの回収はできなかった。そのため、実験に用いる組換えホルモンは、これまでに確立していた封入体をリフォールディングし、tag 精製と透析を行う手法をスケールアップすることにより得た。本手法は、プロトコル化しており本種の組換えレプチンを安定して作製できるものであるが、リフォールディングの際に用いる試薬が高価である点が難点としてあげられる。組換えホルモンの作製においては、可溶性タンパク質を高い収量で得られることが望ましい。今後は、組換えレプチン合成の効率化のために、可溶性タンパク質のさらなる高収量化が望めるバキュロウイルス-カイコ発現系を構築することが望まれる。

(2) マサバレプチンの血中測定系の開発

本種のレプチンを特異的に認識するポリクローナル抗体を作製し、間接法による血中濃度測定系の構築を目指した。しかし、検量線は確立できたものの、実際の血清サンプルの測定では、

サンプル中の夾雑物の影響によりバックグラウンドが高くなる傾向が認められた。また、添加回収試験では、添加サンプルの適切な回収が認められなかったことより、目的ホルモンを正しく測定できていない可能性が示唆された。そこで、測定系の特異性を向上させるために、レプチンの別の部位を認識する新たなポリクローナル抗体を作製し、サンドイッチ法による ELISA の成立を試みた。その結果、検量線の立ち上げに成功するとともに、複数サンプルにおける希釈直線性と並行性の確認でも良好な結果が得られた。また、添加回収試験においても、高い収率で添加サンプルを回収することができたことより、本種の血中レプチンを特異的に測定する ELISA の構築に成功した。

(3) 摂食調節におけるレプチン機能の推定

本種のレプチンの血中分泌動態を明らかにするために、異なる年齢、摂餌および絶食に伴う血中濃度の変化を調べた。幼魚（魚体重平均 78 g）の血中濃度平均は 7.67 nM である一方、成魚（魚体重平均 227 g）の血中濃度平均は 19.09 nM であり、有意な高値（ $P=0.0358$ ）を示すことが明らかになった。また、摂餌後における血中濃度を経時的に測定した結果、食後 2 時間において、摂餌群は非摂餌群と比較して 118%と有意な高値（ $P=0.0317$ ）を示し、この差は食後 4 時間では消失した。一方、10 日間の絶食により血中レプチン濃度は上昇傾向を示したが、毎日給餌群との間に統計的な有意差は認められなかった。食後の血中濃度の有意な増加が認められたことより、本種のレプチンが摂食調節に影響を与える可能性が示唆された。

(4) GTH 産生細胞と LepR の細胞組織学的解析

FSH と LH 分泌を促す作用機序を明らかにするために、レプチン受容体（LepR）が、それぞれの産生細胞上に局在するかを、二重蛍光標識による *in situ* hybridization 法により調べた。共焦点レーザー顕微鏡による解析の結果、FSH および LH のどちらの産生細胞上にも *lepr* 遺伝子が発現していることが確認された。以上の結果より、FSH と LH の分泌がレプチンの直接的な支配下にあることが魚類で始めて明らかになった。特に、魚類の FSH 分泌を上流から制御する因子については未だ明らかになっておらず、本研究で得られた知見は、FSH 分泌の制御機構の一つを明らかにした初めての報告となった。

(5) レプチン投与試験

本種のレプチンが生殖腺の発達に与える影響を検証した。まず、FSH と LH の分泌に与える影響を調べるために、初回成熟前の雌個体より採取した脳下垂体を用いて、初代培養系を立ち上げ、レプチン添加による *in vitro* バイオアッセイを行った。添加したレプチンの濃度依存的に培地中への FSH と LH の分泌が促されたことより、レプチン刺激が生殖腺の発達に直接的な影響を与える可能性が示唆された。次に、初回成熟前の雌個体に対して、400 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 濃度の組換えレプチンを、背筋中に中二日の三日間隔で計 6 回投与した。最終投与から 4 日後に全個体のサンプリングを行い、生殖腺の発達状況を調べた。その結果、生理食塩水投与群とレプチン投与群の間で GSI の有意差は認められなかった。一方、レプチン投与群では 10 個体中 2 個体で著しい生殖腺の発達が認められた。今回の投与試験では、計 6 回の反復投与を行ったため、ハンドリングのストレスにより、多くの個体で生殖腺の発達が妨げられた可能性が考えられる。今後は、浸透圧ポンプを用いるか、あるいは投与ホルモンをエマルジョン化し筋中に打ち込み徐放させるなど、魚体ストレスを低減させる投与法の検討が求められる。

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 1件）

1. 著者名 Ohga H, Ito K, Kakino K, Mon H, Kusakabe T, Lee JM, Matsuyama M	4. 巻 10(12)
2. 論文標題 Leptin Is an Important Endocrine Player That Directly Activates Gonadotropic Cells in Teleost Fish, Chub Mackerel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 伊藤晃輔, 大賀浩史, 松森皇士郎, 木村龍人, 太田耕平, 松山倫也
2. 発表標題 マサバの生殖内分泌軸におけるレプチンの機能
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会九州支部会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------