

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580219

研究課題名（和文）組換えニホンウナギ生殖腺刺激ホルモンの産生および卵形成における機能解析

研究課題名（英文）Production of recombinant Japanese eel gonadotropins and their roles on the oogenesis

研究代表者

風藤 行紀（KAZETO YUKINORI）

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・養殖技術部・主任研究員

研究者番号：60399996

研究成果の概要（和文）：哺乳類の細胞を用いて生体内寿命の長い 2 種類のウナギ組換え生殖腺刺激ホルモン（rGTH：rFSH-CTP および rLH-CTP）の作製に成功した。これら rGTH を未熟な雌ウナギに投与したところ、成熟を誘導することが可能で、且つ同一の成熟ステージにもかかわらず卵巣の大きさや成熟関連遺伝子の発現に有意な差が認められた。このことから、rFSH-CTP および rLH-CTP が卵巣において異なる作用を有することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Two recombinant eel gonadotropins (rGTH: rFSH-CTP and rLH-CTP) with long-lasting life were produced in mammalian cells. Administration of these rGTH could induce maturation of immature female eel. Furthermore, ovarian mass and expression of genes related to reproduction, induced by rFSH-CTP were significantly different from those by rLH-CTP, which indicates that two rGTH differentially act in the ovary of eel.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：水産学・ウナギ・生殖生理・バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖腺刺激ホルモン（GTH）は脊椎動物を通して配偶子形成の主要な調節因子であり、有用動物の成熟統御に頻繁に用いられる。これまでの研究で 2 種の GTH（濾胞刺激ホルモン：FSH および黄体形成ホルモン：LH）の存在が知られているが、魚類では両 GTH の詳細な機能については殆ど分かっていない。

(2) ウナギでは人為催熟のために、雌では GTH を多量に含むと考えられるサケの脳下垂

体抽出液を用いているが、得られる卵の質は不安定で概ね低い。この不安定な卵質の原因の一つとして成熟誘導における異種ホルモンの使用が考えられている。そのため、ウナギ自身の GTH を用いて人為催熟を試みる必要があることは以前から指摘されていたが、十分量のウナギ GTH を調整する事が出来なかったため、この様な試みは行われていない。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子工学的手法を用いて十分量のウ

ナギ組換え FSH (rFSH) および組換え LH (rLH) を作製する。

(2) 組換え GTH (rGTH) を作製する際に、タンパク質の寿命に関与する糖鎖結合部位を挿入し、生体内寿命の長い rGTH の作製を試みる。

(3) 生体内外の実験系を用いて、rFSH および rLH が生殖関連因子 (GTH 受容体、ステロイド合成酵素) や卵形成に及ぼす影響を調べる。

(4) 上記実験により、ウナギをモデルとして、魚類における FSH および LH の卵巣における作用の違いを明らかにすると共に、同ホルモンの魚類成熟統御への応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 各種ウナギ rGTH の作製および生体外実験系を用いたホルモン活性の確認

まず、CAG プロモーターの下流にウナギ GTH β 鎖、GS スペーサー、ウナギ糖タンパクホルモン α (GpH α) およびヒスチジンタグをコードする cDNA を連結し、rFSH および rLH の発現ベクターを構築した。更に、タンパク質の生体内寿命の延長化に関与するヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの C 末端糖鎖結合部位 (hCTP) を GTH β 鎖、GS スペーサーの間に導入した rFSH-hCTP および rLH-hCTP の発現ベクターも同様に作製した。次に、これら発現ベクターをヒト腎臓 293 細胞に導入し、1 週間懸濁培養した。培養後、培養液を回収し、ヒスチジンタグを利用した immobilized metal affinity chromatography により精製した。

得られた rGTH のホルモン活性の検討は、GTH 受容体 (GTHR) を用いたレポーターアッセイにより行った。ウナギ FSH 受容体 (FSHR) および LH 受容体 (LHR) の発現ベクターを構築し、cAMP 応答配列の下流にホタルルシフェラーゼ cDNA を連結したレポーターベクターと共に、アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞に導入した。導入 48 時間後、GTHR を発現した COS-7 細胞を、様々な濃度 (1-10000ng/ml) の rGTH と共に 6 時間培養した。培養後、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定することにより rGTH のホルモン活性とした。

(2) ウナギ FSH および LH の測定系の確立

組換え生殖腺刺激ホルモン (GTH) をウナギに投与した後の体内濃度の経時的変動を調べるため、酵素免疫測定法 (ELISA) による 2 種 GTH (FSH および LH) の測定系の確立を行った。

まず、GpH α のみを発現させるベクターを構築、先述の方法に従って組換え GpH α

(rGpH α) を得た。得られた rGpH α を家兔に免疫し、ポリクロナール抗体 (抗 GpH α) を作製した。抗 GpH α の特異性を非変性下および変性還元下のウェスタンブロットにより調べた。

次に、抗 GpH α を捕捉抗体、これまでの研究で既に作製済みの抗 FSH β および抗 LH β をビオチン-標識抗体として用いて、サンドイッチ ELISA の確立を試みた。

また、更に高感度な ELISA の確立に用いるため、新たにヒト腎臓 293 細胞で発現させたウナギ GTH β (FSH β および LH β) およびウサギ GpH α を連結した組換えキメラ rFSH および rLH を家兔に免疫し、抗血清を作製した。更に、(1) で作製した rFSH および rLH を固定化したアフィニティーカラムを作製、抗キメラ rGTH 抗血清からウナギ GTH に対する特異 IgG (抗 FSH IgG および抗 LH IgG) のみを精製した。得られた抗 FSH IgG および抗 LH IgG を捕捉抗体として、抗 FSH IgG および抗 LH IgG をペプシン消化した F(ab) $'_2$ をビオチン-標識したものを標識抗体として、サンドイッチ ELISA の確立を試みた。

(3) 各種 rGTH を未熟ウナギに投与した時の生体内での挙動

未熟な雄ウナギに、rFSH、rLH、reFSH-CTP および rLH-CTP の計 4 種類の rGTH を未熟雌ウナギに 1mg/kg-体重で腹腔内投与した。投与 1 週間後まで、経時的に採血を行い、血清を得た。得られた血清中の各種 rGTH 濃度を (2) で確立した高感度 ELISA により測定した。

(4) 卵形成および生殖関連遺伝子の発現に及ぼす rGTH 投与の影響

ここまでの研究で生体内寿命が長く、生体内に投与した場合、高い成熟促進効果が期待される FSH-hCTP および LH-hCTP を、未熟雌ウナギに週 1 回、毎週投与した。期間中に適宜採血を行うと共に、卵黄形成中期および核移動期で卵巣をサンプリングし、生殖腺体指数 (GSI) を算定した。卵巣の一部に関しては、リングル中にて最も発達した (先頭群) 卵濾胞のみを分離した。卵形成誘導ステロイド (E2) の血中変動を調べるとともに、先頭群卵濾胞に関しては、FSHR、LHR および E2 産生酵素である CYP19a1 の mRNA 量をリアルタイム定量 PCR により測定した。

4. 研究成果

(1) 各種ウナギ rGTH の作製および生体外実験系を用いたホルモン活性の確認

ヒト腎臓 293 細胞の懸濁培養系を用いた場合の各種 rGTH の産生量は、培養液 1 リットルあたり 5-10mg と比較的高い値を示し、計画した実験に十分量の rGTH を生産可能で

あることが明らかとなった。

また、GTHR のレポーターアッセイ系を用いて各種 rGTH のホルモン活性を調べた結果、rFSH、rLH 共に、10-30ng/ml 程度で対応する受容体を活性化しすることが明らかとなった。また、rFSH-hCTP および rLH-hCTP を用いた場合でも同様の結果が得られたことから、hCTP を挿入しても、ホルモン活性自体には影響を与えないことが示された。

(2) ウナギ FSH および LH の測定系の確立

抗 GpHα を用いて特異性を非変性下および変性還元下で rGpHα に対してウェスタンブロット解析を行ったところ、各条件下で特異的に抗原を認識していることが確認された。これにより、ウナギ GTH の各サブユニットの対する特異抗体が全て作製された。そこで、これらを用いて FSH および LH に対する ELISA の確立を試みたが、各抗体の力価が低い等の理由で、検出限界が 10ng/ml 程度と、十分な感度が得られなかった。

そこで、新たな抗体の作製、ウナギ GTH に対する特異 IgG (抗 FSH IgG および抗 LH IgG) の精製などにより精製した力価の高い抗体を用いて、再度 FSH および LH に対する ELISA の確立を試みた結果、FSH、LH 共に数十 pg/ml-数 ng/ml の範囲で測定可能な高感度 ELISA の確立に成功した。

(3) 各種 rGTH を未熟ウナギに投与した時の生体内での挙動

各種 rGTH を腹腔内投与下後の、血中変動を ELISA により調べた。その結果、全ての投与群で、投与 6 時間後に rGTH が血中に検出され始めた。血中レベルは投与 12-24 時間後ピークに達し、その後漸減した(図 1)。また、血中 rGTH-hCTP 量は対応する rGTH に比べ常に高く、生体内に長く残留した。

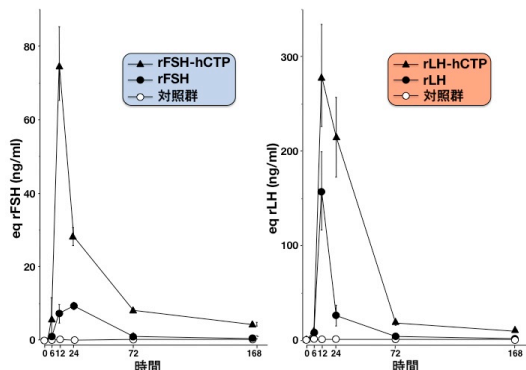


図 1. 組換え GTH 投与後の未熟ウナギにおける血中変動

(4) 卵形成および生殖関連遺伝子の発現に及ぼす rGTH 投与の影響

rGTH を腹腔内に週に 1 回、毎週投与したところ、FSH-hCTP では 8 回の投与で核移動

期に達するのに対し、LH-hCTP では 5 回程度の投与で、同ステージに達した。GSI に関し

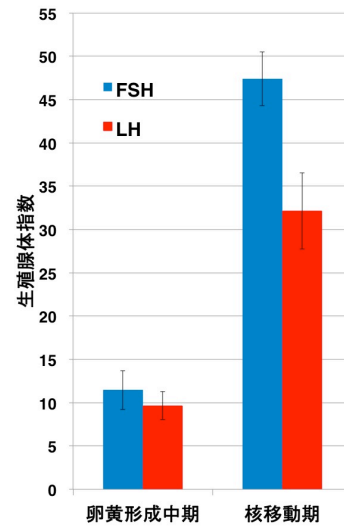


図 2. 組換え GTH により成熟誘導した卵巣の GSI

ては、両群共に卵黄形成中期では 10 程度の値を示し、核移動期で急増したが、FSH-hCTP 群では約 45 であったのに対し、LH-hCTP 群では約 30 と有意に低値を示した(図 2)。血中 E2 量は、処理前は 150pg/ml 程度だったが、両 GTH 処理群ともに、成熟の進行に伴い増加し、核移動期には 4ng/ml 程度に達した。先頭群卵濾胞における FSHR 遺伝子の発現は卵黄形成中期でピークに達した後、核移動期で減少したのに対し、LHR 遺伝子の発現は成熟に伴い高まり核移動期で最高値を示した。この様に両 GTHR 遺伝子の発現は成熟に伴い変化したものの、両 GTH 処理群の間に有意差は認められなかった。一方、CYP19a1 mRNA 量は、両処理

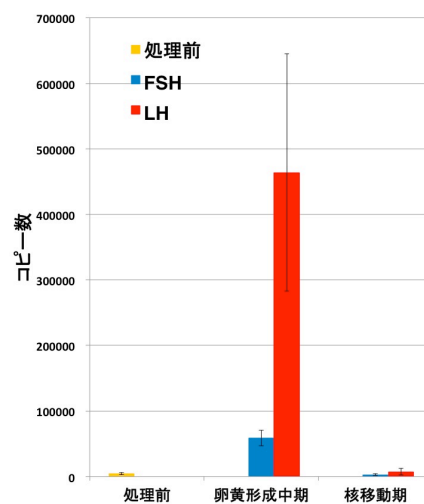


図 3. 組換え GTH により成熟誘導した卵巣における CYP19a1 mRNA 量

示した(図 3)。

以上の結果から、FSH-hCTP、LH-hCTP 共に卵巣の発達を促すことが明らかとなったが、GSI や CYP19a1 遺伝子の発現等に顕著な相

対し、両群共に卵黄形成中期では 10 程度の値を示し、核移動期で急増したが、FSH-hCTP 群では約 45 であったのに対し、LH-hCTP 群では約 30 と有意に低値を示した(図 2)。血中 E2 量は、処理前は 150pg/ml 程度だったが、両 GTH 処理群ともに、成熟の進行に伴い増加し、核移動期には 4ng/ml 程度に達した。先頭群卵濾胞における FSHR 遺伝子の発現は卵黄形成中期でピークに達した後、核移動期で減少したのに対し、LHR 遺伝子の発現は成熟に伴い高まり核移動期で最高値を示した。この様に両 GTHR 遺伝子の発現は成熟に伴い変化したものの、両 GTH 処理群の間に有意差は認められなかった。一方、CYP19a1 mRNA 量は、両処理群共に卵黄形成中期で増加した後、核移動期で急減したが、卵黄形成中期では LH-hCTP 群で FSH-hCTP 群に比べ約 7 倍の高値を示した(図 3)。

違が認められたことから、両 GTH の機能に顕著な相違があることが明らかとなった。

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 1 件)

Kazeto Y, Kohara M, Tosaka R, Gen K, Yokoyama M, Miura C, Miura T, Adachi S, Yamauchi K, Molecular characterization and gene expression of Japanese eel (*Anguilla japonica*) gonadotropin receptors, *Zoological Sciences*, 査読有, 29, 2012, 204-211.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 風藤行紀・深田陽久・鈴木博史・登坂亮太・山口寿哉・奥澤公一・玄浩一郎、ウナギ生殖腺刺激ホルモンの酵素免疫測定系の確立および生体内寿命の長い組換え生殖腺刺激ホルモンの産生、平成 24 年度日本水産学会春季大会、平成 24 年 3 月 27 日、東京海洋大学
- ② 風藤行紀・尾崎雄一・鈴木博史・伊藤理紗・今泉均・野村和晴・田中秀樹・太田博己・田中寿臣・玄浩一郎、組換えウナギ生殖腺刺激ホルモンを恒常発現する哺乳類細胞株の樹立および得られたホルモンの生物活性の検討、平成 25 年度日本水産学会春季大会、平成 25 年 3 月 28 日、東京海洋大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

(3) 連携研究者

無し