

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and Biochemical Studies
on Growth Hormone in Salmonids

（サケ科魚類の成長ホルモンに関する免疫生化学的研究）

学位論文内容の要旨

魚類の増養殖において効率的な成長と健全な卵を得ることは最優先課題である。一般に成長には脳下垂体より分泌される成長ホルモン（GH）が重要な役割を果たしていることが広く知られている。近年、この GH が魚類において生殖腺刺激ホルモン存在下で卵巣においてエストラジオール-17 β の合成量を増加させること、さらにエストラジオール-17 β 存在下で肝臓におけるピテロジェニン（卵黄蛋白前駆物質）の合成を促進するなど、成長だけでなく成熟にも関与していることが生体外培養実験で示されてきている。これらのことから、魚類の成長と成熟を解析する上で GH の動態を観察することは重要であるが、魚類において生体内での血中 GH 量の変動を観察した例は少ない。また、GH はほ乳類と同様に魚類においてもその受容体である GH レセプターを介して作用すると考えられているが、GH レセプターの最大結合容量と血中 GH 量とともに観察した研究はほとんどない。これまで数種の魚種において GH 測定系が確立されてきたが、GH の血中量は非常に微量であるため高感度なラジオイムノアッセイ法が用いられてきた。しかしながら放射性物質には、安全性および半減期などの問題点があげられる。近年、放射性物質に代わり同等もしくはより高感度な検出を可能とする標識物質が開発されてきている。本研究では、サケ科魚類 GH の成熟への作用を解析することを目的に、化学発光物質のアクリジニウムを標識として用いた高感度な測定系と化学発光レセプターバインディングアッセイの確立を行った。さらに様々なステージにおけるサケ科魚類の血中 GH 量の動態および成熟時期の肝臓における GH レセプターの最大結合容量の変化を調べた。

供試魚には北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設で飼育中のサクラマスとカットスロートトラウト、および、さけ・ます資源管理センターで飼育中のシロサケ稚仔魚を用いた。抗シロサケGH血清 (anti-GH) はリコンビナントシロサケ GH を家兎に免疫し作製した。作製した anti-GH を用いサケ GH 化学発光イムノアッセイの確立を two-site 法により行った。はじめに、anti-GH IgG をポリスチレンボールに固相化し、次に非特異的反応を減少させるために 0.1% ウシ血清アルブミンによりブロッキングを行った。ガラス試験管内に既知の濃度の GH または希釈した血清を添加し、anti-GH IgG 固相化ポリスチレンボールとともに室温で 6 時間反応させた。洗浄後、アクリジニウム標識 specific anti-GH F(ab')₂ を添加し、室温で 6 時間反応させ、再び洗浄後、自動化学発光測定装置により測定を行った。その結果、GH 濃度 39-1250 pg/ml 間で良好なスタンダードカーブが得られ、サクラマス血清希釈系列と平行性を示した。さらに固相化された抗体と抗原の反応を 4℃ で 12 時間、次いで標識抗体を 4℃ で 20 時間反応させることにより 3.9-125 ng/ml の範囲で高感度なスタンダードカーブが得られた。この測定系を用いることにより、通常の測定は十分であると考えられたが、孵化直後における仔魚の血中 GH 量を測定するためには、より高感度化する必要性があった。そこで、近年開発された特異的反応を減少させずに、非特異的反応を除去することにより高感度化が可能な Immune complex transfer immunoassay (免疫複合体転移法) を用いて、超高感度サケ GH 測定系の確立を試みた。その結果、測定範囲は 7.8-250 fg/ml であり、シロサケ血清希釈系列もこれと良く一致した。この測定系を用いることにより、血清 1 μl から血中 GH 量が測定可能となった。

次に、化学発光物質を用いた GH レセプターの検出および GH レセプターバインディングアッセイの確立を試みた。カットスロートトラウトの肝臓から常法によりサイトゾール分画を得た。この分画をジゴキシゲニン標識 GH と 15℃ で 20 時間反応させた後、洗浄、遠心を行い、得られた沈殿分画を電気泳動およびウエスタンブロットティングに供した。ブロッキング後、ペルオキシダーゼ標識抗

ジゴキシゲニン血清と反応を行い、化学発光法によりバンドを可視化した。その結果、分子量 112 kDa および 83 kDa の二つのバンドが観察され、先に報告されたギンザケの結果と良く一致していた。さらに、未標識の GH を 100 倍量添加することによりこれらのバンドは消失したため GH レセプターと同定した。またアクリジニウム標識 GH を用いて、GH レセプターバインディングアッセイの確立を試みた。特異的結合はサイトゾール分画の蛋白量に依存して増加し、一方、未標識 GH の添加量に依存して減少した。スキッチャード解析により得られた親和係数は $0.69 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 、最大結合容量は 105 fmol/mg protein でありこれまでの報告とほぼ一致していた。

これらの確立した化学発光サケGH測定系を用いてサケ科魚類の血中 GH 量の測定および解析を行った。サクラマス1年魚では血中GH量は銀毛時の4月に上昇した後、8月に最大値を示し以後、減少した。GH の動態は先に報告されたギンザケと良く似ていたことから、この測定系の有効性が確認された。次に、シロサケ仔魚の血中 GH 量を孵化2週目から測定した。孵化2週目から孵化7週目まで、成熟魚の約 10 倍量である 100 ng/ml という高値を示した。浮上後、血中 GH 量は減少し、放流時には成熟魚の血中 GH 量とほぼ一致した。シロサケは孵化7週目より、十分な塩分耐性を有することから、この高値の GH は海水適応能の獲得に関与していることが示唆された。

最後に、カットスロートトラウト1年魚群および2年魚群の血中 GH 量の測定を行った。2年魚群の雌においては GH レセプターバインディングアッセイで肝臓における GH レセプターの最大結合容量も併せて解析した。1年魚群において血中GH量は11月にピークを示したのに続き、エストラジオール-17 β は12月に最大値を示した。2年魚群の血中 GH 量は雌雄ともに11月と12月に高値を示し、雌魚において血中エストラジオール-17 β 量の動態は血中 GH 量の動態と良く一致していた。また、血中ピテロジェニン量は、排卵4ヶ月前の11月から1月まで高値を維持していた。これらのことから、カットスロートトラウトにおいて GH は生体内においても卵巣でのエストラジオール-17 β 合成を促進させ、さらにエ

ストラジオール-17β とともに存在することにより肝臓におけるピテロゲニン合成の効率化に貢献していることが示唆された。一方、肝臓の GH レセプターの最大結合容量は、GH が高値を示した冬期に低値を示した。このことは、成熟期の体成長の停滞と関連していると考えられた。

以上、本研究は高感度なサケ GH 化学発光イムノアッセイを初めて確立し、微量な GH を測定することを可能にした。さらに成熟期のカットスロートトラウトの血中 GH 量の動態を解析し、ピテロジェニン合成への関与を示唆した。しかしながら、卵巣等の生殖器官における GH レセプターの最大結合容量と血中 GH 量の関連は今後の課題とされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 崎 健 二
副 査 教 授 原 彰 彦
副 査 教 授 小 城 春 雄
副 査 助 教 授 桜 井 泰 憲

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and Biochemical Studies on Growth Hormone in Salmonids

(サケ科魚類の成長ホルモンに関する免疫生化学的研究)

魚類の増養殖において効率的な成長と健全な卵を得ることは最優先課題である。一般に成長には脳下垂体より分泌される成長ホルモン (GH) が重要な役割を果たしていることが知られている。近年、GH が成長だけでなく成熟にも関与していることが生体外培養実験で示されてきている。これらのことから、魚類の成長と成熟機構を解析する上で GH の動態を解析することは重要であるが、生体内での血中 GH 量の変動を観察した例は非常に少ない。また、魚類GH はほ乳類と同様にその受容体である GH レセプターを介して作用すると考えられているが、GH レセプターの最大結合容量と血中 GH 量とともに観察した研究はほとんどない。本研究では、サケ科魚類において GH の成熟への作用を解明することを目的に、化学発光法による高感度な GH 測定系と GH レセプターバインディングアッセイの確立を行った。さらに様々なステージにおけるサケ科魚類の血中 GH 量の動態および成熟時期の肝臓における GH レセプターの最大結合容量の変化を調べた。

供試魚には北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設で飼育中のカットスロートトラウト、および、さけ・ます資源管理センターで飼育中のシロサケ稚仔魚を用いた。抗シロサケ GH 血清 (anti-GH) はリコンビナントシロサケ GH を家兎に免疫し作製した。作製した anti-GH を用いサケ GH 化学発光イムノアッセイの確立を

two-site 法により行った。その結果、GH 濃度 39~1250 pg/ml 間で良好なスタンダードカーブが得られ、サクラマス血清希釈系列と平行性を示した。この測定系を用いることにより、通常の測定は十分であると考えられたが、孵化直後における仔魚の血中 GH 量を測定するためには、より高感度化する必要性があった。そこで、近年開発された特異的反応を減少させずに、非特異的反応を除去することにより高感度化が可能な免疫複合体転移法を用いて、超高感度サケ GH 測定系の確立を試みた。その結果、測定範囲は 7.8~250 fg/ml であり、シロサケ血清希釈系列もこれと良く一致した。この測定系を用いることにより、血清 1 μ l から血中 GH 量が測定可能となった。

次に、化学発光法を用いた GH レセプターの検出および GH レセプターバインディングアッセイの確立を試みた。カットスロートトラウトの肝臓から常法によりサイトゾール分画を得た。この分画をジゴキシゲニン標識 GH と反応させた後、検出を行ったところ2つのバンドが可視化された。これらのバンドは未標識の GH を 100 倍量添加することにより消失したため GH レセプターと同定した。またアクリジニウム標識 GH を用いて、GH レセプターバインディングアッセイの確立を試み、スクッチャード解析により得られた親和係数は $0.69 \times 10^9 M^{-1}$ 、最大結合容量は 105 fmol/mg proteinでありこれまでの報告とほぼ一致していた。

これらの確立した化学発光サケ GH 測定系を用いてサケ科魚類の血中 GH 量の測定および解析を行った。シロサケ仔魚の血中 GH 量を孵化2週目から測定した。孵化2週目から孵化7週目まで、成熟魚の約 10 倍量である 100 ng/mlの高値を示した。浮上後、血中GH量は減少し、放流時には成熟魚の血中 GH 量とほぼ一致した。シロサケは孵化7週目より、十分な塩分耐性を有することから、この高値の GH は海水適応能の獲得に関与していることが示唆された。次に、カットスロートトラウト1年魚群および2年魚群の血中 GH 量の測定を行った。2年魚群の雌においては GH レセプターバインディングアッセイで肝臓における GH レセプターの最大結合容量も併せて解析した。1年魚群において血中GH量は11月にピークを示したのに続き、エストラジオール-17 β は12月に最大値を示した。2年魚群の血中 GH 量は雌雄ともに11月と12月に高値を示し、雌魚において血中エストラジオール-17 β 量の動態は

血中 GH 量の動態と良く一致していた。また、血中ビテロジェニン量は、排卵 4 ヶ月前の 11 月から 1 月まで高値を維持していた。これらのことから、カットスロートトラウトにおいて GH は生体内においても卵巣でのエストラジオール-17 β 合成を促進させ、さらにエストラジオール-17 β とともに存在することにより肝臓におけるビテロジェニン合成の効率化に貢献していることが示唆された。一方、肝臓の GH レセプターの最大結合容量は、GH が高値を示した冬期に低値を示した。このことは、成熟期の体成長の停滞と関連していると考えられた。

以上の結果は、硬骨魚類において GH の作用を解明するための有用な方法および貴重な知見を提供したものとして高く評価され、審査員一同は本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の業績であると認定した。