

博士（水産科学） 尾崎雄一

学位論文題名

Molecular endocrinological studies
on the growth hormone receptor of Japanese eel,
Anguilla japonica, during early development

(ニホンウナギの初期発生過程における
成長ホルモン受容体に関する分子内分泌学的研究)

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は水産養殖上非常に重要な魚種である。現在、養鰻業は天然のシラスウナギ資源に依存しているが、その数は年々減少している。そのため、早急な人工種苗生産技術の確立が要求されている。本種の産卵場はマリアナ諸島西方海域とされており、プレレプトケファルスと呼ばれる孵化仔魚はレプトケファルスへと成長した後、さらにシラスウナギへと変態し河川に遡上すると考えられている。しかし、天然海域において卵およびプレレプトケファルスはこれまで発見されておらず、本種の初期発生過程は殆ど解明されていない。親魚に人為催熟を施すことにより孵化仔魚を得ることは可能であるが、その孵化仔魚の生存日数は短く、未だシラスウナギの形態を呈するには至っていない。人工種苗生産技術の確立には、初期発生過程に関する様々な知見の集積が必要と考えられる。

成長ホルモン (GH) は脳下垂体から分泌されるペプチドホルモンである。数種の硬骨魚類では、胚や孵化直後の仔魚で既に GH 産生が認められ、孵化後の成長に GH が重要な役割を果たしていると考えられている。GH の作用はその標的細胞の細胞膜に存在する GH 受容体 (GHR) に、GH が結合することから開始される。しかし、硬骨魚類の GHR に関する知見は殆ど得られていない。そこで本研究では、特に初期発生過程におけるニホンウナギ

の GH および GHR に関する基礎的知見の集積を目的として、以下の実験を行った。

まず、ニホンウナギ GHR cDNA の単離を試みた。既知の他の脊椎動物の GHR のアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを設計し、稚魚の肝臓から調整した cDNA を鑄型として RT-PCR を行った。その結果、他の脊椎動物の GHR cDNA と比較的高い相同意を示す 2 種の cDNA 断片を得た。次に、5'-および 3'-RACE を行い 2 種の cDNA の全翻訳領域の塩基配列を決定し、それぞれがコードするタンパクを eGHR1 および eGHR2 とした。eGHR1 および eGHR2 は 629 および 527 個のアミノ酸からなり、アミノ酸配列の相同意は 58 % であった。eGHR1 および eGHR2 cDNA から推定されるアミノ酸配列には GHR に特徴的な細胞外領域の 6 個のシステイン残基および YGEFS モチーフ、1 箇所の膜貫通領域、細胞内領域の box 1 および box 2 ドメインが認められた。また、eGHR1 および eGHR2 cDNA から推定されるアミノ酸配列はキンギョ GHR と 56 および 46 %、ターボット GHR とは 51 および 42 % の相同意を示した。これらの結果から、本研究で得られた 2 種の cDNA はニホンウナギの GHR cDNA であること、並びに本種には GHR が 2 種類存在することが示唆された。しかし、これまでに他種において異なる GHR 遺伝子をコードする 2 種の cDNA が単離された例はなく、得られた eGHR1 および eGHR2 cDNA からリコンビナントタンパクを作製し、それらの機能解析を行うことが必要と考えられた。

そこで、バインディングアッセイにより GH との結合能を確かめるため、eGHR1 および eGHR2 の細胞外領域からなるリコンビナントタンパク (reGHR1 および reGHR2) の作製を試みた。併せて、リガンドとしてリコンビナントニホンウナギ GH (reGH) を作製した。それらリコンビナントタンパクは大腸菌発現系により作製し、リフォールディング処理を施した。また、GHR と結合した GH のみを分離するために、reGHR1 および reGHR2 に対する抗体を作製した。さらに、reGH に対する抗体も作製した。

次に、得られた reGHR1 および reGHR2 を用い、バインディングアッセイを行った。リガンドにはディゴキシゲニンで標識した reGH (Dig-reGH) および精製シロサケ GH (Dig-sGH) を用いた。その結果、Dig-sGH の reGHR1 および reGHR2 への結合量はその添加濃度依存的に増加した。また、Dig-reGH の reGHR1 との結合量は Dig-reGH を単独添加したものに比べ、その 10 および 100 倍量の未標識の reGH またはシロサケ GH を複合添加したものでは著しく低値を示した。以上の結果、eGHR1 および eGHR2 が GH との結合能を有することが示され、eGHR1 および eGHR2 がニホンウナギ GHR であることが明らかとなった。

さらに、eGHR1 および eGHR2 の性状解析を行った。未成熟雌の肝臓および卵巣、さらに稚魚肝臓から調整した mRNA を用い、ノーザンプロット解析を行った。その結果、未成熟雌の肝臓および卵巣では eGHR1 遺伝子については 6 kb 、eGHR2 遺伝子については 6 および 4 kb 、加えて、稚魚肝臓では 0.8 kb の eGHR2 遺伝子の転写産物が認められた。次に、肝臓からミクロゾーム画分を調整し、ウエスタンプロット解析を行った結果、抗 reGHR1 抗体と免疫反応する 58 、 35 および 32 kDa 、抗 reGHR2 抗体と免疫反応する 58 、 53 、 32 および 29 kDa のバンドが観察された。さらに、脳、脳下垂体、鰓、心臓、筋肉、肝臓、脾臓、腸、頭腎、腎臓、卵巣および精巣から調整した cDNA を用い、RT-PCR により eGHR1 および eGHR2 の発現部位を調べた。その結果、eGHR1 および eGHR2 ともに腎臓以外の全ての組織で発現が認められた。以上の結果、GH の作用は選択的スプライシングおよび翻訳後の修飾により產生される eGHR1 および eGHR2 の数種のアイソフォームを介することにより、複雑に制御されていることが示唆された。また、各組織で eGHR1 および eGHR2 の発現が認められたことから、GH が様々な生理作用をもつことが推察された。

最後に、未受精卵、受精卵、孵化直後および孵化後 3 、 6 、 10 日の仔魚を材料とし、初期発生過程における GH 、 eGHR1 および eGHR2 の発現

変化を調べた。RT-PCR により転写開始時期を調べた結果、GH の転写は孵化後 6 日のプレレプトケファルスから認められ、孵化後 10 日ではその量は増加していた。eGHR1 および eGHR2 の転写は孵化直後の仔魚から認められた。さらに、親魚由来と考えられる eGHR1 mRNA が未受精卵および受精卵中に検出された。抗 reGH 抗体を用いた免疫組織化学的観察の結果、孵化後 6 および 10 日の仔魚の脳下垂体で GH 産生細胞が認められた。以上の結果、GH 産生が孵化後 6 日で既に開始されていることが明らかとなり、GH がプレレプトケファルスからレプトケファルスへの成長に関与することが示唆された。また、eGHR1 および eGHR2 が孵化前から発現していることが示され、eGHR1 および eGHR2 との結合を介した GH の作用は GH 産生と同時に開始されることが明らかとなった。

以上の結果、ニホンウナギにおいて脊椎動物で初めて機能的な GHR をコードする 2 種の cDNA を単離し、その 2 種の GHR が孵化前から発現していることが明らかとなり、GH が孵化後の成長に関与することが示された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 山内 眞平
副査 教授 原 彰彦
副査 教授 都木 靖彰
副査 助教授 足立 伸次

学位論文題名

Molecular endocrinological studies
on the growth hormone receptor of Japanese eel,
Anguilla japonica, during early development

(ニホンウナギの初期発生過程における
成長ホルモン受容体に関する分子内分泌学的研究)

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は水産養殖上非常に重要な魚種であり、早急な人工種苗生産技術の確立が要求されている。親魚に人为催熟を施すことにより孵化仔魚を得ることは可能であるが、その孵化仔魚の生存日数は短く、未だシラスウナギの形態を呈するには至っていない。人工種苗生産技術の確立には、初期発生過程、特に孵化後の成長に関する様々な知見の集積が必要と考えられる。

数種の硬骨魚類では、胚や孵化直後の仔魚で既に成長ホルモン (GH) 産生が認められ、孵化後の成長に GH が重要な役割を果たしていると考えられている。GH の作用はその標的細胞の細胞膜に存在する GH 受容体 (GHR) に、GH が結合することから開始される。しかし、硬骨魚類の GHR に関する知見は殆ど得られていない。本研究では、特に初期発生過程に着目し、ニホンウナギの GH および GHR に関する基礎的知見の集積を目的として、以下の実験を行った。

まず、5'-および3'-RACEを行い GHR cDNA と思われる 2 種の cDNA を単離し、それぞれがコードするタンパクを eGHR1 および eGHR2 とした。eGHR1 および eGHR2 cDNA から推定されるアミノ酸配列には GHR に特徴的な配列が認められ、キンギョ GHR と 56 および 46 %、ターポット GHR とは 51 および 42 % の相同性を示した。しかし、これまでに他種において異なる GHR 遺伝子をコードする 2 種の cDNA が単離された例はなく、得られた eGHR1 および eGHR2 cDNA からリコンビ

ナントタンパクを作製し、それらの機能解析を行うことが必要と考えられた。

そこで次に、バインディングアッセイにより GH との結合能を確かめるため、eGHR1 および eGHR2 の細胞外領域からなるリコンビナントタンパク（reGHR1 および reGHR2）の作製を試みた。それらリコンビナントタンパクは大腸菌発現系により作製し、リフォールディング処理を施した。また、GHR と結合した GH のみを分離するために、reGHR1 および reGHR2 に対する特異抗体を作製した。得られた reGHR1 および reGHR2 を用い、バインディングアッセイを行った結果、GH との結合が確認され、本研究で得られた 2 種の cDNA がニホンウナギの機能的な GHR をコードしていることが明らかとなった。

さらに、eGHR1 および eGHR2 の性状解析を行った。ノーザンプロット解析の結果、未成熟雌の肝臓および卵巣では eGHR1 については 6 kb、eGHR2 については 6 および 4 kb、加えて、稚魚肝臓では 0.8 kb の eGHR2 の転写産物が認められた。次に、肝臓からミクロゾーム画分を調整しウエスタンプロット解析に供した結果、抗 reGHR1 抗体と免疫反応する 58、35 および 32 kDa、抗 reGHR2 抗体と免疫反応する 58、53、32 および 29 kDa のバンドが観察された。以上の結果、GH の作用は選択的スプライシングおよび翻訳後の修飾により產生される eGHR1 および eGHR2 の数種のアイソフォームを介することにより、複雑に制御されていることが示唆された。さらに、RT-PCR により発現部位を調べた結果、eGHR1 および eGHR2 とともに腎臓以外の全ての組織で発現が認められ、GH が様々な生理作用をもつことが推察された。

最後に、RT-PCR および免疫組織化学的観察により初期発生過程における GH および GHR の発現変化を調べた。その結果、GH 產生が孵化後 6 日以前、eGHR1 および eGHR2 の転写が孵化前から開始されていることが明らかとなり、GH がプレレプトケファルスからレプトケファルスへの成長に関与することが示唆された。また、eGHR1 および eGHR2 との結合を介した GH の作用は GH 产生と同時に開始されることが明らかとなった。さらに、親魚由来と考えられる eGHR1 mRNA が未受精卵および受精卵中に検出された。

上記のように、本研究では、ニホンウナギにおいて脊椎動物で初めて異なる GHR 遺伝子をコードする 2 種の cDNA を単離し、それらの性状解析を行い GHR に関する詳細な知見が数多く得られた。さらに、孵化後の成長に関する GH の重要性を提唱してきた。これらの結果は、今後、ニホンウナギの人工種苗生産技術を確立するために極めて重要な知見を提供したものとして高く評価され、本論文が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。